



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

ELIZABETH MARIA BISPO BELTRÃO

**Análise do perfil genético de virulência, resistência e relação clonal de isolados clínicos
de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} provenientes
de um hospital de Recife-PE**

Recife

2021

ELIZABETH MARIA BISPO BELTRÃO

Análise do perfil genético de virulência, resistência e relação clonal de isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* provenientes de um hospital de Recife-PE

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

Área de concentração: Medicina Tropical.

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

RECIFE

2021

Catálogo na Fonte
Bibliotecário: Rodrigo Leopoldino Cavalcanti I, CRB4-1855

B453a Beltrão, Elizabeth Maria Bispo.
Análise do perfil genético de virulência, resistência e relação clonal de isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene blaKPC e blaNDM provenientes de um hospital de Recife-PE / Elizabeth Maria Bispo Beltrão. – 2021.
181 f. : il. ; tab. ; 30 cm.

Orientadora : Ana Catarina de Souza Lopes.
Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Proteus mirabilis*. 2. Fatores de Virulência. 3. beta-Lactamases. 4. Fatores R. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (Orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2021-241)

ELIZABETH MARIA BISPO BELTRÃO

ANÁLISE DO PERFIL GENÉTICO DE VIRULÊNCIA, RESISTÊNCIA E RELAÇÃO CLONAL DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Proteus mirabilis* CARREADORES E NÃO CARREADORES DO GENE *BLA_{KPC}* E *BLA_{NDM}* PROVENIENTES DE UM HOSPITAL DE RECIFE-PE

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

Área de concentração: Medicina Tropical.

Aprovada em: 12/11/2021.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Presidente da Banca/Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Celia Maria Machado Barbosa de Castro (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Prof^a. Dr^a. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

Prof^a. Dr^a. Sibele Ribeiro de Oliveira (Examinadora Externa)
Associação Caruaruense de Ensino Superior (ASCES-UNITA)

“Por amor de Cristo.

Porque quando sou fraco, então,

é que sou forte”.

(BÍBLIA, 2ª Coríntios, 12,10)

AGRADECIMENTOS

Em meio a tantos acontecimentos nesses 4 anos o que me sustentou em todos os momentos de dificuldade foi Deus. Renovou minha fé todos os dias e sempre esteve comigo. Glorificado seja o nome Dele.

Aos meus pais, Pedro *in memoriam* e Maria de Lourdes, por sempre me apoiarem e sempre me ensinaram que conhecimento muda pessoas e pessoas mudam o mundo. Pelo apoio incondicional todos os dias.

A minha irmãzinha Elisa pelo apoio, força e torcida.

Ao futuro cunhadinho Daniel pelas idas na rodoviária, os filmes e séries nos momentos de descontração e apoio.

A Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes, orientadora deste trabalho, por toda a paciência, confiança e dedicação. Pelos momentos de descontração nos congressos e no laboratório, sempre presente para todas as necessidades na pesquisa e como pessoa.

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

A Coordenação da Pós-graduação nas pessoas das Professoras Dr^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo e Dr^a Vláudia Maria Assis Costa, pelos esforços e dedicação para o melhoramento do curso.

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

Aos amigos do laboratório, Área de Medicina Tropical, CCM-UFPE, Mitaliene e Graça.

Às amigas do grupo de pesquisa Elza e Alexsandra, pelos momentos de descontração, companheirismo e apoio.

À amiga Érica pelos momentos de descontração nas nossas maratonas de PCR, nos eventos, nas análises da ERIC-PCR, pela ajuda na coleta de dados dos pacientes e pelo companheirismo no laboratório.

À biomédica Josineide responsável pelo laboratório de Microbiologia do hospital de estudo pelo apoio na disponibilidade dos isolados, laudos e dados dos pacientes, além da parceria com os dados da pesquisa e a CCIH do hospital.

Aos amigos da pós-graduação Cynthia e Fernanda, pela amizade e apoio nas quantificações de DNA.

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

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

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

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

A doutoranda Crhisllane Vasconcelos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio na montagem do sequenciamento de DNA plasmidial.

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

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

Ao programa Mendeley pelo apoio na formatação do presente trabalho.

Aos componentes da banca avaliadora.

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

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

MUITÍSSIMO OBRIGADA! A todos.

RESUMO

Este estudo teve por objetivo caracterizar os genes de virulência, resistência e relação clonal em isolados clínicos de *P. mirabilis* carreadores e não carreadores do gene *blaKPC* ou *blaNDM* provenientes de um hospital público de Recife em 2017 a 2019. Foram coletados 39 isolados clínicos de *P. mirabilis*, sendo 20 isolados carreadores e 19 não carreadores do gene *blaKPC* ou *blaNDM*, provenientes de diferentes sítios de infecção nos pacientes. Os isolados foram identificados por sistema automatizado pelo laboratório de Microbiologia do Hospital do esudo. O DNA total dos isolados foi extraído e submetido a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a investigação de genes de resistência (*blaKPC*, *blaNDM*, *blaOXA-10*, *blaOXA-48*, *blaOXA-23*, *blaOXA-58*, *blaGES*, *blaIMP*, *blaVIM* e *qnrD*) e virulência (*mrpG*, *pstS*, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA*, *pmfA*), como também submetido à técnica de tipagem Consenso Intergênico Repetitivo Enterobacteriano-Reação em Cadeia da Polimerase (ERIC-PCR). Os amplicons foram sequenciados pela técnica de Sanger. Foram selecionados dois isolados de *P. mirabilis* multidroga resistente e carreadores dos genes *blaKPC* e *blaNDM* para a extração de DNA plasmidial e posterior sequenciamento por Illumina MiSeq. As sequencias dos plasmídeos foram montadas e analisadas pelos programas Trimmomatic, Velvet, Cap3 e Artemis Sanger. Os resultados mostraram que os isolados apresentaram disseminação multiclonal e alta variabilidade genética, de acordo com a tipagem pela ERIC-PCR. O gene de resistência mais encontrado foi *blaOXA-10-like* (n = 18), seguido por *blaKPC* (n = 10) e *blaNDM* (n = 8). Este é o primeiro relato de *blaOXA-10* em *P. mirabilis* no Brasil, bem como da ocorrência de *P. mirabilis* co-portador de *blaOXA-10/blaKPC* e *blaOXA-10/blaNDM*. Como também o primeiro relato de *P. mirabilis* albergando o gene *blaGES* em 3 isolados. Revelando o vasto e variado arsenal genético de resistência dessas cepas bacterianas. Os genes de virulência para adesinas *pmfA* e *mrpG*, e o gene para transporte de fosfato *pstS* foram encontrados em todos os isolados investigados, isso sugere que esses genes são intrínsecos nessa espécie. Por sua vez, os isolados portadores de *blaNDM* ou *blaKPC* apresentaram genes de virulência importantes que codificam adesinas fimbriais, como *ucaA* (n = 8/ 44,4%) e sideróforos, como *pbtA* (n = 10/55,5%) e *nrpG* (n = 2/11,1%). Porém, em geral, os isolados não portadores de *blaKPC* e *blaNDM* apresentaram maior número de genes de virulência, além disso este grupo apresentou maior frequência em pacientes com mais de 60 anos e os pacientes fizeram uso de mais antimicrobianos quando comparados ao grupo portador. Com relação ao conteúdo plasmidial, o isolado P20-A2 albergava os genes de resistência *aph(3')-VI*, *blaKPC* e *qnrD1*, além disso o isolado albergava os plasmídeos IncQ e Col3M, juntamente com o transposon NTEKPC-IId.

Os isolados clínicos de *P. mirabilis*, além de multirresistentes, apresentam fatores de virulência eficientes que podem estabelecer infecção fora do trato gastrointestinal. Visto que *P. mirabilis* é um patógeno emergente e frequentemente esquecido, a presença de importantes fatores de resistência e virulência nesse patógeno é alarmante e demonstra a necessidade de estudos epidemiológicos adicionais e monitoramento frequente desse organismo.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis*; fatores de virulência; beta-lactamases; fatores de resistência.

ABSTRACT

The objective of this study is to characterize the virulence, resistance and clonal relationship genes in clinical isolates of *P. mirabilis* carriers and non-carriers of the *bla*KPC or *bla*NDM from a public hospital of Recife in 2017 to 2019. Were collected 39 clinical isolates of *P. mirabilis*, being 20 isolated carriers and 19 not carriers of the *bla*KPC or *bla*NDM gene, coming from different sites of infection in patients. The isolates were identified by an automated system by the Hospital Microbiology laboratory. Total DNA was extracted and submitted to Reaction in Chain of Polymerase (PCR) for investigation of resistance genes (*bla*KPC, *bla*NDM, *bla*OXA-10, *bla*OXA-48, *bla*OXA-23, *bla*OXA-58, *bla*GES, *bla*IMP, *bla*VIM and *qnrD*) and virulence (*mrpG*, *pstS*, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA* and *pmfA*), as well as subject to the typing technique Repetitive Intergenic Consensus Enterobacteria-Reaction in Chain of Polymerase (ERIC-PCR). Sequenced were amplicons by the Sanger technique. We selected two isolates of multidrug resistant *P. mirabilis* carrying two *bla*KPC and *bla*NDM genes for extraction of plasmid DNA and subsequent sequencing by Illumina MiSeq. Thus, two were plasmids assembled and analyzed from the Trimmomatic, Velvet, Cap3 and Artemis Sanger programs. The results will show that isolates show multiclonal dissemination and high genetic variability, according to the type of ERIC-PCR. The most resistance gene found for *bla*OXA-10-like (n = 18), followed by *bla*KPC (n = 10) and *bla*NDM (n = 8). This is the first report of *bla*OXA-10 in *P. mirabilis* in Brazil, as the occurrence of *P. mirabilis* co-carrier of *bla*OXA-10/*bla*KPC and *bla*OXA-10/*bla*NDM. As also the first report of *P. mirabilis* harboring the *bla*GES gene in 3 isolates. Revealing the vast and varied genetic arsenal of resistance to these bacterial strains. The virulence genes for adhesins *pmfA* and *mrpG*, and the gene for phosphate transport *pstS* were found in all the isolates investigated, does not suggest that these genes are intrinsic to each species. In turn, isolates carriers of *bla*NDM or *bla*KPC show important virulence genes that encode adhesins fimbriae, such as *ucaA* (n = 8 / 44.4%) and siderophores, such as *pbtA* (n = 10 / 55.5%) and *nrpG*. (n = 2/11.1%). Therefore, in general, those isolated who do not carry *bla*KPC and *bla*NDM show a higher number of virulence genes, also this group shows a higher frequency in patients over 60 years of age and in patients who use more antimicrobials when compared to the carrier group. Relation to the plasmid content, or isolated P20-A2 harbors the resistance genes *aph(3')-VI*, *bla*KPC and *qnrD1*, also isolated or isolated it harbors the IncQ and Col3M plasmids, together with the transposon NTEKPC-IId. The clinical isolates of *P. mirabilis*, also multi-resistant, show efficient virulence factors that can establish infection for gastrointestinal

treatment. Given that *P. mirabilis* is an emerging and frequently skeletal pathogen, in the presence of important factors of resistance and virulence, it is an alarming pathogen and demonstrates the need for additional epidemiological studies and frequent monitoring of the organism.

Key-words: *Proteus mirabilis*; fatores de virulência; beta-lactamases; fatores de resistência.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Infecções de trato urinário associados a cateter (CAUTI) de prevalência uropatogênica.....	22
Figura 2 - Fatores de virulência de <i>Proteus</i> . As fímbrias PMP, PMF, MR-P e urease.	24
Figura 3 - Óperon fimbrial <i>mrp</i> , <i>mrpABCDEFGHJ</i>	25
Figura 4 - O papel de vários fatores de virulência para formação de biofilme cristalino por <i>Proteus mirabilis</i> na superfície de cateter.....	28
Figura 5 - Distribuição de <i>Enterobacteriaceae</i> KPC positiva e <i>P. aeruginosa</i> coletada de 2012 a 2014.....	31
Figura 6 - Presença de <i>aac(6')-Ib-D179Y</i> em SMKP03, análise genômica de pSMKP03 e comparação com outros plasmídeos por BLAST procurar (A) Ocorrência de <i>aac(6')-Ib-D179Y</i> em SMKP03. <i>aac(6')-Ib-D179Y</i> abrigou uma substituição de aminoácido, R102W, em relação a <i>aac(6')-Ib-cr</i> em SMKP01; assim, AAC (69) - Ib-D179Y é geneticamente intermediário entre <i>aac(6')-Ib</i> e <i>aac(6')-Ib-cr</i> devido à presença de substituições dos aminoácidos quiméricos 102W e 179Y.....	35

Artigo 1:

Gráfico 1 - Porcentual da quantidade de antimicrobianos utilizados pelos pacientes com relação ao grupo dos isolados carreadores dos genes <i>bla_{NDM}</i> e <i>bla_{KPC}</i> (CNK) e o grupo de isolados não carreadores de <i>bla_{NDM}</i> and <i>bla_{KPC}</i> (NCNK).....	59
Gráfico 2 - Distribuição de <i>Proteus mirabilis</i> de acordo com o perfil de virulência para o grupo de isolados carreadores dos genes <i>bla_{NDM}</i> e <i>bla_{KPC}</i> (CNK) e o grupo de isolados não-carreadores dos genes de <i>bla_{NDM}</i> e <i>bla_{KPC}</i> (NCNK).....	64
Figura 1 - Dendrograma do perfil genético dos isolados de <i>Proteus mirabilis</i> . Análise de cluster por ERIC-PCR usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de cluster Weighted Neighbour-Joining. A escala indica a porcentagem da distância genética.....	66

Artigo 3:

Figura 1 - Sequência completa do plasmídeo IncQ1 e elemento genético móvel não-Tn4401 (NTE_{KPC-IIId}) que alberga o gene *bla*_{KPC-2} no isolado P20-A2 do estudo e comparação com sequências de referência provenientes do GenBank (NTE_{KPC-IIId}:MG786907 (Beltrão et al., 2020). As sequências de codificação de proteínas foram representadas como setas e marcadas com o nome do gene. Tracejado em cinza representa regiões homólogas compartilhadas (> 95%). A sequência IR de NTE_{KPC-IIId} é representada por um círculo.....87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Principais testes bioquímicos para identificação de <i>Proteus</i> spp.....	20
---	----

Tabela 2 - Sequência dos Primers que foram utilizados no estudo.....	43
---	----

Artigo 1:

Tabela 1 - Sequência dos primers que foram usados no estudo	50
--	----

Tabela 2 - Antibiótico terapia, idade, gênero, tempo de internação e desfecho clínico de pacientes com isolados de <i>P. mirabilis</i> carreadores dos genes <i>bla_{KPC}</i> ou <i>bla_{NDM}</i> de Recife entre 2017 e 2018.....	53
---	----

Tabela 3 - Antibiótico terapia, idade, gênero, tempo de internação e desfecho clínico de pacientes com isolados de <i>P. mirabilis</i> não carreadores dos genes <i>bla_{KPC}</i> ou <i>bla_{NDM}</i> de Recife entre 2017 e 2018.....	55
---	----

Tabela 4 - Fonte de isolamento, presença de genes de virulência e perfil ERIC-PCR de isolados de <i>P. mirabilis</i> carreadores dos genes <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i> de Recife em 2017 e 2018.....	60
---	----

Tabela 5 - Fonte de isolamento, presença de genes de virulência e perfil ERIC-PCR de isolados de <i>P. mirabilis</i> não carreadores dos genes <i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i> de Recife em 2017 e 2018.....	62
---	----

Artigo 2

Tabela 1 - Perfil de isolados de <i>Proteus mirabilis</i> analisados no estudo.....	77
--	----

Artigo 3

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores para PCR que foram utilizados no estudo.....	84
--	----

Tabela 2 - Perfil fenotípica de resistência e presença de genes de resistência investigados por PCR para os dois isolados de <i>Proteus mirabilis</i> (P20-A2 e P21-A2).....	86
Tabela 3 - Caracterização do DNA plasmidial do isolado de <i>Proteus mirabilis</i> P20-A2	87

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	<i>Proteus spp.</i>	21
2.1.1	<i>Proteus mirabilis</i>	22
2.2	Fatores de Virulência.....	24
2.2.1	Adesinas fimbriais	24
2.2.2	Transporte de Fosfato.....	27
2.2.3	Sideróforos	27
2.2.4	Formação de biofilme	28
2.3	Beta-lactâmicos: carbapenêmicos	30
2.3.1	Carbapenemases	31
2.3.1.1	<i>Serina-Carbapenemase: KPC, GES e OXA</i>	31
2.3.1.2	<i>Metallo-Carbapenemases: NDM</i>	33
2.4	Enzimas de Classe D do tipo OXA.....	33
2.5	Resistência à Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR)	34
2.6	Plasmídeos e grupos de Incompatibilidade Plasmidial (Inc)	36
2.7	Tipagem Molecular	37
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo Geral.....	39
3.2	Objetivos específicos.....	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	40
4.1	Hospital do estudo	40
4.2	Origem e coleta das amostras	40
4.3	Critérios de inclusão e exclusão	40
4.4	Isolados Bacterianos.....	40
4.5	Deteção da susceptibilidade a antimicrobianos.....	41
4.6	Extração e quantificação de DNA total.....	41
4.7	Condições da PCR para identificação dos genes <i>mrpG</i>, <i>pstS</i>, <i>nrpG</i>, <i>pbtA</i>, <i>ucaA</i> e <i>pmfA</i>.....	41

4.8	Condições da PCR para identificação dos genes <i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>bla_{OXA-23}</i> , <i>bla_{OXA-48}</i> , <i>bla_{OXA-58}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{IMP}</i> , <i>bla_{SPM}</i> , <i>bla_{GES}</i> , <i>bla_{NDM}</i> e <i>qnrD</i> , <i>aac(6')-Ib</i> .	44
4.9	Eletoforese em gel de agarose	44
4.10	Sequenciamento dos amplicons para os genes de virulência e resistência detectados.	44
4.11	ERIC-PCR	45
4.12	Extração do DNA plasmidial	45
4.13	Sequenciamento completo do DNA plasmidial	45
5	RESULTADOS	47
	Artigo 1: Fatores de virulência em isolados clínicos de <i>Proteus mirabilis</i> carreando <i>bla_{KPC-2}</i> e <i>bla_{NDM-1}</i> e primeiro relato de <i>bla_{OXA-10}</i> no Brasil	47
	Artigo 2: Primeiro relato de <i>bla_{GES-1}</i> em isolados clínicos de <i>Proteus mirabilis</i>	75
	Artigo 3: <i>Proteus mirabilis</i> portador de <i>NTE_{KPC-II}</i> , <i>bla_{NDM-1}</i> , <i>bla_{OXA-10}</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>qnrD1</i> e plasmídeos <i>incQ</i> e <i>Col3M</i> proveniente de paciente internado em hospital de Recife-PE, brasil.	81
6	CONCLUSÕES	95
	REFERÊNCIAS	97
	APÊNDICE A – ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS	119
	APÊNDICE B – ARTIGO 2 – VERSÃO EM INGLÊS.	152
	APÊNDICE C - VARIANTES DO GENE <i>BLA_{KPC}</i> , ESPÉCIES BACTERIANAS RELATADAS, PAÍS DE ORIGEM DO ISOLADO E REFERÊNCIA.	160
	APÊNDICE D - VARIANTES DE <i>BLA_{GES}</i> , ESPÉCIES BACTERIANAS RELATADAS, INFORMAÇÃO FUNCIONAL, PAÍS DE ORIGEM DA AMOSTRA E REFERÊNCIA.	164
	APÊNDICE E - VARIANTES DO GENE <i>BLA_{NDM}</i> , ESPÉCIES BACTERIANAS RELATADAS, PAÍS DE ORIGEM DA AMOSTRA E REFERÊNCIA.	168
	APÊNDICE F – VARIANTES DO GENE <i>BLA_{OXA}</i> AS VARIANTS DERIVADAS	170
	ANEXO A – CARTA DE ACEITE DO ARTIGO 1	175
	ANEXO B – PRIMEIRA FOLHA DO ARTIGO 2 PUBLICADO.	176

ANEXO C - REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA	177
--	------------

1 INTRODUÇÃO

Proteus mirabilis, patógeno pouco estudado geneticamente, é uma bactéria gram-negativa, pertencente à ordem *Enterobacterales* (ADEOLU *et al.*, 2016), sendo originária do ambiente, do trato intestinal normal do homem e de animais, e comumente associada à Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAs), principalmente causando Infecções do Trato Urinário (ITU) e sepse em humanos (RAMOS *et al.*, 2018). É preocupante a resistência intrínseca dessa espécie bacteriana às polimixinas, nitrofurantoína e tigeciclina (CUNHA; BARON; CUNHA, 2017), além disso a aquisição de genes codificadores de carbapenemases, como *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e Nova Dheli Metallo-Beta-Lactamase (NDM), por este patógeno é cada vez mais frequente, diminuindo o espectro de ação dos antimicrobianos existentes. O gene *bla_{KPC}* em *P. mirabilis* foi relatado em diversos continentes e em alguns países, incluindo Brasil (CABRAL *et al.*, 2015; FIRMO *et al.*, 2020; BELTRÃO; OLIVEIRA; LOPES, 2021), Índia (SHANMUGAM; MEENAKSHISUNDARAM; JAYARAMAN, 2013), Itália e Grécia (PILATO *et al.*, 2016). Contudo, associações entre os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em *P. mirabilis* foram pouco relatadas (FIRMO *et al.*, 2020). Além da resistência aos antimicrobianos, os fatores de virulência bacteriana são importantes para o estabelecimento da infecção. Desta forma *P. mirabilis* é capaz de sobreviver no trato urinário e causar ITUs graves devido à capacidade de produzir diversos fatores de virulência. Apesar disso, são poucos os estudos anteriores que analisaram a ocorrência de diferentes genes de virulência em isolados clínicos de *P. mirabilis* portadores dos genes *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}*, juntamente com outros genes de resistência.

O mecanismo de virulência responsável por aderência possui diversidade nessa espécie, incluindo fímbria *Proteus* do tipo resistente a manose (MR/P), *Proteus mirabilis* fímbria (PMF) e Adesina Celular Uroepitelial (UCA) (GIRLICH *et al.*, 2015; DONG *et al.*, 2019; BITAR *et al.*, 2020). Adicionalmente, *P. mirabilis* também pode codificar dois sistemas de sideróforos, o sideróforo independente de peptídeo sintetase não ribossômico (proteobactina) e o sideróforo peptídeo não ribossômico (Nrp). O Transporte de Potássio (Pst) também pode ser um grande aliado no desenvolvimento da infecção por essa bactéria, assim como os sideróforos desempenham um papel de captura de ferro, o transporte de fosfato atua levando o fosfato livre no meio extracelular para o interior da célula bacteriana. Além disso, a formação de biofilme desempenha um papel importante no estabelecimento de ITUs severas e pielonefrites,

especialmente em pacientes com cateter vesical (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011; SCHAFFER; PEARSON 2015). *Proteus* é conhecido por produzir quantidades elevadas da enzima urease, contribuindo para a formação de pedras urinárias (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011; SCHAFFER; PEARSON 2015). Apesar da gravidade das infecções causadas por esta espécie, ainda são poucos os estudos sobre suas características de virulência. Por outro lado, em espécies mais estudadas como *Klebsiella pneumoniae*, sabe-se que os genes de virulência são mais frequentes em conjunto, em isolados produtores de KPC (MELO *et al.*, 2014; XIAO *et al.*, 2019).

Além da indiscutível importância da resistência a antimicrobianos somado a presença dos fatores de virulência, a disseminação clonal de enterobactérias multidroga resistentes carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} é considerado um problema global emergente (FIRMO *et al.*, 2020; TAGGAR *et al.*, 2020). Adicionalmente, a disseminação mundial de *P. mirabilis* carreando outros genes de resistência têm sido descritos. As enzimas GES são β -lactamases de Classe A e foram descritas inicialmente em *Klebsiella pneumoniae* na França (POIREL *et al.*, 2000). Desde então, *bla*_{GES} já foi relatada em diversos países, incluindo Brasil, em várias espécies bacterianas, exceto em *Proteus* spp. Tem sido descrita com uma maior frequência em bacilos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa* (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2017), e *Acinetobacter baumannii* (MOUBARECK *et al.*, 2009) e também em enterobactéria como *K. pneumoniae* (RÍOS *et al.*, 2018). Assim como GES, as enzimas do tipo OXA podem ser ESBL ou Carbapenemase, a depender da variante enzimática. As enzimas do tipo OXA são amplamente difundidas e foram descritas principalmente em *Enterobacterales* e *Pseudomonas aeruginosa*. Já a resistência a quinolonas mediadas por plasmídeo (PMQR), causada por genes como *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrVC* e *qnrD*, podem conferir susceptibilidade reduzida a levofloxacina ou ciprofloxacina (HU *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2013; GUILLARD *et al.*, 2014). Esses determinantes de resistência são responsáveis pela alta taxa de resistência as quinolonas e fluoroquinolonas em *Proteus*, antimicrobianos estes necessários para o tratamento de infecções do trato urinário.

Considerando que fatores de virulência presentes em *P. mirabilis* são importantes para o estabelecimento da infecção, mas ainda são pouco conhecidos, principalmente em isolados portadores dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, o presente estudo visa investigar os genes responsáveis por importantes mecanismos de virulência *mrpG*, *pmfA*, *ucaA*, *nrpG*, *pstS* e *pbtA* em isolados clínicos de *P. mirabilis* carreadores e não carreadores dos genes *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM}, como também analisar a presença de outros genes de resistência (*bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48},

*bla*_{OXA-58}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES} e *qnrD*, *aac(6')-Ib*) e relação clonal dos isolados investigados provenientes de um hospital público de Recife-PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Proteus* spp.

A primeira descrição do gênero *Proteus* data de 1885, tendo sido realizado pelo microbiologista alemão Gustav Houser, que descobriu sua característica de crescimento intensivo de enxame em superfícies sólidas (HAUSER, 1885; DRZEWIECKA, 2016). Houser nomeou esse novo grupo de bactérias inspirado em Proteu, um personagem mitológico do livro “Odisséia” de Homero, que podia mudar de forma para fugir de seus perseguidores. Ainda na mesma publicação, Houser relata duas espécies para o gênero *Proteus*: *P. mirabilis* e *Proteus vulgaris*. *Proteus mirabilis* que do latim significa “incrível”, por sua habilidade de mudança entre células nadadoras com flagelos curtos e células hiperflageladas. Houser pode ter considerado *P. vulgaris* mais comum, visto que a característica de alastramento é especialmente visível em *P. mirabilis*, por isso deu-lhe o nome em latim que significa “usual” (HAUSER, 1885; DRZEWIECKA, 2016).

Atualmente, o gênero *Proteus* pertence à ordem *Enterobacterales* e à família *Morganellaceae* (O’HARA; BRENNER; MILLER, 2000). *Proteus* spp. contém 6 espécies: *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus cibarius*, *Proteus penneri* e *Proteus hauseri* (O’HARA; BRENNER; MILLER, 2000). *P. mirabilis* é a principal espécie do gênero *Proteus*. *P. vulgaris* e *P. penneri* são comumente descritos como patógenos oportunistas (GIRLICH *et al.*, 2020). Os microrganismos deste gênero possuem, como uma das principais características a motilidade, através de um fenômeno denominado “swarming” (JONES *et al.*, 2005). Além disso, essas bactérias são oxidase negativas e negativas para arginina descarboxilase e Voges-Proskauer (GIRLICH *et al.*, 2020) (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Principais testes bioquímicos para identificação de *Proteus* spp.

Testes bioquímicos	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. penneri</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. myxofaciens</i>	<i>Morganella</i>	<i>Providencia</i>	<i>Salmonella</i>
Lactose	2%	1%	0%	2%	0%	1%	0%	1%
Glicose	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%
Sulfeto de Hidrogênio	98%	30%	50%	95%	0%	20%	0%	95%

Urease	98%	100%	100%	95%	100%	95%	30%	1%
Motilidade	95%	85%	100%	95%	100%	95%	85%	95%
Indol	2%	0%	100%	98%	0%	95%	98%	1%
Lisina	0%	0%	0%	0%	0%	1%	0%	98%
Ornitina	99%	0%	0%	0%	0%	95%	0%	97%
Citrato de Simmons	65%	0%	0%	15%	50%	0%	93%	95%

Fonte: Adaptado de Procop, *et al.*, (2018)

É frequente o surgimento de cepas de *Proteus* com resistência moderada ao imipenem. Existem evidências que esta resistência se deve a alterações na proteína de ligação a penicilina (PBP2) (GIRLICH *et al.*, 2020). Além disso, *Proteus* pode adquirir resistência a diversos grupos antimicrobianos devido a presença de genes de resistência como, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{ACC-1}, *bla*_{FOX}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{VEB-6}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM}, que podem ser transferidos por plasmídeos conjugativos (GIRLICH *et al.*, 2020).

Desde a descoberta do gênero, Houser fez experimentos adicionais em coelhos e alertou em 1885, que *Proteus* poderia causar bacteremias em animais (HOUSER, 1885). Atualmente, *P. mirabilis* é uma das espécies de *Enterobacterales* mais comumente encontrada em amostras clínicas, sendo 90% de infecções do trato urinário. No Brasil, *P. mirabilis* também é uma das 5 principais espécies mais encontrada como causadora de IRAS, principalmente em infecções do trato urinário (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; KARLOWSKY, *et al.*, 2011).

2.1.1 Características gerais da espécie *Proteus mirabilis*

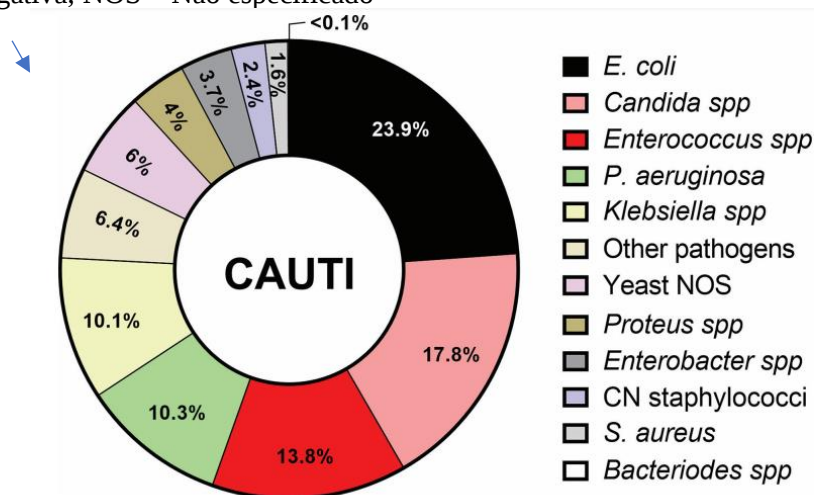
Proteus mirabilis frequentemente encontrados em uma ampla variedade de ambientes, incluindo matéria orgânica, solo, fontes de água e esgoto, mas é predominantemente um comensal de trato gastrointestinais de humanos e animais. Contudo, esta bactéria é capaz de causar uma variedade de infecções humanas, incluindo infecções no trato urinário, em feridas, no globo ocular, ouvido, queimaduras e no trato gastrointestinal (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

A espécie *P. mirabilis* possui características bioquímicas que possibilitam sua identificação. Possui reação de oxidase e lactose negativas; motilidade positiva; Sulfeto de

hidrogênio - H₂S e Indol negativos; urease positiva e Lisina negativos (**Tabela 1**) (RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997).

Proteus mirabilis, pode causar cerca de 1-10% de todas as infecções do trato urinário a depender da localização geográfica (Karlowsky *et al.*, 2011). Karlowsky *et al.*, (2011), analisaram amostras de urina coletadas no Canadá e observaram ocorrência de 4% em infecções causadas por *P. mirabilis* de um total de 3000 casos de infecções do trato urinário (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019; KARLOWSKY *et al.*, 2011)(**Figura 1**). No Japão, Kobayashi *et al.*, (2020), analisaram isolados causadores de infecções no trato urinário com ocorrência de 6,6% para *P. mirabilis*, perdendo para *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Klebsiella pneumoniae*. Este organismo é mais comum em casos de complicadas infecções do trato urinário, contribuindo entre 10-44% no uso prolongado em pacientes em uso de cateteres internados em UTI (KOBAYASHI *et al.*, 2020).

Figura 1 - Infecções de trato urinário associados a cateter (CAUTI) de prevalência uropatogênica. CN – Coagulase negativa; NOS – Não especificado



Fonte: (FLORES-MIRELES; HREHA; HUNSTAD, 2019)

Armbruster, Mobley e Pearson, (2018), em Michigan nos Estados Unidos, relataram que *P. mirabilis* é o principal causador de infecções no trato urinário com ocorrência de 22%, seguido de *Escherichia coli* e *Enterococcus spp.* com 18% e 12%, respectivamente. No Brasil, Padrão *et al.*, (2010) estudo em UTI relataram *P. mirabilis* como sendo o principal agente etiológico encontrado com maior frequência como causador de infecções principalmente no trato urinário. Recentemente, um estudo de monitoramento realizado em oito centros médicos de três cidades no Brasil relataram a ocorrência de infecções causadas por bacilos gram-negativos, o estudo descreveu *P. mirabilis* com 6%, como sendo o terceiro principal patógenos

causador de ITU, perdendo apenas para *E. coli* e *K. pneumoniae* com 35% e 28%, respectivamente. Em estudo recente, foi observado que *P. mirabilis* mesmo em condições celulares desfavorável, ainda permanece viável, indetectável em cultura e permanece com suas características de virulência preservadas (WASFI *et al.*, 2020). Com isso, é provável que a ocorrência de infecções causadas por *Proteus* seja maior do que observado na literatura.

2.2 Fatores de Virulência

2.2.1 Adesinas fimbriais

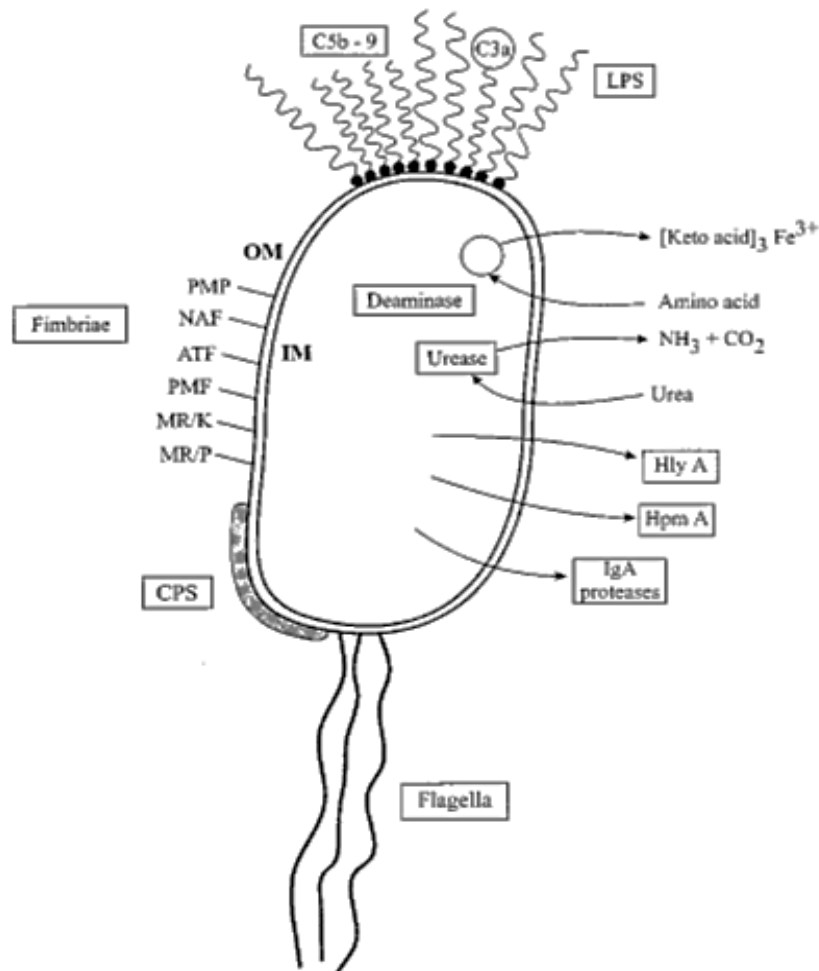
A capacidade das bactérias para aderirem as superfícies do tecido no hospedeiro é um passo importante no desenvolvimento da infecção. A adesão se deve principalmente a existência de adesinas fimbriais. Estas adesinas fimbriais são estruturas proteicas, filamentosas, que possuem a capacidade de aderência célula-célula bacteriana e bactéria-hospedeiro (JANSEN *et al.*, 2004; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Embora as fímbrias sejam fatores de virulência essenciais para infecções do trato urinário, muito permanece desconhecido sobre sua expressão, características físicas e funções biológicas. As primeiras fímbrias de *P. mirabilis* foram identificadas pela sua capacidade para aglutinar glóbulos vermelhos do sangue e se ligarem as células uroepiteliais (RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997; ZHAO *et al.*, 1997; SCHAFFER; PEARSON, 2015;).

Antes de sequenciar o genoma de *P. mirabilis* em 2008, cinco proteínas fimbrias tinham sido descobertas. O sequenciamento revelou 12 fímbrias chaperonas adicionais no genoma de *P. mirabilis*. Em comparação, *Escherichia coli* Uropatogênica (UPEC) codificam tipicamente de nove a 12 óperons fimbriais. Dez dos operons chaperonas codificam o homólogo de MrpJ, uma proteína reguladora no início ou no fim do óperon que permite a adesão e motilidade, e pode permitir a regulação fimbrial de outras fímbrias (ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007; PEARSON *et al.*, 2011; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Cinco tipos fimbriais foram descritos até o momento em isolados de *Proteus mirabilis*: *Proteus* manose-resistente (MR/P), Adesina patogênica uroepitelial (UCA) ou Fímbria não aglutinante (NAF), Fímbria *Proteus mirabilis* (PMF), Fímbria Temperatura Ambiente (ATF) e *Proteus mirabilis* Pili (PMP). As fímbrias MR/P, UCA e PMF foram encontradas desempenhando um papel na patogênese em estudos de virulência (Figura 4) (ZHAO *et al.*, 1997; ZUNINO *et al.*, 2003; JANSEN *et al.*, 2004; ROCHA; PELAYO; ELIAS, 2007; PEARSON *et al.*, 2011; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Figura 2 - Fatores de virulência de *Proteus*. As fímbrias PMP, PMF, MR-P e urease.



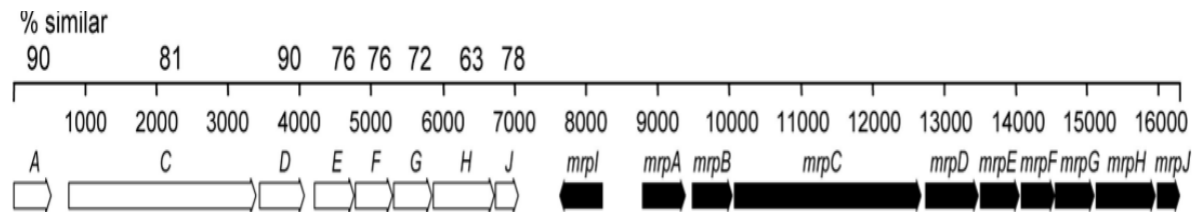
Fonte: (RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997)

O MR/P é a fímbria melhor caracterizada em *P. mirabilis*. O óperon MRP (*mrp*ABCDEFGHJ) codifica a subunidade principal (*mrpA*), quatro pequenas subunidades (*mrp*BEFG), um acompanhante (*mrpD*), uma região promotora (*mrpC*), uma adesina de extremidade (*mrpH*) e um regulador de transcrição (*mrpJ*) (Figura 3) (PEARSON *et al.*, 2011; SCHAFFER; PEARSON, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2021)

O óperon está precedido por um promotor $\sigma 70$ dentro de um elemento invertido cuja orientação é controlada pelo gene *mrpI*, uma recombinase transcrita de forma divergente a partir do óperon estrutural. Quando o promotor $\sigma 70$ está à frente do óperon estrutural, MR/P é “ON”, enquanto que quando o promotor $\sigma 70$ está à frente do *mrpI*, MR/P é “OFF”. A transcrição do *mrpI* não é afetada pela orientação do elemento invertível. O MR/P contribui para a formação

de biofilme, presumivelmente por mediar fixação em superfícies e auto agregação (PEARSON *et al.*, 2011; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

Figura 3 - Óperon fimbrial *mrp*, *mrpABCDEFGHJ*.



Fonte: (PEARSON *et al.*, 2008)

Zhao *et al.*, (1997), analisaram o operon *mrp* e observaram a presença do gene *mrpG* localizado no fim do agrupamento, relatando que este gene pode ser responsável por codificar o receptor responsável pela ligação ao hospedeiro. Rocga, Sérgio *et al.*, (2007), analisaram a expressão da fímbria MR/P através do gene *mrpA*, e descobriram que esta é a fímbria com maior influência na formação de biofilme.

UCA, também conhecido por Fímbria não aglutinante (NAF), foi identificado pela sua capacidade para se ligarem a superfície de células epiteliais. Um estudo constatou que uma cepa de *P. mirabilis* mutante de $\Delta ucaA$, é diminuída na colonização dos rins, mas coloniza a bexiga, bem como *P. mirabilis* tipo selvagem sugerindo que a fímbria UCA pode ser importante para o rim ao invés da colonização da bexiga (PEARSON *et al.*, 2011; RÓZALSKI; SIDORCZYK; KOTELKO, 1997; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

PMF, também conhecido como Mannose-Resistant *Klebsiella*-Like (MR/K), foi inicialmente caracterizado como um padrão de hemaglutinação de *P. mirabilis* revelando uma hemaglutinina MR/K ou PMF (SCHAFFER; PEARSON, 2015). A hemaglutinação MR/K é caracterizada pela capacidade das bactérias de aglutinar ácido tânico tratados com células vermelhas do sangue. A expressão da fímbria de 4-5nm de diâmetro foi encontrada em cerca de 60% das cepas que apresentaram padrão de hemaglutinação MR/K, sugerindo que pode haver mais de uma fímbria em *P. mirabilis* que é capaz de mediar a hemaglutinação MR/K (ZUNINO *et al.*, 2003; JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011; OLD; ADEGBOLA, 2016).

Em 1995, *Proteus mirabilis* Pili (PMP) foi nomeado pela primeira vez em uma fímbria expressa de *P. mirabilis* isolado da urina canina. No entanto os autores notaram a existência de um artigo de 1991, e observaram que a sequência de *pmpA* tinha sido anteriormente identificada

como *rmpA*. Embora, a importância do PMP na infecção humana é desconhecida, o sequenciamento genômico revelou a presença de *pmpA* em todos os genomas de *P. mirabilis* sequenciados (KUANG *et al.*, 2014; SCHAFFER; PEARSON, 2015).

2.2.2 Transporte de Fosfato

O fósforo, elemento essencial para a vida, é mais frequentemente incorporado como fosfato inorgânico. A detecção e absorção de fosfato têm sido associadas a virulência em muitas espécies bacterianas e *P. mirabilis* não é exceção. Alguns estudos têm apontado para importância do sistema de captação de fosfato de *pstSCAB* para a virulência em *Proteus* (O'MAY *et al.*, 2009; ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

Proteus mirabilis codifica um transportador de fosfato inorgânico de elevada afinidade muito semelhante ao do operon *pst* da *E. coli*. O operon *pst* de *P. mirabilis* inclui genes que codificam quatro proteínas relacionadas com o transporte de fosfato (*pstSCAB*) e um regulador transcricional. Quando a atividade da fosfatase alcalina é medida no tipo selvagem, *P. mirabilis* tem pouca atividade em meio LB e atividade muito elevada em meios limitados de fosfato. Na urina humana, não há indução de fosfatase alcalina intermediário, sugerindo que a urina é limitada de fosfato (THOMPSON; WARD; HOPWOOD, 1982; MONDS; SILBY; MAHANTY, 2001; O'MAY *et al.*, 2009; . Com isso, a urina é um meio propício para o desenvolvimento da célula e progressão da infecção, por conta da expressão de *pst* em meio limitado de fosfato.

2.2.3 Sideróforos

O ferro, um elemento essencial necessário para a função de muitas proteínas e enzimas envolvidas em diversos processos biológicos, incluindo transporte de oxigênio, regulação gênica e fixação de nitrogênio. Em condições aeróbicas e pH neutro, o ferro existe na forma férrica insolúvel (Fe^{3+}), que pode ser tóxica após interação com o oxigênio e espécies com redução de oxigênio. Durante a colonização do hospedeiro, os patógenos devem superar o sequestro de ferro do hospedeiro para estabelecer infecção, porque o ferro livre é essencialmente indisponível *in vivo*. Para contrabalancear as condições limitantes de ferro, reservas intracelulares de ferro, as espécies bacterianas evoluíram em vários sistemas de

transporte de ferro, reservas intracelulares de ferro e sistema de resistência ao stress redox (HIMPSL *et al.*, 2008).

Uma das formas pelas quais as bactérias adquirem ferro férrico extracelular é secretando quelantes férricos conhecidos como sideróforos, que capturam ferro do ambiente em condições limitantes (HIMPSL *et al.*, 2008; HIMPSL *et al.*, 2011). Evidências iniciais sugeriram que *P. mirabilis* não possuía sideróforos, ao serem realizados experimentos de quelação de ferro e observou-se que *P. mirabilis* se saía mal quando comparados a outros patógenos, e em testes para ensaios de detecção de sideróforos *P. mirabilis* foi negativo (HIMPSL *et al.*, 2011).

Espécies do gênero *Proteus* são frequentemente relatadas causando graves infecções no trato urinário, sendo necessário em sua estrutura a produção de sideróforos. Contudo, ao ser analisado o genoma completo de *P. mirabilis*, foi detectado a presença de pelo menos dois agrupamentos genômico com genes relacionados à biossíntese de sideróforos e transporte ABC (GAISSER; HUGHES; GEN, 1997; HIMPSL *et al.*, 2011). Agora, sabe-se que *P. mirabilis* tem pelo menos três maneiras de captura de ferro: proteubactina (*pbt*), um sistema de síntese de peptídeo não ribossômico (*nrp*) e α -cetoácido. Também pode usar a enterobactina, um sideróforo produzido por outras bactérias entéricas, embora essa espécie não seja capaz de sintetizar a enterobactina sozinha. Os genes *nrp* são homólogos ao gene da yersiniabactina, codificado dentro de uma ilha de patogenicidade derivada de *Yersinia spp.* Apesar dos genes *nrp* serem homólogos a yersiniabactina, *P. mirabilis* é incapaz de utilizar ou produzir yersinibactina, sugerindo que este locus relacionado a yersiniabactina é funcionalmente distinto (HIMPSL *et al.*, 2008; ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018;).

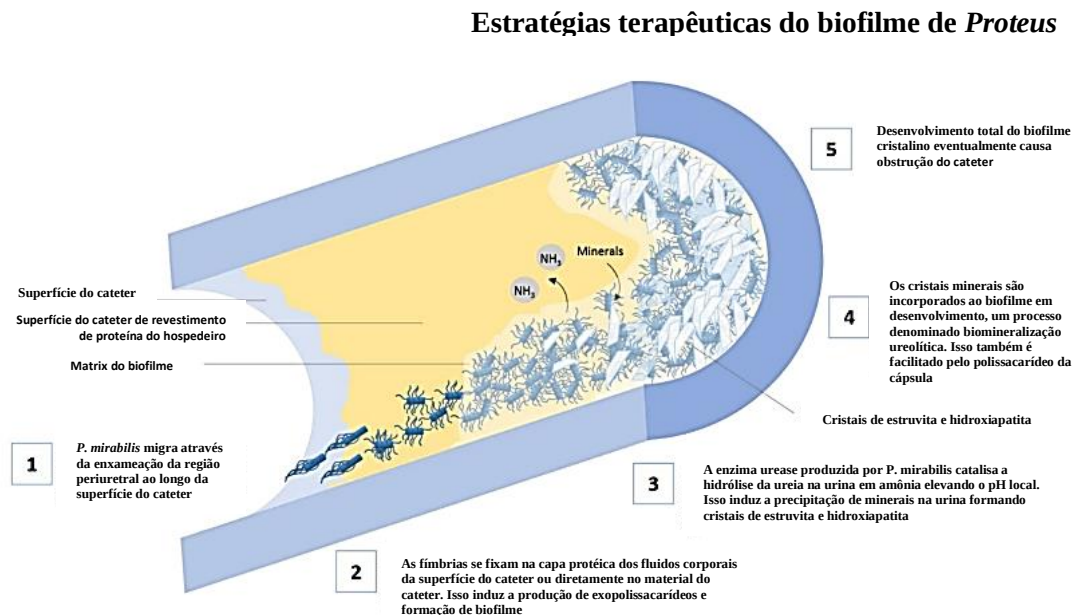
2.2.4 Formação de biofilme

Biofilmes são estruturas bem organizadas de comunidade microbianas de uma ou várias espécies, nas quais as células microbianas estão ligadas a um substrato e umas as outras. Dentro dos biofilmes, as células são incorporadas a uma matriz autoproduzida composta de polissacarídeos, proteínas, lipídios e DNA extracelular (CHEN *et al.*, 2012; WASFI *et al.*, 2020a). O processo de formação de biofilme é composto de múltiplos estágios que começam pela adesão bacteriana a superfícies bióticas ou abióticas, seguida por fixação, formação de microcolônias e finalmente o desenvolvimento de um biofilme maduro (FLEMMING; WINGENDER, 2010; WASFI *et al.*, 2020).

Entre o enorme arsenal de fatores de virulência produzidos por *Proteus* para causar ITUs associadas a cateter, alguns fatores de virulência têm sido relacionados a formação de biofilme

nesta espécie. Em destaque, a capacidade de enxameamento característico de *Proteus*, presença de fímbrias, produção de urease, capsula de polissacarídeo e bombas de efluxo (Figura 4) (WASFI *et al.*, 2020).

Figura 4 - O papel de vários fatores de virulência para formação de biofilme cristalino por *Proteus mirabilis* na superfície de cateter.



Fonte: (WASFI *et al.*, 2020)

Proteus é conhecido por sua característica de enxameamento devido à grande capacidade de motilidade. Em superfície sólida, esta bactéria desencadeia a diferenciação entre células com hastes curtas para células enxame altamente alongadas e hiperflageladas podendo se alinhar em conjuntos multicelulares, podendo migrar rapidamente em superfície sólida de forma coordenada. Essa característica permite que *Proteus* migre da região periuretral da superfície do cateter até a superfície da bexiga urinária dando início a ITUs associadas a cateter (WASFI *et al.*, 2020).

Inicialmente, a formação de biofilme se dá pela fixação de célula bacteriana, através das adesinas fimbriais a superfície do cateter. Pelo menos 17 óperons fimbriais foram identificados no genoma de *P. mirabilis* por sequenciamento do genoma completo (PEARSON *et al.*, 2008; SCAVONE *et al.*, 2016; FILIPIAK *et al.*, 2020; WASFI *et al.*, 2020).

Uma característica do *P. mirabilis* é sua capacidade única de formar biofilmes cristalinos incomuns que geralmente levam à incrustação e obstrução dos cateteres, tornando os CAUTIs mais complicados. Dois fatores de virulência conhecidos por atuarem na formação

de biofilmes cristalinos de *P. mirabilis* são a enzima urease e os polissacarídeos da cápsula (CPSs) (JACOBSEN; SHIRTLIFF, 2011; WASFI *et al.*, 2020).

A urease possui uma enzima que catalisa a hidrólise da ureia em dióxido de carbono e amônia. O amoníaco resultante é a fonte de azoto preferida para muitas espécies bacterianas. Uma consequência direta da produção de urease é a geração de amoníaco e um aumento no pH local. O pH alcalino do trato urinário leva a precipitação de íons cálcio e magnésio e a formação de pedras urinárias compostas de fosfato de amônia magnésio ($\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (estruvita) e fosfato de cálcio [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$] (apatite) (SCHAFFER; PEARSON, 2015; ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018).

Em *P. mirabilis* a urease é codificada pelo óperon *ureDABCEFG*. Um regulador *ureR* é codificado na cadeia inversa adjacente a esse óperon. Ure é uma proteína de ligação que induz a expressão de urease positiva na presença de ureia (COKER; BAKARE; MOBLEY 2000).

2.3 Beta-lactâmicos: carbapenêmicos

O primeiro β -lactâmico surgiu na década de 1920, criado por Alexander Fleming o Benzilpenicilina foi pensado inicialmente como um agente anti-séptico ou como agente seletivo para o isolamento de bactérias gram-negativas. No grupo dos β -lactâmicos estão incluídas as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos. Todos estes possuem em comum o anel- β -lactâmico, que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio (DIAS 2009).

Entre os carbapenêmicos mais descritos, há destaque para imipenem, meropenem e ertapenem. Esses são os carbapenêmicos disponíveis atualmente na prática clínica nos EUA, Europa e Brasil. Em relação a atividade antimicrobiana, o meropenem possui atividade para bactérias gram-negativas, o imipenem possui atividade um pouco superior para bactérias Gram-positivas e o ertapenem não tem apresentado atividade contra *P. aeruginosa* e *A. Baumannii*. Os carbapenêmicos são considerados como a opção terapêutica preferencial para o tratamento de infecções graves associadas aos cuidados de saúde com bactérias gram-negativas multidroga-resistentes. Entretanto, têm sido descritos vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, como a produção de enzimas carbapenemases. Duas grandes classes de carbapenemases são mais comumente encontradas em enterobactérias atualmente: as metalo-beta-lactamases (sendo os tipos IMP, VIM, SPM e NDM as mais frequentes), e as serino carbapenemases (incluindo como mais comuns as do tipo KPC, GES e as OXA-carbapenemases) (PINTO, *et al.*, 2014).

Durante a última década, houve um alarmante aumento global da incidência e prevalência de bactérias gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos. Na Europa, a porcentagem média ponderada por população de isolados invasivos resistentes a carbapenêmicos em 2015 foi de 17,8% para *Pseudomonas aeruginosa*, 8,1% para *K. pneumoniae* e 0,1% para *E. coli* (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC, 2015). A disseminação de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenêmicos (ERC) a nível mundial ameaça o sistema de saúde, uma vez que as bactérias apresentam múltiplos mecanismos de resistência, tais como a produção de carbapenemases, metallo- β -lactamases, oxacilinas e bombas de efluxo (LORENZONI *et al.*, 2017).

Além da disseminação de *Enterobacteriaceae* carreando vários genes de resistência em âmbito hospitalar. São cada vez mais frequentes relatos da disseminação desses patógenos em ambiente e em animais carreando genes como, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3}, *bla*_{NDM-5}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1}, and *bla*_{PER-1}, *bla*_{OXA-181} e *bla*_{VIM-1} (BLEICHENBACHER *et al.*, 2020; HAMZA *et al.*, 2020)

2.3.1 Carbapenemases

2.3.1.1 Serina-Carbapenemase: KPC, GES e OXA

Klebsiella pneumoniae Carbapenemase (KPC) é uma β -lactamase que possui a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (YIGIT *et al.*, 2003). O primeiro isolado detectado como produtor de KPC, foi encontrado em uma cepa de *K. pneumoniae* nos Estados Unidos, em 1996, apresentando resistência a todos os β -lactâmicos. Em seguida, surgiram outros relatos de uma variante da enzima em pacientes hospitalizados na costa leste dos EUA, sendo denominado de KPC-2 (CHEN *et al.*, 2011). Porém, uma correção posterior revelou se tratar da mesma variante descrita inicialmente como KPC-1, diferenciando-se apenas por um aminoácido. A enzima KPC possui identidade de 45% e similaridade $\geq 90\%$ para a enzima SME de *Serratia marcescens* (YIGIT *et al.*, 2003b), confirmando a ancestralidade com esta enzima.

Existem 95 variantes de *bla*_{KPC} que foram descritas até a data (outubro de 2021), classificadas em ordem de sequência numérica em *bla*_{KPC-2} até *bla*_{KPC-82} (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#KPC>). Os genes variantes para KPC já foram descritos em várias espécies de bactérias gram-negativas e em todos os continentes (**Figura 5**)(**APÊNDICE A**). No Brasil, a variante mais identificada é *bla*_{KPC-2}, mas existem relatos da variante *bla*_{KPC-3}

em alguns estudos. Recentemente, *bla*_{KPC-30} foi relatado em *Klebsiella pneumoniae* em hospital no Brasil (APÊNDICE C)(BEIRÃO *et al.*, 2010; MIGLIORINI *et al.*, 2021).

Nos Estados Unidos, o primeiro relato de *P. mirabilis* carreando o gene *bla*_{KPC} proveniente da hemocultura foi de um paciente diabético de 53 anos (TIBBETTS *et al.*, 2008). No Brasil, Monteiro *et al.*, (2009) publicaram o primeiro relato da ocorrência de KPC em 4 cepas de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase em um hospital terciário na cidade de Recife. Cabral *et al.*, (2015), relataram o isolamento da primeira cepa de *P. mirabilis* produtora de KPC no Brasil, também em Recife. É preocupante a disseminação do gene *bla*_{KPC} em bactérias de importância clínica, principalmente no Brasil. Pinto *et al.*, (2014), em hospitais de Porto Alegre, relataram uma predominância de KPC de 48,5% (340/701) em isolados bacterianos, com *K. pneumoniae* em 1º lugar.

Figura 5 - Distribuição de *Enterobacteriaceae* KPC positiva e *P. aeruginosa* coletada de 2012 a 2014.

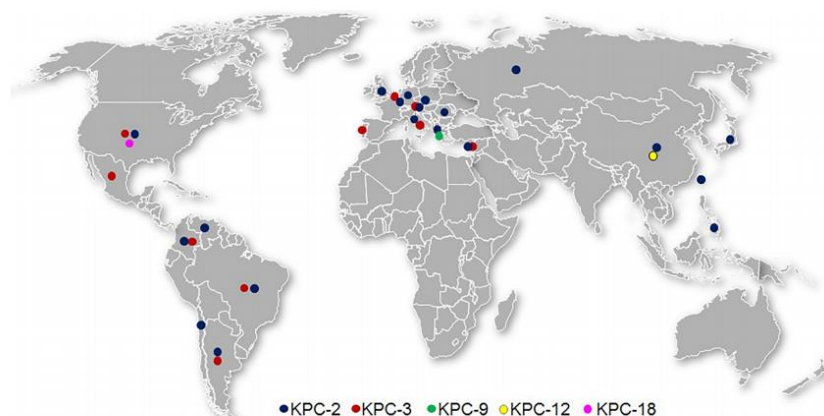


FIG 1 Distribution of KPC-positive *Enterobacteriaceae* and *P. aeruginosa* collected in 2012 to 2014.

Fonte: (KAZMIERCZAK *et al.*, 2016)

Um outro gene também relacionado a produção de carbapenemase é o gene *bla*_{GES} (β -lactamase - Guiana Extended Spectrum). A família GES foi descrita pela primeira vez na França em 1998 em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente de swab retal de uma paciente previamente internada na Guiana Francesa, daí a origem do nome GES (POIREL *et al.*, 2000). Sendo inicialmente classificadas como β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL), esta característica confere a capacidade de resistência desde as penicilinas às cefalosporinas de terceira geração. Em adicional, a enzima GES confere a capacidade de hidrolisar o imipenem (BELTRÃO; OLIVEIRA; LOPES 2021).

Existem 49 variantes de GES que foram descritas até a data (outubro de 2021), classificadas em ordem de sequência numérica em *bla*_{GES-1} até *bla*_{GES-49} (NAAS *et al.*, 2017)

(<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES>) (**APÊNDICE D**). *bla_{GES}* já foi descrito no Brasil em várias espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae* (RIBEIRO, *et al.*, 2014), *Kluyvera intermedia* (RIBEIRO *et al.*, 2014), *A. baumannii* e *E. coli*. Contudo, sua frequência é maior em *P. aeruginosa* (**APÊNDICE B**).

2.3.1.2 Metallo-Carbapenemases: NDM

As Metallo-carbapenemases (MBL) hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e não são inibidas pelo ácido clavulônico. Até o momento são conhecidas 7 variantes de MBL, que são Verona Imipenemase (VIM), Imipenemase (IMP), São Paulo metalo- β -lactamase (SPM), German Imipenemase (GIM) e New Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM) (CABRAL 2016).

São conhecidas 40 variantes de NDM que foram descritos até a data (outubro de 2021), e classificados em ordem numérica de *bla_{NDM-1}* à *bla_{NDM-40}* (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=B1>)(**APÊNDICE E**). Os genes variantes para NDM já foram descritos no Brasil em várias espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *E. coli* (TADA *et al.*, 2013), *P. aeruginosa* (VANEGAS *et al.*, 2014), *Acinetobacter baumannii* (KAASE *et al.*, 2011), *K. pneumoniae* (ZHENG *et al.*, 2016) e *P. mirabilis* (ZHANG *et al.*, 2016).

Apesar de *bla_{NDM-1}* ser a variante mais frequente desse gene, são poucos os relatos em *P. mirabilis*. Baraniak *et al.*, (2016) relataram a presença de *bla_{NDM-1}* em um isolado de *P. mirabilis* proveniente de hospital no Afeganistão. Zhang *et al.*, (2016), relataram a presença do gene *bla_{NDM-5}* em um isolado de *P. mirabilis* proveniente de um hospital na China. Já Valentin *et al.*, (2018), relataram isolados de *P. mirabilis* carregando o gene *bla_{NDM-5}* em Bangladesh na Áustria. No Brasil a variante mais relatada é a *bla_{NDM-1}*. Barberino *et al.*, (2018), relataram a presença de *bla_{NDM}* em isolados de *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii* apresentando resistência aos carbapenêmicos, em estudo de caso de dois pacientes internados em hospitais da Bahia.

2.4 Enzimas de Classe D do tipo OXA

As β -lactamases de Classe D são também conhecidas como oxacilinasas ou β -lactamases do tipo OXA. Possuem como característica a presença de um sítio ativo um resíduo serina, assim como observado nas β -lactamases de classe A e C de Ambler (BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002).

As enzimas do tipo OXA (hidrólise de oxacilina) são amplamente difundidas e foram descritas principalmente em *Enterobacteriaceae* e *P. aeruginosa*. Geralmente possui alto nível de atividade hidrolítica contra penicilina, oxacilina e meticilina. Com atividade fracamente inibida pelo ácido clavulânico (BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002; POIREL *et al.*, 2004; LIKE *et al.*, 2018). As oxacilinases geralmente exibem um fenótipo de espectro restrito. Além da resistência acima mencionada, as enzimas OXAs podem conferir resistência em menor escala ao imipenem e/ou as oximiinas cefalosporinas, como consequência de mutações pontuais em seus derivados (POIREL *et al.*, 2004). Podem apresentar produção de ESBL ou carbapenemase a depender da variante. Até o momento, são conhecidas 1026 enzimas de tipo OXA (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=D>) (**APÊNDICE F**).

O surgimento de novo grupo de β -lactamases transmitidas por plasmídeos foi denominada PSE, pois eram considerados específicos para *P. aeruginosa*. Havia quatro enzimas conhecidas PSE-1 a PSE-4. Contudo, em estudos adicionais os genes *bla*_{PSE} foram transferidos para cepa de *E. coli*, comprovando a denominação incorreta da enzima como específica para *P. aeruginosa*. Quando os genes foram sequenciados, *bla*_{PSE-2} estava intimamente relacionado às β -lactamases OXAs. Posteriormente esta enzima foi denominada de OXA-10 (EVANS; AMYES, 2014)

As enzimas OXAs mais frequentemente encontradas são OXA-23, OXA-48 e OXA-58 (; JEON *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2011; MANAGEIRO *et al.*, 2014; SAMPAIO *et al.*, 2014; HAMMOUDI *et al.*, 2015; SKÁLOVÁ *et al.*, 2016; BERLEUR *et al.*, 2018; AYOUB MOUBARECK *et al.*, 2021). O primeiro produtor de OXA-48 identificado foi de uma cepa de *K. pneumonia* isolada na Turquia em 2003 (POIREL *et al.*, 2004). No Brasil, foi detectado *bla*_{OXA-370}, um derivado de *bla*_{OXA-48} de *E. cloacae* recuperada de swab retal de paciente adulto em Porto Alegre (SAMPAIO *et al.*, 2014). *bla*_{OXA-23} foi amplamente detectado em isolados de *A. baumannii* (CARVALHO *et al.*, 2009; FERREIRA *et al.*, 2011; GROSSO *et al.*, 2011; CORRÊA *et al.*, 2012;).

2.5 Resistência à Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR)

A resistência à Quinolonas Mediada por Plasmídeos (PMQR) foi relatada em 1998, 31 anos depois que o ácido nalidíxico começou a ser usado clinicamente e 12 anos depois que as quinolonas modernas foram aprovadas para uso (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY, 1998; HOOPER; JACOBY, 2016;). O primeiro relato de PMQR foi de um isolado multirresistente de *K. pneumoniae* de amostra de urina no Alabama, que poderia transferir

resistência à ciprofloxacina de baixo nível para uma variedade de bactérias gram-negativas (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; PASCUAL; JACOBY 1998; HOOPER; JACOBY, 2016).

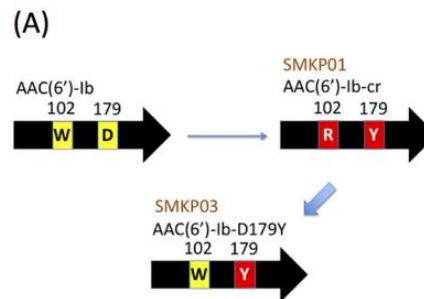
A PMQR compreende os genes de resistência *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrVC*, *qnrE*, *qnrAS*, *aac(6')-Ib-cr*, *OqxAB* e *QepA*. A clonagem e sequenciamento de *qnrA* revelaram que este gene codifica uma proteína com 218 aminoácidos. Outras pesquisas levaram à descoberta de genes relacionados a proteínas de repetição de pentapeptídeo mediadas por plasmídeo *qnrS*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrE*, *qnrAS* e *qnrVC*. Esses genes *qnr* diferiam entre si por 35% ou mais. Variedades alélicas que diferem em 10% ou menos foram descritas em quase todas as famílias: atualmente sete para *QnrA*, 78 para *QnrB*, uma para *QnrC*, duas para *QnrD*, nove para *QnrS* e seis para *QnrVC* (JACOBY; STRAHILEVITZ; HOOPER, 2014; HOOPER; JACOBY, 2016;).

A enzima 6'-N-acetiltransferase type Ib-cr (AAC(6')-Ib-cr) é uma variante da enzima de resistência a aminoglicosídeos *aac(6')-Ib*, fornecendo resistência a canamicina, tobramicina e amicacina. E adicionalmente confere baixo nível de resistência a fluoroquinolonas que afetam o grupo piperazinil não substituído, como norfloxacin e ciprofloxacina (ROBICSEK *et al.*, 2006; RAHERISON *et al.*, 2017).

A disseminação de determinantes de resistência, como *aac(6')-Ib3* já foi relatado em isolados clínicos de *A. baumannii*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *Enterobacter cloacae* em diversos países incluindo Brasil . Além disso, a presença de genes PMQR em elementos móveis como transposons e integrons inseridos em plasmídeos podem contribuir para a disseminação e seleção de cepas multidroga resistentes, uma vez que cassetes de integrons de classe I são frequentemente encontrados albergando *aac(6')-Ib3*, que podem adicionalmente abrigar outros genes de resistência, como *qnrA*, *qnrB*, *bla_{OXA-30}*, *bla_{OXA-10}*, *sul1* e *aadA1* (STRAHILEVITZ *et al.*, 2009; RAHERISON *et al.*, 2017).

Recentemente, um gene híbrido semelhante a ambos genes *aac(6')-Ib3* e *aac(6')-Ib-cr* foi caracterizado e nomeado *aac(6')-Ib-D179Y* (Figura 6). Este novo gene pode conferir resistência elevada a amicacina e as fluoroquinolonas, assim como os genes *aac(6')-Ib3* e *aac(6')-Ib-cr*, respectivamente (SATO *et al.*, 2020a).

Figura 6 - Presença de *aac(6')-Ib-D179Y* em SMKP03, análise genômica de pSMKP03 e comparação com outros plasmídeos por BLAST. (A) Ocorrência de *aac(6')-Ib-D179Y* em SMKP03. *aac(6')-Ib-D179Y* abrigou uma substituição de aminoácido, R102W, em relação a *aac(6')-Ib-cr* em SMKP01; assim, AAC (69) -Ib-D179Y é geneticamente intermediário entre *aac(6')-Ib* e *aac(6')-Ib-cr* devido à presença de substituições dos aminoácidos quiméricos 102W e 179Y.



Fonte: (SATO *et al.*, 2020b)

2.6 Plasmídeos e grupos de Incompatibilidade Plasmidial (Inc)

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

Os plasmídeos são elementos genéticos circulares e extra cromossômico que têm a capacidade de se replicar utilizando uma sequência de DNA que serve como uma origem de replicação (um ponto inicial para a replicação de DNA). E apesar da replicação plasmidial ser autônoma, os plasmídeos possuem importantes mecanismos que controlam o número de cópias daquele mesmo plasmídeo numa célula bacteriana (OZGUMUS *et al.*, 2008; SCHWARZ; JOHNSON, 2016). De acordo com a capacidade dos plasmídeos serem transmitidos através da conjugação bacteriana, os mesmos podem ser classificados em plasmídeos conjugativos e não conjugativos (CARATTOLI *et al.*, 2009; ROGERS; STENGER, 2012).

Os plasmídeos conjugativos podem ser incompatíveis entre si, impedindo a coexistência de tipos iguais em uma mesma célula, pertencendo ao mesmo Grupo de Incompatibilidade Plasmidial (Inc) (BERGER *et al.*, 2013). A incompatibilidade é uma manifestação da relação

entre plasmídeos que compartilham origens de replicação comum (BERGER *et al.*, 2013; DATTA; HUGHES, 1983; COUTURIER *et al.*, 1988).

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

Couturier *et al.* (1988) desenvolveram um novo método para a identificação dos principais replicons de plasmídeos circulantes entre as Enterobacteriaceae. Este método baseou-se na hibridação com 19 sondas de DNA que reconhecem diferentes replicons básicos (COUTURIER *et al.*, 1988). Os plasmídeos parecem aumentar a diversidade genética bacteriana, adquirindo e perdendo genes, e podem ser trocados horizontalmente entre populações bacterianas por conjugação ou mobilização (FRANCIA *et al.*, 2004). Elas contêm genes essenciais para a iniciação e controle de genes de replicação e acessórios que podem ser úteis ao seu hospedeiro bacteriano tal como resistência antimicrobiana ou genes de virulência (FRANCIA *et al.*, 2004).

A identificação e classificação dos plasmídeos deve basear-se em características genéticas presentes e constantes. Esses critérios são melhor atendidos por traços relacionados com a manutenção do plasmídeo, especialmente controles de replicação (RODRIGUES *et al.*, 2016). Desde 2005, está disponível um esquema de tipagem com base em PCR, tendo como alvo os replicons das principais famílias de plasmídeos que ocorrem em *Enterobacteriaceae* (HI2, HI1, I1- γ , X, L / M, N, FIA, FIB, FIC, W, Y, P, A / C, T, K, B / O) (CARATTOLI *et al.*, 2005).

Dentre os plasmídeos já relatados, há destaque para o IncQ. Este é um plasmídeo pequeno e promíscuo e, embora não conjugativo, tem a capacidade de ser mobilizável. Plasmídeos IncQ albergando *bla*_{KPC} foram relatados em isolados clínicos, como *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *K. aerogenes* no Brasil (CERDEIRA *et al.*, 2017; BELTRÃO *et al.*, 2020). Esse fato pode indicar que o IncQ foi o plasmídeo responsável pela disseminação do gene *bla*_{KPC} no Brasil (BELTRÃO *et al.*, 2020).

2.7 Tipagem Molecular

Desde a descoberta de cultivos bacterianos em cultura pura realizada por Koch, o laboratório tem sido um componente importante para a investigação da epidemiologia de

bactérias patogênicas (FOXMAN *et al.*, 2005). Com o tempo a necessidade de discriminar cepas bacteriana da mesma espécie aumentou.

Técnicas foram elaboradas com o intuito de definir a relação clonal de cepas de uma mesma espécie. O que antigamente eram utilizadas técnicas fenotípicas como, sorotipo, biótipo, tipagem fágica ou antibiograma. Com o passar do tempo, foram elaboradas técnicas baseadas em sequências gênicas que se mostraram mais eficientes, apesar dos custos serem mais elevados (FOXMAN *et al.*, 2005).

As metodologias de *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Polymerase Chain Reaction* (ERIC-PCR), *Repetitive extragenic palindrome* (REP-PCR), ribotipagem, *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE), sequenciamento do gene rRNA 16S, *multilocus sequencing type* (MLST) e *multilocus variable number tandem analysis* (MLVA), têm sido utilizadas com sucesso para tais finalidades (FOXMAN *et al.*, 2005).

A ERIC-PCR baseia-se na família de elementos repetitivos presentes em sequências genômicas de DNA bacteriano. A ERIC é um palíndromo imperfeito de 127pb que ocorre em múltiplas cópias em sequências intergênicas não codificantes e altamente conservados do genoma de bactérias entéricas e víbrios. Os números de cópias de sequências variam entre espécies bacterianas (DUAN *et al.*, 2009). As bactérias são diferenciadas de acordo com o número de cópias e posição das bandas em gel de eletroforese.

ERIC-PCR já foi amplamente utilizada para a detecção de relação clonal entre espécies de Enterobactérias. Em *P. mirabilis* foi observada uma grande eficiência na determinação de relação clonal entre esta espécie. Michelim *et al.*, (2008), analisaram relação clonal entre isolados de *P. mirabilis* utilizando diferentes técnicas de tipagem gênica, e observaram que ERIC-PCR possui alta capacidade discriminatória para determinar o perfil clonal dos isolados comparando com outras técnicas, como RAPD, BOX-PCR ou REP-PCR. Um outro estudo investigou a eficiência e capacidade discriminatória de ERIC-PCR e PFGE (considerada padrão ouro em análise de perfil clonal) em 64 isolados de *P. aeruginosa* e observaram que as duas técnicas possuem capacidade discriminatória igual (DUAN *et al.*, 2009; GALES *et al.*, 2003b; AHMED *et al.*, 2015; CODJOE *et al.*, 2019;).

Diferente de outras técnicas, MLST tem sido amplamente utilizada para a definição de relação clonal e permite que o perfil clonal de isolados bacterianos relatados mundialmente sejam comparados em um banco de dados *on line* (<https://pubmlst.org>). Essa tem sido uma das técnicas mais consideradas e utilizadas para determinar os clones (ST) bacterianos mundialmente (MAIDEN, 2006). Contudo, essa técnica ainda não foi padronizada para a investigação de clones ST no gênero *Proteus*. Por outro lado, a técnica de ERIC-PCR pode ser

uma ferramenta molecular útil para a tipagem molecular de *P. mirabilis*, podendo ser determinada a relação clonal, como foi sendo mostrada para *K. pneumoniae*, que também é da ordem *Enterobacterales* (MICHELIM *et al.*, 2008; CODJOE *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar genes de virulência, resistência aos beta-lactâmicos e quinolonas, e relação clonal em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene *bla*_{KPC-2} ou *bla*_{NDM-1} provenientes de um hospital público de Recife de 2017 a 2019.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a presença dos genes de virulência *mrpG*, *pstS*, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA* e *pmfA* nos isolados de *P. mirabilis*;
- Comparar a frequência dos genes de virulência nos isolados portadores e não portadores do gene *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} nos isolados do estudo;
- Verificar a presença dos genes de resistência aos beta-lactâmicos, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58} e às quinolonas *qnrD* nos isolados do estudo;
- Determinar o perfil genético e relação clonal dos isolados de *P. mirabilis*;
- Determinar o conteúdo genético plasmidial de isolado de *P. mirabilis* carreador de *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM};

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Hospital do estudo

O hospital do estudo é localizado em Recife, Pernambuco. Foi fundado em 1948. Atende mais de 5 mil pacientes por mês nas suas quatro emergências (Clínica, Cardiologia, Otorrinolaringologia e Maternidade de alto risco); mais de 10 mil consultas ambulatoriais por mês no ambulatório de especialidades. São 477 leitos disponíveis para a população, sendo 59 de UTI adulto e neonatal. Uma das principais áreas de referência é a Cardiologia, área na qual ele é credenciado pelo Ministério da Saúde (MS) como Centro de Referência em Alto Complexidade em Cardiologia. A maternidade de alto risco é outra área de referência deste hospital, contribuindo de forma importante com a Rede Materno Infantil do Estado. Credenciado pelo MS como de alta complexidade em saúde auditiva, sendo principal referência desta especialidade no estado.

4.2 Origem e coleta das amostras

Os isolados bacterianos foram coletados no laboratório de Microbiologia de um Hospital público de Recife-PE. Os isolados foram inoculados em meio de Transporte Stuart, embalados em sacos ziplock, acondicionados em caixas térmicas hermeticamente fechadas e levados para o Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana (Área de Medicina Tropical, CCM, UFPE).

4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Como critérios de inclusão foram adicionados ao estudo 39 isolados clínicos de *P. mirabilis*, 20 isolados carreadores e 19 não carreadores do gene *bla_{KPC}*, provenientes de diferentes sítios de infecção, fornecidos pelo hospital público de Recife, no período de 2017 a 2019.

Foram excluídos do trabalho isolados que na confirmação de identificação não correspondiam a espécie de *P. mirabilis*.

4.4 Isolados Bacterianos

As amostras bacterianas foram identificadas inicialmente no laboratório de microbiologia do hospital pelo sistema bioquímico automatizado, Phoenix-BD™. No Laboratório de pesquisa da UFPE os isolados foram semeados em Ágar Hektoen Enteric (KONEMAN *et al.*, 2017). Para a confirmação da pureza das culturas bacterianas foram utilizados os testes bioquímicos ágar Indol Sulfeto Motilidade (SIM), ágar Triple Sugar Iron (TSI), Lisina, Citrato, ornitina e urease.

As bactérias foram mantidas em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C, e para análise foram cultivadas em Caldo BHI (Brain Heart Infusion) por 18 horas a 37°C e semeadas em ágar nutriente ou ágar LB (Luria-Bertani).

4.5 Detecção da susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados foram caracterizados quanto ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através dos resultados dos testes automatizados, Phoenix-BD™, advindos do hospital, utilizando os seguintes antimicrobianos: ertapenem (ERT), imipenem (IPM), meropenem (MPM), ampicilina (AMP), ampicilina-ácido clavulânico (AMC), ampicilina-sulbactam (AMP/SUL), piperacilina-tazobactam (PPT), cefturoxima (CFU), cefoxitina (CFO), ceftriaxona (CTX), ceftazidima (CTZ), cefepime (CPM), amicacina (AMI), gentamicina (GEN), ciprofloxacina (CIP), levofloxacina (LEV), Cefalotina (CFL) e Nitrofurtoina (NIT), de acordo com o CLSI (2020).

4.6 Extração e quantificação de DNA total

A extração de DNA total foi realizada por kit Wizard Genomic DNA purification, de acordo com especificações do fabricante (Promega). O DNA foi quantificado utilizando o equipamento Nano Drop e diluído para uso em água Milli Q estéril a 20ng/μL. O DNA extraído foi estocado em freezer -20°C.

4.7 Condições da PCR para identificação dos genes *mrpG*, *pstS*, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA* e *pmfA*

Os genes de virulência *mrpG*, *pstS*, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA*, *pmpA* e *pmfA* foram investigados em todos os isolados de *P. mirabilis* pela técnica de PCR e os iniciadores descritos na tabela 3. Os iniciadores para os genes de virulência foram desenhados no presente trabalho, pois não foram encontrados primers para tais genes na literatura. Os iniciadores foram desenhados com

o auxílio da plataforma primer-BLAST NCBI e em seguida, foram realizados PCR *in silico* na plataforma *In silico* PCR Amplification, utilizando sequências de DNA genômico sob número de acesso *Gene Bank*: NC_022000, ACLE01000068 e NC_010554. 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 e positivo para cada gene. As amplificações dos genes foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto temperatura de anelamento do iniciador para cada gene (**Tabela 2**) e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C.

Tabela 2 - Sequência dos iniciadores utilizados na PCR para o estudo.

Genes	Sequência dos iniciadores	Tamanho fragmento	Temperatura de Anelamento	Ref.
bla_{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882pb	63 °C	(YIGIT <i>et al.</i> , 2001a)
bla_{GES}	ATCAGCCACCTCTCAATGG TAGCATCGGGACACATGAC	860pb	55 °C	(BOYD, D. <i>et al.</i> , 2015)
bla_{NDM}	TGCCCAATATTATGCACCCGG CGAAACCCGGCATGTCGAGA	621pb	60 °C	(HUANG <i>et al.</i> , 2017)
bla_{VIM}	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG AGGTGGGCCATTTCAGCCAGA	ND	62 °C	(CABRAL <i>et al.</i> , 2012)
bla_{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAATT CACT	232pb	60 °C	(CABRAL <i>et al.</i> , 2012)
bla_{SPM}	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	271pb	63 °C	(GALES <i>et al.</i> , 2003b)
bla_{OXA-10}	TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGAAAAACCAG	276pb	62 °C	(BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002)
bla_{OXA-23}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCA	501pb	57 °C	(RANJBAR; ZAYERI; MIRZAIE, 2020)
bla_{OXA-48}	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	743pb	55 °C	(POIREL <i>et al.</i> , 2004)
bla_{OXA-58}	CGATCAGAATGTTCAAGCGC ACGATTCTCCCTCTGCGC	800	ND	(POIREL; NORDMANN, 2006)
qnrD	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	500	61 °C	(CAVACO <i>et al.</i> , 2009)
aac(6')-Ib	CCCGCTTCTCTGTAAGCA TATGAGTGGCTAAATCGAT	500pb	52 °C	(FIRMO <i>et al.</i> , 2020)
mrpG	GGCTTTTGCAATACCGGACAAC CACCCGCAGTTAATGACATCT TGTC	365pb	63 °C	Este trabalho
pstS	CATTGCCGCTGCACTTTCAA TTGTTTTCCAAGCGGCACG	974pb	ND	Este trabalho
ucaA	GCATTTGCTGGCTCATCTATGG AGGCAATGGTGTAATGAACGG	496pb	ND	Este trabalho
pmfA	GCTTTGGCTGCGGCTTTAG CACCTGGCGTTACTTTAGCG	496pb	ND	Este trabalho
nrpG	TAATGAGGTGCATATCTGGATTGG T TAAATGATGTGGCAGGTTGCTT	718pb	ND	Este trabalho
pbtA	ATTGCAGGGCAACAACTGC AGTTCAAGCTCTTCGCCGAT	1667pb	ND	Este trabalho
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGAAGTGGGTGAGCG	ND	36 °C	(DUAN <i>et al.</i> 2009)

Fonte: A autora (2021)

ND – Não determinado

4.8 Condições da PCR para identificação dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{SPM}*, *bla_{GES}*, *bla_{NDM}* e *qnrD*, *aac(6')-Ib*

Os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{OXA-23}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{OXA-58}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GES}*, *bla_{NDM}* e *qnrD* foram investigados em todos os isolados *P. mirabilis* pela técnica de PCR, com o iniciador 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 e positivo para cada gene. As amplificações dos genes *bla_{GES}* e *bla_{NDM}* foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto temperatura de anelamento do iniciador para cada gene (Tabela 2) e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C.

4.9 Eletroforese em gel de agarose

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

4.10 Sequenciamento dos amplicons para os genes de virulência e resistência detectados

Foram selecionados produtos de PCR positivos para cada gene de resistência e virulência, para confirmação da identificação dos genes e determinação das variantes dos genes de resistência. Os produtos de PCR positivos foram purificados através de Kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977). O sequenciamento dos amplicons foi realizado no laboratório multiusuários Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CCB na UFPE. As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST e Clustal W do European Bioinformatics Institute. A tradução dos nucleotídeos em proteínas foi realizada

utilizando o programa expasy (<http://web.expasy.org/tools/translate>). As sequências de nucleotídeos foram depositadas no *GenBank*, sob números de acesso: MW536487, MW527065, MW536486, MW548282, MW536486, MW554921 e MW581825.

4.11 ERIC-PCR

A tipagem molecular para determinar a relação clonal dos isolados foi realizada pela ERIC-PCR conforme a metodologia de Cabral *et al.* (2012) e com iniciadores descritos por Duan *et al.*, (2009) **Tabela 2**. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto a 92 °C para desnaturação, 1 minuto a 36°C para anelamento do primer e 8 minutos a 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos a 72 °C (CABRAL *et al.*, 2012). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software GelAnalyzer 19.1 e DARwin 5.0, respectivamente.

4.12 Extração do DNA plasmidial

Foi selecionado um isolado de *P. mirabilis* (P20-A2) para realização do sequenciamento plasmidial por ser multidroga resistente e portadores dos genes *bla*_{OXA-10}, *bla*_{NDM} e/ou *bla*_{KPC}.

A extração do DNA plasmidial do isolado P20-A2 foi realizada com o Kit de extração plasmidial PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, de acordo com especificações do fabricante. Para a visualização, o DNA plasmidial foi corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose a 0,8% em tampão TBE e voltagem constante de 70V. Foram visualizados em transiluminador de luz UV.

4.13 Sequenciamento completo do DNA plasmidial

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

Foram utilizadas diversas ferramentas gratuitas para as análises dos fragmentos gerados. Os dados foram processados usando o Trimmomatic e montados utilizando a ferramenta Velvet, através do Velvetoptimiser. Os resultados da montagem foram submetidos a outro programa de montagem, o Cap3 e a anotação foi realizada através do Prokka.

Para a análise dos resultados do sequenciamento foi utilizado o software Artemis Sanger. E para a observação dos genes de resistência foram utilizados os sites *Resfinder* 2.1, Plasmidfinder, Rapid Annotation using Subsystem Technology - RAST e Clustal.

5 RESULTADOS

Artigo 1: Fatores de virulência em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreando *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} e primeiro relato de *bla*_{OXA-10} no Brasil

Artigo aceito na revista Journal of Infection and Chemotherapy

Qualis A4

Introdução

Proteus mirabilis é uma bactéria gram-negativa pouco estudada, pertencente à ordem *Enterobacterales* (ADEOLU *et al.*, 2016), sendo comumente causadora de Infecções do Trato Urinário (ITU) e sepse em humanos (CARVALHAES *et al.*, 2018; MARQUES *et al.*, 2019). O que é preocupante é a resistência intrínseca dessa espécie bacteriana às polimixinas, nitrofurantoína e tigeciclina (CUNHA; BARON; CUNHA, 2017b). Além disso, esse patógeno está adquirindo genes que codificam carbapenemases com frequência crescente, diminuindo o espectro de ação dos antimicrobianos existentes. Os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em *P. mirabilis* foram relatados em vários continentes e em vários países, incluindo o Brasil (JÁCOME *et al.*, 2012; SHANMUGAM; MEENAKSHISUNDARAM; JAYARAMAN, 2013; GIRLICH *et al.*, 2015; PILATO *et al.*, 2016; DONG *et al.*, 2019; FIRMO *et al.*, 2020; BITAR *et al.*, 2020). Por outro lado, existem poucos relatos sobre o *bla*_{OXA-10} em qualquer parte do mundo em *P. mirabilis* (POIREL *et al.*, 2011; XIAO *et al.*, 2019b; BITAR *et al.*, 2020).

Além da resistência, os fatores de virulência bacteriana são importantes para o estabelecimento da infecção, assim *P. mirabilis* é capaz de sobreviver no trato urinário e causar infecções do trato urinário graves devido à sua capacidade de produzir diversos mecanismos de virulência, entre os quais está a adesão à célula hospedeira por diferentes estruturas, incluindo a fímbria resistente à manose *Proteus* (MR/P), *P. mirabilis* fímbriae (PMF) e Uroepithelial Cell Adhesin (UCA) (PELLEGRINO *et al.*, 2013; SCAVONE *et al.*, 2016; SANCHES *et al.*, 2019). Essas adesinas são importantes na formação de biofilme desempenhando papel importante no estabelecimento de ITUs graves e pielonefrites, especialmente em pacientes cateterizados. Além disso, essa bactéria também pode usar mecanismo de Transporte de Fosfato (Pst) e diferentes sistemas de captação de ferro, como a proteobactina (Pbt) e a peptídeo sintetase não-ribossômica (NRPS) (Yersiniabactina).

Apesar da gravidade das infecções causadas por *P. mirabilis*, ainda não existem dados sobre essas características de virulência de cepas multirresistentes com *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Por

outro lado, em espécies nas quais há mais estudos, como a *Klebsiella pneumoniae*, sabe-se que os genes de virulência são mais freqüentemente encontrados juntos, em isolados produtores de KPC (BACHMAN *et al.*, 2011; MELO *et al.*, 2014).

A disseminação clonal de patógenos multirresistentes portadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} pode ser considerada um problema global emergente, inclusive no Brasil, principalmente em espécies de *Klebsiella* (CABRAL *et al.*, 2017; FIRMO *et al.*, 2020). Em *P. mirabilis*, esta disseminação foi em Portugal e na Alemanha, evidenciada em humanos e animais, mas em estirpes portadoras de outros genes de resistência, como *bla*_{CMY-1} ou *bla*_{OXA-58} (LANGE *et al.*, 2017; MARQUES *et al.*, 2019). As enzimas do tipo OXA são amplamente difundidas e foram descritas principalmente em Enterobacterales e *Pseudomonas aeruginosa*. Pertencente à classe D de Ambler, OXA-10 é uma ESBL que apresenta alto nível de atividade hidrolítica contra penicilinas, cloxacilina e oxacilina, além de alta resistência à ceftazidima (BELTRÃO *et al.*, 2020; YEZLI; SHIBL; MEMISH, 2015).

Considerando que os fatores de virulência presentes em *P. mirabilis* portadores dos genes *bla*_{KPC-2} ou *bla*_{NDM} ainda são pouco conhecidos, o presente estudo se propõe a investigar os genes *mrpG*, *pmfA*, *ucaA*, *nrpG* e *pbtA* em isolados clínicos e não portadores de *P. mirabilis* dos genes *bla*_{KPC-2} ou *bla*_{NDM} e analisar a variabilidade genética, relação clonal e outros genes que apresentam resistência aos β -lactâmicos.

Material e métodos

Isolados bacterianos e teste de sensibilidade antimicrobiana

Foram analisados 36 isolados clínicos de *P. mirabilis*, dos quais 18 eram portadores e 18 não portadores do gene *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} de diferentes sítios e setores de infecção atendidos sob demanda de um hospital público de Recife-PE, Brasil, entre 2017 a 2019. Os isolados foram identificados pelo sistema bioquímico automatizado Phoenix-BDTM, e mantidos em estoque congelado com glicerol 15% a -70 °C, para posterior análise.

Os testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e de concentração inibitória mínima também foram realizados pelo sistema automatizado Phoenix-BDTM, seguindo critérios determinados pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). Os antimicrobianos testados foram ampicilina, β -lactâmicos/ β -lactamases (ampicilina/sulbactam e piperacilina/tazobactam), β -lactamas monocíclicos (aztreonam), cefalosporinas (Cefepime, Ceftazidima e cefuroxima) Aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina e tobramicina)

fluoroquinolona (ciprofloxacina), carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) e tigeciclina.

Extração de DNA, design de primer e condições de PCR para detectar os genes de virulência e resistência

O DNA dos isolados bacterianos foi extraído por meio do Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, EUA), e sua qualidade e quantidade foram avaliadas em espectrofotômetro NanoDrop.

Seis genes importantes associados à virulência em *P. mirabilis* em humanos foram investigados, incluindo *mrpG*, *pmfA* e *ucaA* (adesinas fimbriais), *pstS* (transporte de fosfato), *nrpG* e *pbtA* (sideróforos). Os primers foram desenhados neste estudo com o auxílio da plataforma primer-BLAST NCBI.

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µl por tubo, compreendendo: DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA), dNTP 8mM (Promega, EUA), MgCl₂ 25mM e 20µmol de primers. Para cada misturador de amostra, um controle negativo e um controle positivo (P4-A2; P26-A2; P27-A2) de um isolado desse mesmo estudo foram adicionados com a confirmação da presença de genes por sequenciamento do produto de PCR. Com ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos, consistindo - em cada ciclo - de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto de temperatura de anelamento do iniciador para cada gene (**Tabela 1**) e 1 minuto a 72°C para extensão. Após esses ciclos, uma etapa final de alongamento de 10 minutos foi realizada a 72°C.

Tabela 1 - Sequência dos primers que foram usados no estudo

Gene	Sequência dos primers	Tamanho dos fragmentos	Temperatura de anelamento	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882bp	63°C	(SCAVUZZI <i>et al.</i> , 2019)
<i>bla_{NDM}</i>	TAAAATACCTTGAGCGGGC AAATGGAAACTGGCGACC	439bp	60°C	(SCAVUZZI <i>et al.</i> , 2019)
<i>bla_{OXA-10-like}</i>	TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGAAAAACCAG	276bp	63°C	(BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002a)
<i>bla_{OXA-48-like}</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	743bp	55°C	(POIREL; HÉRITIER <i>et al.</i> , 2004)
<i>bla_{OXA-23-like}</i>	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCTCA	501bp	55°C	(RANJBAR; ZAYERI; MIRZAI, 2020)
<i>bla_{OXA-58-like}</i>	CGATCAGAATGTTCAAGCGC ACGATTCTCCCCTCTGCGC	NI	55°C	(POIREL; NORDMANN, 2006a)
<i>bla_{SPM}</i>	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	700bp	63°C	(GALES <i>et al.</i> , 2003a)
<i>bla_{GES}</i>	ATCAGCCACCTCTCAATGG TAGCATCGGGACACATGAC	860bp	55°C	(MATASEJE <i>et al.</i> , 2012)
<i>bla_{VIM}</i>	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG AGGTGGGCCATTACAGCCAGA	ND	62°C	(CABRAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTT CACT	232bp	60°C	(CABRAL <i>et al.</i> , 2012)
<i>mrpG</i>	GGCTTTTGCAATACCGGACAAC CACCCGCAGTTAATGACATCT TGTC	365bp	63°C	Este estudo
<i>pstS</i>	CATTGCCGCTGCACTTTCAA TTGTTTTCCAAGCGGCACG	974bp	63°C	Este estudo
<i>ucaA</i>	GCATTTGCTGGCTCATCTATGG AGGCAATGGTGTAAATGAACGG	496bp	63°C	Este estudo
<i>pmfA</i>	GCTTTGGCTGCGGCTTTAG CACCTGGCGTTACTTTAGCG	496bp	63°C	Este estudo
<i>nrpG</i>	TAATGAGGTGCATATCTGGATTGGT TAAATGATGTGGCAGGTTGCTT	718bp	63°C	Este estudo
<i>pbtA</i>	ATTGCAGGGCAACAAACTGC AGTTCAAGCTCTTCGCCGAT	1667bp	63°C	Este estudo
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ND	36°C	DUAN <i>et al.</i> (2009)

Fonte: A autora (2021)

ND – Não determinado; bp – pares de bases; NI – Não informado pela referência

Investigamos em todos os isolados de *P. mirabilis* cinco genes importantes que conferem resistência a antimicrobianos beta-lactâmicos: *bla_{KPC}*, *bla_{SPM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-10-like}* e *bla_{NDM}*, estes sendo investigados pela técnica de PCR, seguido de sequenciamento de amplicons. Para cada ensaio, um controle negativo e um controle positivo foram adicionados para cada gene investigado. Os controles positivos para os genes *bla_{KPC}*, *bla_{SPM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-10}*, *bla_{VIM}* e *bla_{GES}* foram Ea18A (BELTRÃO *et al.*, 2020), PS6-A, PS7-A e PS8-A (SCAVUZZI *et al.*, 2019), respectivamente. As reações de amplificação

foram preparadas em um volume total de 25 µl por misturador de amostra, compreendendo: DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA), dNTP 8mM (Promega, EUA), MgCl₂ 25mM e 20 µmol de primers. Um controle positivo e negativo foi incluído em cada partida de amplificação. As amplificações foram realizadas com ciclagem, temperatura de anelamento e pares de primers para cada gene descrito na Tabela 1. Em seguida, as amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose contendo CyberSafe (Thermofisher, Reino Unido).

Sequenciamento dos amplicons

Os amplicons dos genes de virulência e resistência encontrados foram purificados pelo kit SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER *et al.*, 1977). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas Bioedit (HALL, 2017), BLAST e ClustalW do Instituto Europeu de Bioinformática. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank, sob o número de acesso: MW536487, MW548282, MW581825, MZ562557 e MZ562558.

ERIC-PCR

A tipagem molecular para determinar a relação clonal dos isolados foi realizada por Consenso Intergênica Repetitiva Enterobacteriana - Reação em Cadeia de Polimerase (ERIC-PCR) com primers descritos na Tabela 1 (DUAN *et al.*, 2009). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega, EUA), dNTP 2mM (Promega, EUA), MgCl₂ 25mM e 10 µmol de primers. Um controle negativo foi incluído em cada partida de amplificação. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos de 40 ciclos, consistindo - em cada ciclo - de 1 minuto a 92°C para desnaturação, 1 minuto a 36°C para anelamento do primer e 8 minutos a 72°C para extensão. Após esses ciclos, uma etapa final de alongamento de 16 minutos também foi realizada a 72°C (CABRAL *et al.*, 2017). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA (TBE). A análise dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram realizadas nos softwares

GelAnalyzer (LAZAR; HORVATH-LAZAR, 2010) e DARwin 6.0 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006), respectivamente.

Resultados

Perfil de origem e suscetibilidade a antimicrobianos de isolados de *P. mirabilis*

Os isolados clínicos de *P. mirabilis* analisados vieram de diferentes amostras, incluindo urina (n = 21/58%), ponta do cateter (n = 6/16,6%), tecido (n = 1/2,7%), secreção traqueal (n = 3/7,5%), sangue (n = 1/2,7%), fluido peritoneal (n = 1/2,7%), secreção ocular (n = 1/2,7%) e secreção da ferida (n = 1/2,7%) (Tabelas 2 e 3). O setor com maior ocorrência foi Unidade de Terapia Intensiva (n = 15/41,6%) seguido de Cardiologia (n = 7/19,4%), Unidade Coronariana (n = 5/13,8%) e Clínica Médica (n = 3/8,3%).

Com relação aos dados clínicos dos pacientes, a maioria eram do sexo feminino (n=24/72%) com média de 58 anos. Dos 33 pacientes analisados 39% (n=13) ficaram internados por mais de 90 dias e 54% (n=18) foram à óbito. Os antimicrobianos utilizados pertenciam a grupos, como cefalosporinas, aminoglicosídeos, carbapenêmicos, glicopeptídeo, quinolonas e lincosamidas (**Tabela 2 e 3**).

Tabela 2 - Antibioticoterapia, idade, gênero, tempo de internação e desfecho clínico de pacientes com isolados de *P. mirabilis* carreadores dos genes *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* de Recife entre 2017 e 2018.

Número do Paciente /cepa	Sector	Amostra Clínica	Perfil de resistência	Antibiótico terapia	Gênero/idade (anos)	Tempo de internamento (dias)	Desfecho clínico
2/P3-A2	CM	Urina	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFO (I)=(16); CTX (=32); CTZ (=4); CFU (>16); CFL (>16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vancomicina Amicacina; Piperacilina- tazobactam	F/74	84	Alta
3/P4-A2	CCU	Ponta de cateter	AMI (>32); CPM (>16);CFO (I)=(8); CTX (=32); CFU (>16); CFL (>16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Piperacilina-tazobactam; Meropenem; Levofloxacina; Polimixina; Amicacina; Linezolid; Moxifloxacina	F/66	ND	Óbito
4/P6-A2	CCU	Ponta de cateter	AMI (>32); CPM (>16); CFU (>16); CTX (=16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Não determinado	F/ND	ND	ND
7/P10-A2	CM	Urina	AMI (>32); CPM (>16); CFL (>16); CFU (>16); CFO (I) (=16); CTZ (I) (=2); CTX (=32); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); CIP (>2); LEV (>4);	Piperacilina-tazobactam	M/39	19	Alta
10/P14-A2	CCU	Líquido peritoneal	AMI (>32); AMP (>16)	Piperacilina-tazobactam; Vancomicina; Meropenem	M/41	11	Óbito
11/P16-A2	UTI	Urina	GEN (I)=(8); CPM (>16); CFL (>16); CFO (>16); CTX (>32); CFU (>2); CTZ (>16) AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)=(64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Amfotericina B*; Vancomicina; Meropenem	F/29	359	Óbito
13/P18-A2	UTI	Urina	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); IMP (=4); ERT (=4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxona; Vancomicina; Meropenem; Amicacina; Doxacilina; Metronidazol*	F/32	ND	Óbito
13/P23-A2	UTI	Urina	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)				
15/P20-A2	UTI	Tecido	GEN (=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vacomicina; Polimixina B; Ampicilina; Amicacina; Daptomicina	M/43	104	Óbito
17/P25-A2	UTI	Urina	GEN (I)=(8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (>8); ERT (>4); AMP	Ceftriaxona- azitromicina; Meropenem; Vancomicina; Fluconazol*	F/44	148	Óbito

			(>16); AMC (>16/8); PPT (I)(>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)					
17/P27-A2	UTI	Ponta de cateter	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)					
20/P29-A2	CM	Urina	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vancomycin; Amicacina; Fluconazol*	F/65	120	Alta	
26/P35-A2	CARD	Urina	GEN (I)(=8); CPM (=16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(=64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Azitromicina	F/83	ND	Óbito	
27/P38-A2	UTI	Ponta de cateter	AMI (I)(=32); GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (>8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxona; Ceftazidima; Polimixin B; Meropenem	F/48	66	Óbito	
28/P39-A2	UTI	Urina	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (I); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CPM (>2)	Ciprofloxacina; Clindamicina; Vancomicina;	M/44	32	Alta	
29/P41-A2	CARD	Urina	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (*); IMP (>8); MPM (=4); ERT (=4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2)	Ciprofloxacina	F/79	19	Alta	
30/P42-A2	UTI	Urina	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (>16); CFO (>16); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Linezolid; Fluconazol*	F/54	332	Óbito	
32/P45-A2	UTI	Ponta de cateter	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (=8); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (>16); CFO (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Vancomicina; Meropenem; Cefepime; Polimicina B; Amicacina; Linezolid	M/59	120	Óbito	

Fonte: A autora (2021)

M- Masculino; F- Feminino; CCU - Unidade Coronariana; NCCU - Unidade Coronariana Neonatal; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; CARD - Cardiologia; CM - Clínica Médica; (asterisco *) - Antifúngico; ND - Não determinado; AMP - Ampicilina; TRI / SUL - Sulfametoxazol-trimetoprima; AMP / SUL - Ampicilina-sulbactam; PPT - Piperacilina-tazobactam; CFU - Cefuroxima; CFO - Cefoxitina; CTX - Ceftriaxona; CTZ - Ceftazidima; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amicacina; CFL - Cefalotina; GEN - gentamicina; CIP - Ciprofloxacina; (int) - intermediário; neg - negativo

Tabela 3 - Antibioticoterapia, idade, gênero, tempo de internação e desfecho clínico de pacientes com isolados de *P. mirabilis* não carreadores dos genes *bla*_{KPC} ou *bla*_{NDM} de Recife entre 2017 e 2018.

Número do paciente/ cepa	Setor	Amostra clínica	Perfil de resistência	Antibiótico terapia	Gênero/idade (Anos)	Tempo de internação (dias)	Desfecho clínico
1/P2-A2	SC	Urina	Sensível a todos os antimicrobianos testados	Vancomicina	M/58	8	Óbito
5/P7-A2	CV	Fragmento de osso	GEN (>8); AMP (>16); CIP (>2); LEV (>4); TRI-SUL (>4/76)	Levofloxacina; Clindamicina	F/ND	ND	Alta por insubordinação
6/P8-A2	CARD	Urina	GEN (>8); CFO (I)(=16); CFL (>16); CTZ (I) (=2); AMP (>16); AMC (>16/8); CIP (>2); LEV (>4); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxona; Azitromicina	M/54	9	Alta
8/P12-A2	CCU	Sangue	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>8); CFL (>16); CFU (>16); CTX (>32); AMP (>16)	Ceftriaxona; Clindamicina; Polimixina B; Meropenem; Amicacina; Trimetroprim-sulfamethoxazol	F/55	154	Óbito
9/P13-A2	ICU	Ponta de cateter	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CFU (>16); CTX (>32); AMP (>16); AMC (>16/8); CIP (>2); LEV (>4)	Meropenem; Levofloxacina; Amicacina; Vancomicina; Polimixin B; Amfotericina; Piperacilina-tazobactam; Clindamicina	M/71	96	Óbito
12/P17-A2	ICU	Urina	GEN (>8); CPM (=8); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); IMP (=4); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxona-azitromicina; Piperacilina tazobactam; Linezolid; Amicacina; Gentamicina; Daptomicina; Levofloxacina; Fluconazol*	F/65	160	Óbito
14/P19-A2	ICU	Secreção traqueal	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Cefepime; Meropenem; Tigeciclina; Amicacina; Levofloxacina; Polimixina B; Vancomicina	F/80	97	Óbito

15/P21-A2	CCU	Secreção traqueal	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vacomicina; Polimixina B; Ampicilina; Amicacina; Daptomicina	M/43	104	Óbito
16/P24-A2	CARD	Secreção de ferida	Sensível a todos os antimicrobianos testados	Cefepime; Meropenem; Vancomicina; Ampicilina	F/57	110	Alta
18/P26-A2	AR	Urina	Sensível a todos os antimicrobianos testados	Cefalexina; Clindamicina; Gentamicin; Cefalotina;	F/29	6	Alta
19/P28-A2	ICU	Secreção traqueal	Sensível a todos os antimicrobianos testados	Ceftriaxona; Ciprofloxacina; Meropenem; Polimicina B; Vancomicina; Amicacina; Amfotericina	F/71	47	Óbito
21/P30-A2	CARD	Urina	CFL (=8)	Trimethoprim-sulfamethoxazole; Ceftazidima; ceftriaxone-azitromicina;	F71	47	Alta
22/P31-A2	AMB	Urina	CFL (=8)	Não informado	F/69	Paciente não foi hospitalizado	-
23/P32-A2	EMER	Urina	Sensível a todos os antimicrobianos testados	Cefepime; Meropenem; Vancomicina	F/74	124	Alta
24/P33-A2	CARD	Urina	CFL (=8)	Ceftriaxone	F/82	24	Alta
25/P34-A2	NCCU	Secreção ocular	AMP (>16); TRI-SUL (>4/76)	Vancomicina; Meropenem; Oxacilina; Ceftriaxona	M/0,7	ND	Óbito
31/P43-A2	ICU	Urina	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (=32); CFU (>16); IMP (>8); AMP (>16); AMC (>16/8); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxona; Vancomicina; Piperacilina-tazobactam; Amfotericina B; Amicacina; Meropenem; Polimixina B; clindamicina; Fluconazol*	F/70	138	Óbito
33/P46-A2	MAT	Urina	GEN (I)(=8); AMP (I)(=16); PPT (>64/4); LEV (>4)	ND	F/ND	ND	ND

Fonte: A autora (2021)

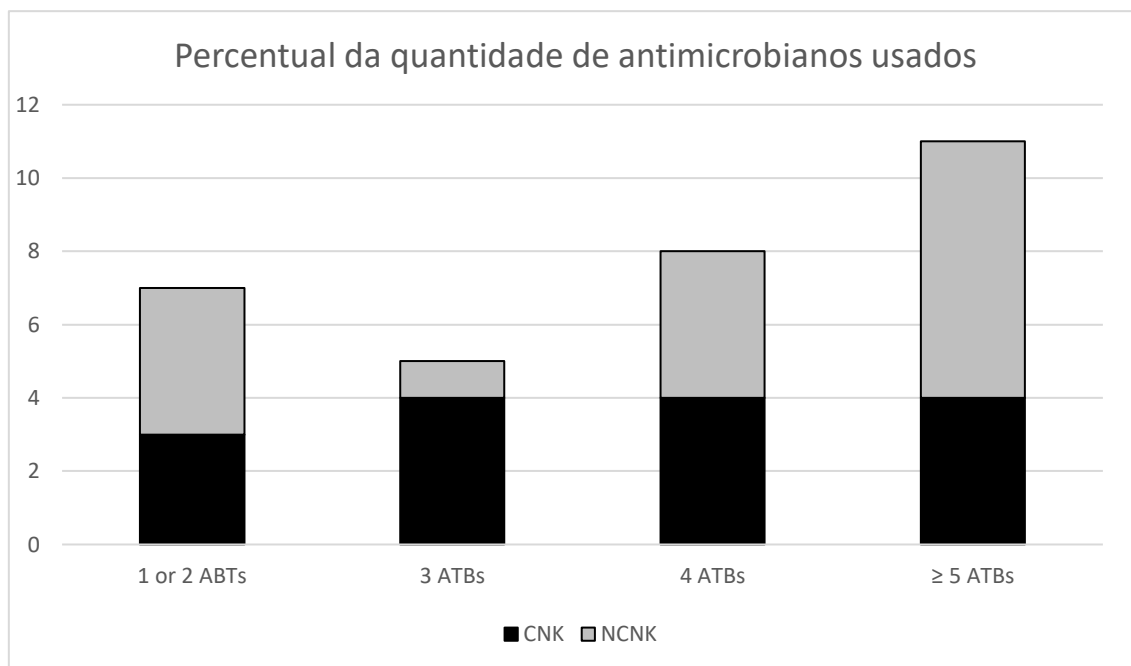
M - Masculino; F- Feminino; CCU - Unidade Coronariana; NCCU - Unidade Coronariana Neonatal; UTI - Unidade de Terapia Intensiva; CARD - Cardiologia; CM - Clínica Médica; AR – Alto risco; (asterisco *) - Antifúngico; ND - Não determinado; AMP - Ampicilina; TRI / SUL - Sulfametoxazol-trimetoprima; AMP / SUL - Ampicilina-sulbactam; PPT - Piperacilina-tazobactam; CFU - Cefuroxima; CFO - Cefoxitina; CTX - Ceftriaxona; CTZ - Ceftazidima; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amicacina; CFL - Cefalotina; GEN - gentamicina; CIP - Ciprofloxacina; (int) - intermediário; neg – negativo; ND – Não determinado

Com relação aos isolados não carreadores e carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, a porcentagem de óbitos foi semelhante para ambos os grupos, com 62.5% (n=10) de óbitos no grupo não carreadores e 50% (n=9) nos carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}.

Entre os pacientes com isolados de *P. mirabilis* não carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, 50% (n=9) tinham mais de 60 anos e destes cinco morreram, 27.7% (n=5) dos pacientes que tinham entre 40 e 59 anos, um paciente tinha sete meses e outro paciente 29 anos. Dos pacientes com isolados de *P. mirabilis* carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, 31.3% (n=5) tinham mais de 60 anos, 43.2% (n=7) tinham entre 40 e 59 anos e 25% (n=4) tinham menos de 40 anos. Com relação ao tempo de internação a porcentagem para ambos os grupos foi semelhante, os grupos de carreadores e não carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, 43.7% (n=7) e 44.4% (n=8) ficaram internados por mais de 90 dias, respectivamente.

Todos os pacientes que fizeram uso de cinco ou mais antimicrobianos foram a óbito em ambos os grupos. Ao todo, os pacientes que fizeram uso de cinco ou mais antimicrobianos ficaram internados por mais de 90 dias. Dos pacientes que fizeram uso de um ou dois antimicrobianos nos grupos de isolados carreadores e não carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} apenas um foi a óbito em cada grupo. O percentual da quantidade de antimicrobianos utilizados pelos pacientes dos dois grupos está na **Gráfico 1**.

Gráfico 1 - Percentual da quantidade de antimicrobianos utilizados pelos pacientes com relação ao grupo dos isolados carreadores dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* (CNK) e o grupo de isolados não carreadores de *bla_{NDM}* and *bla_{KPC}* (NCNK).



Fonte: A autora (2021)
ATBs – Antimicrobianos

Os isolados apresentaram altas taxas de resistência aos principais grupos de antimicrobianos (carbapenêmicos, aminoglicosídeos, cefalosporinas e quinolonas). Por outro lado, apresentaram maior sensibilidade à amicacina ($n = 12/33\%$), cefoxitina ($n = 12/33\%$), seguida de meropenem ($n = 13/36\%$) (**Tabelas 2 e 3**). Os isolados portadores de *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* apresentaram altas taxas de resistência quando comparados aos não portadores, principalmente ampicilina ($n = 18/100\%$), amoxicilina-clavulanato ($n = 17/94,4\%$), cefepime ($n = 17/94,4\%$), levofloxacina ($n = 16/88,8\%$), cefuroxima ($n = 16/88,8\%$) e ciprofloxacina ($n = 16/88,8\%$).

Genes de resistência à beta-lactâmicos

A análise dos genes de resistência aos beta-lactâmicos mostrou que as variantes mais encontradas foram *bla_{OXA-10}* ($n = 8$), *bla_{KPC-2}* ($n = 10$) e *bla_{NDM}* ($n = 8$). Deve-se notar que nenhum isolado foi encontrado carregando os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. Dos 36 isolados de *P. mirabilis* analisados, 18 carregavam o gene *bla_{OXA-10}*, apresentando resistência a uma grande variedade de antimicrobianos. A resistência à ceftazidima foi frequente em 44,4% (8/18) dos isolados portadores de *bla_{OXA-10}* (**Tabelas 4 e 5**).

Tabela 4 - Fonte de isolamento, presença de genes de virulência e perfil ERIC-PCR de isolados de *P. mirabilis* carreadores dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* de Recife em 2017 e 2018.

Identificação	Data da colheita	Setor	Amostra clínica	Genes de Virulência	Genes de resistência	Perfil de virulência	Perfil de resistência	Classificação de resistência antimicrobiana	ERIC
P3-A2	22/09/2017	MC	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V5	AMI/GEN/AMC/AMP/PPT/CFL/CTX/CPM/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E2
P4-A2	13/09/2017	UCO	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V4	AMI/GEN/AMC/AMP/PPT/CFL/CPM/CFO(int)/CFZ(int)/CTX/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E3
P6-A2	27/09/2017	UCO	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/CPM/CFX/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E3
P10-A2	09/10/2017	CM	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA, nrpG</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/CFL/CPM/CTX/CFZ(int)/CFO(int)/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER	XDR	E5
P14-A2	09/11/2017	UCO	Líquido peritoneal	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/ATM/CPM/CTZ/CTX/ERT/IMP/MER/LEV/CIP/PPT/TRI-SUL	XDR	E8
P16-A2	26/01/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10-like}</i>	V3	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN(Int)/LEV/PPT(Int)/TRI-SUL	XDR	E9
P18-A2	04/03/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla_{KPC} bla_{OXA-10}</i>	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFP/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E18
P20-A2	23/03/2018	UTI	Tecido	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10-like}</i>	V3	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN (Int)/IMP/LEV/MER/PPT(Int)/TRI-SUL	XDR	E12
P23-A2	29/03/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla_{KPC} bla_{OXA-10-like}</i>	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E14
P25-A2	03/04/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10}</i>	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN(Int)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E13
P27-A2	06/04/2018	UTI	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10}</i>	V5	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN(Int)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E17
P29-A2	28/03/2018	CM	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, nrpG</i>	<i>bla_{KPC} bla_{OXA-10-like}</i>	V4	AMI/AMP/CFL/CFU/CIP(Int)/LEV(Int)/TRI-SUL	MDR	E19
P35-A2	20/04/2018	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10-like}</i>	V3	AMI(I)/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E25

P38-A2	10/06/2018	UTI	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10}</i>	V4	AMI(I)/AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CIP/ERT/GEN (I)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E26
P39-A2	06/06/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla_{KPC} bla_{OXA-10-like}</i>	V4	AMI/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT	XDR	E27
P41-A2	07/05/2018	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla_{KPC}</i>	V5	AMI/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/ERT/PPT	XDR	E28
P42-A2	19/06/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10-like}</i>	V3	AMI/AMC/AMP/CFL/CPM/CFO/CTZ/CFU/CIP/ERT/IMP/MER/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E29
P45-A2	03/08/2018	UTI	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla_{NDM} bla_{OXA-10-like}</i>	V4	AMC/AMP/AMI/CPM/CFO/CTZ/CFU/CIP/TRI-SUL/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT/	XDR	E31

Fonte: A autora (2021)

UCO – Unidade Coronariana; UCON – Unidade Coronariana Neonatal; UTI – Unidade de Terapia Intensiva; CARD – Cardiologia; MC – Clínica Médica; MAT – Maternidade; AMB – Ambulatório; CV – Clínica vascular; EMER – Emergência; AR – Alto Risco; (linha-) – Sensibilidade a todos os antimicrobianos testados; AMP - Ampicillin; AMP/SUL - Ampicilina-sulbactam; PPT - Piperacilina-tazobactam; CFU - Cefuroxima; CFO - Cefoxitina; CFX - Ceftriaxona; CTZ - Ceftazidima; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amicacina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina; CFL - Cefalotina; (int) - Intermediário; neg - negativo; MDR - Multidroga Resistente; CFU - Cefuroxima; CFO - Cefoxitina; CTX - Ceftriaxona; CTZ - Ceftazidima; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amicacina; CFL – Cefalotina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina ; CEFL - Cefalotina; NIT - Nitrofurantoina; (int) - Intermediário; neg - negativo; MDR - Multidroga Resistente; XDR – Extensivamente resistente a drogas; MDR – resistente a ≥ 1 agente em ≥ 3 categorias antimicrobianas; não-MDR, sensível a todas as classes testadas ou resistente a apenas uma ou duas categorias de Drogas antimicrobianas; XDR, resistente a ≥ 1 agentes em todas as categorias exceto uma ou duas categorias antimicrobianas; *bla_{OXA-10-like}* – gene *bla_{OXA-10}* confirmado por PCR, mas não confirmada a variante derivada pelo sequenciamento de Sanger; *bla_{OXA-10}* – a presença do gene *bla_{OXA-10}* foi confirmada por PCR e sequenciamento de Sanger

Tabela 5 - Fonte de isolamento, presença de genes de virulência e perfil ERIC-PCR de isolados de *P. mirabilis* não-carreadores dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} de Recife em 2017 e 2018.

Identificação	Data da colheita	Setor	Amostras clínicas	Genes de virulência	Perfil Virulência	<i>bla</i> _{OXA-10}	Perfil de resistência	Classificação da resistência antimicrobiana	ERIC
P2-A2	25/09/2017	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	não-MDR	E1
P7-A2	04/10/2017	CV	Fragmento de osso	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	V4	neg	AMP/GEN/CIP/LEV/TRI-SUL	MDR	E4
P8-A2	02/10/2017	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA nrpG, pbtA</i>	V5	neg	AMP/AMC/CFL/CFO(int)/CTZ(int)/CI P/LEV/GEN/TRI-SUL	MDR	E2
P12-A2	14/11/2017	UCON	Sangue	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMI/GEN/CPM/CFL/CFU/CTX/AMP/ AMC	MDR	E6
P13-A2	20/11/2017	UTI	Ponta de cateter	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMP/ATM/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/ GEN	MDR	E7
P17-A2	06/03/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, nrpG, pbtA</i>	V5	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CT X/CFU/CIP/LEV/GEN/IMP/PPT/TRI- SUL	XDR	E10
P19-A2	23/03/2018	UTI	Secreção Traqueal	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	V3	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CPM/CAZ/CTX/CF U/CIP/LEV/ERT/GEN (Int)/TRI-SUL	XDR	E11
P21-A2	25/03/2018	UCO	Secreção Traqueal	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	V3	<i>bla</i> _{OXA-10}	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CT X/CFU/CIP/LEV/GEN(Int)/TRI-SUL	XDR	E13
P24-A2	02/04/2018	CARD	Secreção de ferida	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	-	não-MDR	E15
P26-A2	27/03/2018	AR	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	não -MDR	E16
P28-A2	03/04/2019	UTI	Secreção Traqueal	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	-	não -MDR	E18
P30-A2	13/04/2019	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	CFL	não -MDR	E20
P31-A2	13/04/2018	AMB	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	ATM/CFL/NIT	não -MDR	E21
P32-A2	14/04/2018	EMER	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	não -MDR	E22
P33-A2	13/04/2018	CARD	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	CFL	não -MDR	E23
P34-A2	23/04/2018	UCON	Secreção ocular	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	AMP/TRI-SUL	não -MDR	E24

P43-A2	19/06/2018	UTI	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CAZ/CF O/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E30
P46-A2	31/07/2018	MAT	Urina	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMP(int)/GEN(int)/PPT	não -MDR	E32

Fonte: A autora (2021)

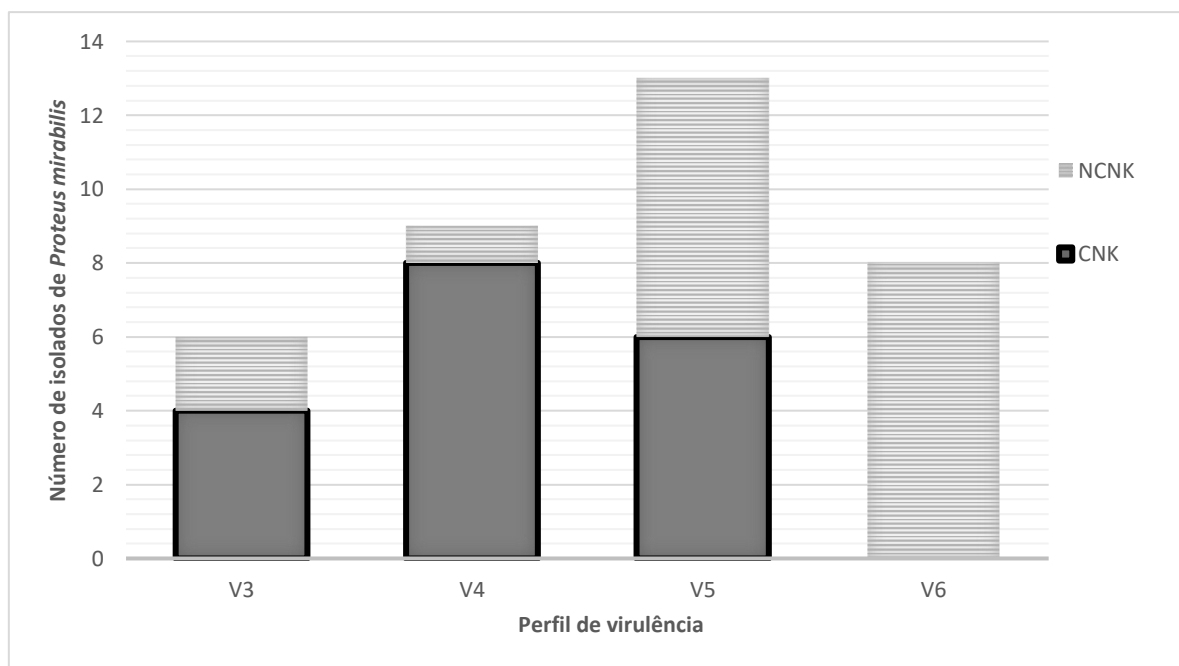
UCO – Unidade Coronariana; UCON – Unidade Coronariana Neonatal; UTI – Unidade de Terapia Intensiva; CARD – Cardiologia; MC – Clínica Médica; MAT – Maternidade; AMB – Ambulatório; CV – Clínica vascular; EMER – Emergência; AR – Alto Risco; (linha-) – Sensibilidade a todos os antimicrobianos testados; AMP - Ampicillin; AMP/SUL - Ampicilina-sulbactam; PPT - Piperacilina-tazobactam; CFU - Cefuroxima; CFO - Cefoxitina; CFX - Ceftriaxona; CTZ - Ceftazidima; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amicacina; GEN - Gentamicina; CIP - Ciprofloxacina; CFL - Cefalotina; (int) - Intermediário; neg - negativo; MDR - Multidroga Resistente; XDR – Extensivamente resistente a drogas; MDR – resistente a ≥ 1 agente em ≥ 3 categorias antimicrobianas; não-MDR, sensível a todas as classes testadas ou resistente a apenas uma ou duas categorias de Drogas antimicrobianas; XDR, resistente a ≥ 1 agentes em todas as categorias exceto uma ou duas categorias antimicrobianas; *bla*_{OXA-10-like} – gene *bla*_{OXA-10} confirmado por PCR, mas não confirmada a variante derivada pelo sequenciamento de Sanger; *bla*_{OXA-10} – a presença do gene *bla*_{OXA-10} foi confirmada por PCR e sequenciamento de Sanger

Perfil genotípica de virulência

Os genes *mrpG*, *pmfA*, *ucaA* (adesinas fimbriais), *pstS* (transporte de fosfato), *nrpG* e *pbtA* (sideróforos), foram encontrados em isolados portadores e não portadores de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, mas com frequência diferente. Os genes *mrpG*, *pmfA* e *pstS* foram encontrados em todos os 36 isolados analisados, seguidos por *ucaA* (n = 21/58,3%), *nrpG* (n = 16/44,4%) e *pbtA* (n = 21/58,3%). Os genes que codificam sideróforos (*nrpG* e *pbtA*) foram encontrados concomitantemente em oito dos 21 isolados de amostras de urina, ocorrendo principalmente em isolados não *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (**Tabelas 4 e 5**), e em apenas um isolado que carregava o gene *bla_{KPC}*.

Os isolados carreadores *bla_{NDM-1}* ou *bla_{KPC-2}* apresentaram menor ocorrência de genes responsáveis pela síntese de adesinas e sideróforos (*ucaA*: n = 8/44,4%, *pbtA*: n = 10/55,5% e *nrpG*: n = 2/11,1 %), quando comparado ao grupo não portador (*ucaA*: n = 13/72%, *pbtA*: n = 11/61% e *nrpG*: n = 14/77%). Além disso, no grupo portador *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}*, a ocorrência de isolados com cinco ou mais genes de virulência foi menor em comparação com os grupos não portadores *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}* (**Gráfico 2**).

Gráfico 2 - Distribuição de *Proteus mirabilis* de acordo com o perfil de virulência para o grupo de isolados carreadores dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* (CNK) e o grupo de isolados não-carreadores dos genes de *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* (NCNK).



Fonte: A autora (2021)

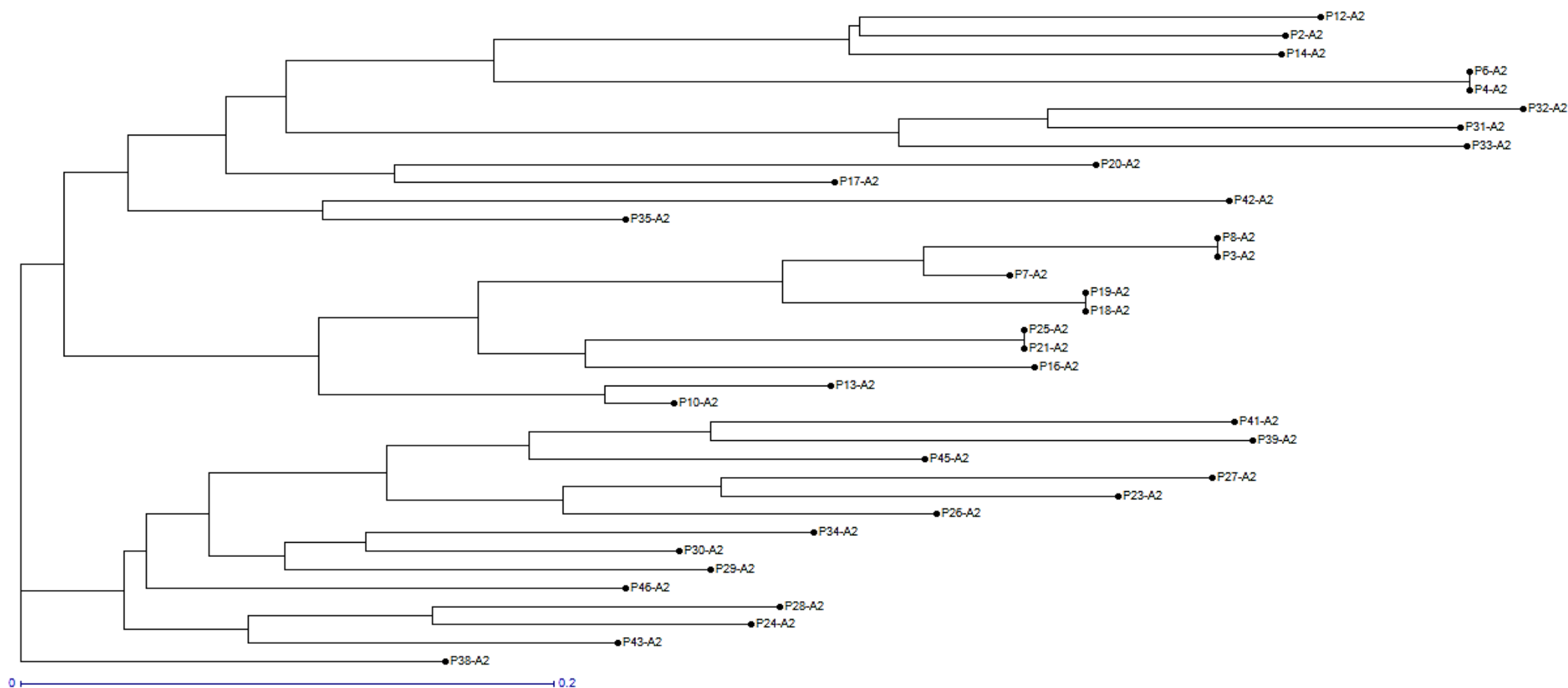
V – Perfil de virulência

Os isolados portadores de *bla*_{OXA-10} apresentaram percentuais de menor virulência dos genes *ucaA* (n= 7/38,8%), *pbtA* (n= 7/38,8%) e *nrpG* (n= 5/27,7%), quando comparados a *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} isolados de portadores (**Tabelas 4 e 5**).

ERIC-PCR

Trinta e dois perfis genéticos diferentes foram detectados por ERIC-PCR entre os 36 isolados de *P. mirabilis* analisados neste estudo (**Figura 1**). Apenas quatro perfis incluíram dois isolados: E2 (P3-A2 e P8-A2), E3 (P4-A2 e P6-A2), E11 (P18-A2 e P19-A2) e E13 (P21-A2 e P25-A2). Esses isolados com o mesmo perfil clonal vieram de diferentes setores, amostras biológicas e diferentes padrões de resistência e virulência (**Tabelas 4 e 5**).

Figure 1 - Dendrograma do perfil genético dos isolados de *Proteus mirabilis*. Análise de cluster por ERIC-PCR usando o coeficiente de similaridade de Jaccard e o método de cluster Weighted Neighbour-Joining. A escala indica a porcentagem da distância genética.



Fonte: A autora (2021)

Discussão

Proteus mirabilis é um dos principais patógenos causadores de ITUs graves, principalmente em pacientes que usam cateter por muito tempo. No entanto, estudos sobre fatores de virulência importantes para o estabelecimento da infecção no hospedeiro e sobre resistência aos antimicrobianos ainda são limitados (FIRMO *et al.*, 2020; MARQUES *et al.*, 2019b; PILATO *et al.*, 2016). Os genes *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{OXA}* são relatados com menos frequência em *P. mirabilis* em comparação com *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (OLIVEIRA *et al.*, 2021; GIRLICH *et al.*, 2015; SCAVUZZI *et al.*, 2019). No presente estudo, não foram encontrados isolados co-portadores de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. No entanto, em outro estudo recente realizado no Brasil, isolados de *P. mirabilis* e *K. pneumoniae*, co-carregavam os dois genes (FIRMO *et al.*, 2020). Em relação ao *bla_{OXA-10}*, até onde sabemos, este é o primeiro relato da presença desse gene em *P. mirabilis* no Brasil. O *bla_{OXA-10}* em *Proteus* já foi relatado na China (XIAO *et al.*, 2019), Suíça (POIREL *et al.*, 2011), Itália (BITAR *et al.*, 2020) e Grécia (GALANI *et al.*, 2012). Pela primeira vez, cepas de *P. mirabilis* co-portadoras de *bla_{OXA-10}* e *bla_{KPC}*. A presença de *P. mirabilis* portador de *bla_{OXA-10}* é preocupante porque este gene codifica uma ESBL que hidrolisa oxiiimino-cefalosporinas e em menor grau imipenem. Além disso, a presença de genes para carbapenemase em isolados de *P. mirabilis* portadores de *bla_{OXA-10}* limita as opções terapêuticas existentes.

Com relação a diversidade genética pela ERIC, foram encontrados 32 perfis clonais distintos, de um total de 36 isolados analisados. Diversos isolados apresentaram perfil de virulência e resistência semelhante, mesmo pertencendo a agrupamentos clonais diferentes. Por outro lado, os grupos clonais compartilhados por mais isolados possuíam características de resistência e virulência diferentes. Isso sugere que algumas características podem ter surgido pela aquisição de plasmídeos, mutação ou outros mecanismos genéticos (OLIVEIRA *et al.*, 2021b). Como observado neste estudo, a disseminação multiclonal, pode favorecer a sobrevivência e persistência dessa bactéria no ambiente hospitalar, colonizando e causando infecções nos pacientes. Adicionalmente, a variabilidade clonal destas cepas pode dificultar as medidas terapêuticas empregadas pelos profissionais de saúde, como terapias empíricas, mesmo que a implementação da Comissão de Controle Infecção Hospitalar (CCIH) seja eficiente. Como já mencionado no presente estudo, isolados de *P. mirabilis* foram encontrados causando infecções urinárias no mesmo paciente em épocas distintas. Traçar o perfil microbiológico e de

resistência de *P. mirabilis* não é tarefa fácil comparado aos demais patógenos causadores de infecções, como *Klebsiella pneumoniae* ou *Klebsiella aerogenes*, que sabidamente possuem o gene *bla_{KPC}* amplamente disseminado nesses dois patógenos (CABRAL *et al.*, 2017; FIRMO *et al.*, 2020). Contudo, ainda não está completamente elucidado como ocorre a associação entre fatores de virulência e a presença de importantes genes de resistência em isolados de *P. mirabilis*.

Todos os isolados investigados carregavam os genes *mrpG* e *pmfA*, pertencentes aos operons dos genes *mrp* e *pmf* em *P. mirabilis*, e parecem ser intrínsecos a este patógeno. O mesmo foi observado em estudo recente no Irã, em que todos os isolados de *P. mirabilis* analisados possuíam os genes *mrpH*, *mrpA* e *pmfA* (OLIVEIRA *et al.*, 2021b). No Brasil, em linhagens de *P. mirabilis*, isoladas de carcaças de frango, a presença dos genes *mrpA* e *pmfA* também foi observada em 100% dos isolados (SANCHES *et al.*, 2019). A presença desses genes em *Proteus*, pode justificar a alta capacidade de produção de biofilme por este patógeno, uma vez que as adesinas fimbriais codificadas por esses genes têm a capacidade de se fixar nas células do hospedeiro no início da formação do biofilme (MIRZAEI *et al.*, 2019a).

O gene *ucaA* (adesina fimbrial UCA) foi encontrado em 70% dos isolados de *P. mirabilis* no presente estudo e encontrado com menor frequência quando comparado aos outros genes para adesinas fimbriais investigados aqui. Percentuais mais elevados foram encontrados por Mirzaei (MIRZAEI *et al.*, 2019b), no Irã, que observou que 95,5% dos isolados de *P. mirabilis* eram portadores de *ucaA*. As cepas de *P. mirabilis* portadoras do gene *ucaA* têm uma capacidade aumentada de colonizar os rins devido às propriedades adesivas do material fimbrial associado a este gene (PELLEGRINO *et al.*, 2013). Kuan, relataram a presença e importância do gene *ucaA* na expressão de adesão às células epiteliais, principalmente nos rins e bexiga, estando ligada à formação de biofilme em *P. mirabilis* devido à capacidade da célula bacteriana. adesão celular, às células do hospedeiro e cateter urinário nas vias urinárias (KUAN *et al.*, 2014). Outros estudos relataram a presença simultânea de vários tipos de fímbrias em *P. mirabilis*, incluindo *pmf*, *uca* e *mrp*, observando que as fímbrias de *P. mirabilis* têm um papel distinto na geração de biofilme (OLIVEIRA *et al.*, 2021c; SCAVONE *et al.*, 2016b).

A expressão do operon gênico para yersiniabactina (*nrp*) e proteobactina (*pbt*) em *Proteus* é o mecanismo que atua na produção de sideróforos, capturando o ferro no meio extracelular e transportando-o para dentro da célula bacteriana. Até então, o único estudo anterior que investigou a presença dos genes *nrp* e *pbt* determinou que dez isolados de *P.*

mirabilis causando ITU carregavam esses dois genes, enquanto em infecções não ITU apenas 50% dos isolados tinham ambos os genes (KUAN *et al.*, 2014). No presente estudo, determinamos que cerca da metade dos isolados de *P. mirabilis* da UTI carregavam esses dois genes responsáveis pela produção de sideróforos, essenciais para a captação de ferro e estabelecimento de infecções urinárias por *Proteus*, em ambientes com limitação de ferro.

Além disso, o gene *pstS* foi encontrado em todos os isolados em nosso estudo. O fósforo, um elemento essencial para a vida, é mais frequentemente incorporado como fosfato inorgânico. A detecção e absorção de fosfato tem sido associada à virulência em muitas espécies bacterianas, incluindo *P. mirabilis* (ARMBRUSTER; MOBLEY; PEARSON, 2018; HIMPSL *et al.*, 2011). Como resultado, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA* e *pstS* detectados simultaneamente em alguns isolados portadores de *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}* representam uma ameaça aos pacientes imunossuprimidos e também aos hospitalizados e, portanto, reduzem as opções terapêuticas existentes.

Inesperadamente, *P. mirabilis* não portador de *bla_{KPC}* e o *bla_{NDM}* acumularam mais fatores de virulência, contendo cinco ou mais genes de virulência, quando comparados ao grupo de portadores de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* neste estudo. A aquisição de genes que determinam a resistência antimicrobiana geralmente tem um custo biológico na fisiologia bacteriana que pode ser observado em algumas espécies, como *Campylobacter jejuni* (LAPIERRE *et al.*, 2016), portanto isolados suscetíveis a antimicrobianos podem albergar mais genes de virulência em conjunto (LAMARCHE *et al.*, 2008). Por outro lado, para patógenos importantes, como *K. pneumoniae* e *Klebsiella variicola* a associação entre resistência a antimicrobianos e determinantes de virulência é convergente, cepas multidroga resistentes podem também ser hipervirulentas (MELO *et al.*, 2014; MORALES-LEÓN *et al.*, 2021). Embora os isolados com *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* analisados neste estudo tenham menos fatores de virulência, comparados ao grupo não portador, eles apresentaram fatores importantes, como *pbtA* e *nrpG*, que são sideróforos que ajudam no estabelecimento de infecções.

A alta diversidade genética de *P. mirabilis* somada à presença de fatores de virulência amplamente disseminados neste patógeno podem implicar no estabelecimento de infecções graves no hospedeiro. Esse patógeno, que pertence à microbiota intestinal humana, pode eventualmente infectar outros locais e causar infecções. Nós observamos neste estudo que isolados não carregadores de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* eram mais frequentes em pacientes com mais de 60 anos quando comparados ao outro grupo. Embora isolados

suscetíveis a antimicrobianos tenham mais fatores de virulência em conjunto, esses fatores podem proteger o microrganismo da ação do sistema imunológico do hospedeiro (LAPIERRE *et al.*, 2016), especialmente se o paciente for imunocomprometido. Apesar dos isolados possuírem mais fatores de virulência em conjunto no grupo não carreador de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} a resistência a antimicrobianos foi menor, mesmo assim, os pacientes nesse grupo fizeram uso de cinco ou mais antimicrobianos com maior frequência que o grupo carreador de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. A patogenicidade desses isolados pode estar relacionada a presença desses fatores de virulência, juntamente com a idade acima de 60 anos o que pode implicar na baixa imunidade do hospedeiro a esses patógenos, isso pode sugerir que bactérias com tais fatores de virulência, independente da resistência antimicrobiana, têm facilidade de causar infecções graves em pacientes com idade acima de 60 anos. E conseqüentemente, dificultar o tratamento dessas infecções.

Conclusão

Um dos achados mais relevantes deste estudo foi o fato de isolados clínicos de *P. mirabilis*, além de multidrogas resistentes (portadores dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} e *bla*_{OXA-10}), apresentarem fatores de virulência eficientes. para o estabelecimento de infecção fora do trato gastrointestinal. Além disso, outro fato relevante foi o fato inesperado de isolados menos resistentes terem mais genes de virulência do que isolados mais resistentes, indicando também o potencial desses isolados, que não possuem os genes *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}, de causar infecção. Inesperadamente, os genes *mrpG*, *pmfA* e *pstS* parecem ser intrínsecos a *P. mirabilis*, uma vez que observamos esses genes de forma unânime em todos os isolados. Uma vez que *P. mirabilis* é um patógeno emergente e frequentemente esquecido, a presença de importantes fatores de resistência e virulência nesse patógeno é alarmante e demonstra a necessidade de estudos epidemiológicos adicionais e monitoramento frequente desse organismo.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

Aprovação ética

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP / Plataforma Brasil) e parecer nº 3.007.636.

REFERÊNCIAS

- ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016a. v. 66, n. 12, p. 5575–5599.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, Harry L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, 2018. v. 8, n. 1.
- BACHMAN, M. A. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. **Infection and Immunity**, 2011. v. 79, n. 8, p. 3309–3316.
- BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2002a. v. 50, n. 1, p. 11–18.
- BITAR, I. *et al.* Complete genome and plasmids sequences of a clinical *proteus mirabilis* isolate producing plasmid mediated ndm-1 from Italy. **Microorganisms**, 2020a. v. 8, n. 3, p. 1–7.
- 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**, 2012. v. 45, n. 5, p. 572–578.
- CABRAL, Adriane Borges *et al.* KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015a. v. 48, n. 1, p. 94–95. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0152-2014>>.
- 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**, 2014. v. 69, n. 6, p. 824–831.
- CUNHA, B. A.; BARON, J.; CUNHA, C. B. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 2017a. v. 15, n. 3, p. 257–267. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1268529>>.
- DANILO DE OLIVEIRA, W. *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, 1 Mar. 2021a. v. 152.

DONG, Dandan *et al.* Characterization of a NDM-1- Encoding Plasmid pHFK418-NDM From a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Harboring Two Novel Transposons, Tn6624 and Tn6625. **Frontiers in Microbiology**, 2019a. v. 10, n. September, p. 1–10.

DUAN, H. *et al.* Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, Jul. 2009. v. 109, n. 5, p. 511–517.

FIRMO, E. F. *et al.* Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020. v. 21, p. 255–261.

GALANI, I. *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek University Hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, 2012. v. 18, n. 3, p. E52–E54. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03738.x>>.

GALES, Ana C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2003a. v. 52, n. 4, p. 699–702.

GIRLICH, D. *et al.* Integration of the blandm-1 carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2015a. v. 70, n. 1, p. 98–102.

HALL, T. **BioEdit software**. Disponível em: <bioedit.software.informer.com>.

HIMPSL, S. D. *et al.* Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. 2011. . Acesso em: 16 oct. 2016.

KUAN, L. *et al.* Characterization of 17 chaperone-usheer fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. **Journal of Medical Microbiology**, 2014. v. 63, n. PART 7, p. 911–922.

LAMARCHE, M. G. *et al.* The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, 2008. v. 32, n. 3, p. 461–473.

LAPIERRE, L. *et al.* Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. **Microbial Drug Resistance**, 1 Jul. 2016. v. 22, n. 5, p. 432–444.

LAZAR JR, I.; HORVATH-LAZAR, E. **GelAnalyzer**. Disponível em: <<http://www.gelanalyzer.com/index.html>>.

MARQUES, C. *et al.* Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans. **Veterinary Microbiology**, 1 Jan. 2019. v. 228, p. 77–82.

- MATASEJE, L. F. *et al.* Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2012. v. 67, n. 6, p. 1359–1367.
- MIRZAEI, A. *et al.* Characterization of antibiotic-susceptibility patterns, virulence factor profiles and clonal relatedness in proteus mirabilis isolates from patients with urinary tract infection in Iran. **Infection and Drug Resistance**, 2019a. v. 12, p. 3967–3979.
- MORALES-LEÓN, F. *et al.* Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum β -lactamase-producing Klebsiella pneumoniae and Klebsiella variicola in Chile. **Virulence**, 2021. v. 12, n. 1, p. 35–44.
- PELLEGRINO, R. *et al.* Proteus mirabilis uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **Pathogens and Disease**, Mar. 2013. v. 67, n. 2, p. 104–107.
- PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. **DARwin software**. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr/>>.
- PILATO, V. Di *et al.* Complete Genome Sequence of the First KPC-Type Carbapenemase- Positive Proteus mirabilis Strain from a Bloodstream Infection. 2016. v. 4, n. 3, p. e00607-16.
- Poirel, L.; HÉRITIER, Clair; *et al.* Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebs. pneu. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004. v. 48, n. 1, p. 15–22.
- Poirel, L.; Nordmann, P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene blaOXA-58 in Acinetobacter baumannii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Apr. 2006b. v. 50, n. 4, p. 1442–1448.
- RAMOS, A. C. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant proteus mirabilis clones carrying a novel integron-borne bla IMP-1 in a tertiary hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2018. v. 62, n. 2, p. 1–5.
- RANJBAR, R.; ZAYERI, S.; MIRZAEI, A. Development of multiplex PCR for rapid detection of metallo- β -lactamase genes in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. **Iranian Journal of Microbiology**, 2020. v. 12, n. 2, p. 107–112.
- SANCHES, M. S. *et al.* Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of Proteus mirabilis isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. **Brazilian Journal of Microbiology**, 1 Jul. 2019. v. 50, n. 3, p. 685–694.
- SANGER, F. *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature**, 1977. v. 265, n. 5596, p. 687–695.
- SCAVONE, P. *et al.* Fimbriae have distinguishable roles in Proteus mirabilis biofilm formation. **Pathogens and Disease**, 2016a. v. 74, n. 5, p. 1–9.
- SCAVUZZI, A. M. L. *et al.* Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboring Pseudomonas aeruginosa isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019. v. 19, n. 19, p. 181–182.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections . **Microbiology Spectrum**, 4 Sep. 2015b. v. 3, n. 5.

SHANMUGAM, P.; MEENAKSHISUNDARAM, J.; JAYARAMAN, P. *BlaKPC* gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2013a. v. 7, n. 12, p. 2736–2738.

XIAO, T. *et al* Distribution and characteristic of SGI1/PGI2 genomic island from *Proteus* strain in China. **Infection, genetics and Evolution**. 2019, v. 70, p. 123-130.

Artigo 2: Primeiro relato de *bla*_{GES-1} em isolados clínicos de *Proteus mirabilis*

Artigo Publicado na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.

Qualis B1

Introdução

Proteus spp. são bacilos gram-negativos pertencentes à ordem *Enterobacterales*. O gênero contém seis espécies: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus cibarius*, *Proteus penneri* e *Proteus hauseri*. *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. penneri* são comumente descritos como patógenos oportunistas (GIRLICH, *et al.* 2020). As cepas de *Proteus* com resistência moderada ao imipenem são frequentes, com evidências de que essa resistência se deve a alterações na proteína de ligação à penicilina (PBP2). Além disso, *Proteus* pode adquirir resistência a vários grupos antimicrobianos por causa da presença de genes de resistência, como *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{ACC-1}, *bla*_{FOX}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{VEB-6}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} (GIRLICH, *et al.* 2020).

Proteus mirabilis é uma bactéria frequentemente associada a infecções do trato urinário (ITU), principalmente em pacientes que usam cateter urinário há muito tempo. Além disso, apresenta resistência intrínseca às polimixinas, nitrofurantoína e tigeciclina, o que dificulta o tratamento das infecções por essa bactéria (CUNHA, *et al.* 2017). Nesse contexto, as infecções por *P. mirabilis* que apresentam resistência adquirida aos beta-lactâmicos são consideradas questões desafiadoras para a terapia antimicrobiana.

As beta-lactamases de espectro estendido de classe A (ESBL) são determinantes da resistência adquirida com alto impacto clínico (BALLABEN, *et al.* 2019). O surgimento de ESBLs, como o GES, tornou-se um problema emergente de saúde pública, junto com os carbapenemases NDM e KPC. GES confere resistência a todas as cefalosporinas de espectro estendido e impacta adversamente a eficiência da ceftazidima, e KPC e NDM para todos os beta-lactâmicos.

A literatura atual descreve a presença de *bla*_{GES} em várias espécies bacterianas e em vários países distribuídos em todos os continentes. No entanto, a presença desse gene em *Proteus* não foi exaustivamente investigada. Pesquisamos bancos de dados mundiais (Pubmed/NCBI, Scielo, Google acadêmico e sequências de nucleotídeos depositadas na plataforma Nucleotide/NCBI) para manuscritos que relataram a presença de isolados de

Proteus carregando *bla*_{GES} (palavras-chave para as pesquisas: “*Proteus*” e “*bla*_{GES},” “*Proteus*” e “GES”, “*Proteus mirabilis*” e “*bla*_{GES}”). Inesperadamente, nenhum dos manuscritos relatou a presença de *bla*_{GES} em *P. mirabilis* ou em qualquer espécie pertencente ao gênero *Proteus*. Até onde sabemos, este é o primeiro relato de caso de um isolado de *P. mirabilis* portador de *bla*_{GES}.

Relato de caso

Foram analisadas três cepas bacterianas isoladas de três pacientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil. O primeiro isolado (P5-A2) foi obtido de uma paciente com infecção urinária internada na clínica cirúrgica. O segundo isolado (P15-A2) foi obtido de uma paciente com infecção do trato urinário admitida no departamento de cardiologia. O terceiro isolado (P44-A2) foi obtido de uma paciente do sexo feminino com amostra coletada da ponta do cateter, internada na unidade de terapia intensiva (UTI).

A identificação bioquímica e susceptibilidade às diferentes classes de antimicrobianos foram realizadas por meio do sistema automatizado Phoenix-BD™. A interpretação da suscetibilidade foi realizada de acordo com o BrCast (BrCast, 2017). A presença de *bla*_{GES}, *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} foi determinada por PCR usando primers específicos⁵. Os produtos de PCR foram sequenciados por sequenciamento de Sanger. As sequências de nucleotídeos foram analisadas utilizando BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.ebi.ac.uk/>) e Bioedit v7. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso: MW527065 e MW554921.

Os três isolados apresentaram multirresistência e indicação fenotípica para produção de ESBL e/ou carbapenemases, apresentando resistência a diversos antimicrobianos (**Tabela 1**). Apenas o isolado P44-A2 apresentou resistência aos carbapenêmicos, imipenem e meropenem (**Tabela 1**). A análise de sequenciamento revelou a presença de variante *bla*_{GES-1} nos três isolados (P5-A2, P15-A2 e P44-A2). Além da presença do *bla*_{GES-1}, também identificamos a presença dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} nos isolados P15-A2 e P44-A2, respectivamente.

Tabela 1 - Perfil de isolados de *Proteus mirabilis* analisados no estudo.

Id.	Data da colheita (dd/mm/aaaa)	Setor	Amostra clínica	Perfil de resistência
P5-A2	24/08/2017	Clínica Cirúrgica	Urina	Amoxicilina-clavulanato (MIC>16/8) Ampicilina (MIC>16) Aztreonam Cefalotina (MIC>16) Cefepime (MIC>16) Ceftazidima Ceftriaxona (MIC>32) Cefuroxima (MIC>16) Ciprofloxacina (MIC>2) Gentamicina (MIC>8) Levofloxacina (MIC>4) Trimetoprim-sulfametoxazol (MIC>4/76)
P15-A2	05/01/2017	Cardiologia	Urina	Amicacin (MIC>32) Amoxicilina-clavulanate (MIC>16/8) Ampicilina (MIC>16) Aztreonam Cefalotina (MIC>16) Cefepime (MIC>16) Ceftazidima Ceftriaxona (MIC=6) Cefuroxima (MIC>16) Ciprofloxacina (MIC>2) Levofloxacina (MIC>4) Nitrofurantoina (MIC>64) Piperacilina-tazobactam (MIC>64/4) Trimetroprim-sulfamethoxazol (MIC>4/76)
P44-A2	03/05/2018	UTI	Ponta de cateter	Amicacina (MIC=32) Amoxicilina-clavulanate (MIC>16/8) Ampicilina (MIC>16) Aztreonam Cefepime (MIC>16) Cefoxitina (MIC>16) Ceftazidima (MIC>16) Ceftriaxona (MIC>32) Cefuroxima (MIC>16) Ciprofloxacina (MIC>2) Gentamicina (MIC>8) Imipenem (MIC>8) Levofloxacina (MIC>4) Meropenem (MIC=8) Nitrofurantoina (MIC>64) Piperacillin-tazobactam (MIC>64/4) Trimetoprim-sulfametoxazol (MIC>4/76)

Fonte: A autora (2021)

UTI – Unidade de Terapia Intensiva; MIC: Concentração Inibitória Mínima; Id: identificação

Discussão

A presença de genes de resistência importantes ocorre com menor frequência em *Proteus* (RAMOS, *et al.* 2017), visto que há poucos relatos de β -lactamases nesta espécie quando comparada a outras espécies da ordem *Enterobacterales*. No entanto, a presença de ESBL em *Proteus* foi mais frequente (POIREL, *et al.* 2000).

As enzimas GES foram inicialmente descritas em *K. pneumoniae* na França usando um swab retal de uma menina de um mês que foi hospitalizada na Guiana Francesa (POIREL, *et al.* 2000). Desde então, o *bla*_{GES} foi relatado em várias espécies e diversos países, incluindo o Brasil, mais frequentemente em bacilos não fermentadores como *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e enterobactérias como *K. pneumoniae* (RÍOS, *et al.* 2018; HAFA, *et al.* 2019; YAMASAKI, *et al.* 2016). GES faz parte de um grupo de ESBL e carbapenemases, compreendendo 49 variantes (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES>) que foram encontradas em várias espécies de bactérias gram-negativas (BALLABEN, *et al.* 2019). Nos três isolados investigados, foi observado um valor de concentração inibitória mínima (CIM) superior a 16 para ceftazidima. GES-1 pode hidrolisar aztreonam, amoxicilina e principalmente ceftazidima com valor MIC muito elevado (MIC = 4 a MIC = 128) (POIREL, *et al.* 2000).

Os genes investigados no presente estudo foram obtidos do genoma bacteriano e podem conter plasmídeos ainda não identificados. *bla*_{GES} é constantemente encontrado em plasmídeos, mas pode estar presente no cromossomo e em plasmídeos conjugativos ou não conjugativos, como IncP, ColE1, IncQ e IncF, bem como em plasmídeos não tipificáveis (DANG, *et al.* 2016; IRRGANG, *et al.* 2020).

A presença de *P. mirabilis* carregando *bla*_{GES-1} é preocupante, pois esse gene codifica a enzima ESBL e apresenta resistência a uma ampla gama de β -lactâmicos, como resistência à cefalosporinas de 3ª geração (ceftazidima, cefotaxima, cefoxitina) e 4ª geração (cefepime) e monobactâmico (Aztreonam) (PAL, *et al.* 2016). Além disso, dentro do gênero *Proteus*, não há relatos desse patógeno portador de *bla*_{GES}. Esses dados enfatizam a importância do monitoramento e vigilância de todas as enterobactérias. A circulação de cepas de *P. mirabilis* portadoras de *bla*_{GES-1} constitui um novo cenário de resistência dessa espécie e deve ser um alerta epidemiológico para a saúde global.

Aprovação ética

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP/Plataforma Brasil) e parecer nº 3.007.636

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- BALLABEN A. *et al.* Plasmid carrying *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{GES-1} in extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cerebrospinal fluid. **Antimicrob Agents Chemother.** 2019;63(7):e00186-19. DOI:10.1128/AAC.00186-19.
- BrCAST; Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2017. Disponível em: <http://brcast.org.br/>.
- DANG B.; MAO D.; LUO Y. Complete Nucleotide Sequence of IncP-1 β Plasmid pDTC28 Reveals a Non-Functional Variant of the *bla*_{GES}-Type Gene. **PLoS ONE.** 2016;11(5):e0154975. DOI:10.1371/ journal.pone.0154975.
- GIRLICH D. *et al.* Genetics of acquired antibiotic resistance genes in *Proteus spp.* **Front. Microbiol.** 2020;11:256. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00256.
- CUNHA A.; BARON J.; CUNHA C. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2017;15(3):257–67. DOI: 10.1080;14787210.2017.1268529.
- HAFA H. *et al.* Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*_{GES}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-23} in Morocco. **Germes.** 2019;9(3):133–41. DOI: 10.18683/germs.2019.1168.
- IRRGANG A. *et al.* First Detection of GES-5-Producing *Escherichia coli* from Livestock—An Increasing Diversity of Carbapenemases Recognized from German Pig Production Microorganisms. 2020;8(10):1593. DOI:10.3390/microorganisms8101593.
- PAL N. *et al.* Phenotypic detection and antibiogram of β -lactamase-producing *Proteus* species in a tertiary care Hospital, India. **Ann Med Health Sci Res.** 2016;6(5):267–73. DOI: 10.4103/amhsr.amhsr_413_15.
- POIREL L. *et al.* Biochemical Sequence analyses of GES-1, a novel Class A Extended-Spectrum β -lactamase, and the Class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2000;44(3):622–32. DOI:10.1128/aac.44.3.622-632.2000.
- RAMOS A. *et al.* Dissemination of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Clones Carrying a Novel Integron-Borne *bla*_{IMP-1} in a Tertiary Hospital. **JAC Antimicrob Resist.** 2017;62:e01321-17. DOI: 10.1128/AAC.01321-17.
- RÍOS P. *et al.* Extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* identified in Lima, Peru co-expressing a VIM-2 metallo- β -lactamase, OXA-1 β -lactamase and GES-1 extended-spectrum β -lactamase. **JMM Case Reports** 2018;5(7):e005154. DOI: 10.1099/jmmcr.0.005154.
- SCAVUZZI A. *et al.* Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2} harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist.** 2019;13(6):612-32. DOI: DOI:10.1016/j.jgar.2019.09.009.

YAMASAKI K. *et al.* Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing *bla*_{GES-4} carbapenemase at a Japanese hospital. **J Infect Chemother**. 2016;26(1):40-4. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.09.006.

Artigo 3: *Proteus mirabilis* portador de NTE_{KPC-IIId}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{OXA-10}, *aph*(3')-VI, *qnrD1* e plasmídeos *IncQ* e *Col3M* proveniente de paciente internado em hospital de Recife-PE, Brasil

Artigo será submetido a revista Research, Society and Development- A3

Resumo

Entre as espécies bacterianas envolvidas em IRAS, há destaque para *P. mirabilis*, uma bactéria gram-negativa comumente causadora de infecções do trato urinário, infecções de corrente sanguínea e tecido, com altos níveis de resistência às diferentes classes de fármacos, inclusive aos carbapenêmicos. Assim, este estudo teve por objetivo caracterizar aspectos clínicos de um paciente com infecção por duas cepas de *P. mirabilis* e a presença de determinantes de resistência nos dois isolados provenientes de um paciente de um hospital público de Recife-PE, Brasil. O DNA total dos isolados foi extraído e submetido a PCR e sequenciamento dos amplicons para a investigação de genes de resistência, *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *blgES*, *bla*_{NDM} e *qnrD*, *aac*(6')-Ib). O isolado P21-A2 albergava os genes *aac*(6')-Ib, *bla*_{OXA-10} e *qnrD*. Um dos isolados, P20-A2, foi selecionado para o sequenciamento do DNA plasmidial por albergar os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}. Os resultados mostraram que o paciente desenvolveu diversas infecções por vários patógenos incluindo duas cepas de *P. mirabilis*. O paciente ficou internado por 103 dias, teve choque séptico de foco cutâneo, abdominal, pulmonar e úlcera, e veio a óbito. O isolado P20-A2 albergava os genes *bla*_{NDM}, *qnrD*, *aph*(3')-VI, *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA-10}, e os plasmídeos *IncQ* e *Col3M*, juntamente com NTE_{KPC-IIId}. Este é o primeiro relato de *P. mirabilis* albergando NTE_{KPC-IIId}. Apesar de *P. mirabilis* estar se destacando como causador de infecções nosocomiais e patógeno multidroga resistente, esta espécie ainda é negligência, a emergência desses isolados de *P. mirabilis* albergando determinantes de resistência antes mencionados e os plasmídeos *IncQ* e *Col3M* demonstra o potencial de disseminação de importantes genes de resistência, principalmente em se tratando de *P. mirabilis*. A alta patogenicidade desse microrganismo pode implicar no estabelecimento de infecções graves, como o desse paciente. Esse patógeno que pertence à microbiota intestinal humana, pode eventualmente infectar outros locais e causar infecções.

Palavras-chave: *Proteus mirabilis*; NTE_{KPC-IIId}; *IncQ*; *Col3M* plasmídeo; patogenicidade

Introdução

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) continuam sendo motivo de grande preocupação aos órgãos públicos de vigilância epidemiológica, devido ao aumento da resistência aos antimicrobianos, principalmente devido à disseminação plasmidial de genes de resistência, juntamente com a disseminação de patógenos oportunistas, como *Proteus mirabilis*. Suas consequências estão associadas ao aumento na morbimortalidade, o aumento no tempo de internação dos pacientes, bem como o aumento da pressão seletiva (Cantón *et al.*, 2002; Del Franco *et al.*, 2015).

O gênero *Proteus* contém seis espécies conhecidas: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus cibarius*, *Proteus penneri* e *Proteus hauseri*. Sendo *P. mirabilis*, *P. vulgaris* e *P. penneri* são comumente descritas como patógenos oportunistas (BELTRÃO, E. M. B.; OLIVEIRA, É. M. DE; LOPES, A. C. D. S., 2021; GIRLICH *et al.*, 2020). *Proteus mirabilis* é um bacilo gram-negativo pertencente a ordem *Enterobacterales* (Oliveira *et al.*, 2021). Este patógeno é frequentemente relatado causando Infecções de Trato Urinário (ITU), principalmente em pacientes fazendo uso prolongado de cateteres e sondas vesicais de demora. Em adicional, *P. mirabilis* possui resistência intrínseca a tigeciclina, nitrofurantoína, polimixinas e tetraciclina (Beltrão *et al.*, 2020; Cunha *et al.*, 2017). E possui susceptibilidade reduzida ao imipenem (BONTRON *et al.*, 2019). Essa característica de resistência intrínseca somada a transferência horizontal de genes através da disseminação plasmidial torna esse patógeno, agente de IRAS, motivo de grande preocupação. Destacando que *P. mirabilis* pertence a microbiota intestinal normal de humanos, e pode eventualmente migrar para outros tecidos e causar infecções graves. Nesse contexto, as infecções causadas por *P. mirabilis* que apresentam resistência aos beta-lactâmicos, principalmente devido aos genes *bla_{GES}*, *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}* são consideradas questões desafiadoras para terapia antimicrobiana (BELTRÃO, E. M. B.; OLIVEIRA, É. M.; LOPES, A. C. D. S., 2021).

Levando em consideração a importância de investigar os aspectos clínicos e microbiológicos de resistência de *P. mirabilis*, o presente estudo teve por objetivo caracterizar aspectos clínicos de um paciente com infecção por duas cepas de *P. mirabilis* em um hospital público de Recife em 2018, e a presença de determinantes de resistência aos carbapenêmicos e quinolonas.

Material e métodos

Foram selecionados dois isolados clínicos de *P. mirabilis* recuperados de um paciente internado em um hospital terciário de Recife-PE, Brasil. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados por sistema automatizado Phoenix-BD™ e os dados foram interpretados de acordo com CLSI, especificações de 2020. Esses dados foram citados em literatura anterior para os mesmos isolados (Beltrão *et al.*, 2021). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CEP / Plataforma Brasil) e parecer nº 3.007.636.

Para os testes de susceptibilidade foram testados os seguintes antimicrobianos: Amicacina, Amoxicilina-ácido clavulânico, Ampicilina; Aztreonam, Cefalotina, Cefepime, Cefoxitina, Ceftazidima, Ceftriaxona, Cefuroxima, Ciprofloxacina; Gentamicina, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Levofloxacina, Piperacilina-tazobactam e Sulfametaxazol-trimetoprim.

O DNA genômico dos isolados foi extraído usando o Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) e os genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM} e *qnrD*, *aac(6')-Ib* foram investigados por PCR. As condições de amplificação e os iniciadores utilizados foram apresentados na **Tabela 1**. Controles positivos e negativos foram incluídos em cada PCR.

Foi realizada a técnica Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR), para determinar o parentesco entre os dois isolados, P20-A2 e P21-A2. Foram utilizados iniciadores descritos na **Tabela 1**. Para as análises dos resultados da ERIC foram utilizados os programas GelAnalyzer e DARwin 6.0.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores para PCR que foram utilizados no estudo.

Genes	Sequência dos iniciadores	Tamanho fragmento	Temperatura de Anelamento	Ref.
<i>bla</i>_{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882pb	63°C	(YIGIT et al., 2001a)
<i>bla</i>_{GES}	ATCAGCCACCTCTCAATGG TAGCATCGGGACACATGAC	860pb	55°C	(BOYD et al., 2015)
<i>bla</i>_{NDM}	TGCCCAATATTATGCACCCGG CGAAACCCGGCATGTGCGAGA	621pb	60°C	(HUANG et al., 2017)
<i>bla</i>_{VIM}	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG AGGTGGGCCATTCAGCCAGA	ND	62°C	(CABRAL et al., 2012)
<i>bla</i>_{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTT CACT	232pb	60°C	(CABRAL et al., 2012)
<i>bla</i>_{SPM}	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	271pb	63°C	(GALES et al., 2003b)
<i>bla</i>_{OXA-10}	TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGAAAAACCAG	276pb	62°C	(BERT et al., 2002)
<i>bla</i>_{OXA-23}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCTCA	501pb	57°C	(RANJBAR; ZAYERI; MIRZAIIE, 2020)
<i>bla</i>_{OXA-48}	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	743pb	55°C	(POIREL et al., 2004)
<i>bla</i>_{OXA-58}	CGATCAGAATGTTCAAGCGC ACGATTCTCCCCTCTGCGC	800		(POIREL; NORDMANN, 2006b)
<i>qnrD</i>	CGAGATCAATTTACGGGGAATA AACAAGCTGAAGCGCCTG	500	61°C	(CAVACO et al., 2009)
<i>aac(6')-Ib</i>	CCCGCTTTCTCGTAGCA TATGAGTGGCTAAATCGAT	500pb	52°C	(FIRMO et al., 2020)
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	ND	36°C	DUAN <i>et al.</i> (2009)

Fonte: A autora (2021)

ND – Não determinado

Para a realização do sequenciamento do DNA plasmidial foi selecionado o isolado P20-A2 por albergar os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}.

O DNA plasmidial do isolado P20-A2 foi extraído utilizando o kit PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega) de acordo com especificações do fabricante. Os isolados foram caracterizados por sequenciamento Illumina MiSeq (bibliotecas Nextera XT).

Os dados foram processados para remover leituras de baixa qualidade usando a ferramenta Trimmomatic. Posteriormente, as leituras filtradas foram utilizadas para a montagem *de novo* aplicando a ferramenta Velvet, cujos parâmetros foram otimizados através do programa Velvet Optimiser. Os resultados do Velvet também foram usados como entrada para outro programa de montagem, CAP3, a fim de melhorar as montagens.

A predição e a anotação do gene foram realizadas usando o programa Prokka. As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando o software Artemis Sanger. Além disso, foram utilizadas as plataformas Resfinder e PlasmidFinder.

Resultados

Informações clínicas do paciente

Em dezembro de 2017, um homem de 43 anos foi internado para pré-operatório de cirurgia bariátrica. O paciente tinha obesidade grau III (216kg no momento da internação) com IMC de 71.4, crise hipertensiva, edema (portador de distúrbio restritivo), Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS) e depressão. Após 16 dias do internamento o paciente foi submetido a cirurgia de gastroplastia aberta em Y de Roux sob anestesia geral balanceada. O paciente fez uso de dreno de Blake em cavidade abdominal e meia elástica em membros inferiores. O tempo de internação foi de 103 dias. Após cirurgia o paciente teve diversas infecções bacterianas e veio a óbito. O motivo do óbito foi insuficiência pulmonar, choque séptico de foco cutâneo, abdominal, pulmonar e úlcera. Durante o internamento de 103 dias o paciente fez uso de meropenem, vancomicina, polimixina B, ampicilina, amicacina, daptomicina e anfotericina.

Perfil dos isolados de *Proteus mirabilis*

Uma amostra de tecido e uma amostra de secreção traqueal do paciente foram enviadas ao laboratório de microbiologia do hospital com um intervalo de 3 dias da colheita de ambas amostras. Foram recuperados dois isolados clínico de *P. mirabilis* (P20-A2 e P21-A2) multidroga resistente e possivelmente produtores de ESBL (**Tabela 2**). O isolado P20-A2 apresentou resistência a maioria dos antimicrobianos, incluindo cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, sulfonamidas, monobactâmicos, carbapenêmicos e quinolonas. O isolado P21-A2 diferiu por não possuir resistência aos carbapenêmicos (**Tabela 2**). Os isolados P20-A2 e P21-A2 não apresentaram relação clonal por Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR).

Tabela 2 - Perfil fenotípica de resistência e presença de genes de resistência investigados por PCR para os dois isolados de *Proteus mirabilis* (P20-A2 e P21-A2).

Id.	Data da colheita (dd/mm/aaaa)	Amostra de isolamento	Setor	Perfil de resistência		Genes de resistência
				Grupos antimicrobianos	Antimicrobianos (MIC)	
P20-A2	23/03/2018	Tecido	UTI	Aminoglicosídeos	Gentamicina (=8)(Int)	<i>aph(3')-VI</i> <i>bla_{OXA-10}</i> <i>bla_{KPC-2}</i> <i>bla_{NDM-1}</i> <i>qnrD1</i>
				Cefalosporinas	Cefepime (>16); Cefoxitina (>16); Ceftriaxona (>32); Ceftazidima (>16); Cefuroxima (>16)	
				Carbapenênicos	Imipenem (>8); Meropenem (=4); Ertapenem	
				Penicilinas	Ampicillin (>16); Amoxicillin-ácido clavulânico (>16/8); Piperacillin tazobactam (=64/4)(Int)	
				Quinolonas e fluoroquinolonas	Levofloxacin (>4); Ciprofloxacin (>2)	
P21-A2	25/03/2018	Secreção traqueal	UTI	Sulfonamida	Sulfamethoxazole-trimethoprim (>4/76)	<i>aac(6')-Ib</i> <i>bla_{OXA-10}</i> <i>qnrD1</i> <i>bla_{OXA-10}</i>
				Monobactâmico	Aztreonam	
				Aminoglicosídeos	Gentamicina (=8)(Int)	
				Cefalosporinas	Cefepime (>16); Ceftriaxona (>32); Ceftazidima; Cefuroxima (>16);	
				Penicilinas	Ampicillin (>16) Amoxicillin+clavulanic acid	
				Quinolones and fluoroquinolones	Levofloxacin (>4); Ciprofloxacin (>2)	
				Sulfonamida	Sulfamethoxazole-trimethoprim (>4/76)	
				Monobactâmico	Aztreonam	

Fonte: A autora (2021)

Id.- Identificação; UTI – Unidade de Terapia Intensiva, UCO – Unidade Coronaria; Int – intermediário;

Além de *P. mirabilis* o paciente também adquiriu infecções em diferentes sítios. Em líquido da cavidade abdominal foram isolados *Morganella morganii* e *Klebsiella pneumoniae*, secreção traqueal foram isolados *P. mirabilis* (P21-A2) e *Acinetobacter baumannii*, em hemocultura *Enterococcus faecalis*, em secreção de ferida *Morganella morganii* e em amostra de tecido *P. mirabilis* (P20-A2).

Análise do ambiente genético do gene *bla_{KPC}* e grupo de Incompatibilidade Plasmidial (Inc)

Os resultados do sequenciamento plasmidial mostrou que o isolado P20-A2 obteve teor de GC de 47,8%, com um total de 31.899 bases. Em resumo, todo o conteúdo sequenciado foi montado em 27 contigs, produzidos com cobertura de 333,0x. Foram obtidos 33 CDS (**Tabela 3**).

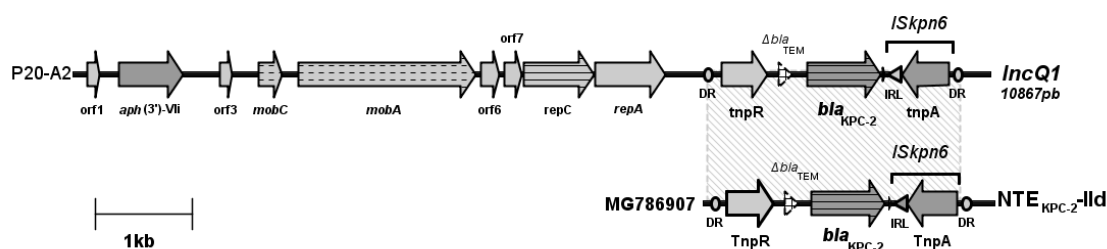
Tabela 3 - Caracterização do DNA plasmidial do isolado de *Proteus mirabilis* P20-A2

Isolado	P20-A2
Conteúdo GC	47,8%,
Tamanho sequencia do DNA plasmidial	31.899pb
Contigs	27
CDS	33
Plasmídeos encontrados	IncQ1 Col3M
Genes de Resistência	<i>bla</i> _{KPC-2} <i>aph(3')-VI</i> <i>qnrD1</i>
Outros genes encontrados nos plasmídeos	<i>tnpA</i> ; <i>tnpR</i> ; <i>mobA</i> ; <i>mobC</i> ; <i>oriV</i> ; <i>repA</i> ; <i>repC</i> ; <i>maze</i> ; <i>mazF</i> ; <i>traU</i> ; <i>higA</i> ; <i>dinG</i>

Fonte: A autora (2021)

A análise usando os bancos de dados Resfinder e GenBank mostrou 100% de identidade para os genes de resistência *bla*_{KPC-2}, *aph(3')-VI* e *qnrD1* no DNA plasmidial do isolado P20-A2. Foram encontrados replicons de incompatibilidade para o plasmídeo IncQ e um pequeno plasmídeo da família Col3M (Figura 1).

Figura 1 - Sequência completa do plasmídeo IncQ1 e elemento genético móvel não-Tn4401 (NTE_{KPC-IIId}) que alberga o gene *bla*_{KPC-2} no isolado P20-A2 do estudo e comparação com sequências de referência provenientes do GenBank (NTE_{KPC-IIId}:MG786907 (BELTRÃO *et al.*, 2020). As sequências de codificação de proteínas foram representadas como setas e marcadas com o nome do gene. Tracejado em cinza representa regiões homólogas compartilhadas (> 95%). A sequência IR de NTE_{KPC-IIId} é representada por um círculo.



Fonte: A autora (2021)

O gene *bla*_{KPC-2} foi encontrado inserido entre a sequência de inserção ISKpn6 parcial (ΔISKpn6) com um IR esquerdo associado (IRL) e *tnpR* resolvase (Figura 1). Um fragmento de 21 pb correspondente ao gene Δ*bla*_{TEM} foi encontrado a montante do gene *bla*_{KPC-2}. Ao comparar o ambiente genético do gene *bla*_{KPC-2} com as sequências depositadas no GenBank, observamos a variante NTE_{KPC-IIId} (número de acesso do GenBank: MG786907) com aproximadamente 100% de identidade para os isolados.

Os outros genes *mobA*, *mobC*, *oriV*, *repA*, *repC*, *mazE*, *mazF*, *traU*, *higA* e *dinG* foram identificados através do Blast/NCBI.

Discussão

Além de outras IRAs, *P. mirabilis* pode causar infecções na pele colonizada e na mucosa oral de pacientes internados (WASFI *et al.*, 2020). Podendo causar infecções graves, além de contribuir para o aumento no tempo de internação e no uso de diversos antimicrobianos (BELTRÃO *et al.*, 2021). O paciente do presente estudo, adquiriu infecções por *Morganella morganii*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* (P21-A2), *Acinetobacter baumannii* e *Enterococcus faecalis* em diversos sítios de infecção, por período de 103 dias. Pacientes que adquirem infecções no hospital, têm histórico de infecções recorrentes, principalmente se o período de internação for prolongado (WASFI *et al.*, 2020). As manifestações clínicas mais comuns causadas por *P. mirabilis* são infecções do trato urinário (ITUs), mas pouco se sabe sobre outras infecções causadas por este patógeno, como no caso do paciente no presente estudo com infecções no trato respiratório e tecido.

Além do estabelecimento de infecções graves no hospedeiro por cepas patogênicas a resistência bacteriana a antimicrobianos vem sendo motivo de grande preocupação aos órgãos de saúde mundial, principalmente em cepas que albergam determinantes de resistência a carbapenêmicos. Os isolados analisados no presente estudo, albergavam determinantes de resistência, incluindo os genes *aph(3')-VI*, *aac(6')-Ib* e *bla_{OXA-10}* amplamente relatados em outras espécies como *K. pneumoniae* ou *Pseudomonas aeruginosa* (FIRMO *et al.*, 2020). Contudo, em *P. mirabilis*, esses genes de resistência são pouco investigados, quando comparados a outras espécies bacterianas. No presente estudo foram analisadas características clínicas do paciente e aspectos genéticos e de resistência das duas cepas isoladas. O isolado P20-A2 albergava os genes *bla_{KPC-2}* e *bla_{NDM-1}*. A presença desses genes representa um verdadeiro desafio, uma vez que a identificação desse fenótipo de resistência por testes da rotina laboratorial no hospital não tem a sensibilidade dos métodos moleculares (Beirão *et al.*, 2011). Além disso, as opções disponíveis para tratamento de tais infecções causadas por esta espécie são reduzidas, pois essa espécie possui resistência intrínseca a diversos antimicrobianos que poderiam ser utilizados alternativamente para o tratamento de infecções graves.

O ambiente genético do gene *bla*_{KPC-2} vem sendo amplamente investigado em todo o mundo. O transposon Tn4401 é comumente relatado albergando esse gene e já foi amplamente estudado. Este transposon possui até a data nove variantes nomeadas por Tn4401a até Tn4401i sendo diferenciados por deleções em sua estrutura. A estrutura do Tn4401 compreende duas *tnpA*, uma *tnpR*, as sequências de inserção ISKpn6 e ISKpn7, o gene *bla*_{KPC} e os genes *istA* e *istB*, todas essas estruturas auxiliam na capacidade de transferência deste transposon. Além do transposon Tn4401, outros transposons podem albergar o gene *bla*_{KPC-2}, a exemplo o transposon Tn3000 e o elemento móvel não-Tn4401 (NTE). O NTE_{KPC-IIId} foi relatado no Brasil em *K. pneumoniae* e *Klebsiella aerogenes*, inclusive em hospitais de Recife-PE, Brasil (Cerdeira *et al.*, 2017; Beltrão *et al.*, 2020; Fuga *et al.*, 2020; Lima *et al.*, 2020). Existem indícios de que NTE_{KPC-IIId} seja a variante circulante em Recife albergando o gene *bla*_{KPC} em *K. pneumoniae* e *K. aerogenes*, juntamente com o plasmídeo IncQ (Beltrão *et al.*, 2020b; Lima *et al.*, 2020; Oliveira *et al.*, 2020). Uma vez que *bla*_{KPC} está amplamente disseminado em nosso país (Almeida *et al.*, 2012; Pereira *et al.*, 2013, 2015; Dalmolin *et al.*, 2018; Oliveira *et al.*, 2020). Além disso, NTE_{KPC-IIId} pode diminuir ou potencializar a disseminação de *bla*_{KPC} (BELTRÃO *et al.*, 2020). Em adicional, pelo nosso conhecimento NTE_{KPC-IIId} ainda não tinha sido relatado em *P. mirabilis*.

O plasmídeo IncQ1 encontrado no isolado P20-A2 é um plasmídeo pequeno, promíscuo e não conjugativo. Contudo, este plasmídeo tem a capacidade de se ligar a plasmídeos conjugativos no momento da conjugação, o que pode facilitar sua disseminação em bactérias patogênicas da mesma espécie e de espécies distintas (BELTRÃO *et al.*, 2020; LIMA, G. J. De *et al.*, 2020; OLIVEIRA, É. M. De *et al.*, 2020). Além do plasmídeo IncQ1, um plasmídeo pequeno pertencente a família Col3M foi encontrado albergando o gene *qnrD1*, que confere resistência às quinolonas, no isolado P20-A2. A presença de *qnrD* transportado pelo plasmídeo Col3M foi pouco relatado, o que se sabe é que o gene *qnrD* está amplamente disseminado em isolados de *P. mirabilis* causando infecções em humanos e em animais (SANCHES *et al.*, 2019). Os mecanismos de resistência mediado por plasmídeos são preocupantes pois apresentam uma maior capacidade de disseminação por transferência horizontal de genes (Rozwandowicz *et al.*, 2018; Lerminiaux e Cameron, 2019)

Em conclusão, apesar de *P. mirabilis* estar ganhando destaque como causador de infecções nosocomiais e patógeno multidroga resistente, esta espécie ainda é negligência. A emergência desses isolados de *P. mirabilis* albergando determinantes de resistência

como *qnrD1*, *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *aph(3')-VI*, *aac(6')-Ib* e *bla_{OXA-10}* e os plasmídeos IncQ e Col3M demonstra o potencial de disseminação de importantes genes de resistência, principalmente em se tratando de *P. mirabilis*. Adicionalmente, o elemento genético móvel NTE_{KPC-IIId}, juntamente com o IncQ pode estar relacionado com a alta disseminação do gene *bla_{KPC}* em Recife. Coinfecções podem contribuir para um mal prognóstico, principalmente em paciente imunocomprometido com internamento prolongado como no presente estudo.

Aprovação ética

O estudo obteve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos (CEP/Plataforma Brasil) e e parecer nº 3.007.636

Agradecimentos

Agradecemos ao Centro Laboratorial do CCB/UFPE - LABCEN, Brasil, pelo sequenciamento, especialmente ao Prof. Dr. Marcos Antônio de Moraes e Dr. Heidi Lacerda. Agradecemos também a Josineide Ferreira de Barros, biomédica responsável pelo laboratório de Microbiologia do hospital do estudo em Recife-PE, Brasil.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

- Almeida, A. C. S., Vilela, M. A., Cavalcanti, F. L. S., Martins, W. M. B. S., Moraes, M. A., & Moraes, M. M. C. (2012). First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(4), 2205–2206. <https://doi.org/10.1128/AAC.05268-11>
- Beirão, E. M., Jose, J., Furtado, D., Girardello, R., Ferreira Filho, H., & Gales, A. C. (2011). Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Brazilian Journal Infectious Diseases*, 15(1), 69–73. [https://doi.org/10.1016/s1413-8670\(11\)70143-x](https://doi.org/10.1016/s1413-8670(11)70143-x)
- Beltrão, E. M. B., de Oliveira, É. M., & Lopes, A. C. D. S. (2021). First report of *bla_{GES-1}* in *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 54. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0864-2020>

- Beltrão, E. M. B., de Oliveira, É. M., dos Santos Vasconcelos, C. R., Cabral, A. B., Rezende, A. M., & Souza Lopes, A. C. (2020). Multidrug-resistant *Klebsiella aerogenes* clinical isolates from Brazil carrying IncQ1 plasmids containing the *bla*_{KPC-2} gene associated with non-Tn4401 elements (NTEKPC-IId). In *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (Vol. 22, pp. 43–44). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.001>
- Beltrão, E. M. B., de Oliveira, É. M., Scavuzzi, A. M. L., Firmo, E. F. & Lopes, A. C. S. (2021). Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinicals isolates carrying *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} and first report *bla*_{OXA-10} in Brazil. *Journal of Infection and Chemotherapy*, <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2021.11.001>
- Bert, F., Branger, C., & Lambert-Zechovsky, N. (2002). Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 50(1), 11–18. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf069>
- Bontron, S., Poirel, L., Kieffer, N., Savov, E., Trifonova, A., Todorova, I., Kueffer, G., & Nordmann, P. (2019). Increased resistance to carbapenems in *proteus mirabilis* mediated by amplification of the *bla*_{VIM-1}-carrying and IS26-associated class 1 integron. *Microbial Drug Resistance*, 25(5), 663–667. <https://doi.org/10.1089/mdr.2018.0365>
- Boyd, D., Taylor, G., Fuller, J., Bryce, E., Embree, J., Gravel, D., Katz, K., Kibsey, P., Kuhn, M., Langley, J., Mataseje, L., Mitchell, R., Roscoe, D., Simor, A., Thomas, E., Turgeon, N., & Mulvey, M. (2015). Complete Sequence of Four Multidrug-Resistant MOBQ1 Plasmids Harboring *bla*_{GES-5} Isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* Persisting in a Hospital in Canada. *Microbial Drug Resistance*, 21(3), 253–260. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0205>
- Cabral, A. B., Melo, R. de C. de A., Maciel, M. A. V., & Lopes, A. C. S. (2012). Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 45(5), 572–578.
- Cantón, R., Oliver, A., Coque, T. M., Varella, M. del C., Pérez-Díaz, J. C., & Baquero, F. (2002). Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter* isolates in a Spanish hospital during a 12-year period. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(4), 1237–1243. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1237-1243.2002>
- Cavaco, L. M., Hasman, H., Xia, S., & Aarestrup, F. M. (2009). *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 53(2), 603–608. <https://doi.org/10.1128/AAC.00997-08>
- Cerdeira, L. T., Cunha, M. P. V., Francisco, G. R., Bueno, M. F. C., Araujo, B. F., Ribas, R. M., Gontijo-Filho, P. P., Knöbl, T., de Oliveira Garcia, D., & Lincopan, N. (2017). IncX3 plasmid harboring a non-Tn4401 genetic element (NTEKPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(2), 164–167. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.06.022>

Cunha, B. A., Baron, J., & Cunha, C. B. (2017). Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. In *Expert Review of Anti-Infective Therapy* (Vol. 15, Issue 3, pp. 257–267). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268529>

Dalmolin, T. V., Martins, A. F., Zavascki, A. P., de Lima-Morales, D., & Barth, A. L. (2018). Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 90(2), 132–133. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016>

Oliveira, D. W., Barboza, M. G. L., Faustino, G., Inagaki, W. T. Y., Sanches, M. S., Kobayashi, R. K. T., Vespero, E. C., & Rocha, S. P. D. (2021). Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. *Microbial Pathogenesis*, 152. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104642>

Lima, G. J., Scavuzzi, A. M. L., Beltrão, E. M. B., Firmo, E. F., de Oliveira, É. M., de Oliveira, S. R., Rezende, A. M., & Lopes, A. C. de S. (2020). Identification of plasmid *incQ1* and *NTE_{KPC-II}* harboring *bla_{KPC-2}* in isolates from *Klebsiella pneumoniae* infections in patients from Recife-PE, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, 1–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0526-2019>

Del Franco, M., Paone, L., Novati, R., Giacomazzi, C. G., Bagattini, M., Galotto, C., Montanera, P. G., Triassi, M., & Zarrilli, R. (2015). Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d'Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 101 (ST101 and ST1789). *BMC Microbiology*, 15(1), 260. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0597-z>

Duan, H., Chain, T., Liu, J., Zhang, X., Qi, Z., Gao, J., Chunhua, Q., Goa, J., Wang, Y., Cai, Y., Miao, Z., Yao, M., Schlenker, G. (2009). Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental research*, 109, 511–7. <https://doi.org/10.106/j.envres.2009.02.014>

Firmo, E. F., Beltrão, E. M. B., Silva, F. R. F. da, Alves, L. C., Brayner, F. A., Veras, D. L., & Lopes, A. C. S. (2020). Association of *bla_{NDM-1}* with *bla_{KPC-2}* and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 21, 255–261. <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>

Fuga, B., Ferreira, M. L., Cerdeira, L. T., de Campos, P. A., Dias, V. L., Rossi, I., Machado, L. G., Lincopan, N., Gontijo-Filho, P. P., & Ribas, R. M. (2020). Novel small *IncX3* plasmid carrying the *bla_{KPC-2}* gene in high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 96(2), 114900. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114900>

Gales, A. C., Menezes, L. C., Silbert, S., & Sader, H. S. (2003). Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 52(4), 699–702. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg416>

- Girlich, D., Bonnin, R. A., Dortet, L., & Naas, T. (2020). Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00256>
- Huang, J., Deng, S., Ren, J., Tu, J., Ye, M., & Wang, M. (2017). Characterization of a *bla*_{NDM-1}-harboring plasmid from a *Salmonella enterica* clinical isolate in China. *Molecular Medicine Reports*, 16(2), 1087–1092. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.6733>
- Lerminiaux, N. A., & Cameron, A. D. S. (2019). Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. *Canadian Journal of Microbiology*, 65(1), 34–44. <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>
- Lima, G. J. de, Scavuzzi, A. M. L., Beltrão, E. M. B., Firmo, E. F., Oliveira, É. M. de, Oliveira, S. R. de, Rezende, A. M., & Lopes, A. C. de S. (2020). Identification of plasmid IncQ1 and NTE_{KPC-III} harboring *bla*_{KPC-2} in isolates from *Klebsiella pneumoniae* infections in patients from Recife-PE, Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20190526. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0526-2019>
- Oliveira, É. M. de, Beltrão, E. M. B., Scavuzzi, A. M. L., Barros, J. F., & Lopes, A. C. S. (2020). High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} from patients at a public hospital in Brazil. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 53, e20200397. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0397-2020>
- Pereira, P. S., Borghi, M., Albano, R. M., Lopes, J. C. O., Silveira, M. C., Marques, E. A., Oliveira, J. C. R., Asensi, M. D., & Carvalho-Assef, A. P. D. (2015). Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Microbial Drug Resistance (Larchmont, N.Y.)*, 21(2), 234–236. <https://doi.org/10.1089/mdr.2014.0171>
- Pereira, P. S., de araujo, C. F. M., Seki, L. M., Zahner, V., Carvalho-Assef, A. P. D. A., & Asensi, M. D. (2013). Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(2), 312–316. <https://doi.org/10.1093/jac/dks396>
- Poirel, L., Héritier, C., Tolün, V., & Nordmann, P. (2004). Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(1), 15–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15-22.2004>
- Poirel, L., & Nordmann, P. (2006). Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50(4), 1442–1448. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006>
- Ranjbar, R., Zayeri, S., & Mirzaie, A. (n.d.). Development of multiplex PCR for rapid detection of metallo-β-lactamase genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. <http://ijm.tums.ac.ir>
- Rozwandowicz, M., Brouwer, M. S. M., Fischer, J., Wagenaar, J. A., Gonzalez-Zorn, B., Guerra, B., Mevius, D. J., & Hordijk, J. (2018). Plasmids carrying antimicrobial

resistance genes in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 73(5), 1121–1137. <https://doi.org/10.1093/jac/dkx488>

Sanches, M. S., Baptista, A. A. S., de Souza, M., Menck-Costa, M. F., Koga, V. L., Kobayashi, R. K. T., & Rocha, S. P. D. (2019). Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(3), 685–694. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00086-2>

Wasfi, R., Hamed, S. M., Amer, M. A., & Fahmy, L. I. (2020). *Proteus mirabilis* Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. In *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (Vol. 10). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00414>

Yigit, H., Queenan, A. M., Anderson, G. J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J. W., Steward, C. D., Alberti, S., Bush, K., & Tenover, F. C. (2001). Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45(4), 1151–1161. <https://doi.org/10.1128/AAC.45.4.1151-1161.2001>

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos, podemos concluir que:

- Os isolados clínicos de *P. mirabilis* do presente estudo, além de multirresistentes, apresentaram fatores de virulência eficientes como a presença de adesinas fimbriais, e sideróforos que podem facilitar o estabelecimento de infecções fora do trato gastrointestinal;
- Os genes de virulência *mrpG*, *pmfA* e *pstS* parecem ser intrínsecos nos isolados de *P. mirabilis* do presente estudo. Com isso este patógeno possui naturalmente a capacidade aumentada de estabelecer infecções graves no hospedeiro;
- Isolados menos resistentes tiveram mais genes de virulência do que isolados mais resistentes, indicando também o potencial desses isolados, que não possuem os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*, de causar infecção, ou seja, isolados multirresistentes são menos patogênicos que isolados sensíveis;
- Isolados clínicos de *P. mirabilis* não carreadores dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* infectam com maior frequência pacientes acima de 60 anos e que por sua vez aumenta o risco de internamentos prolongados e até mesmo óbito;
- Isolados clínicos de *P. mirabilis* frequentemente albergam o gene de resistência *bla_{OXA-10}*, aumentando a multirresistência desse patógeno;
- A presença de *P. mirabilis* carregando *bla_{GES-1}* é preocupante, pois esse gene codifica a enzima ESBL e apresenta resistência a uma ampla gama de β -lactâmicos. Além disso, dentro do gênero *Proteus*, não há relatos desse patógeno portador de *bla_{GES}*. Esses dados enfatizam a importância do monitoramento e vigilância de todas as enterobactérias. A circulação de cepas de *P. mirabilis* portadoras de *bla_{GES-1}* constitui um novo cenário de resistência dessa espécie e deve ser um alerta epidemiológico para a saúde global.
- *Proteus mirabilis* possui alta variabilidade multiclonal por ERIC-PCR, contudo foi encontrado com em menor quantidade perfis clonais compartilhados por mais de um isolado;
- O elemento genético móvel *NTE_{KPC-II}*, juntamente com o *IncQ* pode estar relacionado com a alta disseminação do gene *bla_{KPC}* em Recife;
- O plasmídeo Col3M albergando o gene *qnrD* pode estar relacionado a alta disseminação deste gene em isolados clínicos de *P. mirabilis*, o que implica na

resistência desse patógeno à quinolonas, antimicrobianos frequentemente utilizados para tratamentos de ITUs.

REFERÊNCIAS

- ADEOLU, M. *et al.* Genome-based phylogeny and taxonomy of the Enterobacteriales: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 2016a. v. 66, n. 12, p. 5575–5599.
- AHMAD, N.; ALI, S. M.; KHAN, A. U. Co-existence of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{VIM-1} producing *Moellerella wisconsensis* in NICU of North Indian Hospital. **Journal of Infection in Developing Countries**, 2020. v. 14, n. 2, p. 228–231.
- AHMAD, N. *et al.* Draft Genome of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* 223/14 Carrying KPC-6, Isolated from a General Hospital in Malaysia . **Journal of Genomics**, 2015. v. 3, p. 97–98.
- AHMED, H. A. *et al.* ERIC-PCR genotyping of some campylobacter jejuni isolates of chicken and human origin in Egypt. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, 1 Dec. 2015. v. 15, n. 12, p. 713–717.
- AL-AGAMY, M. H. *et al.* First Detection of GES-5 Carbapenemase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolate. **Microbial Drug Resistance**, 2017. v. 23, n. 5, p. 556–562.
- ALMEIDA, A. C. S. *et al.* First description of KPC-2-producing pseudomonas putida in brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 4, p. 2205–2206.
- AMIRKAMALI, S. *et al.* Distribution of the *bla*_{OXA}, *bla*_{VEB-1}, and *bla*_{GES-1} genes and resistance patterns of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from hospitals in Tehran and Qazvin, Iran. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2017. v. 50, n. 3, p. 315–320.
- ANDRADE, L. N. *et al.* Multidrug-resistant CTX-M-(15, 9, 2)- and KPC-2-producing *Enterobacter hormaechei* and enterobacter asburiae isolates possessed a set of acquired heavy metal tolerance genes including a chromosomal sil operon (for acquired silver resistance). **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. MAR, p. 1–6.
- ANTONELLI, A. *et al.* KPC-31 expressed in a ceftazidime/avibactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* is associated with relevant detection issues. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2019. v. 74, n. 8, p. 1–3.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. **EcoSal Plus**, 2018. v. 8, n. 1.
- MOUBARECK, C. A. *et al.* Detection of OXA-23, GES-11 and NDM-1 among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Dubai: A preliminary study. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2021a. v. 24, p. 27–28.

MOUBARECK, C. *et al.* **Detection of OXA-23, GES-11 and NDM-1 among carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* in Dubai: A preliminary study.** *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Elsevier Ltd.

AYSEGUL S.; LEONARD, D. A.; DUZGUN, A. C. C. A.O.; JUNE, C. M. Kinetic characterization of GES-22 β -lactamase harboring the M169L clinical mutation. *J Antibio*, 2017. v. 176, n. 3, p. 139–148.

BACHMAN, M. A. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. *Infection and Immunity*, 2011. v. 79, n. 8, p. 3309–3316.

BAE, I. K. *et al.* Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2007. v. 58, n. 4, p. 465–468.

BAHRAMIAN, A. *et al.* First report of New Delhi metallo- β -lactamase-6 (NDM-6) among *Klebsiella pneumoniae* ST147 strains isolated from dialysis patients in Iran. *Infection, Genetics and Evolution*, 2019. v. 69, n. November 2018, p. 142–145.

BARANIAK, A. *et al.* NDM-producing Enterobacteriaceae in Poland, 2012-14: Inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016. v. 71, n. 1, p. 85–91.

BARBERINO, M. G. *et al.* Isolation of *bla*_{NDM}-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2018. v. 22, n. 1, p. 16–23. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjid.2017.10.002>>.

BARR, A. C. *et al.* Molecular typing and genetic environment of the *bla*_{KPC} gene in Chilean isolates of *Klebsiella pneumoniae*. 2016. n. 2010.

BARRIOS, H. *et al.* A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum β -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Mexico. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012. v. 56, n. 7, p. 4032–4034.

BEBRONE, C. *et al.* GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. v. 57, n. 1, p. 396–401.

BEIRÃO, E. M. *et al.* Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2011, v.15, n. 1, p. 69-73.

BELTRÃO, E. M. B. *et al.* Multidrug-resistant *Klebsiella aerogenes* clinical isolates from Brazil carrying IncQ1 plasmids containing the *bla*_{KPC-2} gene associated with non-Tn4401 elements (NTEKPC-II_d). *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, 2020. v. 22, p. 43–44. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.001>>.

BELTRÃO, E. M. B.; OLIVEIRA, É. M. DE; LOPES, A. C. D. S. First report of *bla*_{GES-1} in *Proteus mirabilis* clinical isolates. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2021. v. 54.

BERLEUR, M. *et al.* Activity of fosfomycin alone or combined with temocillin in vitro and in a murine model of peritonitis due to KPC-3- or OXA-48-producing *Escherichia coli*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018. v. 73, n. 11, p. 3074–3080.

BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2002a. v. 50, n. 1, p. 11–18.

BERGER, S. *et al.* Characterization of a new *bla*OXA-48-carrying plasmid in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013. v. 57, n. 8, p. 4064–4067.

BÍBLIA. 2 Coríntios. Português. In A Bíblia Sagrada: antigo e novo testamentos. Tradução de João Ferreira de Almeida. 2 ed. Barueri-SP: Sociedade Bíblica do Brasil, 2008. p. 1520-1434.

BITAR, I. *et al.* Complete genome and plasmids sequences of a clinical *Proteus mirabilis* isolate producing plasmid mediated ndm-1 from Italy. **Microorganisms**, 2020. v. 8, n. 3, p. 1–7.

BLEICHENBACHER, S. *et al.* Environmental dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in rivers in Switzerland. **Environmental Pollution**, 1 Oct. 2020. v. 265.

BOGAERTS, P. *et al.* GES extended-spectrum β -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2010. v. 54, n. 11, p. 4872–4878.

BONNIN, R. A. *et al.* Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2011. v. 55, n. 1, p. 349–354.

BONTRON, S. *et al.* Increased resistance to carbapenems in proteus mirabilis mediated by amplification of the *bla*VIM-1-carrying and IS26-associated class 1 integron. **Microbial Drug Resistance**, 1 Jun. 2019. v. 25, n. 5, p. 663–667.

BOYD, D. *et al.* Complete Sequence of Four Multidrug-Resistant MOBQ1 Plasmids Harboring *bla*_{GES-5} Isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* Persisting in a Hospital in Canada. **Microbial Drug Resistance**, 2015. v. 21, n. 3, p. 253–260.

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**, 2012. v. 45, n. 5, p. 572–578.

CABRAL, A. B. *et al.* KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2015. v. 48, n. 1, p. 94–95. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0152-2014>>.

CABRAL, A. B. **Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência e virulência**. Caracterização genética de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*: determinantes de resistência. 2016. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016

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**, 2017a. v. 66, n. 1, p. 70–77.

CANEIRAS, C. *et al.* First description of colistin and tigecycline-resistant *Acinetobacter baumannii* producing KPC-3 carbapenemase in Portugal. **Antibiotics**, 2018. v. 7, n. 4, p. 1–11.

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**, 2002. v. 40, n. 4, p. 1237–1243.

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

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

CARVALHO, K. R. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* genotypes carrying blaOXA-23 collected from hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2009. v. 34, n. 1, p. 25–28.

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**, 2004. v. 48, n. 6, p. 2344–2345.

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

CAVACO, L. M. *et al.* qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Feb. 2009. v. 53, n. 2, p. 603–608.

CENTERS FOR DIASEASE CONTROL AND PREVENTION. CDC. Facility Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious diseases**, 2015. n. November, p. 24. Disponível em: <https://www.osha.gov/SLTC/ebola/control_prevention.html>.

CENTONZE, A. R. *et al.* Klebsiella pneumoniae (ST1519) producing KPC-19 carbapenemase in a patient undergoing selective digestive decontamination before liver transplantation. **Clinical Microbiology and Infection**, 2018. v. 24, n. 2, p. 203–204.

CERDEIRA, L. T. *et al.* IncX3 plasmid harboring a non-Tn4401 genetic element (NTEKPC) in a hospital-associated clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST340/CG258. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2017. v. 89, n. 2, p. 164–167.

CHEN, C. Y. *et al.* *Proteus mirabilis* urinary tract infection and bacteremia: Risk factors, clinical presentation, and outcomes. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, Jun. 2012. v. 45, n. 3, p. 228–236.

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

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

CHIH, H. *et al.* GES-11-producing *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Tunisian hospitals: Long-term dissemination of GES-type carbapenemases in North Africa. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2016. v. 5, p. 47–50.

CICEK, A. C. *et al.* OXA- and GES-type β -lactamases predominate in extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates from a Turkish University Hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, 2014. v. 20, n. 5, p. 410–415.

CODJOE, F. S. *et al.* Genetic relatedness in carbapenem-resistant isolates from clinical specimens in Ghana using ERIC-PCR technique. **PLoS ONE**, 1 Sep. 2019. v. 14, n. 9.

COKER, C.; BAKARE, O. O.; MOBLEY, H. L. T. H-NS Is a Repressor of the *Proteus mirabilis* Urease Transcriptional Activator Gene *ureR*. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, 2000. v. 182, n. 9, p. 2649–2653.

CONTE, D. *et al.* Antimicrobial resistance in *Aeromonas* species isolated from aquatic environments in Brazil. **Journal of Applied Microbiology**, 2020. v. 55, n. 41, p. 0–2.

CORRÊA, L. L. *et al.* Detection of *bla_{OXA-23}* in *Acinetobacter* spp. isolated from patients of a university hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Nov. 2012. v. 16, n. 6, p. 521–526.

COUTURIER, M *et al.* Identification and classification of bacterial plasmids. Microbiological review. 1988, v. 52, n. 2, p. 375-395.

CUNHA, B. A.; BARON, J.; CUNHA, C. B. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, 2017a. v. 15, n. 3, p. 257–267. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/14787210.2017.1268529>>.

CUZON, G. *et al.* Spread of plasmids carrying multiple GES variants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016. v. 60, n. 8, p. 5040–5043.

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 and infectious disease**, 1 Feb. 2018. v. 90, n. 2, p. 132–133. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29169659>>. Acesso em: 30 apr. 2018.

OLIVEIRA, W. D. *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, 1 Mar. 2021. v. 152.

DATTA, N; HUGHES, V. M. Plasmid of the same Inc group s in Enterobacteria before and after the medical use of antibiotics. **Nature**, 1983. V. 306, n. 5943, p. 616-617.

DATTA, N. *et al.* Virulence, resistance and clonality of *Proteus mirabilis* isolated from patients with community-acquired urinary tract infection (CA-UTI) in Brazil. **Microbial Pathogenesis**, 2021. v. 152.

DELBRÜCK, H. *et al.* Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14 β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 11, p. 5618–5625.

DELGADO-VALVERDE, M. *et al.* Activity of cefiderocol against high-risk clones of multidrug-resistant Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2020. v. 75, n. 7, p. 1840–1849.

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

DONG, Dandan *et al.* Characterization of a NDM-1- Encoding Plasmid pHFK418-NDM From a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Harboring Two Novel Transposons, Tn6624 and Tn6625. **Frontiers in Microbiology**, 2019. v. 10, n. September, p. 1–10.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, 2016. v. 72, n. 4, p. 741–758. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s00248-015-0720-6>>.

DUAN, H. *et al.* Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, Jul. 2009. v. 109, n. 5, p. 511–517.

EL-BADAWY, M. F. *et al.* The first Egyptian report showing the co-existence of blaNDM-25, blaOXA-23, blaOXA-181, and blaGES-1 among carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clinical isolates genotyped by BOX-PCR. **Infection and Drug Resistance**, 2020. v. 13, p. 1237–1250.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. B. OXA β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, 2014. v. 27, n. 2, p. 241–263.

FALCONE, M. *et al.* Extremely drug-resistant NDM-9-producing ST147 *Klebsiella pneumoniae* causing infections in Italy, May 2020. **Eurosurveillance**, 2020. v. 25, n. 48, p. 2001779.

FAM, N. S. *et al.* Molecular Characterization of Carbapenem / Colistin-Resistant *Acinetobacter baumannii* Clinical Isolates from Egypt by Whole-Genome Sequencing. **Infection and Drug Resistance**, 2020. p. 4487–4493.

FERREIRA, A. E. *et al.* Presence of OXA-23-producing isolates of *Acinetobacter baumannii* in wastewater from hospitals in Southern Brazil. **Microbial Drug Resistance**, 1 Jun. 2011. v. 17, n. 2, p. 221–227.

FILIPIAK, A. *et al.* Pathogenic Factors Correlate With Antimicrobial Resistance Among Clinical *Proteus mirabilis* Strains. **Frontiers in Microbiology**, 25 Nov. 2020. v. 11.

FIRMO, E. F. *et al.* Association of bla_{NDM-1} with bla_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020. v. 21, p. 255–261.

FLEMMING, H. C.; WINGENDER, J. The biofilm matrix. **Nature Reviews Microbiology**. 2010. v. 8, n. 9, p. 623-633.

FLORES-MIRELES, A.; HREHA, T. N.; HUNSTAD, D. A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. **Topics in Spinal Cord Injury Rehabilitation**, 2019. v. 25, n. 3, p. 228–240.

FOURNIER, D. *et al.* Mechanisms of Resistance to Ceftolozane/Tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa*: Results of the GERPA Multicenter Study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020. V. 65, n. 2, p. 1117-1120.

FOXMAN, B. *et al.* Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. **Epidemiologic Perspectives and Innovations**, 25 Nov. 2005. v. 2.

FRANCIA, A. *et al.* Classification scheme for mobilization regions of bacterial plasmids, **FEMS microbiology reviewer**, 2004. V. 28, n. 1, p. 79-100.

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

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4640108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

FUGA, B. *et al.* Novel small IncX3 plasmid carrying the blaKPC-2 gene in high-risk *Klebsiella pneumoniae* ST11/CG258. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2020. v. 96, n. 2, p. 114900. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.114900>>.

FURLAN, J. P. R.; PITONDO-SILVA, A.; STEHLING, E. G. Detection of bla_{NDM-1} in *Stenotrophomonas maltophilia* isolated from Brazilian soil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2018. v. 113, n. 6, p. 6–8.

GAISSER, S.; HUGHES, C.; GEN GENET, M. Communicated by W. Goebel A locus coding for putative non-ribosomal peptide/polyketide synthase functions is mutated in a swarming-defective *Proteus mirabilis* strain. **Molecular & General Genetics**, 1997, v. 253, n. 4, p. 415-427.

GALANI, I. *et al.* Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek University Hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, 2012. v. 18, n. 3, p. E52–E54. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03738.x>>.

GALANI, L. *et al.* Genomic characterization of a KPC-23-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clinical isolate resistant to ceftazidime-avibactam. **Clinical Microbiology and Infection**, 2019. v. 25, n. 6, p. 763.e5-763.e8.

GALES, A. C. *et al.* Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-β-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2003a. v. 52, n. 4, p. 699–702.

GAO, H. *et al.* The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* from clinical settings. **EBioMedicine**, 2020. v. 51, p. 102599.

GARZA-RAMOS, U. *et al.* Widespread of ESBL- and carbapenemase GES-type genes on carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates: A multicenter study in Mexican hospitals. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2015. v. 81, n. 2, p. 135–137.

GIRLICH, D. *et al.* Integration of the bla_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2015. v. 70, n. 1, p. 98–102.

GIRLICH, D. *et al.* Promoter characterization and expression of the bla_{KPC-2} gene in *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2017. v. 72, n. 6, p. 1597–1601.

GIRLICH, D. *et al.* Genetics of Acquired Antibiotic Resistance Genes in *Proteus* spp. **Frontiers in Microbiology**, 2020. v. 11, n. February, p. 1–21.

GROSSO, F. *et al.* OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii*: A new hotspot of diversity in Rio de Janeiro? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Jan. 2011. v. 66, n. 1, p. 62–65.

GUILLARD, T. *et al.* Mobile insertion cassette elements found in small non-transmissible plasmids in may explain qnrD mobilization. **PLoS ONE**, 2014.

HALL, T. **BioEdit software**. Disponível em: <bioedit.software.informer.com>.

HAMMAMI, S. *et al.* Rectal Carriage of Extended-Spectrum Beta-Lactamase and Carbapenemase Producing Gram-Negative Bacilli in Intensive Care Units in Tunisia. **Microbial Drug Resistance**, 2017. v. 23, n. 6, p. 695–702.

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

HAMZA, D. *et al.* Emergence of β -lactamase- and carbapenemase- producing Enterobacteriaceae at integrated fish farms. **Antimicrobial resistance and Incetion control**. 2020, v. 9, n. 1, p. 67

HASSAN, R. *et al.* Genotypic characterization of multiple drug resistant *Escherichia coli* isolates from a pediatric cancer hospital in Egypt. **Scientific Reports**, 2020. v. 10, n. 1, p. 1–10.

HAUSER. Ueber Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, 1885. v. 11, n. 44, p. 756–757.

HERNÁNDEZ-GARCÍA, M. *et al.* Distinct epidemiology and resistance mechanisms affecting ceftolozane/tazobactam in *Pseudomonas aeruginosa* isolates recovered from ICU patients in Spain and Portugal depicted by WGS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2020. p. 1–10.

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

HIMPSL, S. D. *et al.* Identification of virulence determinants in uropathogenic *Proteus mirabilis* using signature-tagged mutagenesis. **Journal of Medical Microbiology**, 2008. v. 57, n. 9, p. 1068–1078.

HIMPSL, S. D. *et al.* Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. 2011. Acesso em: 16 oct. 2016.

HISHINUMA, T. *et al.* Spread of GES-5 carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Japan due to clonal expansion of ST235. **PLoS ONE**, 2018. v. 13, n. 11, p. 1–9.

HONG, J. S. *et al.* Clonal dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 isolates carrying *bla*_{IMP-6} and emergence of *bla*_{GES-24} and *bla*_{IMP-10} on novel genomic islands PAGI-15 and -16 in South Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016. v. 60, n. 12, p. 7216–7223.

- HONG, J. S. *et al.* Molecular Characteristics of GES-Type Carbapenemase-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Clinical Isolates from Long-Term Care Facilities and General Hospitals in South Korea. **Microbial Drug Resistance**, 2020. v. 26, n. 6, p. 605–610.
- HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Topoisomerase inhibitors: Fluoroquinolone mechanisms of action and resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, 1 Sep. 2016. v. 6, n. 9.
- HORNSEY, M.; PHEE, L.; WAREHAM, D. W. A novel variant, NDM-5, of the New Delhi metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* ST648 isolate recovered from a patient in the United Kingdom. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2011. v. 55, n. 12, p. 5952–5954.
- HOUCHI, S. *et al.* Investigation of common chemical components and inhibitory effect on GES-type β -lactamase (GES22) in methanolic extracts of Algerian seaweeds. **Microbial Pathogenesis**, 2019. v. 126, p. 56–62.
- HU, Y. *et al.* Emergence of *Proteus mirabilis* Harboring *bla*_{KPC-2} and *qnrD* in a Chinese Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. p. 2278–2282.
- HUANG, J. *et al.* Characterization of a blaNDM-1-harboring plasmid from a *Salmonella enterica* clinical isolate in China. **Molecular Medicine Reports**, 2017. v. 16, n. 2, p. 1087–1092.
- JACOBSEN, S. M.; SHIRTLIFF, M. E. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. **Virulence**, 2011. v. 2, n. 5, p. 460–465.
- JACOBY, GA; STRAHILEVITZ, J; HOOPER, D. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiol Spectr.**, 2014. v. 2, n. 2, p. 997–1003.
- JÁCOME, P. R. L. De A. *et al.* First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 9, p. 4990.
- JANSEN, A. M. *et al.* Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. **Infection and Immunity**, 2004. v. 72, n. 12, p. 7294–7305.
- JEON, B. C. *et al.* Investigation of a nosocomial outbreak of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 β -lactamase in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, May. 2005. v. 43, n. 5, p. 2241–2245.
- JONES, B. V. *et al.* Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. **Journal of Medical Microbiology**, 2005. v. 54, n. 9, p. 807–813.
- KAASE, M.; NORDMANN, P.; WICHELHAUS, T. A.; GATERMANN, S. G.; BONNIN, Rémy A.; *et al.* NDM-2 carbapenemase in *Acinetobacter baumannii* from Egypt. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2011. v. 66, n. 6, p. 1260–1262.

KARLOWSKY, J. A. *et al.* Antimicrobial resistance in urinary tract pathogens in Canada from 2007 to 2009: CANWARD surveillance study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2011.

KAZMIERCZAK, K. M. *et al.* Global dissemination of blaKPC into bacterial species beyond *Klebsiella pneumoniae* and in vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam and aztreonam-avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 Aug. 2016. v. 60, n. 8, p. 4490–4500.

KHAJURIA, A. *et al.* Presence of a novel variant NDM-10, of the New Delhi metallo-beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* isolate. **Indian Journal of Medical Microbiology**, 2016. v. 34, n. 1, p. 121–123.

KHAN, A. *et al.* Extensively Drug-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* ST309 Harboring Tandem Guiana Extended Spectrum β -Lactamase Enzymes: A Newly Emerging Threat in the United States. **Open Forum Infectious Diseases**, 2019. v. 6, n. 7, p. 0–6.

KIM, J. S. *et al.* Emergence of NDM-4 and OXA-181 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020. v. 20, p. 332–333.

KOBAYASHI, K. *et al.* The third national Japanese antimicrobial susceptibility pattern surveillance program: Bacterial isolates from complicated urinary tract infection patients. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2020a. v. 26, n. 5, p. 418–428.

KOTSAKIS, S. D. *et al.* GES-13, a β -lactamase variant possessing Lys-104 and Asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2010. v. 54, p. 1331.

KUAN, L. *et al.* Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. **Journal of Medical Microbiology**, 2014. v. 63, n. PART 7, p. 911–922.

LA CADENA, E. *et al.* Molecular characterisation of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in Colombia: bla_{KPC} and the ‘changing landscape’. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018. v. 13, n. 2010, p. 184–189.

LAMARCHE, M. G. *et al.* The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis. **FEMS Microbiology Reviews**, 2008. v. 32, n. 3, p. 461–473.

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

LANGE, F. *et al.* Dissemination of blaOXA-58 in *Proteus mirabilis* isolates from Germany. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2017. v. 72, n. 5, p. 1334–1339.

LAPIERRE, L. *et al.* Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in

Campylobacter jejuni and *Campylobacter coli* Isolates from Animals, Meat, and Humans. **Microbial Drug Resistance**, 1 Jul. 2016. v. 22, n. 5, p. 432–444.

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

LAUDY, A. E. *et al.* Prevalence of ESBL-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Warsaw, Poland, detected by various phenotypic and genotypic methods. **PLoS ONE**, 2017. v. 12, n. 6, p. 1–15.

LAZAR JR, I.; HORVATH-LAZAR, E. **GelAnalyzer**. Disponível em: <<http://www.gelanalyzer.com/index.html>>.

LERMINIAUX, N. A.; CAMERON, A. D. S. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. **Canadian Journal of Microbiology**, 2019. v. 65, n. 1, p. 34–44.

LI, X. *et al.* Dissemination of bla NDM-5 gene via an IncX3-type plasmid among non-clonal *Escherichia coli* in China. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2018. v. 7, n. 1, p. 1–9.

LI, X. *et al.* Detection and characterization of a clinical *Escherichia coli* ST3204 strain coproducing NDM-16 and MCR-1. **Infection and Drug Resistance**, 2018. v. 11, p. 1189–1195.

LIKE, O.- *et al.* Phenotypic and Genotypic Characterization of Enterobacteriaceae Producing. 2018. v. 24, n. 4.

LIMA, G. J. De *et al.* Identification of plasmid IncQ1 and NTEKPC-IIId harboring bla KPC-2 in isolates from *Klebsiella pneumoniae* infections in patients from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2020. v. 53, p. e20190526.

LITERACKA, E. *et al.* Spread of *klebsiella pneumoniae* ST45 producing GES-5 carbapenemase or GES-1 extended-spectrum β -lactamase in newborns and infants. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020. v. 64, n. 9.

LIU, Lu *et al.* blaNDM-21, a new variant of bla_{NDM} in an *Escherichia coli* clinical isolate carrying bla_{CTX-M-55} and rmtB. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2018. v. 73, n. 9, p. 2336–2339.

LIU, Yao *et al.* Characterization of an NDM-19-producing *Klebsiella pneumoniae* strain harboring 2 resistance plasmids from China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2019. v. 93, n. 4, p. 355–361.

LIU, Z. *et al.* Plasmid-mediated novel blaNDM-17 gene encoding a carbapenemase with enhanced activity in a sequence type 48 *Escherichia coli* Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2017. v. 61, n. 5, p. 1–9.

LIU, Z. *et al.* Novel variant of New Delhi metallo- β -lactamase, NDM-20, in *Escherichia coli*. **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. FEB, p. 1–7.

LÓPEZ-GARCÍA, A. *et al.* Characterization of antimicrobial resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* carrying IMP variants recovered from a Mexican hospital. **Infection and Drug Resistance**, 2018. v. 11, p. 1523–1536.

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**, 2017. v. 50, n. 5, p. 685–688.

MAIDEN, M. C. J. **Multilocus sequence typing of bacteria. Annual Review of Microbiology**. 2006. v. 60, p. 561–588.

MANAGEIRO, V. *et al.* First description of oxa-48 carbapenemase harbored by *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* from a single patient in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014. v. 58, n. 12, p. 7613–7614.

MANAGEIRO, V. *et al.* Molecular epidemiology and risk factors of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates in Portuguese hospitals: Results From European survey on carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE). **Frontiers in Microbiology**, 2018. v. 9, n. NOV, p. 1–8.

MANCINI, S. *et al.* Detection of NDM-19, a novel variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity under zinc-limited conditions, in Switzerland. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2019. v. 95, n. 3, p. 114851.

MARGATE, E. *et al.* KPC-Producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from RECIFE, BRAZIL. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 2015. v. 57, n. 4, p. 359–360.

MARQUES, C. *et al.* Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans. **Veterinary Microbiology**, 1 Jan. 2019. v. 228, p. 77–82.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; PASCUAL, A.; JACOBY, George. Quinolone resistance from a transferable plasmid. **Early report**, 1998. v. 351.

MATASEJE, L. F. *et al.* Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009–10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2012. v. 67, n. 6, p. 1359–1367.

MATTEOLI, F. P. *et al.* Population structure and pangenome analysis of *Enterobacter bugandensis* uncover the presence of blaCTX-M-55, blaNDM-5 and blaIMI-1, along with sophisticated iron acquisition strategies. **Genomics**, 2020. v. 112, n. 2, p. 1182–1191.

MAVROIDI, A. *et al.* An integron-associated β -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum β -lactamase IBC-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2001. v. 48, n. 5, p. 627–630.

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**, 2014. v. 69, n. 6, p. 824–831.

MENDONÇA, N. *et al.* Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of extended- and broad-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Portugal. **International Journal of Antimicrobial Agents**, 2009. v. 34, n. 1, p. 29–37.

MICHELIM, L. *et al.* Comparison of PCR-Based Molecular Markers for the Characterization of *Proteus mirabilis* Clinical Isolates. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2008. v. 12, n. 5, p. 423–429.

MIGLIORINI, L. B. *et al.* Prevalence of *bla*_{KPC-2}, *bla*_{KPC-3} and *bla*_{KPC-30}—carrying plasmids in *Klebsiella pneumoniae* isolated in a Brazilian hospital. **Pathogens**, 2021. v. 10, n. 3.

MIKUCIONYTE, G. *et al.* Nosocomial dissemination of VIM-2-producing ST235 *Pseudomonas aeruginosa* in Lithuania. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, 2016. v. 35, n. 2, p. 195–200.

MIRZAEI, A. *et al.* Characterization of antibiotic-susceptibility patterns, virulence factor profiles and clonal relatedness in *proteus mirabilis* isolates from patients with urinary tract infection in Iran. **Infection and Drug Resistance**, 2019a. v. 12, p. 3967–3979.

MITRA, S. *et al.* Evaluation of co-transfer of plasmid-mediated fluoroquinolone resistance genes and *bla*_{NDM} gene in Enterobacteriaceae causing neonatal septicemia. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2019. v. 8, n. 1, p. 1–15.

MOLAND, E. S. *et al.* Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2003. v. 51, n. 3, p. 711–714.

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

MORALES-LEÓN, F. *et al.* Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in Chile. **Virulence**, 2021. v. 12, n. 1, p. 35–44.

MOUBARECK, C. *et al.* GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Aug. 2009. v. 53, n. 8, p. 3579–3581.

MUELLER, L. *et al.* crossm KPC-3 Variant Conferring Resistance to Ceftazidime-Avibactam and Exhibiting Reduced Carbapenemase Activity. 2019. n. August, p. 1–7.

NAAS, Thierry *et al.* Beta-lactamase database (BLDB)—structure and function. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, 2017. v. 32, n. 1, p. 917–919.

NIU, S. *et al.* A Ceftazidime-Avibactam-Resistant and Carbapenem-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* Strain Harboring *bla*_{KPC-14} Isolated in New York City. 2020. v. 5, n. 4, p. 1–5.

NORDMANN, P.; BOULANGER, A. E.; POIREL, L.. NDM-4 metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2012. v. 56, n. 4, p. 2184–2186.

NTSHOBENI, N. B.; ESSACK, S. Y. crosssm an NDM-18-Producing Clinical Strain Originating from Hospital Effluent in South Africa. 2019. n. May, p. 18–19.

O'HARA, C. M.; BRENNER, F. W.; MILLER, J. M. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical Microbiology Reviews**, 2000. v. 13, n. 4, p. 534–546.

OLD, D. C.; ADEGBOLA, R. A. Haemagglutinins and Fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. **J Med. Microbiol**, 2016. v. 15, n. 1982, p. 551–564.

OLIVEIRA, É. M. *et al.* High plasmid variability, and the presence of IncFIB, IncQ, IncA/C, IncHI1B, and IncL/M in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} from patients at a public hospital in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2020. v. 53, p. e20200397.

O'MAY, G. A. *et al.* The high-affinity phosphate transporter Pst in *Proteus mirabilis* HI4320 and its importance in biofilm formation. **Microbiology**, 2009. v. 155, n. 5, p. 1523–1535.

QUESLATI, S. *et al.* Unravelling ceftazidime/avibactam resistance of KPC-28, a KPC-2 variant lacking carbapenemase activity. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2019. v. 74, n. 8, p. 2239–2246.

OZGUMUS O. B. *et al.* Horizontal dissemination of TEM- and SHV- type beta-lactamase gene- carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Brazilian Journal of Microbiological**, 2008. v. 38, n. 4, p. 636–643.

PADRÃO, M. D. C. *et al.* Prevalência de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva. **Revista Brasileira de clínica médica**, 2010. v. 8, n. 2, p. 125–128.

PAPAGIANNITSIS, C. C. *et al.* Identification of a New Delhi metallo- β -lactamase-4 (NDM-4)-producing *Enterobacter cloacae* from a Czech patient previously hospitalized in Sri Lanka. **Folia Microbiologica**, 2013. v. 58, n. 6, p. 547–549.

PAUL, D. *et al.* Occurrence of *bla*_{NDM-7} within IncX3-type plasmid of *Escherichia coli* from India. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2017. v. 23, n. 4, p. 206–210.

PEARSON, M. M. *et al.* Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. **Journal of Bacteriology**, 2008. v. 190, n. 11, p. 4027–4037.

PEARSON, M. M. *et al.* Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the Murine Urinary Tract: Virulence and Nitrogen Assimilation Gene Expression. **INFECTION AND IMMUNITY**, 2011. v. 79, n. 7, p. 2619–2631.

PELLEGRINO, R. *et al.* *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. **Pathogens and Disease**, Mar. 2013. v. 67, n. 2, p. 104–107.

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

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

PEREZ, F. *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: Impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2010. v. 65, n. 8, p. 1807–1818.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. **DARwin software**. Disponível em: <<http://darwin.cirad.fr/>>.

PHOON, H. Y. P. *et al.* Molecular characterization of extended-spectrum beta lactamase and carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains from a Malaysian tertiary hospital. **Microbial Drug Resistance**, 2018. v. 24, n. 8, p. 1108–1116.

PILATO, V. D. *et al.* Complete Genome Sequence of the First KPC-Type Carbapenemase- Positive *Proteus mirabilis* Strain from a Bloodstream Infection. **Genome announcements**. 2016. v. 4, n. 3, p. e00607-16.

PILATO, V. D. *et al.* KPC-53, a KPC-3 variant of clinical origin associated with reduced susceptibility to ceftazidime-avibactam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2020. n. October.

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

POIREL, L. *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2000. v. 44, n. 3, p. 622–32.

POIREL, L. *et al.* Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2000. v. 44, n. 3, p. 622–632.

POIREL, L. *et al.* A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum β -lactamase GES-2 in South Africa. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2002. v. 49, n. 3, p. 561–565.

POIREL, L. *et al.* Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebs. pneu. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004. v. 48, n. 1, p. 15–22.

POIREL, L. *et al.* Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Feb. 2011. v. 55, n. 2, p. 934–936.

POIREL; NORDMANN, Patrice. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla_{OXA-58}* in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2006a. v. 50, n. 4, p. 1442–1448.

POLOTTO, M. *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring *bla* CTX-M-2, *bla* GES-1 and *bla* GES-5, *bla* IMP-1 and *bla* SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infectious Diseases**, 2012. v. 12.

PULCRANO, G. *et al.* Isolation of *Enterobacter aerogenes* carrying *bla_{TEM-1}* and *bla_{KPC-3}* genes recovered from a hospital Intensive Care Unit. **Apmis**, 2016. p. n/a-n/a.

QIN, S. *et al.* Emergence of extensively drug-resistant *Proteus mirabilis* harboring a conjugative NDM-1 plasmid and a novel *Salmonella* genomic island 1 variant, SGI1-Z. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015. v. 59, n. 10, p. 6601–6604.

RAHERISON, S. *et al.* Expression of the *aac(6')-Ib-cr* gene in class 1 integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 1 May. 2017. v. 61, n. 5.

RAHMAN, M. *et al.* Novel variant NDM-11 and other NDM-1 variants in multidrug-resistant *Escherichia coli* from South India. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2018. v. 14, n. 2010, p. 154–157.

RAMADAN, H. *et al.* Circulation of emerging NDM-5-producing *Escherichia coli* among humans and dogs in Egypt. **Zoonoses and Public Health**, 2020. v. 67, n. 3, p. 324–329.

RAMOS, A. C. *et al.* Dissemination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clones carrying a novel integron-borne *bla_{IMP-1}* in a tertiary hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2018. v. 62, n. 2, p. 1–5.

RANJBAR, R.; ZAYERI, S.; MIRZAIE, A. Development of multiplex PCR for rapid detection of metallo- β -lactamase genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Iranian Journal of Microbiology**, 2020. v. 12, n. 2, p. 107–112.

RASHEED, J. K. *et al.* New Delhi metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae, United States. **Emerging Infectious Diseases**, 2013. v. 19, n. 6, p. 870–878.

RIBEIRO, V. B. *et al.* Detection of *bla*GES-5 in carbapenem-Resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014a. v. 58, n. 1, p. 622–623.

- RIBEIRO, V. B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2014b. v. 18, n. 2, p. 231–232.
- RÍOS, P. *et al.* Extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* identified in Lima, Peru co-expressing a VIM-2 metallo- β -lactamase, OXA-1 β -lactamase and GES-1 extended-spectrum β -lactamase. **JMM Case Reports**, 2018. v. 5, n. 7.
- ROBICSEK, A. *et al.* qnr prevalence in ceftazidime-resistant Enterobacteriaceae isolates from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2006. v. 50, n. 8, p. 2872–2874.
- ROBLEDO, I. E. *et al.* Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2010. v. 54, n. 3, p. 1354–1357.
- ROCHA, S. P D; PELAYO, J. S.; ELIAS, W. P. Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2007. v. 51, n. 1, p. 1–7.
- ROCHA, S. P. D. *et al.* Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, 2007.
- RODRIGUES, C *et al.* KPC-3 producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to Previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and TN4401d-IncN), *Frontiers in Microbiology*. 2016. v. 7, n. 1000
- ROGERS, B. A. *et al.* Treatment options for New Delhi metallo-beta-lactamase-harboring enterobacteriaceae. **Microbial Drug Resistance**, 2013. v. 19, n. 2, p. 100–103.
- RÓZALSKI, A.; SIDORCZYK, Z.; KOTELKO, K. Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 1997. v. 61, n. 1, p. 65–89.
- ROZWANDOWICZ, M. *et al.* Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 1 May. 2018. v. 73, n. 5, p. 1121–1137.
- RYOO, N. H. *et al.* Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2005. v. 56, n. 4, p. 698–702.
- SADER, H. S. *et al.* WCK 5222 (cefepime/zidebactam) antimicrobial activity tested against Gram-negative organisms producing clinically relevant β -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2017. v. 72, n. 6, p. 1696–1703.
- SAMPAIO, J. L. M. *et al.* Detection of OXA-370, an OXA-48-related class d β -lactamase, in enterobacter hormaechei from Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **American Society for Microbiology**. 2014. v. 58, n. 2, p. 3566-3567.

SANCHES, M. S. *et al.* Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2019. v. 50, n. 3, p. 685–694.

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

SATO, T. *et al.* Emergence of the novel aminoglycoside acetyltransferase variant aac(6')-ib-d179y and acquisition of colistin heteroresistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* due to a disrupting mutation in the dna repair enzyme mutS. **mBio**, 2020a. v. 11, n. 6, p. 1–14.

SCAVONE, P. *et al.* Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. **Pathogens and Disease**, 2016a. v. 74, n. 5, p. 1–9.

SCAVUZZI, A. M. L. *et al.* Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2}-harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019. v. 19, n. 19, p. 181–182.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. **Microbiology Spectrum**, 4 Sep. 2015. v. 3, n. 5.

SEPEHRI, S. *et al.* Osteomyelitis due to multiple carbapenemase-producing Gram-negative bacteria: The first case report of a GES-13-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolate in Canada. **Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology**, 2014. v. 25, n. 4, p. 229–231.

SHANKAR, C. *et al.* First report of whole-genome sequence of colistin-resistant *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Producing KPC-9 in India. **Microbial Drug Resistance**, 2019. v. 25, n. 4, p. 489–493.

SHANMUGAM, P.; MEENAKSHISUNDARAM, J.; JAYARAMAN, P. *bla*_{KPC} gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary care hospital. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2013a. v. 7, n. 12, p. 2736–2738.

SHRESTHA, B. *et al.* Identification of a novel NDM variant, NDM-13, from a multidrug-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015. v. 59, n. 9, p. 5847–5850.

SHRESTHA, B. *et al.* Emergence of Various NDM-Type Metallo--Lactamase-Producing *Escherichia coli* Clinical Isolates in Nepal. 2017. v. 61, n. 12, p. 1–6.

SILVA JÚNIOR, V. V. Da *et al.* Detection of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-11} in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 2017. v. 50, n. 6, p. 764–768.

SKÁLOVÁ, A. *et al.* Molecular characterization of OXA-48-like-producing *Enterobacteriaceae* in the Czech Republic: evidence for horizontal transfer of pOXA-48-like plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2016. n. November, p.

AAC.01889-16. Disponível em: <<http://aac.asm.org/lookup/doi/10.1128/AAC.01889-16>>.

STRAHILEVITZ, J. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: A multifaceted threat. **Clinical Microbiology Reviews**, 2009. v. 22, n. 4, p. 664–689.

STRELING, A. P. *et al.* Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-type β -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2018. v. 92, n. 2, p. 147–151.

SUN, L.; XU, J.; HE, F. Genomic characterisation of a *Proteus mirabilis* clinical isolate from China carrying *bla*_{NDM-5} on an IncX3 plasmid. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2019. v. 19, p. 317–319.

TADA, T. *et al.* NDM-8 metallo- β -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2013. v. 57, n. 5, p. 2394–2396.

TADA, T. *et al.* NDM-12, a novel new delhi metallo- β -lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2014. v. 58, n. 10, p. 6302–6305.

TAGGAR, G. *et al.* Molecular epidemiology of carbapenemases in Enterobacteriales from humans, animals, food and the environment. **Antibiotics**, 2020. v. 9, n. 10, p. 1–22.

TARAFDAR, F.; JAFARI, B.; AZIMI, T. Evaluating the antimicrobial resistance patterns and molecular frequency of *bla*_{oxa-48} and *bla*_{GES-2} genes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* strains isolated from burn wound infection in Tehran, Iran. **New Microbes and New Infections**, 2020. v. 37, p. 100686.

THOMSON, G. K. *et al.* *E. cloacae*: Implications for Newer β -Lactam – β -Lactamase Inhibitor. 2016. v. 54, n. 3, p. 791–794.

TIBBETTS, R. *et al.* Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC β -lactamase in *P. mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, 2008.

UECHI, K. *et al.* A carbapenem-resistant clinical isolate of *Aeromonas hydrophila* in Japan harbouring an acquired gene encoding GES-24 β -lactamase. **Journal of Medical Microbiology**, 2018. v. 67, n. 11, p. 1535–1537.

VALENTIN, T. *et al.* *Proteus mirabilis* harboring carbapenemase NDM-5 and ESBL VEB-6 detected in Austria. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 1 Jul. 2018. v. 91, n. 3, p. 284–286.

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

VOURLI, S. *et al.* Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical Enterobacteria. **FEMS Microbiol Lett**, 2004. v. 234, p. 209–213.

WACHINO, J. I. *et al.* Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004. v. 48, n. 6, p. 1960–1967.

WACHINO, J. *et al.* Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A β -lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the β -loop. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004. v. 48, n. 8, p. 2905–2910.

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

WASFI, R.; ABDELLATIF, G. R.; *et al.* First-time characterization of viable but non-culturable *Proteus mirabilis*: Induction and resuscitation. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, 2020. v. 24, n. 5, p. 2791–2801.

WASFI, R. *et al.* **Proteus mirabilis Biofilm: Development and Therapeutic Strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. Frontiers Media S.A.

WOLTER, D. J. *et al.* Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2009. v. 53, n. 2, p. 557–562.

WOODFORD, N. *et al.* Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2004. v. 48, n. 12, p. 4793–4799.

XANTHOPOULOU, K. *et al.* First Report of New Delhi Metallo- β -Lactamase-6 (NDM-6) in a Clinical *Acinetobacter baumannii* Isolate From Northern Spain. **Frontiers in Microbiology**, 2020. v. 11, n. November, p. 1–6.

XIAO, L. *et al.* Polymorphisms of Gene Cassette Promoters of the Class 1 Integron in Clinical *Proteus* Isolates. **Frontiers in Microbiology**, 2019. v. 10, n. April, p. 1–12.

YAMASAKI, K. *et al.* Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing blaGES-4 carbapenemase at a Japanese hospital. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 2017. v. 23, n. 1, p. 40–44.

YAGHI. Unusually high prevalence of cosecretion of ambler class A and B Carbapenemase and nonenzymatic mechanisms in Multidrug resistant Clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Lebanon. *Microbial Drug resistance*, 2020. v. 26, n. 2, p.150–159.

- YANG, B. *et al.* Occurrence of *Enterobacter hormaechei* carrying blaNDM-1 and blaKPC-2 in China. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 2018. v. 90, n. 2, p. 139–142.
- YEZLI, S.; SHIBL, A. M.; MEMISH, Z. A. The molecular basis of β -lactamase production in Gram-negative bacteria from Saudi Arabia. **Journal of Medical Microbiology**, 2015. v. 64, n. 2, p. 127–136.
- YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2001. v. 45, n. 4, p. 1151–1161.
- YIGIT, H. *et al.* Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Dec. 2003. v. 47, n. 12, p. 3881–3889.
- YU, W. L. *et al.* Emergence of KPC new variants (KPC-16 and KPC-17) and ongoing outbreak in southern Taiwan. **Clinical Microbiology and Infection**, 2015. v. 21, n. 4, p. 347.e5–347.e8.
- YUAN, Y. *et al.* Bla NDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 2019. v. 8, n. 1, p. 6–9.
- ZHANG, F. *et al.* Further Spread of bla_{NDM-5} in Enterobacteriaceae via IncX3 plasmids in Shanghai, China. **Frontiers in Microbiology**, 2016. v. 7, n. MAR, p. 3–7.
- ZHANG, S. *et al.* Prevalence and plasmid characterization of the *qnrD* determinant in enterobacteriaceae isolated from animals, retail meat products, and humans. **Microbial Drug Resistance**, 2013. v. 19, n. 4, p. 331–335.
- ZHAO, H. *et al.* In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. **Molecular Microbiology**, 1997. v. 23, n. 5, p. 1009–1019.
- ZHENG, R. *et al.* Outbreak of plasmid-mediated NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST105 among neonatal patients in Yunnan, China. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, 2016. v. 15, n. 1, p. 10.
- ZOU, D. *et al.* A novel New Delhi metallo- β -lactamase variant, NDM-14, isolated in a Chinese hospital possesses increased enzymatic activity against carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2015. v. 59, n. 4, p. 2450–2453.
- ZUNINO, P. *et al.* *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. **Microbiology**, 2003. v. 149, n. 11, p. 3231–3237.

APÊNDICE A – ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS

Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} and first report *bla*_{OXA-10} in Brazil

Running title: Virulence in *Proteus mirabilis* from Brazil

Elizabeth Maria Bispo Beltrão¹, Érica Maria de Oliveira¹, Alexsandra Maria Lima Scavuzzi¹, Elza Ferreira Firmo¹, Ana Catarina de Souza Lopes¹

Laboratório de Microbiologia. Área de Medicina Tropical. Centro de Ciências Médicas - CCM, Universidade Federal de Pernambuco, Brazil.

⁽¹⁾ Universidade Federal de Pernambuco-UFPE

Highlight

- Virulence factors in *Proteus mirabilis*
- First report of *bla*_{OXA-10} in *Proteus mirabilis* in Brazil
- First report of *bla*_{OXA-10} and *bla*_{KPC-2} in *Proteus mirabilis*

ABSTRACT

Introduction: *Proteus mirabilis* is one of the main pathogens that cause urinary tract infections. Therefore, the aim of this study was to analyze and compare the genetic profile of 36 clinical isolates of *P. mirabilis* that carry and do not carry the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} gene with respect to virulence factors (*mrpG*, *pmfA*, *ucaA*, *nrpG* and *pbtA*) and antimicrobial resistance (*bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{SPM}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-23-like}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{OXA-58-like} and *bla*_{OXA-10-like})

Methods: The virulence and resistance genes were investigated by using PCR and sequencing.

Results: ERIC-PCR typing showed that the isolates showed multiclonal dissemination and high genetic variability. The gene that was most found *bla*_{OXA-10-like} (n = 18), followed by *bla*_{KPC} (n=10) and *bla*_{NDM} (n=8). To our knowledge, this is the first report of *bla*_{OXA-10} in *P. mirabilis* in Brazil, as well as the first report of the occurrence of *P. mirabilis* co-carrying *bla*_{OXA-10}/*bla*_{KPC} and *bla*_{OXA-10}/*bla*_{NDM}. The *bla*_{NDM} or *bla*_{KPC} carrier isolates showed important virulence genes, such as *ucaA* (n=8/44.4%), *pbtA* (n=10/55.5%) and *nrpG* (n=2/11.1%). However, in general, the non-carrier isolates of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} showed a greater number of virulence genes when compared to the carrier group.

Conclusion: Clinical isolates of *P. mirabilis*, in addition to being multi-drug resistant, presented efficient virulence factors that can establish infection outside the gastrointestinal tract.

Keywords: *Proteus mirabilis*; virulence; *bla*_{KPC}; *bla*_{NDM}; *bla*_{OXA}

INTRODUCTION

Proteus mirabilis is a little studied gram-negative bacterium, belonging to the order *Enterobacterales* ^[1], and is commonly the cause of Urinary Tract Infections (UTI) and sepsis in humans^[2,3]. What is worrying is the intrinsic resistance of this bacterial species to polymyxins, nitrofurantoin and tigecycline ^[4]. Moreover, this pathogen is acquiring genes that encode carbapenemases with increasing frequency, thus decreasing the spectrum of action of existing antimicrobials. The *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes in *P. mirabilis* have been reported on several continents and in several countries, including Brazil ^[5,6,7,8, 9,10,11]. On the other hand, there have been few reports about *bla*_{OXA-10} from anywhere in the world ^[11,12,13].

Besides resistance, bacterial virulence factors are important for the establishment of infection, and thus *P. mirabilis* is able to survive in the urinary tract and cause severe UTIs due to its ability to produce several virulence mechanisms, amongst which is the adhesion to the host cell by different structures, including mannose-resistant fimbria *Proteus* (MR/P), *P. mirabilis* fimbriae (PMF) and Uroepithelial Cell Adhesin (UCA) ^[14,15,16]. These adhesins are important in the formation of biofilm which plays an important role in establishing severe UTIs and pyelonephritis, especially in catheterized patients. In addition, this bacterium can also use a Phosphate Transport (Pst) mechanism and different iron uptake systems, such as proteobactin (Pbt) and nonribosomal peptide synthetase (NRPS) (Yersiniabactin).

Despite the severity of infections caused by *P. mirabilis*, there is still no data on these virulence characteristics of multidrug-resistant strains carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}. On the other hand, in species on which there are more studies, such as *Klebsiella*

pneumoniae, it is known that virulence genes are more frequently found together, in isolates producing KPC [17,18].

The clonal dissemination of resistant multidrug pathogens carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} can be considered an emerging global problem, including in Brazil, mainly in *Klebsiella* species [8,19]. In *P. mirabilis*, this spread was in Portugal and Germany, evidenced in humans and animals, but in strains carrying other resistance genes, such as *bla*_{CMY-1} or *bla*_{OXA-58} [3,20]. Enzymes of the OXA type are widespread and have been described mainly in *Enterobacteriales* and *Pseudomonas aeruginosa*. Belonging to Ambler's class D, OXA-10 is an ESBL that has a high level of hydrolytic activity against penicillins, cloxacillin and oxacillin, in addition to high resistance to ceftazidime [21,23].

Considering that virulence factors present in *P. mirabilis* carrying the *bla*_{KPC-2} or *bla*_{NDM} genes are still scarcely known, the present study sets out to investigate the *mrpG*, *pmfA*, *ucaA*, *nrpG* and *pbtA* genes in clinical and non-carrier *P. mirabilis* isolates of the *bla*_{KPC-2} or *bla*_{NDM} genes and to analyze the genetic variability, clonal relationship and other genes that show resistance to β -lactams.

Materials and Methods:

Bacterial isolates and antimicrobial susceptibility test

Were analyzed of 36 clinical isolates of *P. mirabilis*, 18 of which were carriers and 18 non-carriers of the *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM} gene from different infection sites and sectors provided under the demand of a public hospital in Recife-PE, Brazil, between 2017 and 2018. The isolates were identified by the automated biochemical system Phoenix-BD™, and kept in frozen stock with 15% glycerol at -70°C, for further analysis.

The tests of susceptibility to antimicrobials and minimum inhibitory concentration were also performed by the automated system Phoenix-BD™, following criteria determined by the Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2020). The antimicrobials tested were Ampicillin, β -lactam / β -lactamases (ampicillin/ sulbactam and piperacillin/ tazobactam), monocyclic β -lactams (aztreonam), cephalosporins (Cefepime, Ceftazidime, Cefuroxime) aminoglycosides (tobramycin, amikacin and gentamicin), fluoroquinolone (Ciprofloxacin), carbapenems (meropenem, imipenem and ertapenem) and tigecycline.

DNA extraction, primer design and PCR Conditions for detecting the virulence and resistance genes

The DNA of the bacterial isolates was extracted using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA), and its quality and quantity were evaluated by a NanoDrop spectrophotometer.

Six important genes associated with virulence in *P. mirabilis* in humans were investigated, including *mrpG*, *pmfA* and *ucaA* (fimbrial adhesins), *pstS* (phosphate transport), *nrpG* and *pbtA* (siderophores). Primers were designed in this study with the aid of the primer-BLAST NCBI platform.

The amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, comprising: genomic DNA at 20ng/µl, 1.0U of the *Taq* DNA polymerase enzyme (Promega, USA), 8mM dNTP (Promega, USA), 25mM MgCl₂ and 20µmol of primers. For each sample mixer, a negative control and a positive control (P4-A2; P26-A2; P27-A2) from an isolate from this same study were added with confirmation of the presence of genes by sequencing the PCR product. With cycles of initial denaturation at 95°C for 5 minutes, followed by 30 cycles, consisting - in each cycle - of 1 minute at 95°C for denaturation, 1 minute annealing temperature of the initiator for each gene (Table 1) and 1 minute at 72°C for extension. After these cycles, a 10-minute final stretching step was performed at 72°C.

Table 1 - Sequence of Primers that were used in the study.

Gene	Primer Sequence	Fragment size	Annealing temperature	Ref.
<i>bla</i> _{KPC}	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	882bp	63°C	[24]
<i>bla</i> _{NDM}	TAAAATACCTTGAGCGGGC AAATGGAAACTGGCGACC	439bp	60°C	[24]
<i>bla</i> _{OXA-10-like}	TCAACAAATCGCCAGAGAAG TCCCACACCAGAAAAACCAG	276bp	63°C	[44]
<i>bla</i> _{OXA-48-like}	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGATGGC	743bp	55°C	[45]
<i>bla</i> _{OXA-23-like}	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCCA	501bp	55°C	[46]
<i>bla</i> _{OXA-58-like}	CGATCAGAATGTTCAAGCGC ACGATTCTCCCCTCTGCGC	NI	55°C	[47]
<i>bla</i> _{SPM}	CCTACAATCTAACGGCGACC TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	700bp	63°C	[48]
<i>bla</i> _{GES}	ATCAGCCACCTCTCAATGG TAGCATCGGGACACATGAC	860bp	55°C	[49]
<i>bla</i> _{VIM}	CAGATTGCCGATGGTGTTTGG AGGTGGGCCATTCAGCCAGA	ND	62°C	[50]
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGCTTAATTCTC	232bp	60°C	[50]

	GTGATGCGTCYCCAAAYTT CACT			
<i>mrpG</i>	GGCTTTTGCAATACCGGACAAC CACCCGCAGTTAATGACATCT TGTC	365bp	63°C	This study
<i>pstS</i>	CATTGCCGCTGCACTTTCAA TTGTTTTCCAAGCGGCACG	974bp	63°C	This study
<i>ucaA</i>	GCATTTGCTGGCTCATCTATGG AGGCAATGGTGTAATGAACGG	496bp	63°C	This study
<i>pmfA</i>	GCTTTGGCTGCGGCTTTAG CACCTGGCGTTACTTTAGCG	496bp	63°C	This study
<i>nrpG</i>	TAATGAGGTGCATATCTGGATTGGT TAAATGATGTGGCAGGTTGCTT	718bp	63°C	This study
<i>pbtA</i>	ATTGCAGGGCAACAAACTGC AGTTCAAGCTCTTCGCCGAT	1011bp	63°C	This study
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	ND	36°C	[27]

Fonte: A autora (2021)

We investigated in all *P. mirabilis* isolates five important genes that confer resistance to beta-lactam antimicrobials: *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-10-like} and *bla*_{NDM}, these being investigated by the PCR technique, followed by sequencing of amplicons. For each assay, a negative control and a positive control were added for each gene investigated. The positive controls for the *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IPM}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{VIM} and *bla*_{GES} genes were Ea18A [23], PS6-A, PS7-A and PS8-A [24], respectively. The amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl by sample mixer, comprising: genomic DNA at 20ng/µl, 1.0U of the *Taq* DNA polymerase enzyme (Promega, USA), 8mM dNTP (Promega, USA), 25mM MgCl₂ and 20µmol of primers. A positive and negative control was included in each amplification match. The amplifications were performed with cycling, annealing temperature and pairs of primers for each gene described in Table 1. Then, the amplified samples were subjected to agarose gel electrophoresis containing CyberSafe (Thermofisher, UK).

Sequencing Amplicons

The amplicons of the virulence and resistance genes found were purified using the SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) and sequenced by the deoxyribonucleotide chain termination method[25]. The nucleotide sequences were analyzed by the Bioedit [26], BLAST and ClustalW programs of the European Institute of Bioinformatics. The nucleotide sequences were deposited in GenBank, under access number: MW536487, MW548282, MW581825, MZ562557 and MZ562558.

ERIC-PCR

The molecular typing to determine the clonal relationship of the isolates was performed by Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-Polymerase Chain Reaction (ERIC-PCR) with primers described in Table 1 [27]. The amplification reactions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, comprising: genomic DNA at 100ng/µl, 1.0U of the *Taq* DNA polymerase enzyme (Promega, USA), 2mM dNTP (Promega, USA), 25mM MgCl₂ and 10µmol of primers. A negative control was included in each amplification match. The amplifications were performed with cycling of initial denaturation at 95°C for 3 minutes, followed by 40 cycles, consisting – in each cycle - of 1 minute at 92°C for denaturation, 1 minute at 36°C for annealing of the primer and 8 minutes at 72°C for extension. After these cycles, a 16-minute final stretching step was also performed at 72°C [28]. The amplification products were submitted to electrophoresis in 1.5% agarose gel in Tris, Boric Acid and EDTA (TBE) buffer. The analysis of fragments amplified by ERIC-PCR and the construction of the dendrogram were performed using the software GelAnalyzer [29] and DARwin 6.0 [30], respectively.

Results

Clinical information about the patients, origin and susceptibility profile to antimicrobials of *P. mirabilis* isolates

As to clinical data about the patients, most were female (n=24/72%) with a mean age of 58 years. Of the 33 patients analyzed, 39% (n=13) were hospitalized for more than 90 days and 54% (n=18) died. The antimicrobials used belonged to groups such as cephalosporins, aminoglycosides, carbapenems, glycopeptides, quinolones and lincosamides (Table 2 and 3).

Table 2 - Antibiotic therapy, age, gender, length of stay and clinical outcome of patients for the of *P. mirabilis* isolates carriers the *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM} gene from Recife of 2017 and 2018

Patient number/st rain	Sector	Clinical samples	Resistance profile	Antibiotic therapy	Gender/ Age (years)	Length of stay (days)	Clinical outcome
2/P3-A2	MC	Urine	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFO (I)=(16); CTX (=32); CTZ (=4); CFU (>16); CFL (>16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vancomycin Amikacin; Piperacillin- tazobactam	F/74	84	Hospital Discharge
3/P4-A2	CCU	Catheter tip	AMI (>32); CPM (>16);CFO (I)=(8); CTX (=32); CFU (>16); CFL (>16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Piperacillin-tazobactam; Meropenem; Levofloxacin; Polymycin; Amikacin; Linezolid; Moxifloxacin	F/66	ND	Death
4/P6-A2	CCU	Catheter tip	AMI (>32); CPM (>16); CFU (>16); CTX (=16); IMP (>8); MER (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Not determined	F/ND	ND	ND
7/P10-A2	MC	Urine	AMI (>32); CPM (>16); CFL (>16); CFU (>16); CFO (I) (=16); CTZ (I) (=2); CTX (=32); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); CIP (>2); LEV (>4);	Piperacillin- tazobactam	M/39	19	Hospital Discharge
10/P14-A2	CCU	Peritonia l liquid	AMI (>32); AMP (>16)	Piperacillin-tazobactam; Vancomycin; Meropenem	M/41	11	Death
11/P16-A2	ICU	Urine	GEN (I)=(8); CPM (>16); CFL (>16); CFO (>16); CTX (>32); CFU (>2); CTZ (>16) AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)=(64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Amphotericin B*; Vancomycin; Meropenem	F/29	359	Death
13/P18-A2	ICU	Urine	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); IMP (=4); ERT (=4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Vancomycin; Meropenem; Amikacin; Doxacillin; Metronidazole*	F/32	ND	Death
13/P23-A2	ICU	Urine	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)				
15/P20-A2	ICU	Tissue	GEN (=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vacomycin; Polymyxin B; Ampicillin; Amikacin; Daptomycin	M/43	104	Death
17/P25-A2	ICU	Urine	GEN (I)=(8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (>8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone- azithromycin; Meropenem; Vancomycin; Fluconazole*	F/44	148	Death

17/P27-A2	ICU	Catheter tip	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)					
20/P29-A2	MC	Urine	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vancomycin; Amikacin; Fluconazole*	F/65	120	Hospital Discharge	
26/P35-A2	CARD	Urine	GEN (I)(=8); CPM (=16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(=64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Azithromycin	F/83	ND	Death	
27/P38-A2	ICU	Catheter tip	AMI (I)(=32); GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); CTZ (>16); IMP (>8); MPM (>8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Ceftazidime; Polymyxin B; Meropenem	F/48	66	Death	
28/P39-A2	ICU	Urine	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (I); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CPM (>2)	Ciprofloxacin; Clindamycin; Vancomycin;	M/44	32	Hospital Discharge	
29/P41-A2	CARD	Urine	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (*); IMP (>8); MPM (=4); ERT (=4); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (>64/4); LEV (>4); CIP (>2)	Ciprofloxacin	F/79	19	Hospital Discharge	
30/P42-A2	ICU	Urine	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (>16); CFO (>16); IMP (>8); MPM (=8); ERT (>4); AMP (>16); AMC (>16/8); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Linezolid; Fluconazole*	F/54	332	Death	
32/P45-A2	ICU	Catheter tip	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (=8); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CTZ (>16); CFO (>16); IMP (>8); MPM (=8); AMP (>16); AMC (>16/8); PPT (I)(64/4); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Vancomycin; Meropenem; Cefepim; Polymyxin B; Amikacin; Linezolid	M/59	120	Death	

Fonte: A autora (2021)

M- Male; F- Female; CCU– Coronary Care Unit; NCCU – Neonatal Coronary Care Unit; ICU – Intensive Care Unit; CARD – Cardiology; MC – Medical Clinic; SC - Surgical Clinic; (asterisk*) – Antifungal; ND - Not determined; AMP - Ampicillin; TRI/SUL – Sulfamethoxazole-trimethoprim; AMP / SUL - Ampicillin-sulbactam; PPT - Piperacillin-tazobactam; CFU - Cefuroxime; CFO - Cefoxitin; CTX - Ceftriaxone; CTZ - Ceftazidime; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amikacin; CFL – Cephalothin; GEN - Gentamycin; CIP - Ciprofloxacin; (int) - Intermediate; neg – negative

Table 3 - Antibiotic therapy, age, gender, length of stay and clinical outcome of patients for the of *P. mirabilis* isolates non-carriers the *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM} gene from Recife of 2017 and 2018

Patient number/st rain	Sector	Clinical samples	Resistance profile	Antibiotic therapy	Gender/Age (years)	Length of stay (days)	Clinical outcome
1/P2-A2	SC	Urine	Sensitivity to all tested antimicrobials	Vancomycin	M/58	8	Death
5/P7-A2	VC	Bone fragment	GEN (>8); AMP (>16); CIP (>2); LEV (>4); TRI-SUL (>4/76)	Levofloxacin; Clindamycin	F/ND	ND	Hospital Discharged for insubordination
6/P8-A2	CARD	Urine	GEN (>8); CFO (I)(=16); CFL (>16); CTZ (I) (=2); AMP (>16); AMC (>16/8); CIP (>2); LEV (>4); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Azithromycin	M/54	9	Hospital Discharge
8/P12-A2	CCU	Blood	AMI (>32); GEN (>8); CPM (>8); CFL (>16); CFU (>16); CTX (>32); AMP (>16)	Ceftriaxone; Clindamycin; Polymyxin B; Meropenem; Amikacin; Trimethoprim-sulfamethoxazole	F/55	154	Death
9/P13-A2	ICU	Catheter tip	GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CFU (>16); CTX (>32); AMP (>16); AMC (>16/8); CIP (>2); LEV (>4)	Meropenem; Levofloxacin; Amikacin; Vancomycin; Polymyxin B; Amphotericin; Piperacillin-tazobactam; Clindamycin	M/71	96	Death
12/P17-A2	ICU	Urine	GEN (>8); CPM (=8); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); IMP (=4); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone-azithromycin; Piperacillin tazobactam; Linezolid; Amikacin; Gentamicin; Daptomycin; Levofloxacin; Fluconazole*	F/65	160	Death
14/P19-A2	ICU	Tracheal secretion	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Cefepim; Meropenem; Tigecycline; Amikacin; Levofloxacin; Polymyxin B; Vancomycin	F/80	97	Death
15/P21-A2	CCU	Tracheal secretion	GEN (I)(=8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (>32); CFU (>16); CFO (>16); AMP (>16); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Meropenem; Vacomycin; Polymyxin B; Ampicillin; Amikacin; Daptomycin	M/43	104	Death
16/P24-A2	CARD	Wound secretion	Sensitivity to all tested antimicrobials	Cefepim; Meropenem; Vancomycin; Ampicillin	F/57	110	Hospital Discharge

18/P26-A2	HR	Urine	Sensitivity to all tested antimicrobials	Cephalexin; Clindamycin; Gentamicin; Cephalothin;	F/29	6	Hospital Discharge
19/P28-A2	ICU	Tracheal secretion	Sensitivity to all tested antimicrobials	Ceftriaxone; Ciprofloxacin; Meropenem; Polymyxin B; Vancomycin; Amikacin; Amphotericin	F/71	47	Death
21/P30-A2	CARD	Urine	CFL (=8)	Trimethoprim-sulfamethoxazole; Ceftazidime; ceftriaxone-azithromycin;	F71	47	Hospital Discharge
22/P31-A2	AMB	Urine	CFL (=8)	Uninformed	F/69	Patient was not hospitalized	-
23/P32-A2	EMER	Urine	Sensitivity to all tested antimicrobials	Cefepim; Meropenem; Vancomycin; Cefepim	F/74	124	Hospital Discharge
24/P33-A2	CARD	Urine	CFL (=8)	Ceftriaxone	F/82	24	Hospital Discharge
25/P34-A2	NCCU	Eye Secretion	AMP (>16); TRI-SUL (>4/76)	Vancomycin; Meropenem; Oxacillin; Ceftriaxone	M/0,7	ND	Death
31/P43-A2	ICU	Urine	AMI (I)(=32); GEN (>8); CPM (>16); CFL (>16); CTX (=32); CFU (>16); IMP (>8); AMP (>16); AMC (>16/8); LEV (>4); CIP (>2); TRI-SUL (>4/76)	Ceftriaxone; Vancomycin; Piperacillin-tazobactam; Amphotericin B; Amikacin; Meropenem; Polymyxin B; clindamycin; Fluconazole*	F/70	138	Death
33/P46-A2	MAT	Urine	GEN (I)(=8); AMP (I)(=16); PPT (>64/4); LEV (>4)	ND	F/ND	ND	ND

Fonte: A autora (2021)

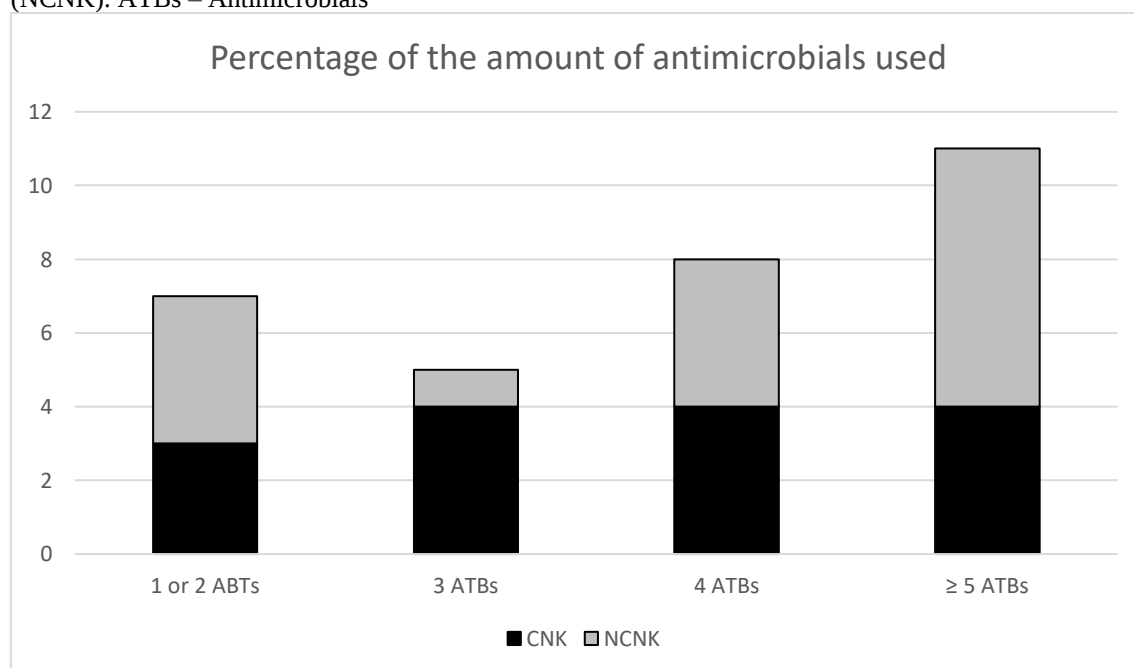
M- Male; F- Female; CCU– Coronary Care Unit; NCCU – Neonatal Coronary Care Unit; ICU – Intensive Care Unit; CARD – Cardiology; MC – Medical Clinic; SC - Surgical Clinic; (asterisk*) – Antifungal; ND - Not determined; AMP - Ampicillin; TRI/SUL – Sulfamethoxazole-trimethoprim; AMP / SUL - Ampicillin-sulbactam; PPT - Piperacillin-tazobactam; CFU - Cefuroxime; CFO - Cefoxitin; CTX - Ceftriaxone; CTZ - Ceftazidime; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amikacin; CFL – Cephalothin; GEN - Gentamycin; CIP - Ciprofloxacin; (int) - Intermediate

Regarding the carriers and non-carriers *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} gene isolates, the percentage of deaths was similar for both groups, with 62.5% (n=10) of deaths in the non-carriers group and 50% (n=9) in the groups of carriers of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} gene.

Among patients with *P. mirabilis* isolates not carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, 50% (n=9) were over 60 years old and of these five died, 27.7% (n=5) of the patients were between 40 and 59 years old, one patient was seven months old and one patient was 29 years old. Of the patients with *P. mirabilis* isolates carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, 31.3% (n=5) were over 60 years old, 43.2% (n=7) were between 40 and 59 years old and 25% (n=4) were younger 40 years old. Regarding the length of stay, the percentage for both groups was similar, in the groups of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} carriers and non-carriers, 43.7% (n=7) and 44.4% (n=8) were hospitalized for more than 90 days, respectively.

All patients who used five or more antimicrobials died in both groups. In all, patients who used five or more antimicrobials were hospitalized for more than 90 days. Of the patients who used one or two antimicrobials in the isolated groups carrying and not carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, only one died in each group. The percentage of the amount of antimicrobials used by patients in both groups is shown in Figure 1.

Graphic 1 – Percentage of the amount of antimicrobials used by patients in relation to the group of isolates that carry the *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} (CNK) genes and the group of isolates that do not carry *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} (NCNK). ATBs – Antimicrobials



Fonte: A autora (2021)

The clinical isolates of *P. mirabilis* analyzed came from different samples, including urine (n=21/58%), catheter tip (n=6/16.6%), tissue (n=1/2.7%), tracheal secretion (n=3/7.5%), blood (n =1/2.7%), peritoneal fluid (n=1/2.7%), ocular secretion (n=1/2.7%) and wound secretion (n=1/2.7%) (Tables 4 and 5). The sector with the highest occurrence was the Intensive Care Unit (n=15/41.6%) followed by Cardiology (n=7/19.4%), Coronary Care Unit (n=5/13.8%) and medical clinic (n=3/8.3%).

Table 4 - Source of isolation, the presence of virulence genes, and ERIC-PCR profile of *P. mirabilis* isolates carriers the *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM} gene from Recife of 2017 and 2018.

Id.	Harvest date	Sector	Clinical samples	Virulence genes	Resistance genes	Virulence Profile	Resistance profile (MIC)	Antimicrobial resistance classification	ERIC
P3-A2	22/09/2017	MC	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V5	AMI/GEN/AMC/AMP/PPT/CFL/CTX/CPM/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E2
P4-A2	13/09/2017	CCU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V4	AMI/GEN/AMC/AMP/PPT/CFL/CPM/CFO(int)/CFZ(int)/CTX/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E3
P6-A2	27/09/2017	CCU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/CPM/CFX/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER/TRI-SUL	XDR	E3
P10-A2	09/10/2017	MC	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA, nrpG</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/CFL/CPM/CTX/CFZ(int)/CFO(int)/CFU/CIP/LEV/ERT/IMP/MER	XDR	E5
P14-A2	09/11/2017	CCU	Peritoneal liquid	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V5	AMI/AMC/AMP/PPT/ATM/CPM/CTZ/CTX/ERT/IMP/MER/LEV/CIP/PPT/TRI-SUL	XDR	E8
P16-A2	26/01/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V3	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN(Int)/LEV/PPT(Int)/TRI-SUL	XDR	E9
P18-A2	04/03/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{OXA-10}	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFP/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E18
P20-A2	23/03/2018	ICU	Tissue	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V3	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN(Int)/IMP/LEV/MER/PPT(Int)/TRI-SUL	XDR	E12
P23-A2	29/03/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E14
P25-A2	03/04/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10}	V4	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN(Int)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E13
P27-A2	06/04/2018	ICU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10}	V5	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN(Int)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E17
P29-A2	28/03/2018	MC	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, nrpG</i>	<i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V4	AMI/AMP/CFL/CFU/CIP(Int)/LEV(Int)/TRI-SUL	MDR	E19
P35-A2	20/04/2018	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V3	AMI(I)/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E25

P38-A2	10/06/2018	ICU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10}	V4	AMI(I)/AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CIP/ERT/GEN (I)/IMP/LEV/MER/PPT/TRI-SUL	XDR	E26
P39-A2	06/06/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA</i>	<i>bla</i> _{KPC} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V4	AMI/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT	XDR	E27
P41-A2	07/05/2018	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{KPC}	V5	AMI/AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/ERT/GEN/IMP/LEV/ERT/PPT	XDR	E28
P42-A2	19/06/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V3	AMI/AMC/AMP/CFL/CPM/CFO/CTZ/CFU/CIP/ERT/IMP/MER/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E29
P45-A2	03/08/2018	ICU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	<i>bla</i> _{NDM} <i>bla</i> _{OXA-10-like}	V4	AMC/AMP/AMI/CPM/CFO/CTZ/CFU/CIP/TRI-SUL/ERT/GEN/IMP/LEV/MER/PPT/	XDR	E31

Fonte: A autora (2021)

CCU– Coronary Care Unit; NCCU – Neonatal Coronary Care Unit; ICU – Intensive Care Unit; CARD – Cardiology; MC – Medical Clinic; (line-) – Sensitivity to all tested antimicrobials; AMP - Ampicillin; AMP / SUL - Ampicillin-sulbactam; PPT - Piperacillin-tazobactam; CFU - Cefuroxime; CFO - Cefoxitin; CTX - Ceftriaxone; CTZ - Ceftazidime; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amikacin; CFL – Cephalothin; GEN - Gentamycin; CIP - Ciprofloxacin ; CEFL - Cephalothin; NIT - Nitrofurantoin; (int) - Intermediate; neg - negative; MDR - Multidrug Resistant; XDR - Extensively Drug Resistant; MDR - resistant to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories; non-MDR, sensitive to all classes tested or drug resistant to only one or two categories of antimicrobials; XDR, resistant to ≥ 1 agent in all categories except one or two categories of antimicrobials; *bla*_{OXA-10-like} – the *bla*_{OXA-10} gene confirmed by PCR, but no confirmation of variant derived by Sanger sequencing; *bla*_{OXA-10} - the presence of *bla*_{OXA-10} was confirmed by PCR and Sanger sequencing

Table 5 - Source of isolation, the presence of virulence genes, and ERIC-PCR profile of *P. mirabilis* isolates non-carriers the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes from Recife in 2017 and 2018.

Id.	Harvest date	Sector	Clinical Sample	Virulence genes	Virulence Profile	<i>bla</i> _{OXA-10}	Resistance Profile	Antimicrobial resistance classification	ERIC
P2-A2	25/09/2017	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	non-MDR	E1
P7-A2	04/10/2017	VC	Bone fragment	<i>mrpG, pstS, pmfA, pbtA</i>	V4	neg	AMP/GEN/CIP/LEV/TRI-SUL	MDR	E4
P8-A2	02/10/2017	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA nrpG, pbtA</i>	V5	neg	AMP/AMC/CFL/CFO(int)/CTZ(int)/CIP/LEV/GEN/TRI-SUL	MDR	E2
P12-A2	14/11/2017	CCU	Blood	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMI/GEN/CPM/CFL/CFU/CTX/AMP/AMC	MDR	E6
P13-A2	20/11/2017	ICU	Catheter tip	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMP/ATM/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/GEN	MDR	E7
P17-A2	06/03/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, nrpG, pbtA</i>	V5	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CTZ/CTX/CFU/CIP/LEV/GEN/IMP/PP T/TRI-SUL	XDR	E10
P19-A2	23/03/2018	ICU	Tracheal secretion	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	V3	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CPM/CAZ/CTX/CFU/CIP/LEV/ERT/GEN(Int)/TRI-SUL	XDR	E11
P21-A2	25/03/2018	CCU	Tracheal secretion	<i>mrpG, pstS, pmfA</i>	V3	<i>bla</i> _{OXA-10}	AMC/AMP/ATM/CPM/CFO/CTZ/CTX/CFU/CIP/LEV/GEN(Int)/TRI-SUL	XDR	E13
P24-A2	02/04/2018	CARD	Wound secretion	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	-	non-MDR	E15
P26-A2	27/03/2018	HR	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	non-MDR	E16
P28-A2	03/04/2019	ICU	Tracheal secretion	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	-	non-MDR	E18

P30-A2	13/04/2019	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	CFL	non-MDR	E20
P31-A2	13/04/2018	AMB	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	ATM/CFL/NIT	non-MDR	E21
P32-A2	14/04/2018	EMER	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	-	non-MDR	E22
P33-A2	13/04/2018	CARD	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	CFL	non-MDR	E23
P34-A2	23/04/2018	NCCU	Eye Secretion	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG</i>	V5	neg	AMP/TRI-SUL	non-MDR	E24
P43-A2	19/06/2018	ICU	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	<i>bla</i> _{OXA-10-like}	AMC/AMP/ATM/CFL/CPM/CAZ/ CFO/CFU/CIP/GEN/LEV/TRI-SUL	XDR	E30
P46-A2	31/07/2018	MAT	Urine	<i>mrpG, pstS, pmfA, ucaA, nrpG, pbtA</i>	V6	neg	AMP(int)/GEN(int)/PPT	non-MDR	E32

Fonte: A autora (2021)

CCU– Coronary Care Unit; NCCU – Neonatal Coronary Care Unit; ICU – Intensive Care Unit; CARD – Cardiology; MC – Medical Clinic; MAT – Maternity; AMB – Ambulatory; VC - Vascular clinic; EMER – Emergency; HR - High risk; (line-) – Sensitivity to all tested antimicrobials; AMP - Ampicillin; AMP / SUL - Ampicillin-sulbactam; PPT - Piperacillin-tazobactam; CFU - Cefuroxime; CFO - Cefoxitin; CFX - Ceftriaxone; CTZ - Ceftazidime; CPM - Cefepime; MPM - Meropenem; IMP - Imipenem; AMI - Amikacin; GEN - Gentamycin; CIP - Ciprofloxacin; CFL - Cephalothin; (int) - Intermediate; neg - negative; MDR - Multidrug Resistant; XDR - Extensively Drug Resistant; MDR - resistant to ≥ 1 agent in ≥ 3 antimicrobial categories; non-MDR, sensitive to all classes tested or drug resistant to only one or two categories of antimicrobials; XDR, resistant to ≥ 1 agent in all categories except one or two categories of antimicrobials; *bla*_{OXA-10-like} – the *bla*_{OXA-10} gene confirmed by PCR, but no confirmation of variant derived by Sanger sequencing; *bla*_{OXA-10} - the presence of *bla*_{OXA-10} was confirmed by PCR and Sanger sequencing.

The isolates showed high rates of resistance to the main groups of antimicrobials (carbapenems, aminoglycosides, cephalosporins and quinolones). On the other hand, they showed greater sensitivity to amikacin (n=12/33%), cefoxitin (n=12/33%), followed by meropenem (n=13/36%) (Tables 4 and 5). The *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} carrier isolates showed high rates of resistance when compared to non-carriers, mainly ampicillin (n=18/100%), amoxicillin-clavulanate (n=17/94.4%), cefepime (n=17/94.4%), levofloxacin (n=16/88.8%), Cefuroxime (n=16/88.8%) and Ciprofloxacin (n= 16/88.8%).

Beta-lactam resistance genes

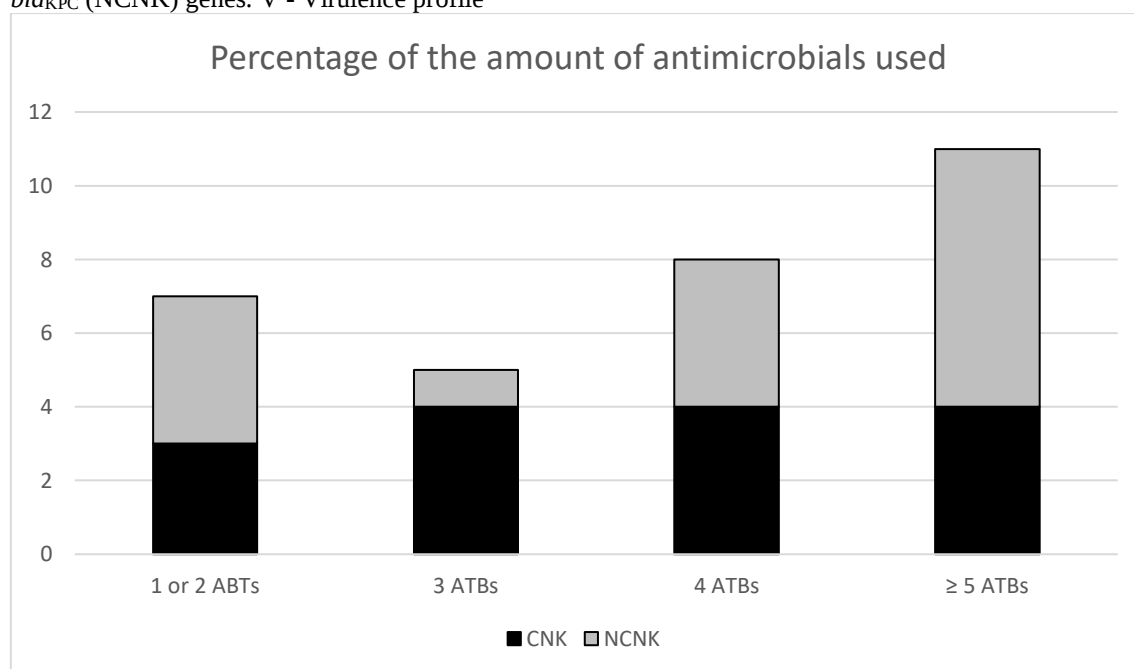
The analysis of the beta-lactam resistance genes showed that the variants most found were *bla*_{OXA-10} (n= 8), *bla*_{KPC-2} (n=10) and *bla*_{NDM} (n=8). It should be noted that no isolates were found co-carrying the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes. Of the 36 *P. mirabilis* isolates analyzed, 18 carried the *bla*_{OXA-10} gene, showing resistance to a wide variety of antimicrobials. Resistance to ceftazidime was frequent in 44.4% (8/18) of *bla*_{OXA-10} carrier isolates (Tables 4 and 5).

Genotypic virulence profile

The genes *mrpG*, *pmfA*, *ucaA* (fimbrial adhesins), *pstS* (phosphate transport), *nrpG* and *pbtA* (siderophores), were found in both carrier and non-carrier isolates of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, but in different numbers of occurrence. The *mrpG*, *pmfA* and *pstS* genes were found in all 36 isolates analyzed, followed by *ucaA* (n=21/58.3%), *nrpG* (n=16/44.4%) and *pbtA* (n=21/58,3%). The genes encoding siderophores (*nrpG* and *pbtA*) were found concomitantly in eight of the 21 isolates from urine samples, occurring mainly in non- *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} isolates (Tables 4 and 5), and in only one isolate that carried *bla*_{KPC} genes.

The *bla*_{NDM-1} or *bla*_{KPC-2} carrier isolates showed a lower occurrence of genes responsible for the synthesis of adhesins and siderophores (*ucaA*: n=8/ 44.4%, *pbtA*: n=10/55.5% and *nrpG*: n=2/11.1%), when compared to the non-carrier group (*ucaA*: n=13/72%, *pbtA*: n=11/61% and *nrpG*: n=14/77%). Additionally, in the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} carrier group, the occurrence of isolates with five or more virulence genes was lower compared to the *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2} non-carrier groups (Figure 2).

Graphic 2. Distribution of *Proteus mirabilis* according to the virulence profile for the groups of the isolates carrying the *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} (CNK) genes and the group of the non-carrier isolates of the *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} (NCNK) genes. V - Virulence profile



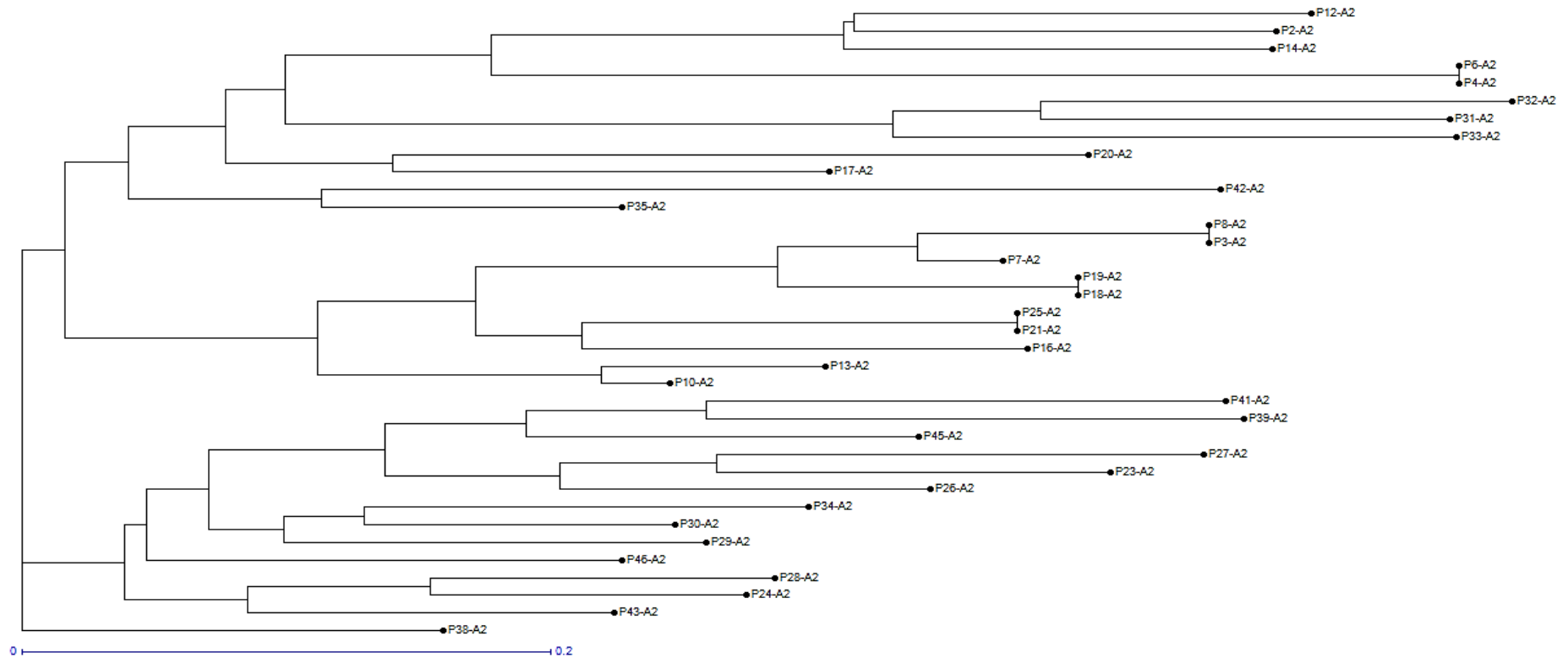
Fonte: A autora (2021)

The *bla*_{OXA-10} carrier isolates showed percentages of lesser virulence of the genes *ucaA* (n=7/38.8%), *pbtA* (n=7/38.8%) and *nrpG* (n=5 /27.7%), when compared to *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} carrier isolates (Tables 4 and 5).

ERIC-PCR

Thirty-two different genetic profiles were detected by ERIC-PCR among the 36 isolates of *P. mirabilis* analyzed in this study (Figure 3). Only four profiles included two isolates: E2 (P3-A2 and P8-A2), E3 (P4-A2 and P6-A2), E11 (P18-A2 and P19-A2) and E13 (P21-A2 and P25-A2). We found that these isolates with the same clonal profile came from different sectors, biological samples, and different resistance and virulence patterns (Tables 4 and 5).

Figure 3 - Dendrogram of the genetic profile of *Proteus mirabilis* isolates. Cluster analysis by ERIC-PCR using the Jaccard similarity coefficient and the Weighted Neighbor-Joining cluster method. The scale indicates the percentage of genetic distance.



Fonte: A autora (2021)

Discussion

Proteus mirabilis is one of the main pathogens that cause severe UTIs, especially in patients using catheters for a long time. However, studies on important virulence factors for establishing infection in the host and on resistance to antimicrobials are still limited [3,7,8]. The *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{OXA} genes are reported less frequently in *P. mirabilis* compared to *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} [8,10,33]. In the present study, no isolates were found co-carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}. However, in another recent study carried out in Brazil, isolates of *P. mirabilis* and *K. pneumoniae*, co-carried the two genes [8]. Regarding *bla*_{OXA-10}, to our knowledge this is the first report of the presence of this gene in *Proteus mirabilis* in Brazil. *bla*_{OXA-10} in *Proteus* has already been reported in China [12], Switzerland [13], Italy [11] and Greece [32]. To our knowledge, we also report here for the first time strains of *P. mirabilis* co-carrying *bla*_{OXA-10} and *bla*_{KPC}. The presence of *P. mirabilis* carrying *bla*_{OXA-10} is worrying because this gene encodes an ESBL that hydrolyzes oxyimino-cephalosporins and to a lesser extent imipenem. Additionally, the presence of genes for carbapenemase in isolates of *P. mirabilis* carrying *bla*_{OXA-10} limits the existing therapeutic options.

Regarding genetic diversity by ERIC, 32 distinct clonal profiles were found out of a total of 36 isolates analyzed. Several isolates had a similar virulence and resistance profile, even if they belong to different clonal groups. On the other hand, clonal groups shared by other isolates had different resistance and virulence characteristics. This suggests that some characteristics may have arisen because they acquired plasmids, underwent mutation or other genetic mechanisms [33]. As observed in this study, multiclonal dissemination can favor the survival and persistence of this bacteria in the hospital environment, which colonized and caused infections in patients. Additionally, the clonal variability of these strains can hinder the therapeutic measures used by health professionals, such as empirical therapies, even if the implementation of the guidelines of the Nosocomial Infection Control Commission (NICC) is efficient. As already mentioned in the present study, isolates of *P. mirabilis* were found to cause urinary infections in the same patient at different times. Tracing the microbiological and resistance profile of *P. mirabilis* is not an easy task compared to other infection-causing pathogens, such as *Klebsiella pneumoniae* or *Klebsiella aerogenes*, in both of which it is known that the *bla*_{KPC} gene is widely disseminated [8,28]. However, it is still not completely

elucidated how the association between virulence factors and the presence of important resistance genes in *P. mirabilis* isolates occurs.

All the isolates investigated carried the genes *mrpG* and *pmfA*, belonging to the gene operons *mrp* and *pmf* in *P. mirabilis*, and appear to be intrinsic in this pathogen. The same was observed in a recent study in Iran, in which all *P. mirabilis* isolates analyzed had the genes *mrpH*, *mrpA* and *pmfA* [34]. In Brazil, in strains of *P. mirabilis*, isolated from chicken carcasses, the presence of genes *mrpA* and *pmfA* were also observed in 100% of the isolates [14]. The presence of these genes in *Proteus*, may justify the high capacity of biofilm production by this pathogen, since the fimbrial adhesins encoded by these genes have the ability to fixate on host cells at the beginning of biofilm formation [35].

The *ucaA* gene (UCA fimbrial adhesin) was found in 70% of *P. mirabilis* isolates in the present study and found less frequently when compared to the other genes for fimbrial adhesins investigated here. Higher percentages were found by Mirzaei [34], in Iran, who observed that 95.5% of *P. mirabilis* isolates carried *ucaA*. *P. mirabilis* strains carrying the *ucaA* gene have an increased capacity to colonize the kidneys due to the adhesive properties of fimbrial material associated with this gene [15]. Kuan [36], reported the presence and importance of the *ucaA* gene in the expression of adhesion to epithelial cells, mainly in the kidneys and bladder, this being linked to the formation of biofilm in *P. mirabilis* due to the ability of bacterial cell-cell adhesion, to host cells and urinary catheter in urinary pathways. Other studies have reported the simultaneous presence of various types of fimbriae in *P. mirabilis*, including *pmf*, *uca* and *mrp*, noting that *P. mirabilis* fimbriae have a distinct role in generating biofilm [16,34].

The expression of the gene operon for yersiniabactin (*nrp*) and proteobactin (*pbt*) in *Proteus* is the mechanism that acts in the production of siderophores, thereby capturing iron in the extracellular environment and transporting it inside the bacterial cell. Until then, the only previous study that investigated the presence of the *nrp* and *pbt* genes determined that ten isolates of *P. mirabilis* causing UTI carried these two genes, whereas in non-UTI infections only 50% of the isolates had both genes [37]. In the present study, we determined that about half of the isolates of *P. mirabilis* from the ICU carried these two genes that are responsible for producing siderophores, which is essential for the uptake of iron and the establishment of urinary infections caused by *Proteus*, in iron-limited environments.

Additionally, the *pstS* gene was found in all isolates in our study. Phosphorus, an essential element for life, is most often incorporated as inorganic phosphate. The

detection and absorption of phosphate has been associated with virulence in many bacterial species, including *P. mirabilis* [38,39]. As a result, *nrpG*, *pbtA*, *ucaA* and *pstS* detected concurrently in some *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM} carrier isolates pose a threat to immunosuppressed patients and also those hospitalized, and thus reduce existing therapeutic options.

Unexpectedly, *P. mirabilis*, a non-carrier of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, accumulated more virulence factors, and contained five or more virulence genes, when compared to the group of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} carriers in this study. The acquisition of genes that determine antimicrobial resistance generally has a biological cost in bacterial physiology that can be observed in some species, such as *Campylobacter jejuni* [40]. Therefore, antimicrobial-susceptible isolates may harbor more virulence genes together [41]. On the other hand, for important pathogens such as *K. pneumoniae* and *Klebsiella varicola*, the association between antimicrobial resistance and virulence determinants is convergent. Resistant multidrug strains can also be hypervirulent [42,43]. Although the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} isolates analyzed in this study had fewer virulence factors compared to the non-carrier group, they had important factors such as *pbtA* and *nrpG*, which are siderophores that help establish infections.

The high genetic diversity of *P. mirabilis* added to the presence of widely disseminated virulence factors in this pathogen may imply serious infections become established in the host. This pathogen, which belongs to the intestinal microbiota of humans, can eventually infect other sites and cause infections. We observed in this study that isolates not carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} were more frequent in patients older than 60 years when compared to the other group. Although isolates susceptible to antimicrobials have more virulence factors together, these factors can protect the microorganism from the action of the host's immune system [40], especially if the patient is immunocompromised. Although the isolates had more virulence factors together in the group that non-carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, resistance to antimicrobials was lower, even so, patients in this group used five or more antimicrobials more frequently than the group that carried *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}. The pathogenicity of these isolates may be related to the presence of these virulence factors, along with age above 60 years, which may imply in low host immunity to these pathogens, this may suggest that bacteria with such virulence factors, regardless of antimicrobial resistance, can easily cause serious infections in patients over 60 years of age. And consequently, make it difficult to treat these infections.

Conclusion

One of the most relevant findings of this study was the fact that clinical isolates of *P. mirabilis*, in addition to being resistant multi-drugs (carriers of *bla*_{NDM-1} and *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{KOXA-10} genes), presented efficient virulence factors for the establishment of infection outside the gastrointestinal tract. Additionally, another relevant fact was the unexpected fact that less resistant isolates had more virulence genes than more resistant isolates, also indicating the potential of these isolates, which do not have the *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} genes, to cause infection. Unexpectedly, the *mrpG*, *pmfA* and *pstS* genes appear to be intrinsic to *P. mirabilis* since we have unanimously observed these genes in all isolates. Since *P. mirabilis* is an emerging and often overlooked pathogen, the presence of important resistance and virulence factors in this pathogen is alarming and demonstrates the need for additional epidemiological studies and frequent monitoring of this organism.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical Approval

The work was approved by the ethics committee for research involving human beings (CEP/Plataforma Brasil) and registered under CAAE number: 99147818.6.0000.5208.

References

- [1] Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘*Enterobacteriales*’: Proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., Morgane. Int J Syst Evol Microbiol 2016;66:5575–99. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>.
- [2] Ramos AC, Cayô R, Carvalhaes CG, Jové T, Da Silva GP, Sancho FMP, et al.

- Dissemination of multidrug-resistant *Proteus mirabilis* clones carrying a novel integron-borne *bla*_{IMP-1} in a tertiary hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2018;62:1–5.
<https://doi.org/10.1128/AAC.01321-17>.
- [3] Marques C, Belas A, Aboim C, Trigueiro G, Cavaco-Silva P, Gama LT, et al. Clonal relatedness of *Proteus mirabilis* strains causing urinary tract infections in companion animals and humans. *Vet Microbiol* 2019;228:77–82.
<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.10.015>.
- [4] Cunha BA, Baron J, Cunha CB. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2017;15:257–67.
<https://doi.org/10.1080/14787210.2017.1268529>.
- [5] Shanmugam P, Meenakshisundaram J, Jayaraman P. *BlaKPC* gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary care hospital. *J Clin Diagnostic Res* 2013;7:2736–8. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/7759.3747>.
- [6] Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Lopes ACS. KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop* 2015;48:94–5. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0152-2014>.
- [7] Pilato V Di, Chiarelli A, Boinett CJ, Riccobono E, Harris SR, Maria D 'andrea M, et al. Complete Genome Sequence of the First KPC-Type Carbapenemase- Positive *Proteus mirabilis* Strain from a Bloodstream Infection 2016;4:e00607-16.
<https://doi.org/10.1128/genomeA.00607-16>.
- [8] Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of *bla*_{NDM-1} with *bla*_{KPC-2} and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist* 2020;21:255–61.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.08.026>.

- [9] Dong D, Li M, Liu Z, Feng J, Jia N, Zhao H, et al. Characterization of a NDM-1-Encoding Plasmid pHFK418-NDM From a Clinical *Proteus mirabilis* Isolate Harboring Two Novel Transposons, Tn6624 and Tn6625. *Front Microbiol* 2019;10:1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02030>.
- [10] Girlich D, Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Integration of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene into *Proteus* genomic island 1 (PGI1-PmPEL) in a *Proteus mirabilis* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:98–102. <https://doi.org/10.1093/jac/dku371>.
- [11] Bitar I, Marchetti VM, Mercato A, Nucleo E, Anesi A, Bracco S, et al. Complete genome and plasmids sequences of a clinical *Proteus mirabilis* isolate producing plasmid mediated *ndm-1* from Italy. *Microorganisms* 2020;8:1–7. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8030339>.
- [12] Xiao T, Dai H, Lu B, Li Z, Cai H, Huang Z, et al. Distribution and characteristics of SGI1/PGI2 genomic island from *Proteus* strains in China. *Infect Genet Evol* 2019;70:123–30. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.02.027>.
- [13] Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic Features of *bla*_{NDM-1}-Positive *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011;55:5403–7. <https://doi.org/10.1128/AAC.00585-11>.
- [14] Sanches MS, Baptista AAS, de Souza M, Menck-Costa MF, Koga VL, Kobayashi RKT, et al. Genotypic and phenotypic profiles of virulence factors and antimicrobial resistance of *Proteus mirabilis* isolated from chicken carcasses: potential zoonotic risk. *Brazilian J Microbiol* 2019;50:685–94. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00086-2>.
- [15] Pellegrino R, Scavone P, Umpiérrez A, Maskell DJ, Zunino P. *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathog Dis* 2013;67:104–7. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12027>.
- [16] Scavone P, Iribarnegaray V, Caetano AL, Schlapp G, Härtel S, Zunino P. Fimbriae have

- distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. Pathog Dis 2016;74:1–9.
<https://doi.org/10.1093/femspd/ftw033>.
- [17] Bachman MA, Oyler JE, Burns SH, Caza M, Lépine F, Dozois CM, et al. *Klebsiella pneumoniae* yersiniabactin promotes respiratory tract infection through evasion of lipocalin 2. Infect Immun 2011;79:3309–16. <https://doi.org/10.1128/IAI.05114-11>.
- [18] de Cássia Andrade Melo R, de Barros EMR, Loureiro NG, de Melo HRL, Maciel MAV, Souza Lopes AC. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. Curr Microbiol 2014;69:824–31. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0662-0>.
- [19] cabral adriane borges, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Castro CMMB de, Lopes ACS. Clonal spread and accumulation of Beta-lactams resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. J Med Microbiol 2016. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000398>.
- [20] Lange F, Pfennigwerth N, Gerigk S, Gohlke F, Oberdorfer K, Purr I, et al. Dissemination of *bla*_{OXA-58} in *Proteus mirabilis* isolates from Germany. J Antimicrob Chemother 2017;72:1334–9. <https://doi.org/10.1093/jac/dkw566>.
- [21] Yezli S, Shibl AM, Memish ZA. The molecular basis of β -lactamase production in Gram-negative bacteria from Saudi Arabia. J Med Microbiol 2015;64:127–36. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.077834-0>.
- [22] Del Castillo CS, Hikima JJ, Jang H Bin, Nho SW, Jung TS, Wongtavatchai J, et al. Comparative sequence analysis of a multidrug-resistant plasmid from *Aeromonas hydrophila*. Antimicrob Agents Chemother 2013;57:120–9. <https://doi.org/10.1128/AAC.01239-12>.
- [23] Beltrão EMB, Oliveira ÉM, Vasconcelos CR dos S, Cabral AB, Rezende AM, Lopes

- ACS. Multidrug-resistant *Klebsiella aerogenes* clinical isolates from Brazil carrying IncQ1 plasmids containing the *bla*_{KPC-2} gene associated with non-Tn4401 elements (NTEKPC-IId). J Glob Antimicrob Resist 2020;22:43–4.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.05.001>.
- [24] Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, Oliveira ÉM, Beserra FG, Lopes ACS. Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2}-harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. J Glob Antimicrob Resist 2019;19:181–2.
<https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.09.009>.
- [25] Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson a R, Fiddes C a, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. Nature 1977;265:687–95.
<https://doi.org/5,386> base pairs...
- [26] Hall T. BioEdit software 2017.
- [27] Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environ Res 2009;109:511–7. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>.
- [28] Cabral AB, Maciel MAV, Barros JF, Antunes MM, Barbosa De Castro CMM, Souza Lopes AC. 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. J Med Microbiol 2017;66:70–7. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000398>.
- [29] Lazar Jr I, Horvath-Lazar E. GelAnalyzer 2010.
- [30] Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. DARwin software 2006.
- [31] Aires-De-Sousa M, Ortiz De La Rosa JM, Goncalves ML, Costa A, Nordmann P, Poirel L. Occurrence of NDM-1-producing *Morganella morganii* and *Proteus mirabilis* in a single patient in Portugal: Probable in vivo transfer by conjugation. J Antimicrob

- Chemother 2020;75:903–6. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz542>.
- [32] Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek University Hospital. Clin Microbiol Infect 2012;18:E52–4. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03738.x>.
- [33] Oliveira WD, Barboza MGL, Faustino G, Inagaki WTY, Sanches MS, Kobayashi RKT, Vespero EC, Rocha SPD. Virulence, resistance and Clonality of *Proteus mirabilis* isolate from patients with community-acquired Urinary Tract Infection (CA-UTI) in Brazil. Microbial Pathogenesis 2021; 152; 104642. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2020.104642>
- [34] Mirzaei A, Habibi M, Bouzari S, Karam MRA. Characterization of antibiotic-susceptibility patterns, virulence factor profiles and clonal relatedness in *Proteus mirabilis* isolates from patients with urinary tract infection in Iran. Infect Drug Resist 2019;12:3967–79. <https://doi.org/10.2147/IDR.S230303>.
- [35] Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. Microbiol Spectr 2015;3:212–63. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0017-2013>.
- [36] Kuan L, Schaffer JN, Zouzias CD, Pearson MM. Characterization of 17 chaperone-usheer fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. J Med Microbiol 2014;63:911–22. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069971-0>.
- [37] Himpsl SD, Pearson MM, Arewång CJ, Nusca TD, Sherman DH, Mobley HLT. Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis* 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07317.x>.
- [38] Armbruster CE, Mobley HLT, Pearson MM. Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. EcoSal Plus 2018;8. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017>.
- [39] Lamarche MG, Wanner BL, Crépin S, Harel J. The phosphate regulon and bacterial virulence: A regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis.

- FEMS Microbiol Rev 2008;32:461–73. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2008.00101.x>.
- [40] Lapiere L, Gatica MA, Riquelme V, Vergara C, Yañez JM, Martín BS, Sáenz L, Vidal M, Martínez MC, Araya P, Flores R, Duery O, Vidal R. Characterization of Antimicrobial Susceptibility and Its Association with Virulence Genes Related to Adherence, Invasion, and Cytotoxicity in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates from Animals, Meat and humans. *Microbial Drug Resistance* 2016;22(5):432-444. <https://doi.org/10.1089/mdr.2015.0055>.
- [41] Deptuła A, Gospodarek E. Reduced expression of virulence factors in multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. *Arch Microbiol* 2010;192:79–84. <https://doi.org/10.1007/s00203-009-0528-1>.
- [42] Melo RCA, Barros EMR, Loureiro NG, Melo HRL, Maciel MAV, Lopes ACS. PResence of fimH, mrkD and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. *Current Microbiology*. 2011; 69; 824-831. <https://doi.org/10.1007/s00284-014-0662-0>.
- [43] Morales-León F, Opazo-Capurro A, Lincopan N, Cardenas-Arias A, Esposito F, Illesca V, Rioseco ML, Domínguez-Yévenes M, Lima CA, Bello-Toledo H, González-Rocha G. Hypervirulent and hypermucoviscous extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella variicola* in Chile. 2021;12(1) 35-44. <https://doi.org/10.1080/21505594.2020.1859274>.
- [44] Bert F, Branger C, Lambert-Zechovsky N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *J Antimicrob Chemother* 2002;50:11–8. <https://doi.org/10.1093/jac/dkf069>.
- [45] Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:15–22. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.1.15>.

- [46] Ranjbar R, Zayeri S, Mirzaie A. Development of multiplex PCR for rapid detection of metallo- β -lactamase genes in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Iran J Microbiol 2020;12:107–12. <https://doi.org/10.18502/ijm.v12i2.2615>.
- [47] Poirel L, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition and expression of the carbapenem-hydrolyzing oxacillinase gene *bla*_{OXA-58} in *Acinetobacter baumannii*. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:1442–8. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.4.1442-1448.2006>.
- [48] Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. J Antimicrob Chemother 2003;52:699–702. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg416>.
- [49] Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, et al. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). J Antimicrob Chemother 2012;67:1359–67. <https://doi.org/10.1093/jac/dks046>.
- [50] Cabral AB, Melo RC, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop 2012;45:572–8.

APÊNDICE B – ARTIGO 2 – VERSÃO EM INGLÊS**First report of *bla*_{GES-1} in *Proteus mirabilis* clinical isolates**

Running title: Beltrão EMB – First report of *bla*_{GES-1} in *Proteus mirabilis*

***Elizabeth Maria Bispo Beltrão^[1], Érica Maria Oliveira^[1]; Ana Catarina Souza
Lopes^[1]***

Abstract

Proteus mirabilis is one of the main pathogens that cause urinary tract infections and sepsis. To our knowledge, this is the first report of *P. mirabilis* hosting *bla*_{GES}. The presence of genes was determined by PCR and sequencing. We identified the presence of *bla*_{GES-1} in three isolates. In addition, we also identified the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} genes in two strain. These data emphasize the importance of monitoring and surveillance of all enterobacteria. The circulation of *P. mirabilis* strains carrying *bla*_{GES-1} constitutes a new scenario of resistance in this species and should be an epidemiological alert for global health.

Introduction

Proteus spp. are gram-negative bacilli belonging to the order *Enterobacterales*. The genus contains six species: *Proteus vulgaris*, *P. mirabilis*, *Proteus myxofaciens*, *Proteus cibarius*, *Proteus penneri* and *Proteus hauseri*. *P. mirabilis*, *P. vulgaris* and *P. penneri* are commonly described as opportunistic pathogens¹.

Proteus strains with moderate resistance to imipenem are frequent, with evidence that this resistance is due to changes in the penicillin-binding protein (PBP2). In addition, *Proteus* can acquire resistance to several antimicrobial groups due to the presence of resistance genes such as, *bla*_{OXA-58}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{OXA-23}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{ACC-1}, *bla*_{FOX}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{VEB-6}, *bla*_{PER-2}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{TEM}¹.

Proteus mirabilis is a bacterium frequently associated with Urinary Tract Infections (UTI), especially in patients who have been using a urinary catheter for a long time. In addition, it has intrinsic resistance to polymyxins, nitrofurantoin and tigecycline, this making it difficult to treat infections caused by this bacterium². In this context, infections by *P. mirabilis* presenting acquired resistance to beta-lactams are considered challenging issues for antimicrobial therapy.

Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBL) are determinants of acquired resistance that have a high clinical impact³. The emergence of ESBLs, such as GES, has become an emerging public health problem, along with the NDM and KPC carbapenemases. Since GES gives resistance to all extended-spectrum cephalosporins and adversely impacts the efficiency of ceftazidime, and KPC and NDM to all beta-lactams.

The current literature describes the presence of *bla*_{GES} in several bacterial species and in several countries distributed on all continents. However, the presence of this gene in *Proteus* has been little investigated. We searched worldwide databases (Pubmed/NCBI, scielo, Google scholar and nucleotide sequences deposited on the Nucleotide/NCBI platform) for manuscripts that reported the presence of *Proteus* isolates carrying *bla*_{GES} (Keywords for the searches: “*Proteus*” and “*bla*_{GES}”, “*Proteus* ”and“ GES ”, “*Proteus mirabilis* ”and“ *bla*_{GES}”). Unexpectedly, none of the found manuscripts reported the presence of *bla*_{GES} in *P. mirabilis* or any species belonging to the genus *Proteus*. With

that, to our knowledge, here we address the first case report of an isolate of *P. mirabilis* carrying *bla*_{GES}.

Case Report

Three bacterial strains isolated from three patients from a public hospital in Recife-PE, Brazil, were analyzed. The first isolate (P5-A2) was from a female patient with urinary infection, admitted to the surgical clinic. The second isolate (P15-A2) was from a female patient with urinary tract infection, admitted to the cardiology sector. And the third isolate (P44-A2) was from a female patient with a sample collected from the catheter tip, who was admitted to the Intensive Care Unit (ICU).

The biochemical identification and susceptibility to different classes of antimicrobials were performed by an automated system Phoenix-BD™. The susceptibility interpretation was performed according to BrCast⁴. The presence of *bla*_{GES}, *bla*_{NDM} and *bla*_{KPC} was determined by PCR using specific primers⁵. And the PCR products were sequenced using the Sanger technique. The nucleotide sequences were analyzed by the BLAST platforms (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), Clustal W of the European Bioinformatics Institute (<http://www.cbi.ac.uk/>) and Bioedit v7. The nucleotide sequences were deposited in GenBank, under access number: MW527065 and MW554921.

The three isolates showed multidrug resistance and phenotypic indication for the production of ESBL and/or carbapenemases, presenting resistance to several antimicrobials (**Table 1**). Only isolate P44-A2 showed resistance to carbapenems, imipenem and meropenem (**Table 1**). Sequencing analysis revealed the presence of *bla*_{GES-1} variants in the three isolates (P5-A2, P15-A2 and P44-A2). In addition to the

presence of *bla*_{GES-1}, we also identified the presence of the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{NDM-1} genes in isolates P15-A2 and P44-A2, respectively.

Table 1 - Profile of *Proteus mirabilis* isolates analyzed in the study.

Id.	Harvest date (dd/mm/yyyy)	Sector	Clinical Sample	Resistance Profile
P5-A2	24/08/2017	Surgical clinic	urine	Amoxicillin-Clavulanate (MIC>16/8) Ampicillin (MIC>16) Aztreonam Cephalothin (MIC>16) Cefepime (MIC>16) Ceftazidime Ceftriaxone (MIC>32) Cefuroxime (MIC>16) Ciprofloxacin (MIC>2) Gentamicin (MIC>8) Levofloxacin (MIC>4) Trimetoprim-Sulfametoxazol (MIC>4/76)
P15-A2	05/01/2017	cardiology	urine	Amikacin (MIC>32) Amoxicillin-Clavulanate (MIC>16/8) Ampicillin (MIC>16) Aztreonam Cephalothin (MIC>16) Cefepime (MIC>16) Ceftazidime Ceftriaxone (MIC=6) Cefuroxime (MIC>16) Ciprofloxacin (MIC>2) Levofloxacin (MIC>4) Nitrofurantoin (MIC>64) Piperacillin-Tazobactam (MIC>64/4) Trimetoprim-Sulfametoxazol (MIC>4/76)
P44-A2	03/05/2018	ICU	Catheter tip	Amikacin (MIC=32) Amoxicillin-Clavulanate (MIC>16/8) Ampicillin (MIC>16) Aztreonam Cefepime (MIC>16) Cefoxitin (MIC>16) Ceftazidime (MIC>16) Ceftriaxone (MIC>32) Cefuroxime (MIC>16) Ciprofloxacin (MIC>2) Gentamicin (MIC>8) Imipenem (MIC>8) Levofloxacin (MIC>4) Meropenem (MIC=8) Nitrofurantoin (MIC>64) Piperacillin-Tazobactam (MIC>64/4) Trimetoprim-Sulfametoxazol (MIC>4/76)

Fonte: A autora (2021)

ICU – Intensive Care Unit; MIC - Minimum Inhibitory Concentration; Id. Identification

Discussion

The presence of important resistance genes occurs less frequently in *Proteus*⁶, since there are few reports of β -lactamases in this species when compared to other species of the Enterobacterales order. However, the presence of ESBL in *Proteus* is more frequent⁷.

GES enzymes were initially described in *Klebsiella pneumoniae* in France using the rectal swab from a one-month-old girl who was hospitalized in French Guiana⁷. Since then, *bla*_{GES} has been reported in several species and in several countries, including in Brazil. Most frequently in non-fermenting bacilli such as *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* and also in enterobacteria such as *K. pneumoniae*⁸⁻¹⁰. GES is part of a group of ESBL and carbapenemases, comprising 43 variants (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES>) that have been found in several species of gram-negative bacteria³. In the three isolates investigated, a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value greater than 16 for Ceftazidime was observed. GES-1 can hydrolyze aztreonam, amoxicillin and mainly ceftazidime with a very high MIC value (MIC = 4 to MIC = 128)⁷.

The genes investigated in the present study were obtained from the bacterial genome, and may contain plasmids that have not been identified. *bla*_{GES} is constantly found in plasmids, but it can be present in the chromosome and in conjugative or non-conjugative plasmids, such as IncP, ColE1, IncQ and IncF, as well as in non-typable plasmids¹¹⁻¹².

The presence of *P. mirabilis* carrying *bla*_{GES-1} is worrying because this gene encodes the ESBL enzyme, and shows resistance to a wide range of β -lactams, such as resistance to 3rd generation (Ceftazidime, Cefotaxime, Cefoxitin) and 4th generation (Cefepime) cephalosporins and monobactams (Aztreonam)¹³. In addition, within the *Proteus* genus, there were no reports of this pathogen carrying *bla*_{GES}. These data emphasize the importance of monitoring and surveillance of all enterobacteria. The circulation of *P. mirabilis* strains carrying *bla*_{GES-1} constitutes a new scenario of resistance in this species and should be an epidemiological alert for global health.

Conflicts of Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Ethical Approval

The work was approved by the ethics committee for research involving human beings (CEP/Plataforma Brasil) and registered under CAAE number: 99147818.6.0000.5208.

References

1. Girlich D, Bonnin RA, Dortet L, Naas T. Genetics of acquired antibiotic resistance genes in *Proteus spp.* Front. Microbiol. 2020 11:256. DOI: 10.3389/fmicb.2020.00256.
2. Cunha BA, Baron J, and Cunha CB. Once daily high dose tigecycline - pharmacokinetic/pharmacodynamic based dosing for optimal clinical effectiveness: dosing matters, revisited. Expert Rev. Anti. Infect. Ther. 2017 15:257–267. DOI: 10.1080/14787210.2017.1268529.
3. Ballaben AS, Galetti R, Andrade LN, Ferreira JC, Garcia DO, Silva P et al. Plasmid carrying *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{GES-1} in extensively drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* from cerebrospinal fluid. JAC Antimicrob Resist. 2019 63(7): e00186-19. DOI:10.1128/AAC.00186-19.
4. BrCAST; Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2017. Available from: <http://brcast.org.br/>
5. Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, Oliveira EM, Beserra FG, Lopes ACS. Emergence of *bla*_{VIM-2}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{IMP-7} and *bla*_{GES-1} in *bla*_{KPC-2} harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 2019, 13(6): 612-632. DOI: DOI:10.1016/j.jgar.2019.09.009.
6. Ramos AC, Cayô R, Carvalhaes CG, Jové T, Silva GP, Sancho FMP et al. Dissemination of Multidrug-Resistant *Proteus mirabilis* Clones Carrying a Novel

- Integron-Borne *bla*_{IMP-1} in a Tertiary Hospital. JAC Antimicrob Resist. 2017 62:e01321-17. DOI: 10.1128/AAC.01321-17.
7. Poirel L, Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical Sequence analyses of GES-1, a novel Class A Extended-Spectrum β -lactamase, and the Class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. 2000 JAC Antimicrob Resist. 44(3): 622–632. DOI:10.1128/aac.44.3.622-632.2000.
 8. Ríos P, Rocha C, Castro W, Vidal M, Canal E, Bernal M, et al. Extensively drug-resistant (XDR) *Pseudomonas aeruginosa* identified in Lima, Peru co-expressing a VIM-2 metallo- β -lactamase, OXA-1 β -lactamase and GES-1 extended-spectrum β -lactamase. JMM Case Reports 2018; 5(7): e005154. DOI: 10.1099/jmmcr.0.005154.
 9. Hafa HE, Nayme K, Hamzaoui NE, Maroui I, Sbiti M, Zerouali K, et al. Dissemination of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the *bla*_{GES}, *bla*_{NDM} and *bla*_{OXA-23} in Morocco. Germs. 2019 9(3):133–141. DOI: 10.18683/germs.2019.1168.
 10. K Yamasaki; M Komatsu; T Ono; T Zikimoto; T Nakamura; Y Wada. Nosocomial spread of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing *bla*_{GES-4} carbapenemase at a Japanese hospital. J Infect Chemother. 2016 26(1):40-44. DOI: 10.1016/j.jiac.2016.09.006.
 11. Irrgang A, Tausch SH, Pauly N, Grobbel PNM, Kaesbohrer A, Hammerl HA. First Detection of GES-5-Producing *Escherichia coli* from Livestock—An Increasing Diversity of Carbapenemases Recognized from German Pig Production. 2020. DOI:10.3390/microorganisms8101593.

12. Dang B, Mao D, Luo Y. Complete Nucleotide Sequence of IncP-1 β Plasmid pDTC28 Reveals a Non-Functional Variant of the *bla*_{GES}-Type Gene. 2016 PLoS ONE 11(5): e0154975. DOI:10.1371/ journal.pone.0154975.
13. Pal N, Hooja S, Sharma R, Maheshwari RK. Phenotypic detection and antibiogram of β -lactamase-producing *Proteus* species in a tertiary care Hospital, India. Ann Med Health Sci Res. 2016 6(5):267–273. DOI: 10.4103 / amhsr.amhsr_413_15.

APÊNDICE C - Variantes do gene *bla*_{KPC}, espécies bacterianas relatadas, país de origem do isolado e referência.

Variante	Espécie	País	Ref.
<i>bla</i>_{KPC-2}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(YIGIT, H. <i>et al.</i> , 2001b)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(MOLAND <i>et al.</i> , 2003)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	(MONTEIRO, J. <i>et al.</i> , 2009a)
	<i>Proteus mirabilis</i>	Brasil	(CABRAL, Adriane Borges <i>et al.</i> , 2015a)
	<i>Serratia marcescens</i>	Brasil	(MARGATE <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Escherichia coli</i>	França	(GIRLICH <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	França	(GIRLICH <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Enterobacter cloacae</i>	Colômbia	(LA CADENA, DE <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	China	(YANG, B. <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Enterobacter asburiae</i>	Brasil	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Brasil	(SCAVUZZI <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Brasil	(BELTRÃO <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	(OLIVEIRA, É. M. De <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(WOODFORD, Neu <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Klebsiella aerogenes</i>	Itália	(PULCRANO <i>et al.</i> , 2016)
<i>bla</i>_{KPC-3}	<i>Escherichia coli</i>	França	(BERLEUR <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Portugal	(CANEIRAS <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espanha	(DELGADO-VALVERDE <i>et al.</i> , 2020)
<i>bla</i>_{KPC-4}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Porto Rico	(WOLTER <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(CHEN, L. <i>et al.</i> , 2013)
<i>bla</i>_{KPC-5}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Porto Rico	(WOLTER <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Escherichia coli</i>	EUA	(LAMOUREAU <i>et al.</i> , 2012)
<i>bla</i>_{KPC-6}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Malásia	(AHMAD, Norazah <i>et al.</i> , 2015)

bla_{KPC-7}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(PEREZ <i>et al.</i> , 2010)
bla_{KPC-8}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	FJ234412.1
bla_{KPC-9}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Israel	(HIDALGO-GRASS <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Klebsiella quasipneumoniae</i>	Índia	(SHANKAR <i>et al.</i> , 2019)
bla_{KPC-10}	<i>Acinetobacter spp.</i>	Porto Rico	(ROBLEDO, I. E. <i>et al.</i> , 2010)
bla_{KPC-11}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(LASCOLS <i>et al.</i> , 2012)
bla_{KPC-12}	<i>Escherichia coli</i>	China	HQ641422.1
bla_{KPC-13}	<i>Enterobacter cloacae</i>	Tailândia	HQ342889.1
bla_{KPC-14}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(NIU <i>et al.</i> , 2020)
bla_{KPC-15}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(WANG, Dongguo <i>et al.</i> , 2014)
bla_{KPC-16}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(YU, W. L. <i>et al.</i> , 2015)
bla_{KPC-17}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(YU, W. L. <i>et al.</i> , 2015)
bla_{KPC-18}	<i>Enterobacter cloacae</i>	EUA	(THOMSON, G. K. <i>et al.</i> , 2016)
bla_{KPC-19}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	(CENTONZE <i>et al.</i> , 2018)
bla_{KPC-20}	<i>Escherichia coli</i>	EUA	MF772496.1
bla_{KPC-21}	<i>Escherichia coli</i>	Portugal	(MANAGEIRO <i>et al.</i> , 2018)
bla_{KPC-22}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	KM379100.1
bla_{KPC-23}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grécia	(GALANI <i>et al.</i> , 2019)
bla_{KPC-24}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Chile	(BARR <i>et al.</i> , 2016)
bla_{KPC-25}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	KU216748.1
bla_{KPC-26}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	KX619622.1
bla_{KPC-27}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espanha	KX828722.1
bla_{KPC-28}	<i>Escherichia coli</i>	França	(OUESLATI <i>et al.</i> , 2019)
bla_{KPC-29}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	KY563764.1
bla_{KPC-30}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	KY646302.1
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Brasil	(Migliorini, 2021)
bla_{KPC-31}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(ANTONELLI <i>et al.</i> , 2019)
bla_{KPC-32}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	MAPO01000050.1
bla_{KPC-33}			ref

bla_{KPC-34}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	KU985429.1
bla_{KPC-35}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	MH404098.1
bla_{KPC-36}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	MH593787.1
bla_{KPC-37}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MH718730.1
bla_{KPC-38}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	MK098861.1
bla_{KPC-39}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	França	MK118771.1
bla_{KPC-40}	<i>Enterobacter hormaechei</i>	EUA	QRBR01000058.1
bla_{KPC-41}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Suíça	(MUELLER <i>et al.</i> , 2019)
bla_{KPC-42}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alemanha	MK467612.1
bla_{KPC-43}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	República da Coréia	MK628511.1
bla_{KPC-44}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Finlândia	MK823188.1
bla_{KPC-45}	<i>Enterobacter cloacae</i>	EUA	MN104596.1
bla_{KPC-46}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	MN267701.1
bla_{KPC-47}	-	-	-
bla_{KPC-48}	-	-	-
bla_{KPC-49}	-	-	-
bla_{KPC-50}	-	-	-
bla_{KPC-51}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MN725731.1
bla_{KPC-52}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MN725732.1
bla_{KPC-53}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	(PILATO, V. DI <i>et al.</i> , 2020)
bla_{KPC-54}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	República da Coréia	MN854706.1
bla_{KPC-55}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Coréia do Sul	MT028409.1
bla_{KPC-56}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	NDBX01000081.1
bla_{KPC-57}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Grécia	MT358626.1
bla_{KPC-58}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	MT463289
bla_{KPC-59}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	MT463290
bla_{KPC-60}	<i>Escherichia coli</i>	Alemanha	MT482411
bla_{KPC-61}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Espanha	MK559426
bla_{KPC-62}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT604163
bla_{KPC-63}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT604164
bla_{KPC-64}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT604165
bla_{KPC-65}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT604166

bla_{KPC-66}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	MT833884
bla_{KPC-67}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT809697
bla_{KPC-68}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT809698
bla_{KPC-69}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT809700
bla_{KPC-70}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	MT809701
bla_{KPC-71}	-	-	-
bla_{KPC-72}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	MT833885
bla_{KPC-73}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	USA	MT833886
bla_{KPC-74}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MT856045
bla_{KPC-75}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MT920645
bla_{KPC-76}	-	-	-
bla_{KPC-77}	-	-	-
bla_{KPC-78}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MW319056
bla_{KPC-79}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MT875328
bla_{KPC-80}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Argentina	MW444845
bla_{KPC-81}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Argentina	MW444846
bla_{KPC-82}	<i>Citrobacter koseri</i>	USA	Lebreton, 2021
bla_{KPC-83}	<i>Citrobacter koseri</i>	USA	JAERIK010000005
bla_{KPC-84}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MW657985
bla_{KPC-85}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Holanda	MW896839
bla_{KPC-86}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MZ067229
bla_{KPC-87}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MZ067230
bla_{KPC-88}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	MZ067231

- Não atribuído pelo GenBank

APÊNDICE D - Variantes de *bla*_{GES}, espécies bacterianas relatadas, informação funcional, país de origem da amostra e referência.

Variante	Espécie	Informação Funcional	País	Ref.
<i>bla</i>_{GES-1}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	Guiana Francesa	(POIREL, L <i>et al.</i> , 2000)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Brasil	(SILVA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2017); (SCAVUZZI <i>et al.</i> , 2019); (POLOTTO <i>et al.</i> , 2012); (CASTANHEIRA <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Irã	(AMIRKAMALI <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Peru	(RÍOS <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Portugal	(MENDONÇA <i>et al.</i> , 2009)
	<i>Proteus mirabilis</i>		Brasil	Beltrão, 2021
<i>bla</i>_{GES-2}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemase - Hidrólise aumentada para Imipenem	África do Sul	(POIREL, Laurent <i>et al.</i> , 2002)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Irã	(TARAFDAR; JAFARI; AZIMI, T., 2020)
<i>bla</i>_{GES-3}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	Japão	(WACHINO; DOI, Y.; YAMANE; SHIBATA; YAGI; KUBOTA; ITO; <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Escherichia coli</i>		Grécia	(VOURLI <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Coréia	(RYOO <i>et al.</i> , 2005)
<i>bla</i>_{GES-4}	<i>Klebsiella pneumonia</i>	Carbapenemase	Japão	(WACHINO; DOI, Y.; YAMANE; SHIBATA; YAGI; KUBOTA; ARAKAWA, 2004)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Grécia	(VOURLI <i>et al.</i> , 2004)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Japão	(YAMASAKI <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Coréia	(BAE, I. K. <i>et al.</i> , 2007)
<i>bla</i>_{GES-5}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenemase	Arábia Saudita	(AL-AGAMY <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			(HISHINUMA <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>		Polônia	(LITERACKA, E. <i>et al.</i> , 2020)
<i>bla</i>_{GES-6}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Carbapenemase	Grécia	Vourli, 2004

	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Portugal	Botelho, 2015
	<i>Enterobacter cloacae</i>		Bélgica	Cuzon, 2016
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Líbano	Yaghi, 2020
bla_{GES-7}	<i>Enterobacter cloacae</i>	ESBL	Bélgica	(CUZON <i>et al.</i> , 2016)
bla_{GES-8}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ESBL	Grécia	(MAVROIDI <i>et al.</i> , 2001)
bla_{GES-9}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ESBL	França	(FOURNIER <i>et al.</i> , 2020)
bla_{GES-10}	Não informada	ESBL	EUA	NG_049112.1
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Resistência a beta-lactâmicos, incluindo aztreonam, e sensibilidade reduzida a carbapenens	França	(DELBRÜCK <i>et al.</i> , 2012)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Líbano	(HAMMOUDI <i>et al.</i> , 2015a)
bla_{GES-11}	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Tunísia	(CHIH <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Brasil	(SILVA JÚNIOR <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Dubai	(AYOUB MOUBARECK <i>et al.</i> , 2021a)
bla_{GES-12}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ESBL	Tunísia	(HAMMAMI <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Bélgica	(BOGAERTS <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Grécia	(KOTSAKIS <i>et al.</i> , 2010)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Canadá	(SEPEHRI <i>et al.</i> , 2014)
bla_{GES-13}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ESBL	Polônia	(LAUDY <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Malásia	(PHOON <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Portugal	(HERNÁNDEZ-GARCÍA <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Bélgica	(BOGAERTS <i>et al.</i> , 2010)
bla_{GES-14}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenemase	França	(BONNIN, Rémy A. <i>et al.</i> , 2011)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Bélgica	(DELBRÜCK <i>et al.</i> , 2012)
bla_{GES-15}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Polônia	(LAUDY <i>et al.</i> , 2017)
bla_{GES-16}	<i>Serratia masecens</i>	Carbapenemase	Brasil	(STRELING <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Aeromonas sp.</i>		Brasil	(CONTE <i>et al.</i> , 2020)
bla_{GES-17}	<i>Escherichia coli</i>	ESBL	México	HQ874631
bla_{GES-18}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemase	Bélgica	(BEBRONE <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Enterobacteriaceae</i>		Holanda	(SADER, Helio S. <i>et al.</i> , 2017)

	<i>Escherichia coli</i>			(BARRIOS <i>et al.</i> , 2012)
bla_{GES-19}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ESBL	México	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		México	(GARZA-RAMOS <i>et al.</i> , 2015)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		EUA	(KHAN, A. <i>et al.</i> , 2019)
bla_{GES-20}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemase	México	(GARZA-RAMOS <i>et al.</i> , 2015)
bla_{GES-21}	Não informado	Carbapenemase	EUA	NG_049124.1
bla_{GES-22}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ESBL	Turquia	(CASTANHEIRA <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Turquia	(AYSEGUL SARAL, DAVID A. LEONARD, AZER OZAD DUZGUN; CYNTHIA M. JUNE, 2017)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Turquia	(HOUCHI <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Turquia	(CICEK <i>et al.</i> , 2014)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		México	KF179354
bla_{GES-23}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ESBL	Japão	AB901141
bla_{GES-24}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemase	Coreia do Sul	(HONG, J. S. <i>et al.</i> , 2016)
	<i>Aeromonas hydrophila</i>		Japão	(UECHI <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Coreia do Sul	(HONG, J. S. <i>et al.</i> , 2020)
bla_{GES-25}	<i>Citrobacter freundii</i>	-	Alemanha	NG_049128.1
bla_{GES-26}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	EUA	(KHAN, A. <i>et al.</i> , 2019)
bla_{GES-27}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Lituânia	(MIKUCIONYTE <i>et al.</i> , 2016)
bla_{GES-28}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Alemanha	KT626944
bla_{GES-29}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	EUA	KT997885
bla_{GES-30}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Japão	LC126615
bla_{GES-31}	<i>Aeromonas caviae</i>	-	Brasil	KX034181
bla_{GES-32}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	México	(LÓPEZ-GARCÍA <i>et al.</i> , 2018)
bla_{GES-33}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	EUA	KY783911
bla_{GES-34}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Alemanha	MG748726
bla_{GES-35}	<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	Alemanha	MH388469
	<i>Acinetobacter baumannii</i>		Egito	(FAM <i>et al.</i> , 2020)

bla _{GES-36}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Japão	LC385763
bla _{GES-37}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Japão	LC385764
bla _{GES-38}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ESBL	França	MH780082
bla _{GES-39}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenemase	França	MH780083
bla _{GES-40}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	EUA	MK105833
bla _{GES-41}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Canadá	MK880227
bla _{GES-42}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	França	MN065796
bla _{GES-43}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Suíça	MN219691
bla _{GES-44}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	China	MT160807
bla _{GES-45}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Japão	LC558356
bla _{GES-46}	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	Alemanha	MW295358
bla _{GES-47}	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Carbapenemase	Japão	LC612389
bla _{GES-48}	<i>Aeromonas caviae</i>	Carbapenemase	Japão	LC612390

- Não definido pela literatura

APÊNDICE E - Variantes do gene *bla_{NDM}*, espécies bacterianas relatadas, país de origem da amostra e referência.

Variante	Espécie	País	Referência
<i>bla_{NDM-1}</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	China	(QIN <i>et al.</i> , 2015); (DONG, Dandan <i>et al.</i> , 2019a)
	<i>Proteus mirabilis</i>	França	(GIRLICH <i>et al.</i> , 2015a)
	<i>Salmonella enterica</i>	China	(HUANG, J. <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(GAO, H. <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Brasil	(FURLAN; PITONDO-SILVA; STEHLING, 2018)
	<i>Enterobacter hormaechei</i>	China	(YANG, B. <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Proteus mirabilis</i>	Itália	(BITAR <i>et al.</i> , 2020a)
<i>bla_{NDM-2}</i>	<i>Moellerella wisconsensis</i>	Índia	(AHMAD, Nayeem; ALI; KHAN, A. U., 2020)
	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Egito	(KAASE; NORDMANN, Patrice; WICHELHAUS; GATERMANN; BONNIN, Rémy A; <i>et al.</i> , 2011)
<i>bla_{NDM-3}</i>	<i>Escherichia coli</i>	Austrália	(ROGERS <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Escherichia coli</i>	Nepal	(SHRESTHA, B. <i>et al.</i> , 2017)
	<i>Escherichia coli</i>	Índia	(NORDMANN, Patrice; BOULANGER; POIREL, Laurent, 2012)
<i>bla_{NDM-4}</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Sri Lanka	(PAPAGIANNITSIS, Costas C. <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(KIM, J. S. <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Escherichia coli</i>	Reino Unido	(HORNSEY; PHEE; WAREHAM, 2011)
	<i>Escherichia coli</i>	China	(LI, Xi; FU; <i>et al.</i> , 2018)
<i>bla_{NDM-5}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(YUAN, Y. <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Proteus mirabilis</i>	China	(SUN, L.; XU, J.; HE, 2019)
	<i>Enterobacter bugandensis</i>	Brasil	(MATTEOLI <i>et al.</i> , 2020)
	<i>Escherichia coli</i>	Egito	(RAMADAN <i>et al.</i> , 2020)
<i>bla_{NDM-6}</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	EUA	(RASHEED <i>et al.</i> , 2013)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Irã	(BAHRAMIAN <i>et al.</i> , 2019)

	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Espanha	(XANTHOPOULOU <i>et al.</i> , 2020)
bla_{NDM-7}	<i>Escherichia coli</i>	Índia	(PAUL <i>et al.</i> , 2017)
bla_{NDM-8}	<i>Escherichia coli</i>	Nepal	(TADA <i>et al.</i> , 2013)
bla_{NDM-9}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Itália	(FALCONE <i>et al.</i> , 2020)
bla_{NDM-10}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Índia	(KHAJURIA <i>et al.</i> , 2016)
bla_{NDM-11}	<i>Escherichia coli</i>	Índia	(RAHMAN <i>et al.</i> , 2018)
	<i>Escherichia coli</i>	Egito	(HASSAN <i>et al.</i> , 2020)
bla_{NDM-12}	<i>Escherichia coli</i>	Nepal	(TADA <i>et al.</i> , 2014)
bla_{NDM-13}	<i>Escherichia coli</i>	Nepal	(SHRESTHA, B. <i>et al.</i> , 2015)
bla_{NDM-14}	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	China	(ZOU, D. <i>et al.</i> , 2015)
bla_{NDM-15}	<i>Escherichia coli</i>	Índia	(MITRA <i>et al.</i> , 2019)
bla_{NDM-16}	<i>Escherichia coli</i>	China	(LI, Xi; MU; <i>et al.</i> , 2018)
bla_{NDM-17}	<i>Escherichia coli</i>	China	(LIU, Zhihai <i>et al.</i> , 2017)
bla_{NDM-18}	<i>Providencia rettgeri</i>	África do Sul	(NTSHOBENI; ESSACK, 2019)
bla_{NDM-19}	<i>Escherichia coli</i>	Suíça	(MANCINI <i>et al.</i> , 2019)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	China	(LIU, Yao <i>et al.</i> , 2019)
bla_{NDM-20}	<i>Escherichia coli</i>	China	(LIU, Zhihai <i>et al.</i> , 2018)
bla_{NDM-21}	<i>Escherichia coli</i>	China	(LIU, Lu <i>et al.</i> , 2018)
bla_{NDM-22}	<i>Enterobacter cloacae</i>	EUA	MH243357.1
bla_{NDM-23}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Suíça	MH450214.1
bla_{NDM-24}	<i>Providencia stuartii</i>	Suíça	MH450215.1
bla_{NDM-25}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Arábia Saudita	(EL-BADAWY <i>et al.</i> , 2020)
bla_{NDM-26}	<i>Escherichia coli</i>	China	MK079575
bla_{NDM-27}	<i>Escherichia coli</i>	EUA	MK105832
bla_{NDM-28}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Índia	MK425035.1
bla_{NDM-29}	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Rússia	MN624980.1
bla_{NDM-30}	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Coreia	MW306748
bla_{NDM-31}	<i>Citrobacter werkmanii</i>	Coreia	MW306749

APÊNDICE F – Variantes do gene *bla*_{OXA} as variants derivadas

Variante	Variantes Derivadas
<i>bla</i>_{OXA-1} ou <i>bla</i>_{OXA-30}	<i>bla</i> _{OXA-1} , <i>bla</i> _{OXA-224} , <i>bla</i> _{OXA-320} , <i>bla</i> _{OXA-392} , <i>bla</i> _{OXA-534} , <i>bla</i> _{OXA-675} , <i>bla</i> _{OXA-796} , <i>bla</i> _{OXA-921} , <i>bla</i> _{OXA-796} , <i>bla</i> _{OXA-675} , <i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-47} , <i>bla</i> _{OXA-31} , <i>bla</i> _{OXA-392} , <i>bla</i> _{OXA-320} , <i>bla</i> _{OXA-224} , <i>bla</i> _{OXA-47} , <i>bla</i> _{OXA-31} , <i>bla</i> _{OXA-4} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-} ,
<i>bla</i>_{OXA-2}	<i>bla</i> _{OXA-3} , <i>bla</i> _{OXA-838} , <i>bla</i> _{OXA-737} , <i>bla</i> _{OXA-732} , <i>bla</i> _{OXA-681} , <i>bla</i> _{OXA-539} , <i>bla</i> _{OXA-540} , <i>bla</i> _{OXA-541} , <i>bla</i> _{OXA-542} , , <i>bla</i> _{OXA-544} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-681} , <i>bla</i> _{OXA-732} , <i>bla</i> _{OXA-737} , <i>bla</i> _{OXA-838} , <i>bla</i> _{OXA-15} , <i>bla</i> _{OXA-21} , <i>bla</i> _{OXA-32} , <i>bla</i> _{OXA-34} , <i>bla</i> _{OXA-36} , <i>bla</i> _{OXA-53} , <i>bla</i> _{OXA-141} , <i>bla</i> _{OXA-161} , <i>bla</i> _{OXA-226} , <i>bla</i> _{OXA-415} , <i>bla</i> _{OXA-543} , <i>bla</i> _{OXA-534} , <i>bla</i> _{OXA-415} , <i>bla</i> _{OXA-226} , <i>bla</i> _{OXA-210} , <i>bla</i> _{OXA-161} , <i>bla</i> _{OXA-141} , <i>bla</i> _{OXA-53} , <i>bla</i> _{OXA-32} , <i>bla</i> _{OXA-21} , <i>bla</i> _{OXA-15} , <i>bla</i> _{OXA-3}
<i>bla</i>_{OXA-5}	<i>bla</i> _{OXA-129}
<i>bla</i>_{OXA-7}	<i>bla</i> _{OXA-10}
<i>bla</i>_{OXA-8}	-
<i>bla</i>_{OXA-9}	<i>bla</i> _{OXA-896}
<i>bla</i>_{OXA-10} ou <i>bla</i>_{PSE-2}	<i>bla</i> _{OXA-928} , <i>bla</i> _{OXA-836} , <i>bla</i> _{OXA-827} , <i>bla</i> _{OXA-823} , <i>bla</i> _{OXA-824} , <i>bla</i> _{OXA-794} , <i>bla</i> _{OXA-795} , <i>bla</i> _{OXA-736} , <i>bla</i> _{OXA-676} , <i>bla</i> _{OXA-677} , <i>bla</i> _{OXA-663} , <i>bla</i> _{OXA-655} , <i>bla</i> _{OXA-656} , <i>bla</i> _{OXA-520} , <i>bla</i> _{OXA-454} , <i>bla</i> _{OXA-368} , <i>bla</i> _{OXA-256} , <i>bla</i> _{OXA-251} , <i>bla</i> _{OXA-246} , <i>bla</i> _{OXA-240} , <i>bla</i> _{OXA-233} , <i>bla</i> _{OXA-183} , <i>bla</i> _{OXA-147} , <i>bla</i> _{OXA-145} , <i>bla</i> _{OXA-142} , <i>bla</i> _{OXA-101} , <i>bla</i> _{OXA-74} , <i>bla</i> _{OXA-56} , <i>bla</i> _{OXA-35} , <i>bla</i> _{OXA-28} , <i>bla</i> _{OXA-19} , <i>bla</i> _{OXA-17} , <i>bla</i> _{OXA-14} , <i>bla</i> _{OXA-16} , <i>bla</i> _{OXA-13} , <i>bla</i> _{OXA-11}
<i>bla</i>_{OXA-11}	
<i>bla</i>_{OXA-12}	<i>bla</i> _{OXA-950} , <i>bla</i> _{OXA-951} , <i>bla</i> _{OXA-956} , <i>bla</i> _{OXA-957} , <i>bla</i> _{OXA-958} , <i>bla</i> _{OXA-959} , <i>bla</i> _{OXA-912} , <i>bla</i> _{OXA-724} , <i>bla</i> _{OXA-725} , <i>bla</i> _{OXA-726} , <i>bla</i> _{OXA-} ,
<i>bla</i>_{OXA-20}	<i>bla</i> _{OXA-37}
<i>bla</i>_{OXA-22}	<i>bla</i> _{OXA-899} , <i>bla</i> _{OXA-574} , <i>bla</i> _{OXA-572} , <i>bla</i> _{OXA-569} , <i>bla</i> _{OXA-443}
<i>bla</i>_{OXA-23}	<i>bla</i> _{OXA-911} , <i>bla</i> _{OXA-807} , <i>bla</i> _{OXA-808} , <i>bla</i> _{OXA-809} , <i>bla</i> _{OXA-810} , <i>bla</i> _{OXA-811} , <i>bla</i> _{OXA-812} , <i>bla</i> _{OXA-813} , <i>bla</i> _{OXA-814} , <i>bla</i> _{OXA-815} , <i>bla</i> _{OXA-816} , <i>bla</i> _{OXA-817} , <i>bla</i> _{OXA-818} , <i>bla</i> _{OXA-806} , <i>bla</i> _{OXA-657} , <i>bla</i> _{OXA-565} , <i>bla</i> _{OXA-481} , <i>bla</i> _{OXA-482} , <i>bla</i> _{OXA-483} , <i>bla</i> _{OXA-440} , <i>bla</i> _{OXA-435} , <i>bla</i> _{OXA-422} , <i>bla</i> _{OXA-423} , <i>bla</i> _{OXA-398} , <i>bla</i> _{OXA-366} , <i>bla</i> _{OXA-239} , <i>bla</i> _{OXA-225} , <i>bla</i> _{OXA-171} , <i>bla</i> _{OXA-170} , <i>bla</i> _{OXA-169} , <i>bla</i> _{OXA-168} , <i>bla</i> _{OXA-167} , <i>bla</i> _{OXA-166} , <i>bla</i> _{OXA-165} , <i>bla</i> _{OXA-146} , <i>bla</i> _{OXA-133} , <i>bla</i> _{OXA-103} , <i>bla</i> _{OXA-73} , <i>bla</i> _{OXA-49} , <i>bla</i> _{OXA-27}
<i>bla</i>_{OXA-24}	<i>bla</i> _{OXA-897} , <i>bla</i> _{OXA-653} , <i>bla</i> _{OXA-437} , <i>bla</i> _{OXA-207} , <i>bla</i> _{OXA-160} , <i>bla</i> _{OXA-139} , <i>bla</i> _{OXA-72} , <i>bla</i> _{OXA-25} , <i>bla</i> _{OXA-26}
<i>bla</i>_{OXA-29}	-
<i>bla</i>_{OXA-40}	-
<i>bla</i>_{OXA-42}	<i>bla</i> _{OXA-59} , <i>bla</i> _{OXA-57} , <i>bla</i> _{OXA-43}
<i>bla</i>_{OXA-46}	<i>bla</i> _{OXA-835} , <i>bla</i> _{OXA-779} , <i>bla</i> _{OXA-205} , <i>bla</i> _{OXA-119} , <i>bla</i> _{OXA-118}

bla_{OXA-48}	<i>bla_{OXA-D20}</i> , <i>bla_{OXA-D22}</i> , <i>bla_{OXA-535}</i> , <i>bla_{OXA-D281}</i> , <i>bla_{OXA-D282}</i> , <i>bla_{OXA-D283}</i> , <i>bla_{OXA-D284}</i> , <i>bla_{OXA-D285}</i> , <i>bla_{OXA-D286}</i> , <i>bla_{OXA-D287}</i> , <i>bla_{OXA-D288}</i> , <i>bla_{OXA-D289}</i> , <i>bla_{OXA-D290}</i> , <i>bla_{OXA-D291}</i> , <i>bla_{OXA-D292}</i> , <i>bla_{OXA-D293}</i> , <i>bla_{OXA-D294}</i> , <i>bla_{OXA-D295}</i> , <i>bla_{OXA-D296}</i> , <i>bla_{OXA-D297}</i> , <i>bla_{OXA-D298}</i> , <i>bla_{OXA-D299}</i> , <i>bla_{OXA-D300}</i> , <i>bla_{OXA-D301}</i> , <i>bla_{OXA-D302}</i> , <i>bla_{OXA-D303}</i> , <i>bla_{OXA-D304}</i> , <i>bla_{OXA-D305}</i> , <i>bla_{OXA-D306}</i> , <i>bla_{OXA-D307}</i> , <i>bla_{OXA-D308}</i> , <i>bla_{OXA-D309}</i> , <i>bla_{OXA-D310}</i> , <i>bla_{OXA-D311}</i> , <i>bla_{OXA-D312}</i> , <i>bla_{OXA-D313}</i> , <i>bla_{OXA-D314}</i> , <i>bla_{OXA-D315}</i> , <i>bla_{OXA-D316}</i> , <i>bla_{OXA-D317}</i> , <i>bla_{OXA-D318}</i> , <i>bla_{OXA-D319}</i> , <i>bla_{OXA-320}</i> , <i>bla_{OXA-D321}</i> , <i>bla_{OXA-D322}</i> , <i>bla_{OXA-D323}</i> , <i>bla_{OXA-D324}</i> , <i>bla_{OXA-D325}</i> , <i>bla_{OXA-D326}</i> , <i>bla_{OXA-D327}</i> , <i>bla_{OXA-D328}</i> , <i>bla_{OXA-D329}</i> , <i>bla_{OXA-D330}</i> , <i>bla_{OXA-D331}</i> , <i>bla_{OXA-D332}</i> , <i>bla_{OXA-333}</i> , <i>bla_{OXA-D334}</i> , <i>bla_{OXA-D335}</i> , <i>bla_{OXA-D336}</i> , <i>bla_{OXA-D337}</i> , <i>bla_{OXA-D338}</i> , <i>bla_{OXA-D339}</i> , <i>bla_{OXA-D340}</i> , <i>bla_{OXA-D855}</i> , <i>bla_{OXA-D856}</i> , <i>bla_{OXA-929}</i> , <i>bla_{OXA-920}</i> , <i>bla_{OXA-918}</i> , <i>bla_{OXA-894}</i> , <i>bla_{OXA-833}</i> , <i>bla_{OXA-793}</i> , <i>bla_{OXA-731}</i> , <i>bla_{OXA-566}</i> , <i>bla_{OXA-567}</i> , <i>bla_{OXA-546}</i> , <i>bla_{OXA-547}</i> , <i>bla_{OXA-538}</i> , <i>bla_{OXA-519}</i> , <i>bla_{OXA-517}</i> , <i>bla_{OXA-514}</i> , <i>bla_{OXA-515}</i> , <i>bla_{OXA-505}</i> , <i>bla_{OXA-484}</i> , <i>bla_{OXA-439}</i> , <i>bla_{OXA-438}</i> , <i>bla_{OXA-436}</i> , <i>bla_{OXA-416}</i> , <i>bla_{OXA-405}</i> , <i>bla_{OXA-252}</i> , <i>bla_{OXA-247}</i> , <i>bla_{OXA-245}</i> , <i>bla_{OXA-244}</i> , <i>bla_{OXA-232}</i> , <i>bla_{OXA-204}</i> , <i>bla_{OXA-199}</i> , <i>bla_{OXA-181}</i> , <i>bla_{OXA-163}</i> , <i>bla_{OXA-162}</i> , <i>bla_{OXA-54}</i>
bla_{OXA-50}	<i>bla_{OXA-937}</i> , <i>bla_{OXA-913}</i> , <i>bla_{OXA-914}</i> , <i>bla_{OXA-901}</i> , <i>bla_{OXA-902}</i> , <i>bla_{OXA-903}</i> , <i>bla_{OXA-904}</i> , <i>bla_{OXA-905}</i> , <i>bla_{OXA-906}</i> , <i>bla_{OXA-907}</i> , <i>bla_{OXA-908}</i> , <i>bla_{OXA-851}</i> , <i>bla_{OXA-850}</i> , <i>bla_{OXA-849}</i> , <i>bla_{OXA-848}</i> , <i>bla_{OXA-847}</i> , <i>bla_{OXA-846}</i> , <i>bla_{OXA-494}</i> , <i>bla_{OXA-488}</i> , <i>bla_{OXA-486}</i> , <i>bla_{OXA-485}</i> , <i>bla_{OXA-595}</i> , <i>bla_{OXA-396}</i>
bla_{OXA-51}	<i>bla_{OXA-954}</i> , <i>bla_{OXA-955}</i> , <i>bla_{OXA-938}</i> , <i>bla_{OXA-939}</i> , <i>bla_{OXA-940}</i> , <i>bla_{OXA-927}</i> , <i>bla_{OXA-916}</i> , <i>bla_{OXA-909}</i> , <i>bla_{OXA-910}</i> , <i>bla_{OXA-892}</i> , <i>bla_{OXA-891}</i> , <i>bla_{OXA-890}</i> , <i>bla_{OXA-889}</i> , <i>bla_{OXA-888}</i> , <i>bla_{OXA-887}</i> , <i>bla_{OXA-886}</i> , <i>bla_{OXA-885}</i> , <i>bla_{OXA-884}</i> , <i>bla_{OXA-883}</i> , <i>bla_{OXA-882}</i> , <i>bla_{OXA-881}</i> , <i>bla_{OXA-880}</i> , <i>bla_{OXA-879}</i> , <i>bla_{OXA-878}</i> , <i>bla_{OXA-879}</i> , <i>bla_{OXA-878}</i> , <i>bla_{OXA-877}</i> , <i>bla_{OXA-876}</i> , <i>bla_{OXA-875}</i> , <i>bla_{OXA-874}</i> , <i>bla_{OXA-873}</i> , <i>bla_{OXA-872}</i> , <i>bla_{OXA-871}</i> , <i>bla_{OXA-870}</i> , <i>bla_{OXA-869}</i> , <i>bla_{OXA-868}</i> , <i>bla_{OXA-867}</i> , <i>bla_{OXA-866}</i> , <i>bla_{OXA-865}</i> , <i>bla_{OXA-864}</i> , <i>bla_{OXA-863}</i> , <i>bla_{OXA-862}</i> , <i>bla_{OXA-861}</i> , <i>bla_{OXA-860}</i> , <i>bla_{OXA-859}</i> , <i>bla_{OXA-858}</i> , <i>bla_{OXA-857}</i> , <i>bla_{OXA-856}</i> , <i>bla_{OXA-855}</i> , <i>bla_{OXA-854}</i> , <i>bla_{OXA-853}</i> , <i>bla_{OXA-852}</i> , <i>bla_{OXA-834}</i> , <i>bla_{OXA-831}</i> , <i>bla_{OXA-829}</i> , <i>bla_{OXA-828}</i> , <i>bla_{OXA-797}</i> , <i>bla_{OXA-798}</i> , <i>bla_{OXA-799}</i> , <i>bla_{OXA-800}</i> , <i>bla_{OXA-781}</i> , <i>bla_{OXA-782}</i> , <i>bla_{OXA-738}</i> , <i>bla_{OXA-739}</i> , <i>bla_{OXA-740}</i> , <i>bla_{OXA-741}</i> , <i>bla_{OXA-742}</i> , <i>bla_{OXA-743}</i> , <i>bla_{OXA-744}</i> , <i>bla_{OXA-745}</i> , <i>bla_{OXA-746}</i> , <i>bla_{OXA-747}</i> , <i>bla_{OXA-748}</i> , <i>bla_{OXA-749}</i> , <i>bla_{OXA-750}</i> , <i>bla_{OXA-751}</i> , <i>bla_{OXA-752}</i> , <i>bla_{OXA-753}</i> , <i>bla_{OXA-754}</i> , <i>bla_{OXA-755}</i> , <i>bla_{OXA-756}</i> , <i>bla_{OXA-757}</i> , <i>bla_{OXA-758}</i> , <i>bla_{OXA-759}</i> , <i>bla_{OXA-760}</i> , <i>bla_{OXA-761}</i> , <i>bla_{OXA-762}</i> , <i>bla_{OXA-763}</i> , <i>bla_{OXA-764}</i> , <i>bla_{OXA-765}</i> , <i>bla_{OXA-766}</i> , <i>bla_{OXA-767}</i> , <i>bla_{OXA-768}</i> , <i>bla_{OXA-769}</i> , <i>bla_{OXA-770}</i> , <i>bla_{OXA-771}</i> , <i>bla_{OXA-772}</i> , <i>bla_{OXA-773}</i> , <i>bla_{OXA-774}</i> , <i>bla_{OXA-775}</i> , <i>bla_{OXA-776}</i> , <i>bla_{OXA-782}</i> , <i>bla_{OXA-733}</i> , <i>bla_{OXA-734}</i> , <i>bla_{OXA-735}</i> , <i>bla_{OXA-682}</i> , <i>bla_{OXA-683}</i> , <i>bla_{OXA-684}</i> , <i>bla_{OXA-685}</i> , <i>bla_{OXA-686}</i> , <i>bla_{OXA-687}</i> , <i>bla_{OXA-688}</i> , <i>bla_{OXA-689}</i> , <i>bla_{OXA-690}</i> , <i>bla_{OXA-691}</i> , <i>bla_{OXA-692}</i> , <i>bla_{OXA-693}</i> , <i>bla_{OXA-694}</i> , <i>bla_{OXA-695}</i> , <i>bla_{OXA-696}</i> , <i>bla_{OXA-697}</i> , <i>bla_{OXA-698}</i> , <i>bla_{OXA-699}</i> , <i>bla_{OXA-700}</i> , <i>bla_{OXA-701}</i> , <i>bla_{OXA-702}</i> , <i>bla_{OXA-703}</i> , <i>bla_{OXA-704}</i> , <i>bla_{OXA-705}</i> , <i>bla_{OXA-706}</i> , <i>bla_{OXA-707}</i> , <i>bla_{OXA-708}</i> , <i>bla_{OXA-709}</i> , <i>bla_{OXA-710}</i> , <i>bla_{OXA-711}</i> , <i>bla_{OXA-712}</i> , <i>bla_{OXA-713}</i> , <i>bla_{OXA-714}</i> , <i>bla_{OXA-715}</i> , <i>bla_{OXA-716}</i> , <i>bla_{OXA-717}</i> , <i>bla_{OXA-718}</i> , <i>bla_{OXA-719}</i> , <i>bla_{OXA-720}</i> , <i>bla_{OXA-721}</i> , <i>bla_{OXA-722}</i> , <i>bla_{OXA-723}</i> , <i>bla_{OXA-680}</i> , <i>bla_{OXA-654}</i> , <i>bla_{OXA-556}</i> , <i>bla_{OXA-557}</i> , <i>bla_{OXA-558}</i> , <i>bla_{OXA-559}</i> , <i>bla_{OXA-560}</i> , <i>bla_{OXA-561}</i> , <i>bla_{OXA-562}</i> , <i>bla_{OXA-545}</i> , <i>bla_{OXA-536}</i> , <i>bla_{OXA-523}</i> , <i>bla_{OXA-522}</i> , <i>bla_{OXA-521}</i> , <i>bla_{OXA-523}</i> , <i>bla_{OXA-524}</i> , <i>bla_{OXA-525}</i> , <i>bla_{OXA-526}</i> , <i>bla_{OXA-527}</i> , <i>bla_{OXA-528}</i> , <i>bla_{OXA-529}</i> , <i>bla_{OXA-530}</i> , <i>bla_{OXA-531}</i> , <i>bla_{OXA-532}</i> , <i>bla_{OXA-516}</i> , <i>bla_{OXA-507}</i> , <i>bla_{OXA-508}</i> , <i>bla_{OXA-509}</i> , <i>bla_{OXA-510}</i> , <i>bla_{OXA-511}</i> , <i>bla_{OXA-497}</i> , <i>bla_{OXA-480}</i> , <i>bla_{OXA-441}</i> , <i>bla_{OXA-442}</i> , <i>bla_{OXA-429}</i> , <i>bla_{OXA-430}</i> , <i>bla_{OXA-431}</i> , <i>bla_{OXA-432}</i> , <i>bla_{OXA-433}</i> , <i>bla_{OXA-426}</i> , <i>bla_{OXA-435}</i> , <i>bla_{OXA-424}</i> , <i>bla_{OXA-412}</i> , <i>bla_{OXA-413}</i> , <i>bla_{OXA-414}</i> , <i>bla_{OXA-411}</i> , <i>bla_{OXA-406}</i> , <i>bla_{OXA-407}</i> , <i>bla_{OXA-408}</i> , <i>bla_{OXA-409}</i> , <i>bla_{OXA-410}</i> , <i>bla_{OXA-400}</i> , <i>bla_{OXA-401}</i> , <i>bla_{OXA-402}</i> , <i>bla_{OXA-403}</i> , <i>bla_{OXA-404}</i> , <i>bla_{OXA-377}</i> , <i>bla_{OXA-378}</i> , <i>bla_{OXA-379}</i> , <i>bla_{OXA-380}</i> , <i>bla_{OXA-381}</i> , <i>bla_{OXA-382}</i> , <i>bla_{OXA-383}</i> , <i>bla_{OXA-384}</i> , <i>bla_{OXA-385}</i> , <i>bla_{OXA-386}</i> , <i>bla_{OXA-387}</i> , <i>bla_{OXA-388}</i> , <i>bla_{OXA-389}</i> , <i>bla_{OXA-390}</i> , <i>bla_{OXA-391}</i> , <i>bla_{OXA-374}</i> , <i>bla_{OXA-375}</i> , <i>bla_{OXA-376}</i> , <i>bla_{OXA-371}</i> , <i>bla_{OXA-365}</i> , <i>bla_{OXA-340}</i> , <i>bla_{OXA-341}</i> , <i>bla_{OXA-342}</i> , <i>bla_{OXA-343}</i> , <i>bla_{OXA-344}</i> , <i>bla_{OXA-345}</i> , <i>bla_{OXA-346}</i> , <i>bla_{OXA-336}</i> , <i>bla_{OXA-337}</i>

*bla*_{OXA-338}, *bla*_{OXA-339}, *bla*_{OXA-317}, *bla*_{OXA-316}, *bla*_{OXA-315}, *bla*_{OXA-314}, *bla*_{OXA-313}, *bla*_{OXA-312},
*bla*_{OXA-263}, *bla*_{OXA-262}, *bla*_{OXA-261}, *bla*_{OXA-260}, *bla*_{OXA-259}, *bla*_{OXA-254}, *bla*_{OXA-250}, *bla*_{OXA-249},
*bla*_{OXA-248}, *bla*_{OXA-242}, *bla*_{OXA-241}, *bla*_{OXA-234}, *bla*_{OXA-223}, *bla*_{OXA-219}, *bla*_{OXA-217}, *bla*_{OXA-216},
*bla*_{OXA-208}, *bla*_{OXA-206}, *bla*_{OXA-203}, *bla*_{OXA-202}, *bla*_{OXA-201}, *bla*_{OXA-200}, *bla*_{OXA-197}, *bla*_{OXA-196},
*bla*_{OXA-195}, *bla*_{OXA-194}, *bla*_{OXA-180}, *bla*_{OXA-179}, *bla*_{OXA-178}, *bla*_{OXA-177}, *bla*_{OXA-176}, *bla*_{OXA-175},
*bla*_{OXA-174}, *bla*_{OXA-173}, *bla*_{OXA-172}, *bla*_{OXA-150}, *bla*_{OXA-149}, *bla*_{OXA-148}, *bla*_{OXA-144}, *bla*_{OXA-138},
*bla*_{OXA-132}, *bla*_{OXA-131}, *bla*_{OXA-130}, *bla*_{OXA-128}, *bla*_{OXA-127}, *bla*_{OXA-126}, *bla*_{OXA-125}, *bla*_{OXA-124},
*bla*_{OXA-123}, *bla*_{OXA-122}, *bla*_{OXA-121}, *bla*_{OXA-120}, *bla*_{OXA-117}, *bla*_{OXA-115}, *bla*_{OXA-113}, *bla*_{OXA-112},
*bla*_{OXA-111}, *bla*_{OXA-110}, *bla*_{OXA-109}, *bla*_{OXA-108}, *bla*_{OXA-107}, *bla*_{OXA-106}, *bla*_{OXA-104}, *bla*_{OXA-100},
*bla*_{OXA-99}, *bla*_{OXA-98}, *bla*_{OXA-95}, *bla*_{OXA-94}, *bla*_{OXA-93}, *bla*_{OXA-92}, *bla*_{OXA-91}, *bla*_{OXA-90}, *bla*_{OXA-89},
*bla*_{OXA-88}, *bla*_{OXA-87}, *bla*_{OXA-86}, *bla*_{OXA-84}, *bla*_{OXA-83}, *bla*_{OXA-82}, *bla*_{OXA-80}, *bla*_{OXA-79}, *bla*_{OXA-78},
*bla*_{OXA-77}, *bla*_{OXA-76}, *bla*_{OXA-75}, *bla*_{OXA-71}, *bla*_{OXA-70}, *bla*_{OXA-69}, *bla*_{OXA-68}, *bla*_{OXA-67}, *bla*_{OXA-66},
*bla*_{OXA-65}, *bla*_{OXA-64}

<i>bla</i>_{OXA-55}	<i>bla</i> _{OXA-960} , <i>bla</i> _{OXA-961} , <i>bla</i> _{OXA-962} , <i>bla</i> _{OXA-963} , <i>bla</i> _{OXA-964} , <i>bla</i> _{OXA-965} , <i>bla</i> _{OXA-729}
<i>bla</i>_{OXA-58}	<i>bla</i> _{OXA-512} , <i>bla</i> _{OXA-420} , <i>bla</i> _{OXA-397} , <i>bla</i> _{OXA-164} , <i>bla</i> _{OXA-97} , <i>bla</i> _{OXA-96}
<i>bla</i>_{OXA-60}	<i>bla</i> _{OXA-60} , <i>bla</i> _{OXA-898} , <i>bla</i> _{OXA-573} , <i>bla</i> _{OXA-570} , <i>bla</i> _{OXA-571} , <i>bla</i> _{OXA-444}
<i>bla</i>_{OXA-61}	<i>bla</i> _{OXA-786} , <i>bla</i> _{OXA-784} , <i>bla</i> _{OXA-659} , <i>bla</i> _{OXA-660} , <i>bla</i> _{OXA-577} , <i>bla</i> _{OXA-578} , <i>bla</i> _{OXA-579} , <i>bla</i> _{OXA-580} , <i>bla</i> _{OXA-581} , <i>bla</i> _{OXA-582} , <i>bla</i> _{OXA-583} , <i>bla</i> _{OXA-584} , <i>bla</i> _{OXA-585} , <i>bla</i> _{OXA-586} , <i>bla</i> _{OXA-587} , <i>bla</i> _{OXA-588} , <i>bla</i> _{OXA-589} , <i>bla</i> _{OXA-590} , <i>bla</i> _{OXA-591} , <i>bla</i> _{OXA-592} , <i>bla</i> _{OXA-593} , <i>bla</i> _{OXA-594} , <i>bla</i> _{OXA-595} , <i>bla</i> _{OXA-596} <i>bla</i> _{OXA-597} , <i>bla</i> _{OXA-598} , <i>bla</i> _{OXA-599} , <i>bla</i> _{OXA-600} , <i>bla</i> _{OXA-601} , <i>bla</i> _{OXA-602} , <i>bla</i> _{OXA-603} , <i>bla</i> _{OXA-604} , <i>bla</i> _{OXA-605} , <i>bla</i> _{OXA-606} , <i>bla</i> _{OXA-607} , <i>bla</i> _{OXA-608} , <i>bla</i> _{OXA-609} , <i>bla</i> _{OXA-610} , <i>bla</i> _{OXA-611} , <i>bla</i> _{OXA-612} , <i>bla</i> _{OXA-489} , <i>bla</i> _{OXA-460} , <i>bla</i> _{OXA-461} , <i>bla</i> _{OXA-450} , <i>bla</i> _{OXA-451} , <i>bla</i> _{OXA-452} , <i>bla</i> _{OXA-453} , <i>bla</i> _{OXA-193}
<i>bla</i>_{OXA-62}	<i>bla</i> _{OXA-152} , <i>bla</i> _{OXA-151}
<i>bla</i>_{OXA-63}	<i>bla</i> _{OXA-470} , <i>bla</i> _{OXA-471} , <i>bla</i> _{OXA-472} , <i>bla</i> _{OXA-473} , <i>bla</i> _{OXA-474} , <i>bla</i> _{OXA-475} , <i>bla</i> _{OXA-476} , <i>bla</i> _{OXA-477} , <i>bla</i> _{OXA-478} , <i>bla</i> _{OXA-479} , <i>bla</i> _{OXA-192} , <i>bla</i> _{OXA-137} , <i>bla</i> _{OXA-136}
<i>bla</i>_{OXA-81}	-
<i>bla</i>_{OXA-85}	-
<i>bla</i>_{OXA-114}	<i>bla</i> _{OXA-839} , <i>bla</i> _{OXA-790} , <i>bla</i> _{OXA-791} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-} , <i>bla</i> _{OXA-}
<i>bla</i>_{OXA-114a}	<i>bla</i> _{OXA-114x} , <i>bla</i> _{OXA-114w} , <i>bla</i> _{OXA-114v} , <i>bla</i> _{OXA-114u} , <i>bla</i> _{OXA-114t} , <i>bla</i> _{OXA-114s} , <i>bla</i> _{OXA-114r} , <i>bla</i> _{OXA-} 114q, <i>bla</i> _{OXA-114p} , <i>bla</i> _{OXA-114m} , <i>bla</i> _{OXA-114n} , <i>bla</i> _{OXA-114l} , <i>bla</i> _{OXA-114k} , <i>bla</i> _{OXA-114j} , <i>bla</i> _{OXA-114i} , <i>bla</i> _{OXA-114h} , <i>bla</i> _{OXA-114g} , <i>bla</i> _{OXA-114f} , <i>bla</i> _{OXA-114e} , <i>bla</i> _{OXA-114d} , <i>bla</i> _{OXA-114c} , <i>bla</i> _{OXA-114b}
<i>bla</i>_{OXA-134}	<i>bla</i> _{OXA-646} , <i>bla</i> _{OXA-915} , <i>bla</i> _{OXA-647} , <i>bla</i> _{OXA-648} , <i>bla</i> _{OXA-537} , <i>bla</i> _{OXA-496} , <i>bla</i> _{OXA-360} , <i>bla</i> _{OXA-361} , <i>bla</i> _{OXA-362} , <i>bla</i> _{OXA-363} , <i>bla</i> _{OXA-335} , <i>bla</i> _{OXA-285} , <i>bla</i> _{OXA-284} , <i>bla</i> _{OXA-283} , <i>bla</i> _{OXA-282} , <i>bla</i> _{OXA-278} , <i>bla</i> _{OXA-277} , <i>bla</i> _{OXA-276} , <i>bla</i> _{OXA-237} , <i>bla</i> _{OXA-236} , <i>bla</i> _{OXA-235} , <i>bla</i> _{OXA-191} , <i>bla</i> _{OXA-190} , <i>bla</i> _{OXA-189} , <i>bla</i> _{OXA-188} , <i>bla</i> _{OXA-187} , <i>bla</i> _{OXA-186}
<i>bla</i>_{OXA-143}	<i>bla</i> _{OXA-945} , <i>bla</i> _{OXA-825} , <i>bla</i> _{OXA-649} , <i>bla</i> _{OXA-499} , <i>bla</i> _{OXA-255} , <i>bla</i> _{OXA-253} , <i>bla</i> _{OXA-231} , <i>bla</i> _{OXA-182}
<i>bla</i>_{OXA-153}	-
<i>bla</i>_{OXA-154}	<i>bla</i> _{OXA-155}

bla_{OXA}-156	<i>bla_{OXA}-158, bla_{OXA}-159</i>
bla_{OXA}-184	<i>bla_{OXA}-785, bla_{OXA}-783, bla_{OXA}-658, bla_{OXA}-613, bla_{OXA}-614, bla_{OXA}-615, bla_{OXA}-616, bla_{OXA}-617, bla_{OXA}-618, bla_{OXA}-619, bla_{OXA}-620, bla_{OXA}-621, bla_{OXA}-622, bla_{OXA}-623, bla_{OXA}-624, bla_{OXA}-625, bla_{OXA}-626, bla_{OXA}-627, bla_{OXA}-628, bla_{OXA}-629, bla_{OXA}-630, bla_{OXA}-631, bla_{OXA}-632, bla_{OXA}-633, bla_{OXA}-634, bla_{OXA}-635, bla_{OXA}-636, bla_{OXA}-637, bla_{OXA}-638, bla_{OXA}-639, bla_{OXA}-640, bla_{OXA}-465, bla_{OXA}-466, bla_{OXA}-446, bla_{OXA}-447, bla_{OXA}-448, bla_{OXA}-449, bla_{OXA}-185</i>
bla_{OXA}-198	-
bla_{OXA}-209	-
bla_{OXA}-211	<i>bla_{OXA}-662, bla_{OXA}-650, bla_{OXA}-651, bla_{OXA}-652, bla_{OXA}-643, bla_{OXA}-644, bla_{OXA}-645, bla_{OXA}-498, bla_{OXA}-373, bla_{OXA}-333, bla_{OXA}-334, bla_{OXA}-309, bla_{OXA}-281, bla_{OXA}-280</i>
bla_{OXA}-212	<i>bla_{OXA}-211</i>
bla_{OXA}-213	<i>bla_{OXA}-941, bla_{OXA}-942, bla_{OXA}-943, bla_{OXA}-840, bla_{OXA}-841, bla_{OXA}-842, bla_{OXA}-843, bla_{OXA}-844, bla_{OXA}-832, bla_{OXA}-826, bla_{OXA}-819, bla_{OXA}-820, bla_{OXA}-821, bla_{OXA}-822, bla_{OXA}-801, bla_{OXA}-802, bla_{OXA}-803, bla_{OXA}-804, bla_{OXA}-805, bla_{OXA}-777, bla_{OXA}-778, bla_{OXA}-678, bla_{OXA}-642, bla_{OXA}-563, bla_{OXA}-564, bla_{OXA}-533, bla_{OXA}-526, bla_{OXA}-506, bla_{OXA}-500, bla_{OXA}-501, bla_{OXA}-502, bla_{OXA}-503, bla_{OXA}-421, bla_{OXA}-417, bla_{OXA}-357, bla_{OXA}-358, bla_{OXA}-359, bla_{OXA}-348, bla_{OXA}-349, bla_{OXA}-350, bla_{OXA}-351, bla_{OXA}-352, bla_{OXA}-353, bla_{OXA}-354, bla_{OXA}-332, bla_{OXA}-331, bla_{OXA}-330, bla_{OXA}-329, bla_{OXA}-328, bla_{OXA}-327, bla_{OXA}-326, bla_{OXA}-325, bla_{OXA}-324, bla_{OXA}-323, bla_{OXA}-322, bla_{OXA}-305, bla_{OXA}-304, bla_{OXA}-273, bla_{OXA}-272, bla_{OXA}-271, bla_{OXA}-270, bla_{OXA}-269, bla_{OXA}-268, bla_{OXA}-267</i>
bla_{OXA}-214	<i>bla_{OXA}-936, bla_{OXA}-845, bla_{OXA}-575, bla_{OXA}-265, bla_{OXA}-264</i>
bla_{OXA}-215	<i>bla_{OXA}-214</i>
bla_{OXA}-228	<i>bla_{OXA}-952, bla_{OXA}-953, bla_{OXA}-895, bla_{OXA}-418, bla_{OXA}-356, bla_{OXA}-355, bla_{OXA}-301, bla_{OXA}-300, bla_{OXA}-257, bla_{OXA}-230, bla_{OXA}-229, bla_{OXA}-228, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-,</i>
bla_{OXA}-243	<i>bla_{OXA}-787, bla_{OXA}-513, bla_{OXA}-457, bla_{OXA}-458, bla_{OXA}-459, bla_{OXA}-455, bla_{OXA}-364</i>
bla_{OXA}-258	<i>bla_{OXA}-925 bla_{OXA}-922, bla_{OXA}-923, bla_{OXA}-924</i>
bla_{OXA}-266	<i>bla_{OXA}-661</i>
bla_{OXA}-274	<i>bla_{OXA}-667, bla_{OXA}-668, bla_{OXA}-669, bla_{OXA}-275</i>
bla_{OXA}-279	<i>bla_{OXA}-289, bla_{OXA}-290</i>
bla_{OXA}-286	<i>bla_{OXA}-670, bla_{OXA}-671, bla_{OXA}-672, bla_{OXA}-673, bla_{OXA}-674, bla_{OXA}-307, bla_{OXA}-306, bla_{OXA}-303, bla_{OXA}-302, bla_{OXA}-293, bla_{OXA}-291, bla_{OXA}-292, bla_{OXA}-288, bla_{OXA}-,</i>
bla_{OXA}-294	<i>bla_{OXA}-298, bla_{OXA}-297, bla_{OXA}-295</i>
bla_{OXA}-296	<i>bla_{OXA}-666</i>
bla_{OXA}-299	-
bla_{OXA}-372	<i>bla_{OXA}-641, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-, bla_{OXA}-</i>
bla_{OXA}-427	<i>bla_{OXA}-427, bla_{OXA}-917</i>

<i>bla</i>_{OXA-464}	<i>bla</i> _{OXA-464} , <i>bla</i> _{OXA-490} , <i>bla</i> _{OXA-491} , <i>bla</i> _{OXA-}
<i>bla</i>_{OXA-493}	<i>bla</i> _{OXA-518} , <i>bla</i> _{OXA-493}
<i>bla</i>_{OXA-504}	<i>bla</i> _{OXA-780} , <i>bla</i> _{OXA-504}
<i>bla</i>_{OXA-548}	<i>bla</i> _{OXA-549} , <i>bla</i> _{OXA-550} , <i>bla</i> _{OXA-551} , <i>bla</i> _{OXA-552} , <i>bla</i> _{OXA-553} , <i>bla</i> _{OXA-} ,
<i>bla</i>_{OXA-568}	-
<i>bla</i>_{OXA-576}	-
<i>bla</i>_{OXA-664}	-
<i>bla</i>_{OXA-679}	<i>bla</i> _{OXA-946} , <i>bla</i> _{OXA-947} , <i>bla</i> _{OXA-948} , <i>bla</i> _{OXA-949}
<i>bla</i>_{OXA-727}	<i>bla</i> _{OXA-728}
<i>bla</i>_{OXA-900}	-
<i>bla</i>_{OXA-919}	-
<i>bla</i>_{OXA-926}	-

ANEXO A – Carta de aceite do artigo 1



Elizabeth Maria Bispo Beltrão <bethbeltrao@gmail.com>

JICHE: Your manuscript entitled Virulence factors of Proteus mirabilis clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil

2 mensagens

JIC Editorial Office <em@editorialmanager.com>
 Responder a: JIC Editorial Office <jic@elsevier.com>
 Para: Elizabeth Maria Bispo Beltrão <bethbeltrao@gmail.com>

2 de novembro de 2021 06:52

Ref.: Ms. No. JICHE-D-21-00715R2
 Virulence factors of Proteus mirabilis clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil
 Original Article
 Journal of Infection and Chemotherapy

Dear Miss Beltrão,

We are pleased to inform you that your manuscript has been accepted for publication in the Journal of Infection and Chemotherapy and your manuscript will be sent to the publisher Elsevier Japan. The Editorial Board and the Publisher are empowered to make editorial changes as necessary to make the paper suitable for publication in points of grammar, consistency, and style on the understanding that any suggestions made regarding your manuscript are with the best of intentions.

As the editor-in-chief, I encourage all of you to cite this paper whenever possible as you prepare papers for submission to other international journals, as this step will aid in the assignment of an appropriate impact factor to our journal. Your understanding in this respect will be greatly appreciated.

Thank you for your interest in our journal.

With kind regards

Satoshi Takahashi
 Editor-in-Chief
 Journal of Infection and Chemotherapy

Review comments:

Reviewer #2: Thank you for the revision.

%ATTACH_FOR_REVIEWER_DEEP_LINK INSTRUCTIONS%

ANEXO B – Primeira folha do artigo 2 publicado

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Journal of the Brazilian Society of Tropical Medicine

Vol.54:(e0864-2020): 2021

<https://doi.org/10.1590/0037-8682-0864-2020>

Case Report

First report of *bla*_{GES-1} in *Proteus mirabilis* clinical isolates

Elizabeth Maria Bispo Beltrão^[1], Érica Maria de Oliveira^[1]
and Ana Catarina de Souza Lopes^[1]

[1] Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Medicina Tropical, Recife, PE, Brasil

Abstract

Proteus mirabilis is one of the main pathogens causing urinary tract infections and sepsis. To our knowledge, this is the first report of a *P. mirabilis* hosting *bla*_{GES-1}. The presence of these genes was determined using PCR and sequencing. We identified the presence of *bla*_{GES-1} in all three isolates. In addition, we identified the *bla*_{SHV-1} and *bla*_{TEM-1} genes in the two strains. These data emphasize the importance of monitoring and surveillance of all enterobacteria. The circulation of *P. mirabilis* strains carrying *bla*_{GES-1} constitutes a new scenario of resistance in this species and should be an epidemiological alert for global health.

Keywords: *Proteus mirabilis*, *bla*_{GES-1}, *bla*_{SHV-1}.

INTRODUCTION

Proteus spp. are gram-negative bacilli belonging to the order Enterobacteriales. The genus contains six species: *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Proteus morganii*, *Proteus citri*, *Proteus penneri*, and *Proteus hauseri*. *P. mirabilis*, *P. vulgaris*, and *P. penneri* are commonly described as opportunistic pathogens¹.

Proteus strains with moderate resistance to imipenem are frequent, with evidence that this resistance is due to changes in the penicillin-binding protein (PBP2). In addition, *Proteus* can acquire resistance to several antimicrobial groups because of the presence of resistance genes such as *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-2}, *bla*_{TEM-2}, *bla*_{SHV-3}, *bla*_{TEM-3}, *bla*_{SHV-4}, *bla*_{TEM-4}, *bla*_{SHV-5}, *bla*_{TEM-5}, *bla*_{SHV-6}, *bla*_{TEM-6}, *bla*_{SHV-7}, *bla*_{TEM-7}, *bla*_{SHV-8}, *bla*_{TEM-8}, *bla*_{SHV-9}, *bla*_{TEM-9}, *bla*_{SHV-10}, *bla*_{TEM-10}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{TEM-11}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{TEM-12}, *bla*_{SHV-13}, *bla*_{TEM-13}, *bla*_{SHV-14}, *bla*_{TEM-14}, *bla*_{SHV-15}, *bla*_{TEM-15}, *bla*_{SHV-16}, *bla*_{TEM-16}, *bla*_{SHV-17}, *bla*_{TEM-17}, *bla*_{SHV-18}, *bla*_{TEM-18}, *bla*_{SHV-19}, *bla*_{TEM-19}, *bla*_{SHV-20}, *bla*_{TEM-20}, *bla*_{SHV-21}, *bla*_{TEM-21}, *bla*_{SHV-22}, *bla*_{TEM-22}, *bla*_{SHV-23}, *bla*_{TEM-23}, *bla*_{SHV-24}, *bla*_{TEM-24}, *bla*_{SHV-25}, *bla*_{TEM-25}, *bla*_{SHV-26}, *bla*_{TEM-26}, *bla*_{SHV-27}, *bla*_{TEM-27}, *bla*_{SHV-28}, *bla*_{TEM-28}, *bla*_{SHV-29}, *bla*_{TEM-29}, *bla*_{SHV-30}, *bla*_{TEM-30}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{TEM-31}, *bla*_{SHV-32}, *bla*_{TEM-32}, *bla*_{SHV-33}, *bla*_{TEM-33}, *bla*_{SHV-34}, *bla*_{TEM-34}, *bla*_{SHV-35}, *bla*_{TEM-35}, *bla*_{SHV-36}, *bla*_{TEM-36}, *bla*_{SHV-37}, *bla*_{TEM-37}, *bla*_{SHV-38}, *bla*_{TEM-38}, *bla*_{SHV-39}, *bla*_{TEM-39}, *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-40}, *bla*_{SHV-41}, *bla*_{TEM-41}, *bla*_{SHV-42}, *bla*_{TEM-42}, *bla*_{SHV-43}, *bla*_{TEM-43}, *bla*_{SHV-44}, *bla*_{TEM-44}, *bla*_{SHV-45}, *bla*_{TEM-45}, *bla*_{SHV-46}, *bla*_{TEM-46}, *bla*_{SHV-47}, *bla*_{TEM-47}, *bla*_{SHV-48}, *bla*_{TEM-48}, *bla*_{SHV-49}, *bla*_{TEM-49}, *bla*_{SHV-50}, *bla*_{TEM-50}, *bla*_{SHV-51}, *bla*_{TEM-51}, *bla*_{SHV-52}, *bla*_{TEM-52}, *bla*_{SHV-53}, *bla*_{TEM-53}, *bla*_{SHV-54}, *bla*_{TEM-54}, *bla*_{SHV-55}, *bla*_{TEM-55}, *bla*_{SHV-56}, *bla*_{TEM-56}, *bla*_{SHV-57}, *bla*_{TEM-57}, *bla*_{SHV-58}, *bla*_{TEM-58}, *bla*_{SHV-59}, *bla*_{TEM-59}, *bla*_{SHV-60}, *bla*_{TEM-60}, *bla*_{SHV-61}, *bla*_{TEM-61}, *bla*_{SHV-62}, *bla*_{TEM-62}, *bla*_{SHV-63}, *bla*_{TEM-63}, *bla*_{SHV-64}, *bla*_{TEM-64}, *bla*_{SHV-65}, *bla*_{TEM-65}, *bla*_{SHV-66}, *bla*_{TEM-66}, *bla*_{SHV-67}, *bla*_{TEM-67}, *bla*_{SHV-68}, *bla*_{TEM-68}, *bla*_{SHV-69}, *bla*_{TEM-69}, *bla*_{SHV-70}, *bla*_{TEM-70}, *bla*_{SHV-71}, *bla*_{TEM-71}, *bla*_{SHV-72}, *bla*_{TEM-72}, *bla*_{SHV-73}, *bla*_{TEM-73}, *bla*_{SHV-74}, *bla*_{TEM-74}, *bla*_{SHV-75}, *bla*_{TEM-75}, *bla*_{SHV-76}, *bla*_{TEM-76}, *bla*_{SHV-77}, *bla*_{TEM-77}, *bla*_{SHV-78}, *bla*_{TEM-78}, *bla*_{SHV-79}, *bla*_{TEM-79}, *bla*_{SHV-80}, *bla*_{TEM-80}, *bla*_{SHV-81}, *bla*_{TEM-81}, *bla*_{SHV-82}, *bla*_{TEM-82}, *bla*_{SHV-83}, *bla*_{TEM-83}, *bla*_{SHV-84}, *bla*_{TEM-84}, *bla*_{SHV-85}, *bla*_{TEM-85}, *bla*_{SHV-86}, *bla*_{TEM-86}, *bla*_{SHV-87}, *bla*_{TEM-87}, *bla*_{SHV-88}, *bla*_{TEM-88}, *bla*_{SHV-89}, *bla*_{TEM-89}, *bla*_{SHV-90}, *bla*_{TEM-90}, *bla*_{SHV-91}, *bla*_{TEM-91}, *bla*_{SHV-92}, *bla*_{TEM-92}, *bla*_{SHV-93}, *bla*_{TEM-93}, *bla*_{SHV-94}, *bla*_{TEM-94}, *bla*_{SHV-95}, *bla*_{TEM-95}, *bla*_{SHV-96}, *bla*_{TEM-96}, *bla*_{SHV-97}, *bla*_{TEM-97}, *bla*_{SHV-98}, *bla*_{TEM-98}, *bla*_{SHV-99}, *bla*_{TEM-99}, *bla*_{SHV-100}, *bla*_{TEM-100}, *bla*_{SHV-101}, *bla*_{TEM-101}, *bla*_{SHV-102}, *bla*_{TEM-102}, *bla*_{SHV-103}, *bla*_{TEM-103}, *bla*_{SHV-104}, *bla*_{TEM-104}, *bla*_{SHV-105}, *bla*_{TEM-105}, *bla*_{SHV-106}, *bla*_{TEM-106}, *bla*_{SHV-107}, *bla*_{TEM-107}, *bla*_{SHV-108}, *bla*_{TEM-108}, *bla*_{SHV-109}, *bla*_{TEM-109}, *bla*_{SHV-110}, *bla*_{TEM-110}, *bla*_{SHV-111}, *bla*_{TEM-111}, *bla*_{SHV-112}, *bla*_{TEM-112}, *bla*_{SHV-113}, *bla*_{TEM-113}, *bla*_{SHV-114}, *bla*_{TEM-114}, *bla*_{SHV-115}, *bla*_{TEM-115}, *bla*_{SHV-116}, *bla*_{TEM-116}, *bla*_{SHV-117}, *bla*_{TEM-117}, *bla*_{SHV-118}, *bla*_{TEM-118}, *bla*_{SHV-119}, *bla*_{TEM-119}, *bla*_{SHV-120}, *bla*_{TEM-120}, *bla*_{SHV-121}, *bla*_{TEM-121}, *bla*_{SHV-122}, *bla*_{TEM-122}, *bla*_{SHV-123}, *bla*_{TEM-123}, *bla*_{SHV-124}, *bla*_{TEM-124}, *bla*_{SHV-125}, *bla*_{TEM-125}, *bla*_{SHV-126}, *bla*_{TEM-126}, *bla*_{SHV-127}, *bla*_{TEM-127}, *bla*_{SHV-128}, *bla*_{TEM-128}, *bla*_{SHV-129}, *bla*_{TEM-129}, *bla*_{SHV-130}, *bla*_{TEM-130}, *bla*_{SHV-131}, *bla*_{TEM-131}, *bla*_{SHV-132}, *bla*_{TEM-132}, *bla*_{SHV-133}, *bla*_{TEM-133}, *bla*_{SHV-134}, *bla*_{TEM-134}, *bla*_{SHV-135}, *bla*_{TEM-135}, *bla*_{SHV-136}, *bla*_{TEM-136}, *bla*_{SHV-137}, *bla*_{TEM-137}, *bla*_{SHV-138}, *bla*_{TEM-138}, *bla*_{SHV-139}, *bla*_{TEM-139}, *bla*_{SHV-140}, *bla*_{TEM-140}, *bla*_{SHV-141}, *bla*_{TEM-141}, *bla*_{SHV-142}, *bla*_{TEM-142}, *bla*_{SHV-143}, *bla*_{TEM-143}, *bla*_{SHV-144}, *bla*_{TEM-144}, *bla*_{SHV-145}, *bla*_{TEM-145}, *bla*_{SHV-146}, *bla*_{TEM-146}, *bla*_{SHV-147}, *bla*_{TEM-147}, *bla*_{SHV-148}, *bla*_{TEM-148}, *bla*_{SHV-149}, *bla*_{TEM-149}, *bla*_{SHV-150}, *bla*_{TEM-150}, *bla*_{SHV-151}, *bla*_{TEM-151}, *bla*_{SHV-152}, *bla*_{TEM-152}, *bla*_{SHV-153}, *bla*_{TEM-153}, *bla*_{SHV-154}, *bla*_{TEM-154}, *bla*_{SHV-155}, *bla*_{TEM-155}, *bla*_{SHV-156}, *bla*_{TEM-156}, *bla*_{SHV-157}, *bla*_{TEM-157}, *bla*_{SHV-158}, *bla*_{TEM-158}, *bla*_{SHV-159}, *bla*_{TEM-159}, *bla*_{SHV-160}, *bla*_{TEM-160}, *bla*_{SHV-161}, *bla*_{TEM-161}, *bla*_{SHV-162}, *bla*_{TEM-162}, *bla*_{SHV-163}, *bla*_{TEM-163}, *bla*_{SHV-164}, *bla*_{TEM-164}, *bla*_{SHV-165}, *bla*_{TEM-165}, *bla*_{SHV-166}, *bla*_{TEM-166}, *bla*_{SHV-167}, *bla*_{TEM-167}, *bla*_{SHV-168}, *bla*_{TEM-168}, *bla*_{SHV-169}, *bla*_{TEM-169}, *bla*_{SHV-170}, *bla*_{TEM-170}, *bla*_{SHV-171}, *bla*_{TEM-171}, *bla*_{SHV-172}, *bla*_{TEM-172}, *bla*_{SHV-173}, *bla*_{TEM-173}, *bla*_{SHV-174}, *bla*_{TEM-174}, *bla*_{SHV-175}, *bla*_{TEM-175}, *bla*_{SHV-176}, *bla*_{TEM-176}, *bla*_{SHV-177}, *bla*_{TEM-177}, *bla*_{SHV-178}, *bla*_{TEM-178}, *bla*_{SHV-179}, *bla*_{TEM-179}, *bla*_{SHV-180}, *bla*_{TEM-180}, *bla*_{SHV-181}, *bla*_{TEM-181}, *bla*_{SHV-182}, *bla*_{TEM-182}, *bla*_{SHV-183}, *bla*_{TEM-183}, *bla*_{SHV-184}, *bla*_{TEM-184}, *bla*_{SHV-185}, *bla*_{TEM-185}, *bla*_{SHV-186}, *bla*_{TEM-186}, *bla*_{SHV-187}, *bla*_{TEM-187}, *bla*_{SHV-188}, *bla*_{TEM-188}, *bla*_{SHV-189}, *bla*_{TEM-189}, *bla*_{SHV-190}, *bla*_{TEM-190}, *bla*_{SHV-191}, *bla*_{TEM-191}, *bla*_{SHV-192}, *bla*_{TEM-192}, *bla*_{SHV-193}, *bla*_{TEM-193}, *bla*_{SHV-194}, *bla*_{TEM-194}, *bla*_{SHV-195}, *bla*_{TEM-195}, *bla*_{SHV-196}, *bla*_{TEM-196}, *bla*_{SHV-197}, *bla*_{TEM-197}, *bla*_{SHV-198}, *bla*_{TEM-198}, *bla*_{SHV-199}, *bla*_{TEM-199}, *bla*_{SHV-200}, *bla*_{TEM-200}, *bla*_{SHV-201}, *bla*_{TEM-201}, *bla*_{SHV-202}, *bla*_{TEM-202}, *bla*_{SHV-203}, *bla*_{TEM-203}, *bla*_{SHV-204}, *bla*_{TEM-204}, *bla*_{SHV-205}, *bla*_{TEM-205}, *bla*_{SHV-206}, *bla*_{TEM-206}, *bla*_{SHV-207}, *bla*_{TEM-207}, *bla*_{SHV-208}, *bla*_{TEM-208}, *bla*_{SHV-209}, *bla*_{TEM-209}, *bla*_{SHV-210}, *bla*_{TEM-210}, *bla*_{SHV-211}, *bla*_{TEM-211}, *bla*_{SHV-212}, *bla*_{TEM-212}, *bla*_{SHV-213}, *bla*_{TEM-213}, *bla*_{SHV-214}, *bla*_{TEM-214}, *bla*_{SHV-215}, *bla*_{TEM-215}, *bla*_{SHV-216}, *bla*_{TEM-216}, *bla*_{SHV-217}, *bla*_{TEM-217}, *bla*_{SHV-218}, *bla*_{TEM-218}, *bla*_{SHV-219}, *bla*_{TEM-219}, *bla*_{SHV-220}, *bla*_{TEM-220}, *bla*_{SHV-221}, *bla*_{TEM-221}, *bla*_{SHV-222}, *bla*_{TEM-222}, *bla*_{SHV-223}, *bla*_{TEM-223}, *bla*_{SHV-224}, *bla*_{TEM-224}, *bla*_{SHV-225}, *bla*_{TEM-225}, *bla*_{SHV-226}, *bla*_{TEM-226}, *bla*_{SHV-227}, *bla*_{TEM-227}, *bla*_{SHV-228}, *bla*_{TEM-228}, *bla*_{SHV-229}, *bla*_{TEM-229}, *bla*_{SHV-230}, *bla*_{TEM-230}, *bla*_{SHV-231}, *bla*_{TEM-231}, *bla*_{SHV-232}, *bla*_{TEM-232}, *bla*_{SHV-233}, *bla*_{TEM-233}, *bla*_{SHV-234}, *bla*_{TEM-234}, *bla*_{SHV-235}, *bla*_{TEM-235}, *bla*_{SHV-236}, *bla*_{TEM-236}, *bla*_{SHV-237}, *bla*_{TEM-237}, *bla*_{SHV-238}, *bla*_{TEM-238}, *bla*_{SHV-239}, *bla*_{TEM-239}, *bla*_{SHV-240}, *bla*_{TEM-240}, *bla*_{SHV-241}, *bla*_{TEM-241}, *bla*_{SHV-242}, *bla*_{TEM-242}, *bla*_{SHV-243}, *bla*_{TEM-243}, *bla*_{SHV-244}, *bla*_{TEM-244}, *bla*_{SHV-245}, *bla*_{TEM-245}, *bla*_{SHV-246}, *bla*_{TEM-246}, *bla*_{SHV-247}, *bla*_{TEM-247}, *bla*_{SHV-248}, *bla*_{TEM-248}, *bla*_{SHV-249}, *bla*_{TEM-249}, *bla*_{SHV-250}, *bla*_{TEM-250}, *bla*_{SHV-251}, *bla*_{TEM-251}, *bla*_{SHV-252}, *bla*_{TEM-252}, *bla*_{SHV-253}, *bla*_{TEM-253}, *bla*_{SHV-254}, *bla*_{TEM-254}, *bla*_{SHV-255}, *bla*_{TEM-255}, *bla*_{SHV-256}, *bla*_{TEM-256}, *bla*_{SHV-257}, *bla*_{TEM-257}, *bla*_{SHV-258}, *bla*_{TEM-258}, *bla*_{SHV-259}, *bla*_{TEM-259}, *bla*_{SHV-260}, *bla*_{TEM-260}, *bla*_{SHV-261}, *bla*_{TEM-261}, *bla*_{SHV-262}, *bla*_{TEM-262}, *bla*_{SHV-263}, *bla*_{TEM-263}, *bla*_{SHV-264}, *bla*_{TEM-264}, *bla*_{SHV-265}, *bla*_{TEM-265}, *bla*_{SHV-266}, *bla*_{TEM-266}, *bla*_{SHV-267}, *bla*_{TEM-267}, *bla*_{SHV-268}, *bla*_{TEM-268}, *bla*_{SHV-269}, *bla*_{TEM-269}, *bla*_{SHV-270}, *bla*_{TEM-270}, *bla*_{SHV-271}, *bla*_{TEM-271}, *bla*_{SHV-272}, *bla*_{TEM-272}, *bla*_{SHV-273}, *bla*_{TEM-273}, *bla*_{SHV-274}, *bla*_{TEM-274}, *bla*_{SHV-275}, *bla*_{TEM-275}, *bla*_{SHV-276}, *bla*_{TEM-276}, *bla*_{SHV-277}, *bla*_{TEM-277}, *bla*_{SHV-278}, *bla*_{TEM-278}, *bla*_{SHV-279}, *bla*_{TEM-279}, *bla*_{SHV-280}, *bla*_{TEM-280}, *bla*_{SHV-281}, *bla*_{TEM-281}, *bla*_{SHV-282}, *bla*_{TEM-282}, *bla*_{SHV-283}, *bla*_{TEM-283}, *bla*_{SHV-284}, *bla*_{TEM-284}, *bla*_{SHV-285}, *bla*_{TEM-285}, *bla*_{SHV-286}, *bla*_{TEM-286}, *bla*_{SHV-287}, *bla*_{TEM-287}, *bla*_{SHV-288}, *bla*_{TEM-288}, *bla*_{SHV-289}, *bla*_{TEM-289}, *bla*_{SHV-290}, *bla*_{TEM-290}, *bla*_{SHV-291}, *bla*_{TEM-291}, *bla*_{SHV-292}, *bla*_{TEM-292}, *bla*_{SHV-293}, *bla*_{TEM-293}, *bla*_{SHV-294}, *bla*_{TEM-294}, *bla*_{SHV-295}, *bla*_{TEM-295}, *bla*_{SHV-296}, *bla*_{TEM-296}, *bla*_{SHV-297}, *bla*_{TEM-297}, *bla*_{SHV-298}, *bla*_{TEM-298}, *bla*_{SHV-299}, *bla*_{TEM-299}, *bla*_{SHV-300}, *bla*_{TEM-300}, *bla*_{SHV-301}, *bla*_{TEM-301}, *bla*_{SHV-302}, *bla*_{TEM-302}, *bla*_{SHV-303}, *bla*_{TEM-303}, *bla*_{SHV-304}, *bla*_{TEM-304}, *bla*_{SHV-305}, *bla*_{TEM-305}, *bla*_{SHV-306}, *bla*_{TEM-306}, *bla*_{SHV-307}, *bla*_{TEM-307}, *bla*_{SHV-308}, *bla*_{TEM-308}, *bla*_{SHV-309}, *bla*_{TEM-309}, *bla*_{SHV-310}, *bla*_{TEM-310}, *bla*_{SHV-311}, *bla*_{TEM-311}, *bla*_{SHV-312}, *bla*_{TEM-312}, *bla*_{SHV-313}, *bla*_{TEM-313}, *bla*_{SHV-314}, *bla*_{TEM-314}, *bla*_{SHV-315}, *bla*_{TEM-315}, *bla*_{SHV-316}, *bla*_{TEM-316}, *bla*_{SHV-317}, *bla*_{TEM-317}, *bla*_{SHV-318}, *bla*_{TEM-318}, *bla*_{SHV-319}, *bla*_{TEM-319}, *bla*_{SHV-320}, *bla*_{TEM-320}, *bla*_{SHV-321}, *bla*_{TEM-321}, *bla*_{SHV-322}, *bla*_{TEM-322}, *bla*_{SHV-323}, *bla*_{TEM-323}, *bla*_{SHV-324}, *bla*_{TEM-324},

**ANEXO C - REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA CAAE Nº
99147818.6.0000.5208**



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização de genes de virulência e resistência em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene blaKPC-2 provenientes de hospital de Recife-PE

Pesquisador: ELIZABETH MARIA BISPO BELTRAO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 99147818.6.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.007.636

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - UFPE. O projeto foi elaborado pela aluna Elizabeth Maria Bispo Beltrão, sob orientação da Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes. Trata-se de um estudo descritivo e experimental, constituído de amostras clínicas de *P. mirabilis* portadoras e não portadoras do gene blaKPC, isolados de diferentes amostras clínicas provenientes de um hospital público do Recife-PE. Na primeira etapa será investigada a presença de genes de virulência e resistência de todos os espécimes bacterianos selecionados para o estudo, como também a relação clonal dos isolados bacterianos. Seguido de uma segunda etapa, onde serão analisadas as seqüências de DNA genômico completa de dois isolados de *P. mirabilis*, sem relação clonal, com um maior número de genes de resistência e virulência investigados. O trabalho será desenvolvido na Universidade Federal de Pernambuco, onde serão realizados os testes moleculares. O estudo terá o Hospital Agamenon Magalhães como instituição coparticipante, onde amostras serão coletadas e processadas. A amostra será constituída de 40 isolados clínicos de *P. mirabilis*, 20 isolados carreadores e 20 não carreadores do gene blaKPC, provenientes de diferentes sítios de infecção. Serão excluídos do trabalho isolados que na confirmação de identificação não forem da espécie *P. mirabilis*, mesmo sendo do gênero *Proteus*. Também serão excluídos do estudo isolados não clínicos. O projeto dispõe de infraestrutura adequada e todos os equipamentos e reagentes necessários para o desenvolvimento

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.007.636

dos experimentos no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular do Departamento de Medicina Tropical, CCS, Universidade Federal de Pernambuco. Os isolados bacterianos que serão obtidos nesse projeto serão acompanhados apenas das informações de sítio de infecção e resultado do antibiograma realizado no laboratório do hospital, a ser confirmado pelas pesquisadoras, não havendo acesso aos prontuários médicos, nem contato ou dados dos pacientes, impossibilitando a identificação dos respectivos pacientes. Os dados coletados nessa pesquisa (sítio de infecção e resultado do antibiograma realizado no laboratório de análises clínicas do hospital), ficarão armazenados em pastas de arquivos e em computador pessoal, sob a responsabilidade de Msc^a Elizabeth Maria Bispo Beltrão (Pesquisadora responsável) e Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes (Orientadora do projeto) no endereço, Avenida da Engenharia, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-420, segundo andar do Centro de Ciências da Saúde-UFPE, pelo período mínimo de 5 anos.

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

Caracterizar os genes de virulência e de resistência aos carbapenêmicos em isolados clínicos de *Proteus mirabilis* carreadores e não carreadores do gene blaKPC-2 provenientes de um hospital de Recife em 2018 e 2019.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a presença dos genes de virulência mrpG, pstS, nrpG, pbtA, ucaA, pmpA e pmfA em isolados portadores e não portadores do gene blaKPC;
- Verificar a presença dos genes de resistência aos beta-lactâmicos, blaKPC, blaVIM, blaIMP, blaGES, blaBKC e blaNDM nos isolados do estudo;
- Determinar a relação clonal dos isolados de *P. mirabilis*;
- Analisar o DNA plasmidial de isolados de *P. mirabilis*, portadores do gene blaKPC-2, e com o maior número de genes de virulência e resistência investigados, com o intuito de determinar o perfil e ambiente genético dos genes e resistência investigados no estudo e outros genes que possam surgir no resultado do sequenciamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCO

Divulgação do nome do hospital, porém em consonância aos requisitos da resolução 466/12 da

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.007.636

CNS e suas complementares, os pesquisadores envolvidos comprometem-se em utilizar os dados dos isolados bacterianos exclusivamente para fins de pesquisa, mantendo o sigilo das informações e a não divulgação do referido hospital.

BENEFÍCIOS

Considerando que não são realizadas a identificação e sequenciamento de genes de resistência bacteriana nos hospitais incluídos nesse estudo, como também não se determina a relação clonal das bactérias, é importante informar quais os genes de resistência de maior ocorrência em *Proteus mirabilis*, como também se ocorre a disseminação clonal dessa espécie no hospital. Portanto, no final da pesquisa, serão enviados relatórios com os resultados obtidos para a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) da instituição. Ressaltando que os dados desse projeto devem ser divulgados entre os profissionais de saúde da instituição.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa apresenta um excelente referencial teórico e um embasamento científico inquestionável. Apresenta metodologia simples, objetiva e bem delimitada, não apresentando qualquer incoerência do ponto de vista científico. No âmbito ético, a pesquisa também não suscita dúvidas, incluindo coerência argumentativa na solicitação de dispensa do TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos apresentados estão de acordo com as recomendações do CEP.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem recomendações.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.007.636

Informamos, ainda, que o(a) pesquisador(a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1213633.pdf	23/09/2018 10:02:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Doutorado_para_comite23_09_2018.docx	23/09/2018 10:01:46	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	DeclaraçãodevinculoELIZABETHcom_doutorado.pdf	23/09/2018 09:57:16	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	Curriculos_Lattes_Ana_Catarina.pdf	20/09/2018 20:16:28	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	CurriculoLattesElizabeth.pdf	20/09/2018 20:09:51	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_de_TCLE.pdf	20/09/2018 20:07:12	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	Termo_de_confidencialidade.pdf	20/09/2018 19:53:20	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	Carta_de_Anuencia_laboratorio.pdf	20/09/2018 19:51:57	ELIZABETH MARIA BISFO BELTRAO	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_hospital.pdf	20/09/2018	ELIZABETH MARIA	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cep_ocs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 3.007.636

Outros	Carta_de_anuencia_hospital.pdf	19:50:51	BISPO BELTRAO	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rostoPlataforma_Brasil_assinada.pdf	20/09/2018 18:51:45	ELIZABETH MARIA BISPO BELTRAO	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 08 de Novembro de 2018

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81) 2126-8588 **E-mail:** cepccs@ufpe.br