



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

WEVERTON DE OLIVEIRA ALVES

INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORAS DO GENE *bla*_{NDM}
PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO DE UM HOSPITAL PÚBLICO
DO RECIFE-PE

RECIFE

2021

WEVERTON DE OLIVEIRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORAS DO GENE *bla*_{NDM}
PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO DE UM HOSPITAL PÚBLICO
DO RECIFE-PE**

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Medicina
Tropical do Centro de Ciências Médicas da
Universidade Federal de Pernambuco, para
obtenção do título de mestre em Medicina
Tropical.

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

Co-orientadora: Dr^a. Alexsandra Maria Lima Scavuzzi

RECIFE

2021

Catálogo na fonte
Bibliotecário: Mônica Uchôa, CRB4:1010

- A474i Alves, Weverton de Oliveira.
Investigação de genes de virulência e relação clonal de isolados de *Klebsiella pneumoniae* portadoras do gene *bla_{NDM}* provenientes de colonização e infecção de um hospital público do Recife-PE / Weverton de Oliveira Alves. – 2021.
92 f.; tab.; 30 cm.
- Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2021.
Inclui referências e apêndices.
1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Genes de resistência. 3. Genes de virulência. 4. Incs plasmidiais. 5. Colonização. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (orientadora). II. Título.
- 616.988 CDD (20.ed.) UFPE (CCS2021-139)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS (CCM)

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

WEVERTON DE OLIVEIRA ALVES

**INVESTIGAÇÃO DE GENES DE VIRULÊNCIA E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADORAS DO GENE *bla_{NDM}*
PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO DE UM HOSPITAL PÚBLICO
DO RECIFE-PE.**

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

Aprovada em: 23/04/2021.

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª. Dr^ª Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Examinadora Interna)
Medicina Tropical/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Maria Betânia Melo de Oliveira
Departamento de Bioquímica/UFPE

Prof^ª. Dr^ª. Gláucia Manoella de Souza Lima
Departamento de Antibióticos/UFPE

Dedico,

*Primeiramente a Deus, por ser
minha base, força e proteção em
todos os momentos.*

*Aos meus pais, Emília Rosendo de
Oliveira e Claudeci Alves da Silva
por cada suor derramado em favor
a realização dos meus sonhos.*

AGRADECIMENTOS

A Santíssima Trindade (Pai, Filho e o Espírito Santo) e a Virgem Maria Santíssima, por sempre me conduzirem e me auxiliarem em todas as necessidades;

Aos meus pais Emília Rosendo e Claudeci Alves, por incondicional apoio, pelos sacrifícios que viveram e enfrentaram por mim;

Aos meus irmãos Carlos Alberto e Danilo Alves, por sempre vibrarem com as minhas conquistas e por quem tenho todo carinho e cuidado deste mundo;

A minha orientadora Dr^a Ana Catarina de Souza Lopes, por ter aberto as portas do seu grupo de pesquisa e me acolhido muito bem. Pelos conhecimentos repassados, pela confiança e dedicação no decorrer deste trabalho;

A minha Coorientadora Dr^a Alexsandra Maria Lima Scavuzzi, por ter acompanhado de perto toda a minha caminhada científica, por todo ensinamento de bancada e pela paciência e disponibilidade na execução deste projeto;

As amigas de laboratório Elizabeth Beltrão e Érica de Oliveira pelo compartilhamento de conhecimentos no nosso grupo de pesquisa, por toda a ajuda prestada e pelos momentos de descontração;

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

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

Aos amigos/irmãos da vida e “Próximo Rolê” (Otávio Fernandes, Angélia Marques, Anderson Cordeiro, Denise Nascimento, Iandra Kaline, Angélica Marques, Natália Machado e Júlio Pereira), por dividirem comigo o fardo pesado e suavizarem os meus dias com muitas partilhas e apoio;

Aos Biomigos (Érica Oliveira, Isabella Ralph, Rayssa Pastick e Rafael Vinícius) por toda cumplicidade e trocas positivas. Torço pelo crescimento pessoal e profissional de cada um de vocês;

A Gilberto Gomes Barbosa, fundador da Comunidade Obra de Maria e meu pai no carisma, por toda sua doação, comprometimento e generosidade (de forma particular e em atos concretos).

A todos os amigos da pós-graduação, de forma especial (Aline Mirely, Cristyell Aranda e Ádamo Brito), pela presença nos bons e maus momentos vividos;

Ao Professor Dr^o Antônio Mauro Rezende e Dr^a Crhisllane Rafaela dos Santos Vasconcelos do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pela colaboração, apoio e presteza no sequenciamento e análise do DNA plasmidial;

A técnica Dr^a Cássia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, pela sua contribuição no sequenciamento de DNA;

A Plataforma de Sequenciamento LABCEN/CCB na UFPE pelo uso das instalações para o sequenciamento dos produtos de PCR, em especial a Dr^a Heidi Lacerda;

A doutoranda Cynthia Soares pela quantificação dos produtos de PCR;

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

Aos componentes da banca avaliadora, por cada contribuição feita para o aperfeiçoamento deste projeto.

“A educação tem raízes amargas, mas os seus frutos são doces” (Aristóteles).

RESUMO

O controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) causadas por *Klebsiella pneumoniae* tem sido dificultado pelo surgimento de resistência antimicrobiana, principalmente aos carbapenêmicos, codificada por genes *blaKPC* e *blaNDM*. Sendo o seu principal mecanismo a produção de β -lactamases mediadas por plasmídeos conjugativos. Somado a isto, a expressão de determinantes de virulência nestas bactérias facilita o estabelecimento da infecção no paciente. Portanto, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil genético de virulência de isolados Multi-Droga Resistente (MDR) de *K. pneumoniae* portadores do gene *blaNDM*, provenientes de colonização e infecção, e analisar a disseminação clonal desses isolados provenientes de um hospital público do Recife-PE. Foram analisados 20 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a um ou mais carbapenêmicos, dentre os quais, 10 eram provenientes de infecção (sangue e urina) e 10 foram provenientes de colonização (swab retal). Os isolados foram submetidos à pesquisa de genes de resistência (*blaKPC* e *blaNDM*) e genes de virulência (*cps*, *magA*, *rpmA*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* e *irp2*) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), seguido da purificação e sequenciamento dos amplicons. Adicionalmente, foi realizada a ERIC-PCR para avaliar a relação clonal. Um dos isolados (K74-A3) foi selecionado para o sequenciamento do DNA plasmidial, por ser MDR proveniente de sepse. Os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade contra os isolados de *K. pneumoniae* foram amicacina e colistina e as análises de PCR mostraram que 90% (n=18) destes foram simultaneamente positivos para os genes *blaKPC* e *blaNDM*. O sequenciamento dos amplicons identificou as variantes *blaKPC*-2, *blaNDM*-1 e *blaNDM*-7, sendo o primeiro no Brasil para variante *blaNDM*-7. Já a análise do sequenciamento do DNA plasmidial revelou a presença dos genes *blaCTX-M15*, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*, *aac(6')ib-cr*, *mph(A)* e *catB3*, além dos plasmídeos IncX3, IncFIB, IncQ1, ColRNAI e ColpVC, demonstrando uma elevada variabilidade plasmidial desses isolados. Em relação aos genes de virulência foram identificados: *cps* (95%), *wabG* (100%), *fimH* (95%), *mrkD* (95%), *entB* (100%) e *irp2* (45%), evidenciando o vasto arsenal de virulência (cápsula, lipopolissacarídeo, fímbrias e sideróforos) desses isolados. Pela análise da ERIC-PCR, foram encontrados, entre os 20 isolados de *K. pneumoniae*, dez perfis genéticos distintos, e constatou-se que houve disseminação clonal dos isolados em diferentes setores do hospital de estudo. O acúmulo de determinantes de resistência e virulência detectados neste estudo apontam para evolução contínua da *K. pneumoniae*. Destacando que isolados de *K. pneumoniae* portadores de genes *blaNDM* e *blaKPC*-2, analisados nesse estudo, possuem um

importante arsenal genético de virulência, inclusive a presença de genes com comprovada capacidade de aumentar a patogenicidade dessas bactérias como o gene *wabG* e *irp2*, relacionados as infecções mais graves e invasivas. E a variabilidade de Incs plasmidiais detectados também nos alerta sobre a gravidade da disseminação clonal destes patógenos de alto risco, despertando o hospital de estudo para tomada de medidas de controles a fim de se evitar surtos.

Palavras-chaves: *Klebsiella pneumoniae*. Genes de resistência. Genes de virulência. Incs plasmidiais. Colonização. Infecção.

ABSTRACT

The control of Healthcare-Related Infections (HAIs) caused by *Klebsiella pneumoniae* has been hampered by the emergence of antimicrobial resistance, especially to carbapenems, encoded by the *blaKPC* and *blaNDM* genes. Its main mechanism is the production of β -lactamases mediated by conjugative plasmids. In addition, the expression of virulence determinants in these bacteria facilitates the establishment of infection in the patient. Therefore, the objective of this work was to analyze the virulence genetic profile of *K. pneumoniae* Multi-Drug Resistant (MDR) isolates carrying the *blaNDM* gene, from colonization and infection, and to analyze the clonal dissemination of these isolates from a public hospital in the Recife PE. Twenty *K. pneumoniae* isolates resistant to one or more carbapenems were analyzed, among which, 10 were from infection (blood and urine) and 10 were from colonization (rectal swab). The isolates were subjected to the search for resistance genes (*blaKPC* and *blaNDM*) and virulence genes (*cps*, *magA*, *rmpA*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* and *irp2*) by Polymerase Chain Reaction (PCR), followed by purification and sequencing of amplicons. Additionally, ERIC-PCR was performed to assess the clonal relationship. One of the isolates (K74-A3) was selected for plasmidial DNA sequencing, as it is MDR from sepsis. The antimicrobials that showed the best activity against *K. pneumoniae* isolates were amikacin and colistin and PCR analyzes showed that 90% (n = 18) of these were simultaneously positive for the *blaKPC* and *blaNDM* genes. The sequencing of the amplicons identified the *blaKPC*-2 and *blaNDM*-1 and *blaNDM*-7 variants, being the first in Brazil for the *blaNDM*-7 variant. Plasmid DNA sequencing analysis revealed the presence of *blaCTX-M15*, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*, *aac(6')ib-cr*, *mph(A)* and *catB3*, in addition to the plasmids IncX3, IncFIB, IncQ1, ColRNAI and ColpVC, demonstrating a high plasmid variability of these isolates. Regarding virulence genes, *cps* (95%), *wabG* (100%), *fimH* (95%), *mrkD* (95%), *entB* (100%) and *irp2* (45%) were identified, showing the vast arsenal of virulence (capsule, lipopolysaccharide, fimbriae and siderophores) of these isolates. By analyzing the ERIC-PCR, among the 20 isolates of *K. pneumoniae*, ten different genetic profiles were found, and it was found that there was clonal dissemination of the isolates in different sectors of the study hospital. The accumulation of resistance and virulence determinants detected in this study points to the continuous evolution of *K. pneumoniae*. Highlighting that isolates of *K. pneumoniae* carrying *blaKPC*-2 and *blaNDM* genes, analyzed in this study, have an important genetic arsenal of virulence, including the presence of genes with a proven ability to increase the pathogenicity of these bacteria such as the *wabG* and *irp2*

gene, related the most serious and invasive infections. And the variability of plasmid incs detected also alerts us to the severity of the clonal dissemination of these high-risk pathogens, prompting the study hospital to take control measures in order to prevent outbreaks.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Resistance genes. Virulence genes. Plasmid Incs. Colonization. Infection.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Isolados de <i>K. pneumoniae</i> inoculada em ágar MacConkey	22
Figura 2. Estrutura dos antimicrobianos β -lactâmicos.....	24
Figura 3. Imagem ilustrativa das principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antimicrobianos.....	25
Figura 4. Características epidemiológicas de <i>K. pneumoniae</i> produtora de KPC.....	28
Figura 5. Distribuição mundial de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> positivas para NDM.....	31
Figura 6. Distribuição de espécies bacterianas produtoras de NDM em diferentes estados do Brasil. NDM, Nova Delhi, metalo- β -lactamase	32
Figura 7. Distribuição mundial dos tipos de replicons de plasmídeos portadores de <i>bla</i> _{NDM} em <i>Enterobacteriaceae</i>	34
Figura 8. Papel da cápsula na virulência de <i>K. Pneumoniae</i>	35
Figura 9. Papel do lipopolissacarídeo na virulência de <i>K. Pneumoniae</i>	38
Figura 10. Funções das fímbrias do Tipo 1 e Tipo 3 durante a infecção por <i>K. Pneumoniae</i> ..	40
Figura 11. Sideróforos descritos em <i>K. Pneumoniae</i>	41
Figura 1. Dendrograma gerado a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR utilizando o software Darwin 6.0, ilustrando a relação entre os perfis dos 19 isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil. O isolado bacteriano K74-A3 (Alves et al., 2021) foi utilizado como cepa de referência para o gene <i>bla</i> _{NDM-7}	57
Figura 1. Representação esquemática do ambiente genético de <i>bla</i> _{NDM-7}	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação das beta-lactamases segundo Bush e Jacoby (2010), resumida e adaptada.....	26
Tabela 2. Identificação, data e tipo de amostra e setor dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil.....	45
Tabela 3. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	48
Tabela 4. Condições de ciclagem para PCR.....	49
Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes nos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	54
Tabela 2. Caracterização fenotípica, epidemiológica, genotípica e origem dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil	58
Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes de resistência, virulência e IncS no isolado de <i>K. pneumoniae</i>	68
Tabela 2. Caracterização fenotípica, genotípica e origem do isolado clínico K74-A3 proveniente de Recife-PE, Brasil.....	70

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

AMC	Amoxicilina-Ácido clavulânico
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
APS	Ampicilina-Sulbactam
ATM	Aztreonam
BHI	Brain Heart Infusion
<i>bla</i> _{KPC}	Gene que codifica a enzima KPC
<i>bla</i> _{NDM-1}	Gene que condifica a enzima NDM-1
CAZ	Ceftazidima
CETENE	Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CFZ	Cefazolina
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacima
CKp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> clássica
CLI	Clindamicina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CM	Clínica Médica
COL	Colistina
COM	Cefepime
CPS	Cápsula Polissacarídica
CRE	Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos
CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
EG	Emergência Geral
EMB	Eosina Azul de Metileno
ERI	Eritromicina
ERIC-PCR	PCR de sequências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias

ERT	Ertapenem
GEN	Gentamicina
H ₂ S	Gás Sulfídrico
hvkp	<i>Klebsiella pneumoniae</i> hipervirulenta
IMI	Imipenem
Inc	Grupos de Incompatibilidade
IPCS	Infecção Primária de Corrente Sanguínea
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecção no Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LNZ	Linezolida
LPS	Lipopolissacarídeo
LVX	Levofloxacina
<i>magA</i>	Gene associado a mucoviscosidade A
MALDI-TOF	Espectrometria de massa com tempo de ionização por dessorção a laser assistida por matriz
MDR	Multidroga Resistente
MER	Meropenem
MUP	Mupirocina
NDM	Nova-Delhi Metallo- β -lactamase
NIT	Nitrofurantoina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilina
PAVM	Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica
PBP	Proteínas de Ligação à Penicilina
PH	Pneumonia Humana
PIT	Pieracilina-Tazobactam
<i>rmpA</i>	Gene regulador do fenótipo mucóide A
<i>rmpA2</i>	Gene regulador do fenótipo mucóide A2
SUT	Trimetropim-Sulfametaxazol
TGI	Trato Gastrointestinal
UCO	Unidade Coronariana
UCO-NEO	Unidade Coronariana Neonatal

UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAN	Vancomicina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DA <i>Klebsiella pneumoniae</i>	21
2.2	ANTIMICROBIANOS B-LACTÂMICOS	23
2.3	RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS B-LACTÂMICOS E B-LACTAMASES	24
2.3.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)	27
2.3.2	Nova-Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM)	30
2.4	FATORES DE VIRULÊNCIA DE <i>K. pneumoniae</i>	34
2.4.1	Cápsula polissacarídica	35
2.4.2	Lipopolissacarídeo	37
2.4.3	Fímbrias do tipo 1 e tipo 3	39
2.4.4	Sideróforos	40
2.5	TIPAGEM MOLECULAR DE BACTÉRIAS	43
3	DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS	44
3.1	OBJETIVO GERAL	44
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	44
4	MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	45
4.2	SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA	46
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	46
4.4	CONDIÇÕES DE PCR PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA	46
4.5	CONDIÇÕES DE PCR PARA OS GENES DE VIRULÊNCIA	46
4.6	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	47
4.7	SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS	47
4.8	TESTE DA CORDA PARA HIPERMUCOVISCOSIDADE	47

4.9	TIPAGEM MOLECULAR POR ERIC-PCR	47
4.10	EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL	49
4.11	SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL	49
4.12	ANÁLISE DO DNA PLASMIDIAL	50
5	RESULTADOS	51
5.1	ARTIGO 1 : DIVERSIDADE DE GENES DE VIRULÊNCIA E DISSEMINAÇÃO CLONAL EM ISOLADOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> COPRODUZINDO <i>bla</i> _{NDM-7} OU <i>bla</i> _{NDM-1} E <i>bla</i> _{KPC-2} PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO NO BRASIL.....	51
5.2	ARTIGO 2 (SHORT COMMUNICATION): EMERGÊNCIA DO <i>bla</i> _{NDM-7} E ASSOCIAÇÃO COM <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>aac</i> , <i>aph</i> , <i>mph(A)</i> , <i>catB3</i> E GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADO CLÍNICO DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PORTADOR DE DIFERENTES PLASMÍDEOS NO BRASIL.	66
6	CONCLUSÕES	75
6.1	DIVULGAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS	75
	REFERÊNCIAS	76
	APÊNDICE A	91
	SUBMISSÃO DO SHORT COMMUNICATION À BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY - EMERGENCE OF <i>bla</i> _{NDM-7} AND ASSOCIATION WITH <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>aac</i> , <i>aph</i> , <i>mph(A)</i> , <i>catB3</i> AND VIRULENCE GENES IN A CLINICAL ISOLATE OF <i>Klebsiella pneumoniae</i> WITHDIFFERENT PLASMIDS IN BRAZIL-.	91

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria gram-negativa amplamente distribuída no ambiente e na microbiota intestinal humana e de outros animais, e tem sido considerado um patógeno oportunista associado a Infecções Relacionadas à Assistência a Saúde (IRAS), incluindo infecções do trato urinário, de feridas, pneumonia e sepse, mas também pode estar relacionada a infecções adquiridas na comunidade, como nos abscessos hepáticos, por exemplo (HOLT et al 2015; HENRIKSEN et al., 2018; KUNTAMAN et al., 2018). O controle dessas infecções tem sido dificultado pelo surgimento de resistência antimicrobiana, principalmente aos carbapenêmicos. O principal mecanismo de resistência em *K. pneumoniae* é a produção de enzimas β -lactamases, como as carbapenemases (codificada por genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*), com potencial para hidrolisar praticamente todos os β -lactâmicos e tem aparecido como resultado ao uso inadequado ou abusivo desses antimicrobianos (JEONG et al., 2015; GNIADEK et al., 2016; SCAVUZZI et al., 2017).

A resistência aos carbapenêmicos é um problema de saúde pública em todo o mundo, inclusive no Brasil. De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17, publicado em abril de 2019, *K. pneumoniae* é o agente etiológico mais frequente (19%) nas notificações de Infecção Primária de Corrente Sanguínea (IPCS), como também o bacilo Gram-negativo fermentador com maior percentual de resistência em pacientes hospitalizados em UTI adulto no Brasil (ANVISA, 2019).

Embora a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) seja o principal determinante de resistência aos carbapenêmicos associado a amostras de *K. pneumoniae* (TAVARES et al., 2015), a Nova Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) tem emergido e se disseminado em todo o mundo, inclusive em Recife-PE (PHAN et al., 2017; TADA et al., 2017; ZOU et al., 2017; SCAVUZZI et al., 2019; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2019; SUAY-GARCÍA et al., 2019; FIRMO et al., 2020; REYES et al., 2020).

Inicialmente, o gene *bla_{NDM}* foi encontrado em cromossomos bacterianos, mas a grande maioria de seu transporte ocorre através de plasmídeos conjugativos, que desempenham um papel central na aquisição e disseminação de genes (resistência e virulência) entre bactérias de diferentes classes (RAMIREZ et al., 2015). Há relatos de *bla_{NDM}* sendo carregados por plasmídeos com uma variedade de tipos de replicons. O IncX3 parece ser o tipo mais comum de plasmídeo portador de *bla_{NDM}* (WU et al., 2019).

Além da situação crítica devido à evolução de genes de resistência e sua disseminação por meio de plasmídeos conjugativos, estudos têm demonstrado a co-expressão de

determinantes de virulência e resistência em isolados de *K. pneumoniae*, tornando a bactéria ainda mais patogênciã e facilitando o estabelecimento e permanência da infecção no paciente hospitalizado (PATEL et al., 2014; HENNEQUIN; ROBIN, 2016; LIU et al., 2019). Os fatores de virulência (cápsula, fímbrias, sideróforos e outros) em *K. pneumoniae* são codificados por genes e podem determinar a gravidade de uma infecção e portanto a virulência de uma cepa infectante, como também, a capacidade de uma cepa colonizadora intestinal, como *K. pneumoniae*, progredir para a infecção, definindo o potencial patogênico de uma determinada cepa (MARTIN; BACHMAN, 2018).

No Brasil, um estudo realizado por Nava et al (2019) num hospital em Londrina-PR, relatou a presença dos genes de virulência para sideróforos (*kfu*, *ybtS* e *entB*) e adesinas fimbriais (*mrkD* e *fimH*) em isolados de *K. pneumoniae* coproduzindo *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} proveniente de sangue, urina e tecido. No estado do Rio de Janeiro, foram observados pacientes colonizados e infectados por isolados de *K. pneumoniae* coproduzindo o *bla*_{NDM}, outros genes para β -lactamases e determinantes genéticos de resistência a quinolonas e aminoglicosídeos, apresentando genes de virulência para sideróforos e adesinas fimbriais (AIRES et al., 2017). No entanto, esses estudos não pesquisaram genes para cápsula (*cps*) e lipopolissacarídeo (*wabG*) que também contribuem para o potencial patogênico dos isolados.

Em Recife-PE, relatamos em 2019 a presença de genes de virulência encontrados em um isolado de *K. pneumoniae* NDM positivo envolvido em sepse (Scavuzzi et al., 2019). Porém, considerando a limitação do citado relato de caso, onde foi analisado apenas um isolado e poucos genes de virulência, se fez necessário um estudo mais amplo, analisando também outros genes e a relação clonal em um maior número de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecção e colonização de um hospital de Recife-PE.

Devido a emergência no Brasil de *K. pneumoniae* produtoras de NDM em IRAS e levando em consideração a gravidade das infecções causadas por essa espécie bacteriana, este estudo tem por objetivo analisar o perfil genético de virulência que codifica cápsula (*cps*, *magA*, *rmpA*), lipopolissacarídeo (*wabG*), fímbrias (*fimH*, *mrkD*) e sideróforos (*entB* e *irp2*) de isolados multi-droga resistentes de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla*_{NDM}, provenientes de colonização e infecção, e analisar a disseminação clonal desses isolados provenientes de um hospital público do Recife-PE.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DA *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* é composto por oito espécies: *Klebsiella granulomatis*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella mobilis*, *Klebsiella variicola* e *Klebsiella pneumoniae*. Esta última, por sua vez, contém três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*; *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* (PODSCHUN et al., 1998; BRISSE et al., 2006).

Klebsiella pneumoniae é a espécie de maior importância clínica do gênero *Klebsiella*, pois é responsável por causar uma grande diversidade de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), como também na comunidade. Pertencente à família *Enterobacteriaceae*, ordem *Enterobacteriales*, classe *Gammaproteobacteria* e ao filo *Proteobacteria* (DWORKIN et al., 2006).

O primeiro isolado de *K. pneumoniae* foi descrito por Carl Friedländer em 1882, proveniente dos pulmões de pacientes que morreram de pneumonia (FRIEDLÄNDER, 1882). São bacilos Gram-negativos, que podem ser encontrados em corpos hídricos, esgoto, solo, vegetação e também colonizando mucosas como o Trato Gastrointestinal (TGI), respiratório e geniturinário de diversos mamíferos, incluindo o homem (TORTORA et al., 2012).

Klebsiella pneumoniae tem como principais características ser imóvel, não esporulada, anaeróbia facultativa, com tamanho aproximado de 0,3 por 1,5 µm a 0,4 por 2,0 µm. Utiliza o citrato como única fonte de carbono e possui a enzima lisina descarboxilase, além de fermentar glicose, lactose e sacarose. Não produz gás sulfídrico (H₂S) nem enzima citocromo oxidase e são negativas na prova do indol, ornitina e arginina. Em meios de cultura como ágar MacConkey (Figura 1) e Eosina Azul de Metileno (EMB), produzem colônias grandes, rosadas, brilhantes, com consistência mucóide em decorrência da produção de cápsula polissacarídica que confere virulência a esses microrganismos *in vivo* (TRABULSI et al., 2008).

A *K. pneumoniae* clássica (cKp) é considerada um patógeno oportunista, que pode causar infecções quando existe algum nível de comprometimento do sistema imunológico ou mesmo um desequilíbrio na composição da microbiota intestinal do indivíduo, e estão envolvidas em infecções do trato urinário, trato respiratório baixo, pele e tecidos moles, feridas, sistema nervoso central e septicemia (LEE et al., 2010; PEREZ-LOPES et al., 2016). No entanto, há estudos que apontam a colonização intestinal por *K. pneumoniae* como

primeiro passo para a maioria das infecções causadas por este patógeno (STRUVE et al., 2008; BORER et al., 2012). Em um hospital chinês, foi relatada a presença de Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos (CRE) provenientes de amostras de fezes albergando os genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{IMP-4}, e *bla*_{KPC-2} coproduzindo *bla*_{NDM-1} (ZHAO et al., 2014). Isto demonstra a importância de culturas de vigilância, pois os portadores colonizados podem servir como um importante reservatório para a disseminação de bactérias resistentes dentro do hospital.

Figura 1. Isolados de *K. pneumoniae* inoculada em ágar MacConkey.



Fonte: (<http://www.medical-labs.net/gram-negative-bacilli-of-klebsiella-pneumoniae-621/>); acesso 08.09.2019

Nos Estados Unidos, espécies de *Klebsiella* foram identificadas como a terceira principal causa de IRAS, atrás de *Clostridium difficile* e *Staphylococcus aureus*, onde foram identificadas como a principal causa de Pneumonia Hospitalar (PH) que ocorre 48h após a admissão. As espécies de *Klebsiella* também são uma das principais causas de Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAVM) entre pacientes em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (MARTIN et al., 2018). De acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17, publicado em abril de 2019, a *K. pneumoniae* é o agente etiológico mais frequente (19%) nas notificações de Infecção Primária de Corrente Sanguínea (IPCS), como também o bacilo Gram-negativo fermentador com maior percentual de resistência em pacientes hospitalizados em UTI adulto no Brasil (ANVISA, 2019).

O genoma de *K. pneumoniae* é composto por cerca de 5.000-6.000 genes, destes, aproximadamente 2000 genes constituem o genoma essencial, conjunto de genes conservados entre os membros de uma espécie bacteriana, e a maior parte do genoma é formado por genes que variam entre os isolados, conhecido por genoma acessório (HOLT et al., 2015). Os genes

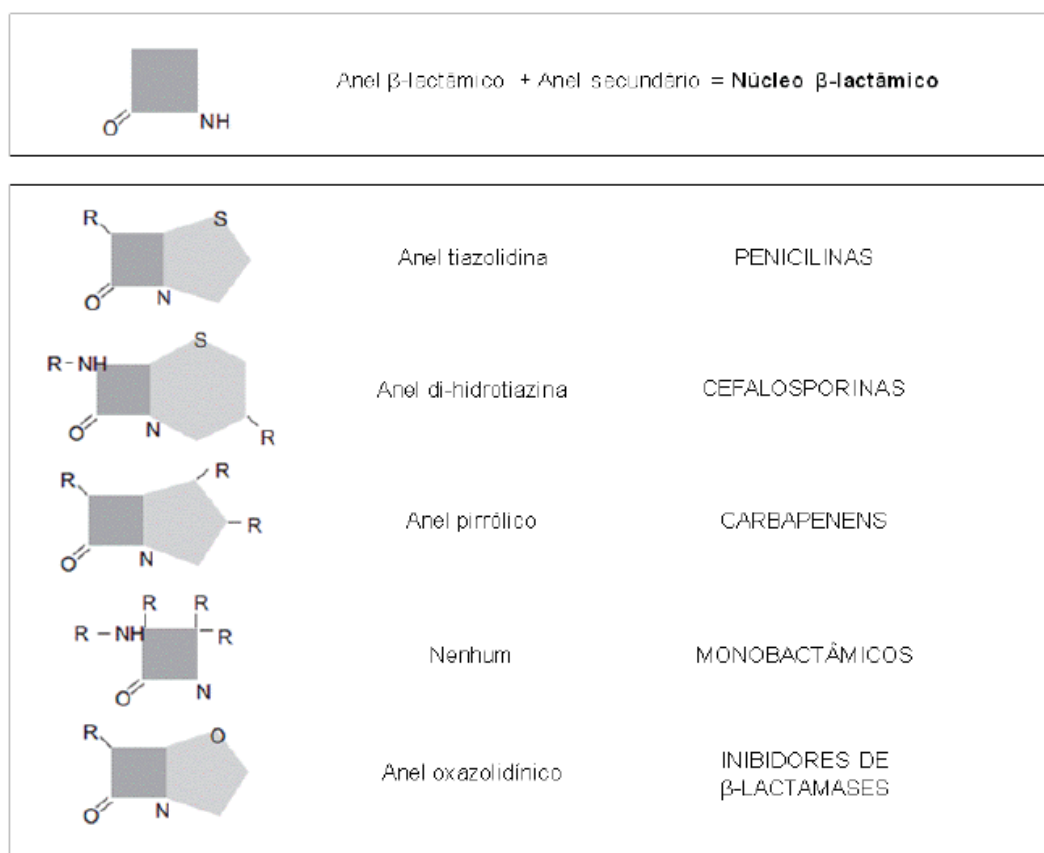
do genoma acessório codificam fatores de virulência específicos, como também várias enzimas de resistência aos antimicrobianos, e podem ser adquiridos por transferência horizontal entre espécies bacterianas através de elementos genéticos móveis (BI et al., 2015). Diante do exposto, *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos têm se espalhado pelo mundo, representando uma ameaça à saúde (RAVICHITRA et al., 2014; JEON et al., 2015).

2.2 ANTIMICROBIANOS B-LACTÂMICOS

Os antimicrobianos β -lactâmicos se caracterizam por conter o anel beta-lactâmico em sua estrutura, é uma classe muito utilizada no tratamento de infecções causadas por bactérias gram negativas, como a *K. pneumoniae*, devido sua eficácia terapêutica, baixa toxicidade, baixo custo e grande variedade de compostos disponíveis (AZEVEDO et al., 2014; GAGETTI et al., 2019).

O anel β -lactâmico determina o mecanismo de ação dessa classe de antibióticos, este é responsável pela inibição da síntese de peptídeoglicano da parede celular bacteriana. Após sua ligação às proteínas de ligação de penicilina (PBPs), os antibióticos β -lactâmicos inibem esta enzima de transpeptidação que forma ligações cruzadas das cadeias peptídicas ligadas ao arcabouço do peptídeoglicano, o que confere à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. O resultado bactericida final consiste na inativação de um inibidor de enzimas autolíticas na parede celular que induz a lise da bactéria (PAPP-WALLACE et al., 2011; ALMEIDA et al., 2013; BRUNTON & KNOLLMANN 2018).

O esqueleto básico dos antimicrobianos β -lactâmicos, chamado de núcleo, é formado pelo anel β -lactâmico, composto por três átomos de carbono e um de nitrogênio, ligado a um radical presente na estrutura química, geralmente outro anel. A associação a diferentes tipos de cadeias lineares (radicais), juntamente com as próprias características do esqueleto básico dos β -lactâmicos classifica-os em penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos, carbapenêmicos e inibidores de β -lactamases (Figura 2). Algumas modificações na molécula dos compostos originais resultam em um maior espectro de ação antimicrobiano, mas o aparecimento gradual de resistência tem limitado a utilização empírica e eficaz desses compostos em determinadas situações (SUAREZ & GUDIOL, 2009).

Figura 2. Estrutura dos antimicrobianos β -lactâmicos.

Fonte: Adaptado de Suárez & Gudíol, 2009.

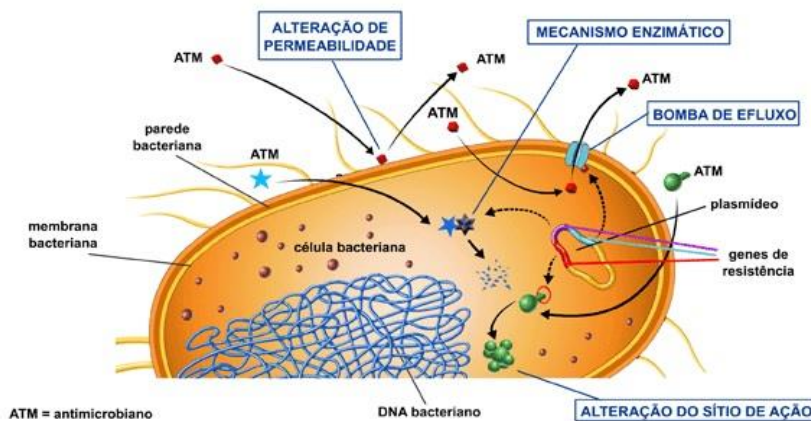
2.3 RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS B-LACTÂMICOS E B-LACTAMASES

O controle de infecções por *K. pneumoniae* tem sido complicado pelo surgimento de resistência antimicrobiana, principalmente aos carbapenêmicos. Esta resistência bacteriana tem aparecido e se disseminado rapidamente entre as bactérias como resultado ao uso inadequado ou abusivo dos antimicrobianos (PITOUT et al., 2015).

Existem quatro mecanismos pelo qual os microrganismos podem evitar a ação bactericida dos β -lactâmicos: (I) Alteração de permeabilidade, perda ou diminuição da expressão de proteínas de membrana externa (porinas), que são portas de entrada para os antimicrobianos na célula bacteriana; (II) Alteração do sítio alvo, mutação nas PBPs podem ser detectadas, que diminui a afinidade dessas proteínas pelos antimicrobianos β -lactâmicos; (III) Hiperexpressão de bombas de efluxo, esse mecanismo retira o antimicrobiano do meio intracelular, impedindo a ação do fármaco em seu local de ação e, (IV) Mecanismos enzimáticos, principal mecanismo de resistência bacteriana, pois envolvem enzimas que

modificam a estrutura química dos antimicrobianos, inativando-os (Figura 3) (FERNANDES et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014).

Figura 3. Imagem ilustrativa das principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antimicrobianos.



Fonte:(http://www.anvisa.gov.br/servicosade/controlere/rede_rm/cursos/atm_racional/modulo1/res_principais2.htm); acesso 12/03/2020.

As β - lactamases são enzimas que degradam os antimicrobianos β - lactâmicos através da catálise hidrolítica do anel β - lactâmico, desta forma, inativa a propriedade bactericida desses fármacos. Como resultado da falha no mecanismo de ação desses antibióticos, a biossíntese normal da parede celular dessas bactérias não é afetada, o que leva ao insucesso terapêutico. Essas enzimas são codificadas por genes localizados em cromossomos ou em plasmídeos. Através de transposons, a mobilidade gênica pode ainda ser aumentada, pois devido a seu caráter dinâmico estes “genes saltadores” podem ser transferidos de cromossomos e inseridos em plasmídeos, e a partir destes, serem disseminados em uma população bacteriana (BUSH; JACOBY, 2010).

À medida que uma nova classe de antimicrobiano é utilizada, surgem novas β - lactamases, isto demonstra a pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de subpopulações de microrganismos resistentes ou com sensibilidade diminuída a esses antimicrobianos. Até o ano de 2013, mais de 1.300 β - lactamases foram identificadas em diferentes isolados clínicos, mutações em seus genes codificadores são os principais responsáveis por esse elevado número de enzimas descritas (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; BUSH, 2013).

Ao longo da história, as β -lactamases têm sido classificadas de acordo com as propostas de Ambler e de Bush, Jacoby e Medeiros. De acordo com Ambler, as β -lactamases são divididas com base em sua estrutura molecular e homologia na sequência de aminoácidos, nas seguintes classes moleculares (A, B, C e D). As classes A, C e D são compostas por serina- β -lactamases, estas enzimas possuem o aminoácido serina no centro ativo da enzima. Enquanto às de classe B são metalo- β -lactamases (MBL), as quais são dependentes de metal (comumente o zinco) como cofator para atividade enzimática (AMBLER, 1980). Conforme Bush, Jacob e Medeiros as β -lactamases são divididas segundo o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de β -lactamases nos seguintes grupos (Grupos de 1 a 4, com subdivisões) (Tabela 1) (BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995; BUSH; JACOB, 2010).

Tabela 1 – Classificação das beta-lactamases segundo Bush e Jacoby (2010), resumida e adaptada.

Grupo Bush e Jacoby	Classe Molecular ¹	Enzimas representativas	Grupo de enzimas ² (espectro/potencial de hidrólise#)	Substratos ³	Inibição por: ⁴				
					CLOXA	CLA	NaCl*	AFB	EDTA
1	C	CMY-2	AmpC	Cfs 1 ^a - 2 ^a ger., cefamicinas	Sim	Não	Não	Variável	Não
1e	C	CMY-37	AmpC	Cfs 1 ^a -3 ^a ger., cefamicinas e monobactâmico	Sim	Não	Não	Variável	Não
2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M-2, 14, 15	ESBL	Cfs 1 ^a -4 ^a ger., e monobactâmico	Não	Sim	Não	Não	Não
2bre	A	TEM-50	IRT-ESBL	Cfs 1 ^a -4 ^a ger., e monobactâmico	Não	Não	Não	Não	Não
2de	D	OXA-11, 15;	ESBL	Cfs 1 ^a -4 ^a ger.	Não	Variável	Variável	Não	Não
2df	D	OXA-23, 48	Carbapenemase	Carbapenêmicos	Não	Variável	Variável	Não	Não
2f	A	KPC-2, 3	Carbapenemase	Cfs 1 ^a -4 ^a ger., cefamicinas, monobactâmico e carbapenêmicos	Não	Variável	Não	Sim (KPC)	Não
3a	B (MBL)	SPM-1, IMP-1, VIM-1, NDM-1	Carbapenemase	Cfs 1 ^a -4 ^a ger., cefamicinas e carbapenêmicos	Não	Não	Não	Não	Sim

1 MBL, Metallo-Beta-Lactamases;

2 ESBL (do inglês, Extended Spectrum Beta-Lactamase): Beta-lactamase de espectro estendido; IRT (do inglês Inhibitor-Resistant TEM): TEM resistente a inibidor;

3 Cfs: Cefalosporinas de 1^a, 2^a, 3^a e 4^a gerações;

4 CLOXA: cloxacilina; CLA: clavulanato (ácido clavulânico); NaCl: cloreto de sódio (*possui potencial de inibição de OXA, no entanto, sua especificidade e sensibilidade não foram otimizadas e, geralmente, não é utilizado in vitro); AFB: ácido fenil borônico; EDTA (do inglês, ethylenediamine tetraacetic acid): ácido etilenodiamino tetra-acético.

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem, biapenem e doripenem) são antimicrobianos de escolha no tratamento de infecções graves por enterobactérias multirresistentes, como a *K. pneumoniae* (NORDMANN et al., 2011). No entanto, assim como ocorreu com as cefalosporinas de amplo espectro, o abuso no uso dos carbapenêmicos levou a seleção e disseminação de bactérias resistentes a estes antibióticos, ocasionando um dos maiores problemas de saúde pública (PAPP-WALLACE et al., 2011).

Entre outros mecanismos, a resistência aos carbapenêmicos é devido à produção de β -lactamases conhecidas por carbapenemases, grupo de enzimas com amplo espectro de atividade, com potencial para hidrolisar praticamente todos os β -lactâmicos, além de apresentar maior resistência aos inibidores de β -lactamases disponíveis comercialmente (JEONG et al., 2015; GNIADEK et al., 2016).

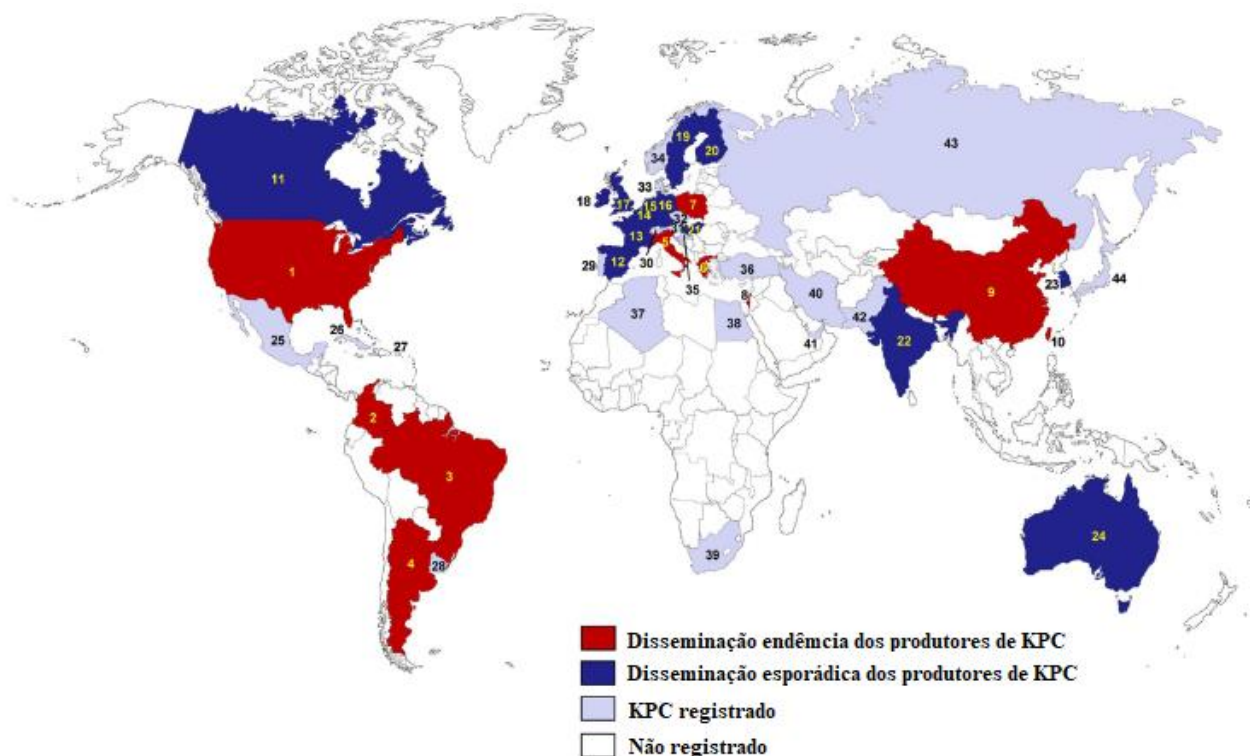
2.3.1 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

As enzimas da família KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) pertencem à classe molecular A de Ambler e ao grupo funcional 2f de bush, Jacoby e Medeiros (BUSH, JACOBY, 2010). Tem potencial para hidrolisar todos os beta-lactâmicos, pouco inibida pelos inibidores clássicos é a serina-carbapenemase mais detectada no mundo, sendo grande problema em infecções hospitalares (ANDRADE; DARINI, 2017).

A enzima KPC foi descrita pela primeira vez na Carolina do Norte em 1996, Estados Unidos, em um isolado de *K. pneumoniae*. A amostra foi resistente a todos β -lactâmicos testados, mas teve a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) diminuída na presença do ácido clavulânico (YIGIT et al., 2001). Das diversas variantes da família KPC (KPC-1 a KPC-24), as mais bem caracterizadas são a KPC-2 e KPC-3. Através da análise na sequência de aminoácidos da enzima KPC-1, observou-se que esta possui 100% de similaridade com a enzima KPC-2, desta forma, o termo KPC-1 já não é mais utilizado. As KPCs são enzimas codificadas por plasmídeo, e as bactérias que as produzem são susceptíveis a poucos antibióticos, como colistina, tigeciclina e aminoglicosídeos. Assim sendo, há alta mortalidade nas infecções de corrente sanguínea em pacientes com essas bactérias (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A epidemiologia das *K. pneumoniae* produtoras de KPC varia geograficamente. Países como EUA, China, Polônia, Grécia, Israel, Brasil, Argentina, Colômbia e Taiwan são localidades onde a produção de *bla*_{KPC} (gene que codifica a enzima KPC) é endêmica (Figura 4) (LEE et al., 2016).

Figura 4. Características epidemiológicas de *K. pneumoniae* produtora de KPC. (1) EUA; (2) Colômbia; (3) Brasil; (4) Argentina; (5) Itália; (6) Grécia; (7) Polônia; (8) Israel; (9) China; (10) Taiwan; (11) Canadá; (12) Espanha; (13) França; (14) Bélgica; (15) Países Baixos; (16) Alemanha; (17) Reino Unido; (18) Irlanda; (19) Suécia; (20) Finlândia; (21) Hungria; (22) Índia; (23) Coreia do Sul; (24) Austrália; (25) México; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguai; (29) Portugal; (30) Suíça; (31) Áustria; (32) República Tcheca; (33) Dinamarca; (34) Noruega; (35) Croácia; (36) Turquia; (37) Argélia; (38) Egito; (39) África do Sul; (40) Irã; (41) Emirados Árabes Unidos; (42) Paquistão; (43) Rússia; (44) Japão.



Fonte: Adaptado de Lee et al (2016)

Na América Latina, a disseminação endêmica de KPCs foi relatada na Colômbia, Argentina e Brasil. Nesta região o primeiro relato de *bla*_{KPC-2} ocorreu na Colômbia em 2005, em duas amostras de *K. pneumoniae*. No entanto, em 2008 houve um surto em um hospital terciário na cidade de Medellin, ocasionado por *K. pneumoniae* produtora de KPC-3 proveniente de um paciente israelita admitido em janeiro para um transplante de fígado. Embora as medidas de controle de infecção terem sido adotadas, em dezembro do mesmo ano, 84 pacientes foram identificados com *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, sendo n=32 infectados e n=52 colonizados (NAVON-VENEZIA et al., 2009; LOPEZ et al., 2011; MUNOZ-PRICE et al., 2013). Na Argentina, o primeiro relato de KPC-2 ocorreu em Buenos Aires em 2006, em isolados de *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii* provenientes da secreção de ferida operatória de uma paciente. A partir do ano de 2009, houve no país uma

abrupta disseminação clonal de *K. pneumoniae* ST258 albergando *bla*_{KPC-2} no transposon Tn4401a (PASTERAN et al., 2008; GOMEZ et al., 2011).

O primeiro relato de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 no Brasil foi em 2006 no Recife, oriundas de quatro pacientes internados em uma unidade de cuidados intensivos (MONTEIRO et al., 2009). Entretanto, estudos subsequentes mostraram que a emergência do gene *bla*_{KPC-2} em hospitais brasileiros ocorreu desde 2005 (PAVEZ et al., 2009; ZAVASCKI et al., 2010). Desde 2010, uma grande disseminação deste gene é observada no Brasil, e isolados produtores de KPC-2 foram detectados nas cinco regiões brasileiras, nas mais diversas espécies bacterianas além da *K. pneumoniae*, como *Citrobacter freundii*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Proteus mirabilis* e *Serratia spp.* e também em bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (JÁCOME et al., 2012; CABRAL et al., 2015; CARRARA-MARRONI et al., 2015; FIGUEIRAL et al., 2015; MARGATE et al., 2015; DI PILATO et al., 2016; GIRLICH et al., 2017; LIANG et al., 2017; RECHENCHOSKI et al., 2017; ZHENG et al., 2017; SCAVUZZI et al., 2019; FIRMO et al., 2020).

Os genes *bla*_{KPC} em *K. pneumoniae* estão frequentemente localizados no transposon Tn4401 (~10kb) presente em plasmídeos de diferentes tamanhos, isto sugere que este gene pode se disseminar através da inserção deste transposon nos diferentes plasmídeos (RODRIGUES et al., 2017; EILERTSON et al., 2019). O gene *bla*_{KPC} também foi identificado em outros elementos móveis não Tn4401 (*NTE*_{KPC}) (CHEN et al., 2014). Um estudo de Cerqueira et al. (2017), no Brasil, detectaram o *NTE*_{KPC} no IncX3 em *K. pneumoniae* produtora de KPC-2. Mais recente, Lima et al. (2020) e Cerdeira et al. (2019) localizaram o gene *bla*_{KPC-2} inserido no *NTE*_{KPC}-IId presente em um plasmídeo IncQ1 em infecções por *K. pneumoniae* no Brasil.

Nosso grupo de pesquisa tem demonstrado que as espécies de enterobactérias que tem se destacado nos últimos anos como produtores de KPC em IRAS no Recife-PE são *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *Enterobacter spp.* e *P. mirabilis* (CABRAL et al., 2012; MELO et al., 2014; MARGATE et al., 2015; CABRAL et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2016; SCAVUZZI et al., 2017; CABRAL et al., 2017; FIRMO et al., 2020). Esses dados ressaltam a necessidade de estudos adicionais sobre a identificação de outros mecanismos genéticos de resistência em *K. pneumoniae*, como também a compreensão do surgimento, propagação e a sua dispersão nessas bactérias.

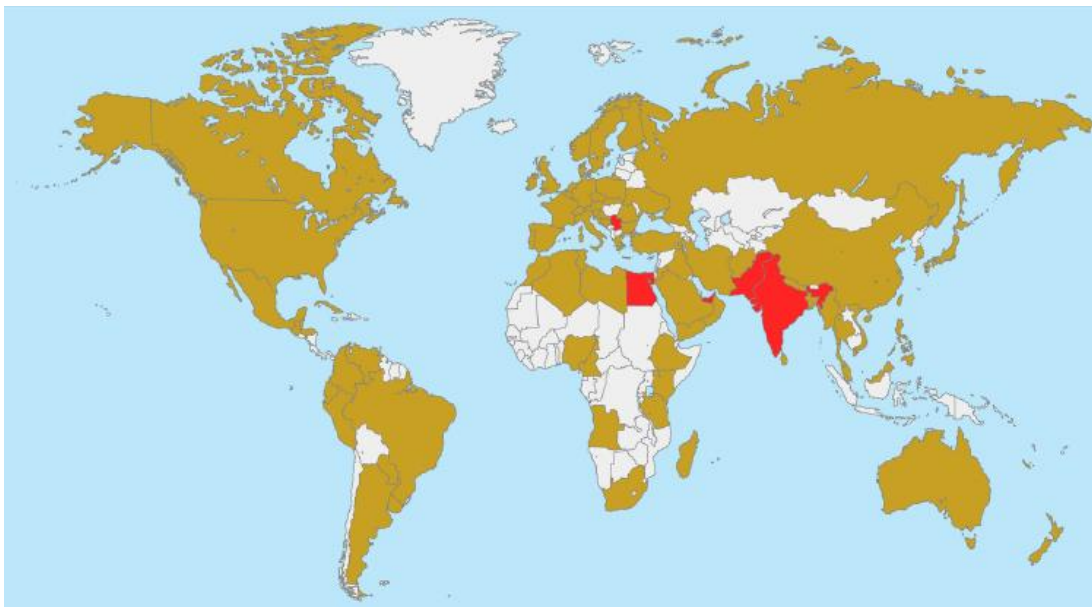
2.3.2 Nova-Delhi Metallo- β -Lactamase (NDM)

As enzimas da família Nova-Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) são Metallo- β -lactamases (MBL), pertencentes à classe molecular B de Ambler e ao subgrupo funcional 3a de Bush, Jacoby e Medeiros, capazes de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos que são os antimicrobianos de escolha no tratamento das infecções graves causadas por Gram negativas, mas não os monobactâmicos (YONG et al., 2009; NORDMANN et al., 2011; BREILH et al., 2013). De relevante importância, as enzimas NDM não apresentam ação bloqueada pelos inibidores de β -lactamases disponíveis clinicamente, incluindo avibactam, clavulanato, sulbactam e tazobactam, ativos contra KPC (BIEDEBACH et al., 2015). Como estas enzimas utilizam um metal (geralmente zinco) como cofator enzimático, são inibidas *in vitro* por EDTA (Ácido Etilenodiamino Tetraacético), um quelante de metal. No entanto, o EDTA não pode ser utilizado em associação com β -lactâmicos no tratamento de infecções bacterianas, pois é incompatível com a fisiologia dos fluidos (sangue) e tecidos corporais.

A NDM-1 teve seu primeiro relato na cidade de New Delhi na Índia, em um paciente sueco do sexo masculino de 59 anos apresentando um abscesso glúteo. Quando transferido para Suécia (local de residência), uma cultura de urina evidenciou um isolado de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos. Testes adicionais confirmaram a presença de um novo mecanismo de resistência presente em um plasmídeo de aproximadamente 180 Kb (YONG et al., 2009).

Após a descoberta do NDM-1, um estudo de acompanhamento revelou a disseminação do *bla*_{NDM-1} (gene que codifica a enzima NDM) no subcontinente indiano, incluindo a Índia, Paquistão e Bangladesh (KUMARASAMY et al., 2010). Desde então, o NDM tem apresentado distribuição global (Figura 5), sendo relatado em diferentes espécies de *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (PHAN et al., 2017; TADA et al., 2017; ZOU et al., 2017; SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2019; SUAY-GARCÍA et al., 2019; REYES et al., 2020). Até o momento, 24 variantes de NDM já foram identificadas em todo o mundo, representando um desafio significativo para o manejo clínico e a saúde pública (MOELLERING e ROBERT, 2010; DORTET et al., 2014).

Figura 5. Distribuição mundial de cepas de *Enterobacteriaceae* positivas para NDM. Os países (Egito, Índia, Paquistão, Sérvia e Emirados Árabes Unidos) com evidências que mostram uma prevalência de cepas positivas para NDM entre as *Enterobacteriaceae* de $\geq 5\%$ estão indicados em vermelho, enquanto países com relatos de cepas positivas para NDM, mas sem evidência de prevalência de $\geq 5\%$ é mostrada em marrom claro. Os países sem relatos ou dados sobre cepas positivas para NDM são indicados em branco.



Fonte: WU et al., 2019.

Na Índia, 75,22% dos isolados produtores de carbapenemases apresentavam o NDM-1, representando o tipo mais frequente de carbapenemase detectado (KAZI et al., 2015). O NDM-1 também foi a enzima mais comum observada nos Emirados Árabes Unidos e em Cingapura (100% e 44,4% respectivamente) (DASH et al., 2014; LING et al., 2015). O Reino Unido que tem estreita relação com Índia e Paquistão, também apresentou disseminação endêmica de *K. pneumoniae* produtora de NDM (NORDMANN e POIREL, 2014). Na China, o principal patógeno produtor de NDM-1 foi *Acinetobacter spp.* No entanto, dados obtidos em pacientes entre junho de 2011 e julho de 2012 revelaram que 33,3% dos isolados de CRE, incluindo *K. pneumoniae*, tinham NDM-1. Isto sugere uma possível transmissão de sequências contendo *bla*_{NDM-1} de *Acinetobacter spp.* para *Enterobacteriaceae* (QIN et al., 2014).

No Brasil, o NDM-1 foi relatado pela primeira vez em uma cepa de *Providencia rettgeri* isolada em um hospital do Rio Grande do Sul em 2013, no entanto, um estudo retrospectivo realizado no mesmo hospital demonstrou que o NDM está presente no país desde 2012 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). A partir daí, o NDM tem sido relatado em diferentes estados do Brasil, como Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Bahia, Distrito Federal e Pernambuco, em diferentes espécies bacterianas,

incluindo *K. pneumoniae* (Figura 6) (DA SILVA et al, 2019; SCAVUZZI et al., 2019; FIRMO et al., 2020).

Figura 6. Distribuição de espécies bacterianas produtoras de NDM em diferentes estados do Brasil. NDM, Nova Delhi, metalo- β -lactamase.



Fonte: Adaptado de DA SILVA et al, 2019.

Assim como no KPC, a coexistência de NDMs e outras carbapenemases em *K. pneumoniae* também tem sido relatada em todo o mundo, no Brasil: NDM-1/KPC-2; (PEREIRA et al., 2015; SCAVUZZI et al., 2019), Malásia: NDM-1/OXA-232 (AL-MARZOOQ et al., 2015), Coréia do Sul: NDM-5/OXA-181 (CHO et al., 2015), China: NDM-1/IMP-4 (CHEN et al., 2015), Índia: NDM-1/OXA-232 (AL-MARZOOQ et al., 2015), Turquia: NDM-1/OXA-48 (KILIC; BAYSALLAR, 2015), Paquistão: NDM-1/KPC-2 (SATTAR et al., 2014), Suíça: NDM-1/OXA-48 (SEIFFERT et al., 2014), Emirados Árabes Unidos: NDM-1/OXA-48 (DASH et al., 2014), Austrália: NDM-1 / OXA-48 (SIDJABAT et al., 2015), Marrocos: NDM-1 / OXA-48 (BARGUIGUA et al., 2013), Cingapura: NDM-1/OXA-181 e NDM-5/ OXA-181 (BALM et al., 2013) e EUA: NDM-1/OXA-232 (DOI et al., 2014).

Inicialmente o *bla*_{NDM} foi encontrado em cromossomos bacterianos, mas a grande maioria de seu transporte ocorre através de plasmídeos, que desempenham um papel fundamental na disseminação deste gene de resistência. Há relatos de *bla*_{NDM} sendo carreados por plasmídeos com uma variedade de tipos de replicons (WU et al., 2019).

Plasmídeos são elementos genéticos com sistema de controle e autonomia de replicação, independente do DNA cromossômico, sendo desta forma replicons. Podem ou não ser transferidos por conjugação. Os conjugativos apresentam genes que codificam toda maquinaria necessária para sua transferência (genes *Tra*), isto é importante para troca de genes (resistência e virulência) entre bactérias da mesma espécie, como também de diferentes espécies dentro de uma mesma família bacteriana (SMILLIE et al., 2010). São classificados em grupos de incompatibilidade (Inc) baseados na condição de que plasmídeos que compartilham o mesmo grupo de genes de incompatibilidade não podem coexistir em uma única célula bacteriana, devido a mecanismos de replicação em comum. Essa classificação e tipagem é importante para agrupar plasmídeos que conferem resistência aos antimicrobianos e para entender a disseminação mundial de plasmídeos de importância clínica (ANDERSON et al., 1977; NOVICK, 1987).

Já foram relatados 20 tipos de plasmídeos (grupos de incompatibilidade, Inc) portadores de *bla*_{NDM} nas *Enterobacteriaceae*, incluindo IncC, IncB / O / K / Z, IncFIA, IncFIB, IncFIC, IncFIII, IncHI1, IncHI2, IncHI3, IncN, IncN2, IncL / M, IncP, IncR , IncT, IncX1, IncX3, IncX4, IncY e ColE10. Isso destaca que a transferência horizontal de *bla*_{NDM} é mediada por vários plasmídeos. A distribuição global dos tipos de plasmídeos portadores de *bla*_{NDM} é mostrada na (Figura 7). O IncX3 parece ser o tipo mais comum de plasmídeo portador de *bla*_{NDM}. Entre os 355 plasmídeos portadores de *bla*_{NDM} disponíveis no GenBank, 117 (cerca de um terço) possuíam o replicon IncX3. A maioria dos plasmídeos IncX3 no GenBank estava presente em *E. coli* (67/117; 57,3%), seguida por *K. pneumoniae* (20/117; 17,1%) (WU et al., 2019).

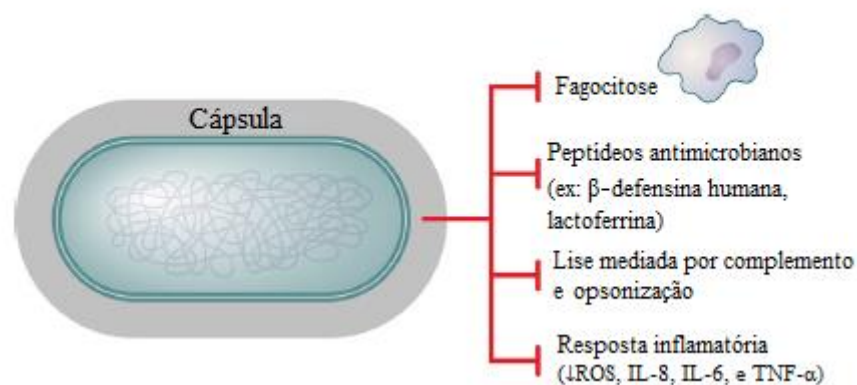
No GenBank, existem 99 plasmídeos portadores do gene *bla*_{NDM} do tipo IncFII isoladamente ou em combinação com outros tipos de replicons, geralmente IncFIB. Estudos realizados por nosso grupo de pesquisa revelaram grande proporção (59,2%) de cepas de *K. pneumoniae* portadoras do *bla*_{NDM-1}. De notável interesse, o IncFIB foi visto na maioria desses isolados sugerindo seu envolvimento na disseminação desse gene de resistência (Oliveira et al., 2019).

consistem em cápsula polissacarídica; fimbrias ou pili; lipopolissacarídeo (LPS) e sistemas de busca ativa de ferro (sideróforos) (BRISSE et al., 2009).

2.4.1 Cápsula Polissacarídica

Assim como outras *Enterobacteriaceae*, a *K. pneumoniae* possui uma membrana extracitoplasmática (parede celular) constituída por uma bicamada lipídica com proteínas associadas, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS). A cápsula polissacarídica (CPS) está por fora desta membrana externa e geralmente é composta por polímeros de um único monossacarídeo (glicana, destrano, lenavo) ou de heteropolissacarídeos contendo hexoses e pentoses, além de ribitol, glicerol ou outros álcoois derivados de açúcares, estando os fosfatos presentes com frequência (CRESS et al., 2014). A cápsula é sem dúvida o fator de virulência mais estudado em *K. pneumoniae*. Os genes necessários para produção da cápsula nestas cepas são codificados no operon *cps*, localizado dentro do cromossomo bacteriano (Figura 8) (PODSCHUN;ULLMANN, 1998; LAWLOR et al., 2006; PAN et al., 2008).

Figura 8. Papel da cápsula na virulência de *K. pneumoniae*. Primeiro, a cápsula impede a fagocitose e a opsonização das bactérias pelas células imunológicas. Segundo, dificulta a ação bactericida de peptídeos antimicrobianos, como as beta-defensinas humanas 1 a 3 e a lactoferrina. Terceiro, ele bloqueia componentes do complemento, como o C3, de interagir com a membrana, impedindo a lise e a opsonização mediadas pelo complemento. Finalmente, evita a ativação fulminante da resposta imune, medida pela diminuição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), IL-8, IL-6 e TNF- α .



Fonte: adaptado de Paczosa e Mecsas, 2016.

A cápsula age como um escudo que protege as bactérias da fagocitose por macrófagos, impedindo a deposição do sistema complemento e de peptídeos antimicrobianos na superfície bacteriana evitando a ação bactericida dos mesmos. Além do mais, a cápsula bloqueia a ativação da reposta imune inata por impedir a opsonização bacteriana com anticorpos. Ainda, a CPS é responsável pelo aparecimento de muco (mas não necessariamente o fenótipo hipermucoviscoso) quando o microrganismo é cultivado em diferentes meios de cultura (CATALAN-NAJERA et al., 2017). Estudos realizados com pulmões de camundongos infectados por *K. pneumoniae* descobriram que cepas capsulares induziam níveis mais baixos das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 e níveis mais altos da citocina anti-inflamatória IL-10 do que as cepas acapsulares (YOSHIDA et al., 2001; RATHORE et al., 2019).

Modelos com camundongos demonstraram que cepas acapsulares de *K. pneumoniae* são menos virulentas que as cepas isogênicas encapsuladas, com base na carga bacteriana diminuída nos pulmões, menor taxa de mortalidade dos camundongos e incapacidade de disseminação sistemática das bactérias (YOSHIDA et al., 2000; LAWLOR et al., 2005; LAWLOR et al., 2006). Além do mais, a variante *Klebsiella pneumoniae* hipervirulenta (hvKp) produz uma hipercápsula também chamada hipermucoviscosa, mais robusta que a cápsula típica, que pode contribuir significativamente para a patogenicidade dessas cepas (YEH et al., 2007).

Inicialmente, cepas de *Klebsiella* eram divididas em tipos através da sorotipagem de antígenos K presentes na cápsula polissacarídica, isto permitiu a diferenciação do gênero em 78 sorotipos (ØRSKOV, 1984). No entanto, uma grande desvantagem da sorotipagem é o grande número de reações cruzadas entre os sorotipos. Recentemente, no entanto, a tipagem do antígeno K é frequentemente realizada pelo sequenciamento do locus *wzi*, que está presente em todos os tipos capsulares de *K. pneumoniae* e diferentes sequências do locus *wzi* estão associadas a antígenos K específicos (BRISSE et al., 2013). Geralmente, as cepas com os tipos capsulares K1 e K2 são mais resistentes à fagocitose e a morte intracelular por macrófagos do que as cepas com outros sorotipos (LEE et al 2014; PACZOSA et al., 2016).

A produção de cápsula pode ser aumentada acima dos níveis basais de diversas formas. Uma delas é através do *rmpA2* (gene regulador do fenótipo mucóide A2) e sua forma truncada *rmpA* (gene regulador do fenótipo mucóide A), que atuam como reguladores transcricionais positivos na síntese da CPS e são transportados através de plasmídeos (CHENG et al, 2010; HSU et al., 2011). Sinais externos também podem estimular a síntese de cápsulas, a exemplo, concentrações aumentadas de glicose regulam positivamente a produção de cápsulas por meio da RmpA, enquanto altas concentrações extracelulares de ferro resultam

na regulação negativa da produção de cápsulas. Foi visto que 55 a 100% de cepas hvKp expressam pelo menos um dos genes *rmpA* ou *rmpA2*, em comparação com 7 a 20% das cepas clássicas de *K. pneumoniae* (HSU et al, 2011; LI et al., 2014).

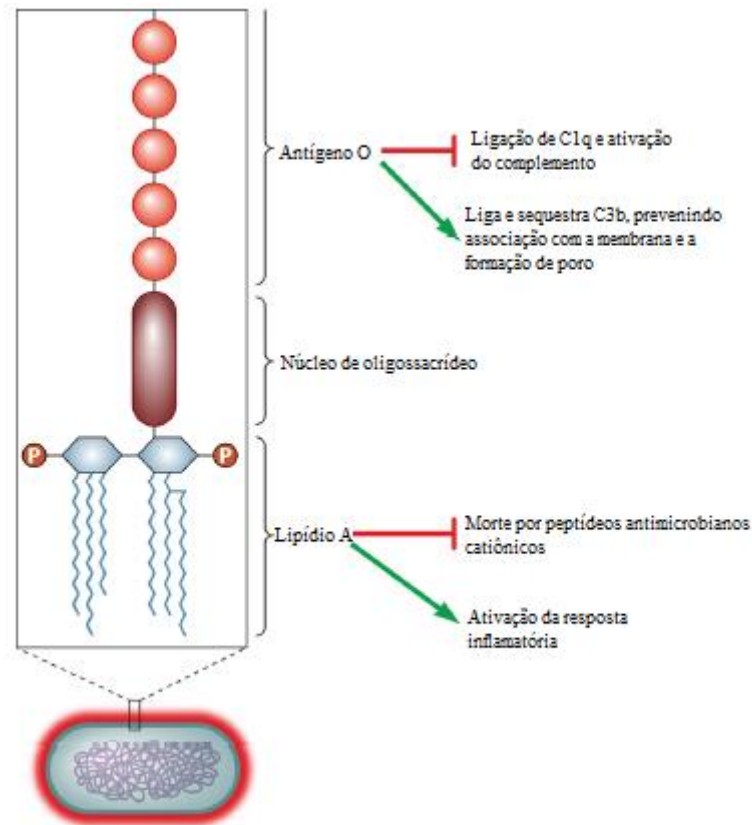
Na ausência de *rmpA* ou *rmpA2*, a hiperprodução capsular pode ser desencadeada por *magA* (gene associado a mucoviscosidade A). O gene cromossomal *magA* foi descoberto em 2004 durante uma pesquisa para identificar genes envolvidos no fenótipo de hipercápsula em cepas de *K. pneumoniae* causando infecções invasivas no fígado (FANG et al., 2004). O *magA* foi encontrado em 98% das cepas invasivas versus 29% das não invasivas, mostrando que pode está associada à resistência ao soro e à fagocitose (FANG et al., 2004; CHUANG et al., 2006). Estudos adicionais mostraram que o gene *magA* codifica uma enzima polissacarídica polimerase específica para o sorotipo capsular K1, responsável pela formação da estrutura característica da cápsula. Posteriormente, foi descoberto que cada um dos 78 sorotipos capsulares conhecidos atualmente possui uma polimerase específica. Assim sendo, o gene *magA* foi renomeado como *wzy_K1*, o mesmo seguiu para os demais sorotipos, o gene específico da polimerase para o sorotipo K2 é chamado *wzy_K2* e assim por diante. Esta polimerase é essencial para a síntese da cápsula e a deleção do gene *wzy* impede a produção da cápsula polissacarídica (FANG et al., 2010; YEH et al., 2010; CLEGG, MURPHY, 2017).

2.4.2 Lipopolissacarídeo

O Lipopolissacarídeo (LPS), também chamado de endotoxina, é um componente importante da membrana externa de todas as bactérias Gram-negativas. Ele é composto por um antígeno O (nove tipos diferentes, sendo o O1 o mais comum), um oligossacarídeo central e um lipídio A (Figura 9) (HANSEN et al., 1999).

O LPS é importante nas interações com sistema imunológico do hospedeiro, pois durante a infecção este fator de virulência protege as bactérias contra as defesas humorais, mas também pode ser um forte ativador imunológico. O lipídio A é bem conhecido por ser um ligante do TLR4 (receptor de reconhecimento padrão) (KNAPP et al., 2004; CAI et al., 2009; STANDIFORD et al., 2012). Desta forma, estudos sugerem que *K. pneumoniae* promova a modificação nesta estrutura, impedindo seu reconhecimento por certos receptores imunes, suprimindo a resposta inflamatória em comparação com a forma nativa do lipídio A, aumentando efetivamente a virulência in vivo dessas cepas (LLOBET et al., 2015).

Figura 9. Papel do lipopolissacarídeo na virulência de *K. pneumoniae*. O LPS é composto por três subunidades principais: lipídio A, um núcleo de oligossacarídeo e antígeno O. O lipídio A se insere na membrana bacteriana e é um ativador potencialmente potente da inflamação. *K. pneumoniae* pode modificar seu lipídio A para torná-lo menos inflamatório durante a infecção, e o lipídio A também pode proteger contra a ação bactericida dos peptídeos antimicrobianos catiônicos. O antígeno O é a subunidade mais externa do LPS. Tem papéis importantes na proteção contra complemento, impedindo a ligação de C1q a bactérias, que inibe a ativação subsequente da via do complemento, bem como a ligação de C3b da membrana bacteriana externa e, assim, a anulação da lise bacteriana pelo complexo de ataque à membrana do complemento.



Fonte: adaptado de Paczosa et al, 2016.

O LPS é o principal meio de proteção contra o sistema complemento, às cepas que apresentam o antígeno O completo, ou “LPS liso”, são resistentes a morte mediada por complemento, enquanto aquelas com cadeias O truncadas ou ausentes, ou “LPS bruto”, são susceptíveis a morte mediada pelo complemento, mesmo na presença da cápsula. Isso porque o antígeno O impede a ligação de C3 com C3b, um processo fundamental visto que essa ligação forma uma estrutura que funciona como uma opsonina e também faz parte da formação de poro (MERLE et al., 2015) Apoiar esse papel do LPS na virulência implica em estudar genes envolvidos na produção adequada de LPS, incluindo o *wabG*. As cepas de *K. pneumoniae* sem esse gene são incapazes de gerar o núcleo externo do LPS e são atenuadas

nos modelos de infecção intraperitoneal, pneumônica e do trato urinário em camundongos (MERINO et al., 1992; IZQUIERDO et al., 2003; JUNG et al., 2013).

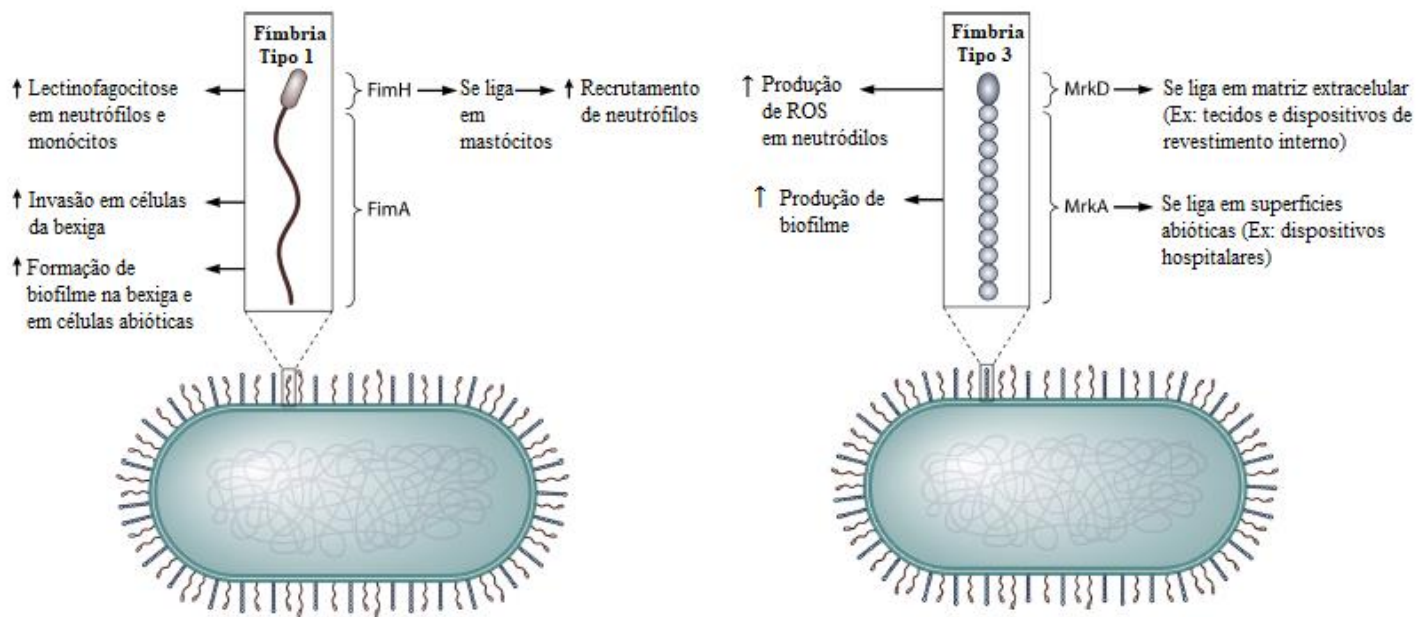
2.4.3 Fímbrias do Tipo 1 e Tipo 3

As fímbrias do Tipo 1 e 3 são componentes da membrana celular de *K. pneumoniae* e desempenham um papel importante na interação bacteriana com células hospedeiras, tecidos e superfícies ambientais, mediando a ligação a superfícies biológicas e não biológicas. Sendo a adesão à mucosa e células epiteliais frequentemente os primeiros passos no desenvolvimento de colonização e infecção (SEBGHATI et al., 1998; STRUVE et al., 2008).

As fímbrias Tipo 1, também denominadas “sensíveis a manose” por se ligarem a glicoproteínas D-manosiladas, são saliências finas com protusões filiformes dispersas por toda a superfície bacteriana e são expressas em 90% dos isolados clínicos e ambientais de *K. pneumoniae* (Figura 10) (FIRON et al., 1984; KLINE et al., 2009). A fímbria Tipo 1 é composta pela subunidade FimA, codificada pelo gene *fimA* que constitui a maior parte da estrutura, e pela subunidade menor FimH, codificada pelo gene *fimH*, responsável pelas propriedades adesivas (GERLACH et al., 1989; STAHLHUT et al., 2009). Em *K. pneumoniae*, os genes das fímbrias Tipo 1 são expressos no trato urinário (contribuindo para Infecções no Trato Urinário- ITUs), mas não no TGI ou nos pulmões, isto evidencia a regulação na expressão da fímbria Tipo 1 por sinais ambientais (STRUVE et al., 2008; STRUVE et al., 2009). Além disto, modelos experimentais com camundongos demonstraram que estas fímbrias contribuem para invasão de células da bexiga e formação de biofilme na bexiga por *K. pneumoniae* durante a ITU, potencializando a persistência do patógeno in vivo (ROSEN et al., 2008; STRUVE et al., 2008).

As fímbrias do Tipo 3 são filamentos semelhantes a hélices. Em *K. pneumoniae*, essas fímbrias são codificadas pelo agrupamento de genes *mrkABCD*. A maior parte da estrutura consiste em subunidades MrkA, com a adesina MrkD localizada na ponta (Figura 10). Diferentemente das fímbrias do Tipo 1, as do Tipo 3 são “insensíveis à manose” e, portanto, não se ligam à manose, no entanto, estudos demonstraram que fímbrias do Tipo 3, mas não do Tipo 1, poderiam mediar a ligação às células traqueais, bucais, pulmonares in vitro via MrkD e a proteínas da matriz extracelular (colágeno tipo IV e V) (HORNICK et al., 1992; PACZOSA et al., 2016).

Figura 10. Funções das fímbrias do Tipo 1 e Tipo 3 durante a infecção por *K. pneumoniae*.



Fonte: Adaptado de Paczosa et al, 2016.

A importância clínica principal das fímbrias está no seu papel fundamental de adesão em superfícies abióticas e formação de biofilme. A capacidade de adesão em superfícies abióticas pode ser de grande relevância quando consideramos a possibilidade de essas superfícies serem dispositivos hospitalares como cateteres, tubos endotraqueais, equipamentos para ventilação de pacientes e etc (STRUVE et al., 2009; FANG et al., 2021). Corroborando com esses dados, um estudo demonstrou que as fímbrias Tipo 3, e possivelmente a do Tipo 1, podem contribuir para entrada e persistência de *K. pneumoniae* nas PAVM através da formação de biofilmes em tubos endotraqueais (KOLLEF et al., 2004; RAMIREZ et al., 2012).

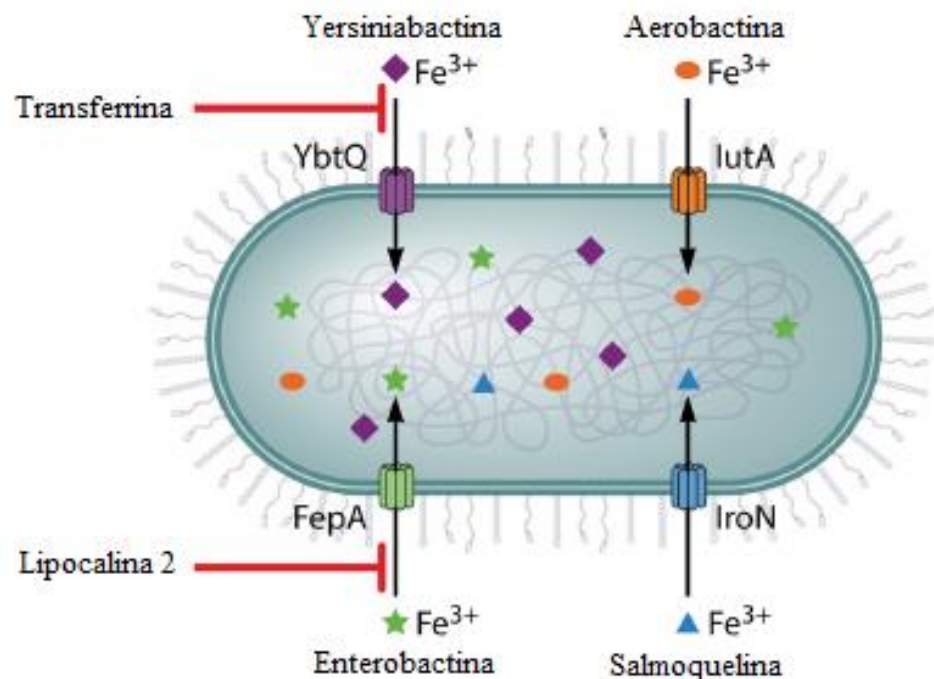
2.4.4 Sideróforos

O ferro é um metal essencial para o crescimento bacteriano e exerce função fundamental na progressão da infecção (RUSSO et al., 2014). No entanto, este metal não se encontra disponível no hospedeiro humano durante a infecção, pois normalmente se encontra ligado a moléculas de transporte de ferro, como a transferrina. O hospedeiro pode reduzir ainda mais os níveis de ferro durante a infecção bacteriana, aumentando a ligação do ferro à

proteína de defesa imune presente nos fluidos corporais, à lactoferrina (MIETHKE; MARAHIEL, 2007).

A estratégia utilizada por muitos patógenos, incluindo *K. pneumoniae*, para aquisição de ferro é através da secreção de sideróforos, pequenas moléculas que possuem maior afinidade pelo ferro do que as proteínas de transporte do hospedeiro. Os sideróforos se ligam ao ferro e se reinserem na célula bacteriana através de receptores específicos. Quatro sideróforos são expressos por *K. pneumoniae*, sendo eles: enterobactina, yersiniabactina, salmochelina e aerobactina (Figura 11). A produção de mais de um sideróforos pode ser um meio de aperfeiçoar a colonização em diferentes tecidos e evitar a neutralização de um sideróforos no hospedeiro (BACHMAN et al., 2012).

Figura 11. Sideróforos descritos em *K. pneumoniae*.



Fonte: Adaptado de Paczosa et al (2016).

Enterobactina é o sideróforo com maior afinidade pelo ferro e está presente em quase todas as cepas de *K. pneumoniae* sejam elas clássicas ou hvKp, sendo considerado o sistema primário de absorção de ferro utilizado por estas cepas (EL-FERTAS AISSANI et al., 2013). Os genes necessários para a biossíntese de enterobactina se encontram no cromossomo no agrupamento de genes *entABCDEF* (MULLER et al., 2009), e este sideróforo é neutralizado

por uma proteína multifuncional com capacidade antimicrobiana liberada por células como neutrófilos durante a infecção, a lipocalina-2 (LAWLOR et al., 2007).

A yersiniabactina foi descoberta em uma ilha de alta patogenicidade em *Yersinia*, mas esse sideróforo já foi identificado em outras bactérias, incluindo *K. pneumoniae* (BACH et al., 2000; LOPES et al., 2016). Está associada a infecções invasivas do trato respiratório em humanos e tem sido implicada na promoção da colonização e infecção neste sítio por evasão da lipocalina 2, no entanto, é incapaz de adquirir ferro para o crescimento bacteriano na presença da proteína transferrina (BACHMAN et al., 2011). A yersiniabactina foi detectada em vários clones multirresistentes, incluindo o KPC-Kp ST258 (HOLT et al., 2015). As proteínas necessárias para a síntese yersiniabactin são codificadas por genes *IRP*, e os transportadores necessários para a secreção deste sideróforos são codificados pelos genes *YBT* e *FYU*, sendo seu receptor de absorção codificado por *ybtQ* (BACH et al., 2000; HSIEH et al., 2008).

Salmoquelina é a forma glicosilada da enterobactina, capaz de impedir a ação da lipocalina-2 (FISCHBACH et al., 2006). Essa modificação é realizada por modificação nos genes do agrupamento *iroABCDE* presentes no cromossomo ou em plasmídeo (HSIEH et al., 2008). O Transportador do ferro adquire para o interior da bactéria é o IroN (HANTKE et al., 2003; MULLER et al., 2009). Este sideróforo está associado a infecções na orofaringe e está presente em mais de 90% de hvKp relacionada a abscessos hepáticos (HSIEH et al 2008; EL FERTAS-AISSANI et al., 2013).

A aerobactina é um sideróforo raramente expresso em cepas clássicas de *K pneumoniae*, mas está presente em 93 a 100% dos isolados de hvKp (RUSSO et al., 2018). A presença da aerobactina está sempre associada à produção de hipercápsula, isto porque o cluster gênico necessário para sua codificação, *iucABCD*, juntamente com o gene que codifica seu receptor cognato *iutA*, são transportados no mesmo plasmídeo de virulência que transporta o *rmpA*, um intensificador da produção de cápsulas (TANG et al., 2010). Estudos *ex vivo* e *in vivo* demonstraram que apenas a aerobactina (mas não yersiniabactina, salmochelina ou enterobactina) aumenta significativamente o crescimento e a sobrevivência da hvKp no fluido de ascite humana, soro humano e em modelos de infecção sistêmica e pulmonar de camundongos, sugerindo que a aerobactina é um determinante crucial de virulência da hvKp (RUSSO et al., 2015).

2.5 TIPAGEM MOLECULAR DE BACTÉRIAS

Os surtos de doenças infecciosas são comumente resultantes da exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente. Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência e características bioquímicas e genéticas semelhantes (PFALLER et al., 2001; BAKHSHI et al., 2008). No entanto, grandes variações genéticas não são distinguidas nos testes microbiológicos e bioquímicos tradicionais, desta forma, a aplicação de tecnologias modernas e avançadas, como ferramentas de diagnóstico molecular e impressões digitais moleculares, pode ser uma escolha apropriada em investigações epidemiológicas moleculares (MEACHAM et al., 2003; BEHZADI; BEHZADI 2007; MOMTAZ et al., 2013).

Existem vários métodos para investigar a diversidade molecular de bactérias na comunidade e em hospitais: análise plasmidial (CHEN et al., 2009), Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) (CHMELNITSKY et al., 2008), ribotipagem clássica (IVERSEN et al., 2007), Random-Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (YE et al., 2010), polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP) (IVERSEN et al., 2007), ribotipagem por PCR e tDNA-PCR (LOPES et al., 2007), PCR dos elementos repetitivos palindrômicos extragênicos (REP-PCR), Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC-PCR) (XU et al., 2020) e MLST (Multilocus Sequence Typing) (SALAZAR-OSPINA et al., 2021). Dentre as várias ferramentas citadas acima a ERIC-PCR é uma tecnologia de genotipagem simples, precisa e econômica para discriminar diferentes impressões digitais de DNA nos diferentes tipos de cepas (RANJBAR et al., 2017), inclusive em *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE (SCAVUZZI et al 2017; FIRMO et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2020).

A disseminação de clones resistentes e de genes no ambiente hospitalar pode ocorrer devido ao contato com os profissionais de saúde e devido à transferência de pacientes entre unidades hospitalares. Isto foi observado por Cassettari et al., (2006) uma vez que isolados apresentando padrões moleculares idênticos foram observados em diferentes enfermarias e alguns isolados apresentaram padrões idênticos à cepa isolada das mãos de profissionais de saúde. Desta forma, Além de ser importante no reconhecimento de surtos de infecções, na determinação da fonte de infecção e no monitoramento de programas de vacinação, a tipagem molecular também auxilia na detecção de transmissão cruzada de patógenos (OLIVE; BEAN, 1999). Portanto, no presente estudo será importante definir se os isolados de *K. pneumoniae* analisados apresentam heterogeneidade genética ou são clones de uma mesma cepa.

3 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

Analisar o perfil genético de virulência de isolados multi-droga resistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla_{NDM}*, provenientes de colonização e infecção, e analisar a disseminação clonal desses isolados provenientes de um hospital público do Recife-PE.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Analisar o perfil fenotípico e genético de resistência dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de colonização e infecção;
- Verificar a ocorrência dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* nos isolados de *K. pneumoniae*;
- Analisar o perfil de virulência dos isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{NDM}* através da investigação da ocorrência de genes *cps*, *magA*, *rmpA*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* e *irp2*.
- Determinar o fenótipo hipermucoviscoso nos isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{NDM}*;
- Determinar o perfil clonal e a disseminação dos isolados nos setores hospitalar;
- Sequenciar e analisar o DNA plasmidial de um isolado de *K. pneumoniae* portador do gene *bla_{NDM}* selecionado.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Foram analisados 20 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a um ou mais carbapenêmicos, provenientes de infecção e colonização (swab retal) de um hospital público do Recife-PE entre outubro de 2017 e novembro de 2018 (Tabela 2), selecionados para este estudo de acordo com a presença do gene de resistência *bla_{NDM}*. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados inicialmente no hospital através do sistema automatizado BD PhoenixTM. Em seguida, no Centro de Tecnologia Estratégica do Nordeste (CETENE), os isolados foram submetidos ao MALD-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization- Time of flight) para confirmação da pureza da cultura bacteriana. Os isolados bacterianos foram conservados em estoque congelado com glicerol 15% a -70°C e fazem parte da coleção de culturas bacterianas do Laboratório Biologia Molecular e Genética Bacteriana (Departamento de Medicina Tropical, CCM, UFPE). Para as análises os isolados foram cultivados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) e plaqueados em Ágar Brain Heart Infusion. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE (Número do parecer: 4.459.621).

Tabela 2. Identificação, data e tipo de amostra e setor dos isolados de *K. pneumoniae* provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil.

Isolados	Data	Tipo da Amostra	Setor
K08-A3	11/10/2017	Urina	UTI
K09-A3	14/11/2017	Sangue	EG
K12-A3	29/11/2017	Sangue	UTI
K16-A3	03/01/2018	Urina	Cardiologia
K20-A3	15/01/2018	Swab retal	UCO1
K24-A3	02/02/2018	Urina	UTI
K27-A3	15/02/2018	Urina	CM
K30-A3	20/02/2018	Sangue	UCO1
K34-A3	09/03/2018	Swab retal	UTI
K36-A3	15/03/2018	Swab retal	UCO2
K37-A3	09/03/2018	Swab retal	UTI
K39-A3	21/03/2018	Swab retal	Cardiologia
K40-A3	22/03/2018	Urina	UTI
K45-A3	23/04/2018	Swab retal	UTI
K47-A3	23/04/2018	Swab retal	UCO2
K63-A3	09/09/2018	Sangue	UCI (NEO)
K64-A3	17/09/2018	Swab Retal	UCO 1
K70-A3	17/09/2018	Swab Retal	UTI
K74-A3	07/11/2018	Sangue	EG
K75-A3	09/11/2018	Swab Retal	UTI

K, *Klebsiella pneumoniae*; EG, Emergência Geral; CM, Clínica Médica; UTI, Unidade de tratamento intensivo; UCO, Unidade coronariana; UCO (NEO), Unidade coronariana neonatal.

4.2 SUSCEPTIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos: Amicacina (AMI); Amoxicilina-ácido clavulânico (AMC); Ampicilina (AMP); Ampicilina-Sulbactam (APS); Aztreonam (ATM); Cefazolina (CFZ); Cefepime (CPM); Cefalotina (CFL); Cefoxitina (CFO); Ceftazidima (CAZ); Ceftriaxona (CRO); Cefuroxima (CRX); Ciprofloxacina (CIP); Colistina (COL); Ertapenem (ERT); Gentamicina (GEN); Imipenem (IMI); Levofloxacina (LVX); Meropenem (MPM); Piperacilina-tazobactam (PIT) e Trimetoprim-sulfametaxazol (SUT), foi determinada através do equipamento automatizado BD PhoenixTM. E o perfil de susceptibilidade foi interpretado de acordo com o CLSI (2019).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

A extração de DNA total foi realizada através de kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Para o procedimento, os isolados de *K. pneumoniae* foram inicialmente cultivados em caldo BHI por 24 horas a 37°C.

4.4 CONDIÇÕES DE PCR PARA OS GENES DE RESISTÊNCIA

Os genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, foram investigados nos isolados de *K. pneumoniae* pela técnica de PCR, com iniciadores descritos na tabela 3. 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 foram inclusos um controle negativo sem DNA e um positivo. As condições térmicas de amplificação dos genes *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} estão presentes na tabela 4.

4.5 CONDIÇÕES DE PCR PARA OS GENES DE VIRULÊNCIA

Os genes de virulência *cps*, *magA*, *rmpA*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* e *irp2* foram investigados em todos os isolados de *K. pneumoniae* pela técnica de PCR, com iniciadores descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂ e 10 µmol dos iniciadores. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo sem DNA e um controle positivo. As condições térmicas de amplificação dos genes de virulência estão presentes na tabela 4.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Quatro microlitros dos produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) acrescidos de 1µL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) a cada 10mL de gel, em voltagem constante de 100V. Foi utilizado um marcador de peso molecular de 100pb (KASVI). Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados em sistema de foto documentação Photocap da Vilber Lourmat.

4.7 SEQUENCIAMENTO DOS AMPLICONS

Produtos de PCR positivos para os genes de resistência e virulência, foram purificados através do kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (Sanger et al., 1977), para a confirmação dos genes identificados e determinar as variantes dos genes. As sequências foram analisadas usando o software Chromas (<http://www.mybiosoftware.com/sequence-analysis>) e comparadas às sequências depositadas nos bancos de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) (Pesquisa básica de alinhamento local (BLAST)). Após a comparação do BLAST, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas em proteínas com o Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html) usando a ferramenta Translation Map.

4.8 TESTE DA CORDA PARA HIPERMUCOVISCOSIDADE

As cepas testadas foram inoculadas em placas de ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 37 ° C por 24h. A hipermucoviscosidade foi definida pelo teste da corda. Sendo o teste da corda positivo quando a formação de cordões viscosos for ≥ 5 mm de comprimento quando uma alça bacteriológica for usada para esticar a colônia na placa de ágar, e foi considerado negativo quando a formação de cordões viscosos foi ≤ 5 mm de comprimento (FANG et al., 2004).

4.9 TIPAGEM MOLECULAR POR ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 3. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo (água Milli-Q estéril). As condições térmicas de amplificação estão presentes na tabela 4. Dez microlitro dos produtos

amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100V. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 6. A cepa de referência K74-A3 (Alves et al., 2021) portadora do gene *bla*_{NDM-7} foi incluída para análises comparativas afim de se investigar possíveis relações clonais com esse isolado positivo para o gene *bla*_{NDM-7}.

Tabela 3. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes nos isolados de *K. pneumoniae*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-1a KPC-1b	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	800	Yigit et al. (2001)
<i>bla</i> _{NDM}	NDM-F NDM-R	TAAAATACCTTGAGCGGGC AAATGGAACTGGCGACC	439	Poirel et al. (2011)
<i>Cps</i>	cps -F cps -R	TCCCAATTGTGACCGAAATC GCTCGCGGCACCAGCTGA	437	Hennequin e forestier (2007)
<i>magA</i>	magA-F magA-R	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	1283	Turton <i>et al.</i> (2010)
<i>rmpA</i>	rmpA -F rmpA -R	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTTCA	536	Al-jailawi <i>et al.</i> , (2014)
<i>wabG</i>	wabG- F wabG-R	CGGACTGGCAGATCCATATC ACCATCGGCCATTTGATAGA	683	Brisse <i>et al.</i> , (2009)
<i>fimH</i>	fim-H F fim-H R	TCCACAGTCGCCAACGCTTC GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	903	Stahlhut <i>et al.</i> , (2009)
<i>mrkD</i>	mrkD- F mrkD- R	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	226	Sahly <i>et al.</i> , (2008)
<i>entB</i>	entB- F entB -R	ATTTCTCAACTTCTGGGGC AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	371	El Fertas Aissani <i>et al.</i> , (2013)
<i>irp2</i>	irp2 F irp2 R	ATTTCTGGCGCACCATCT GCGCCGGTATTACGGACTTC	1000	Guilvout <i>et al.</i> , (1993)
NA	ERIC-1 ERIC-2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG		Duan et al., (2009)

F (1a, F), sequência forward; R (1b, R), sequência reverse; NA, não se aplica.

Tabela 4. Condições de ciclagem para PCR.

Gene Alvo		Condições de Ciclagem				
<i>bla_{KPC}</i>	95°C 5 min	94°C 1 min	*63°C 1min	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 30 ciclos
<i>bla_{NDM}</i>	94°C 10 min	94°C 30 seg	*52°C 40seg	72°C 50 seg	72°C 5 min	Repetido por 36 ciclos
<i>Cps</i>	96°C 5 min	96°C 1 min	*63°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 35 ciclos
<i>magA (K1)</i>	96°C 5 min	96°C 1 min	*54°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 30 ciclos
<i>rmpA</i>	96°C 5 min	96°C 1 min	*54°C 1 min	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 30 ciclos
<i>wabG</i>	94°C 5min	94°C 30seg	*53°C 30seg	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 35 ciclos
<i>fimH</i>	95°C 2 min	94°C 1 min	*62°C 1 min	72°C 2 min	72°C 7 min	Repetido por 33 ciclos
<i>mrkD</i>	95°C 2 min	94°C 30 seg	*60°C 30seg	72°C 1 min	72°C 7 min	Repetido por 33 ciclos
<i>entB</i>	94°C 4 min	94°C 30 seg	*57°C 40seg	72°C 1 min	72°C 10 min	Repetido por 30 ciclos
<i>irp2</i>	95°C 2 min	95°C 1 min	*65°C 2 min	72°C 3 min	72°C 7 min	Repetido por 30 ciclos
ERIC	95°C 3 min	92°C 1 min	*36°C 1 min	72°C 8 min	72°C 16 min	Repetido por 40 ciclos

Min, minuto; Seg, segundo; * Temperatura de anelamento.

4.10 EXTRAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit PureYield Plasmid Miniprep System (Promega), de acordo com especificações do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado com o equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific).

4.11 SEQUENCIAMENTO DO DNA PLASMIDIAL

Foi selecionado o isolado de *K. pneumoniae* (K74-A3) para realização do sequenciamento plasmidial, proveniente de sepse, multidroga resistente e portador do gene *bla_{NDM}*. Após a extração (Kit PureYield Plasmid Miniprep System - Promega) e quantificação do DNA plasmidial, as bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina). A quantificação das bibliotecas foi realizada pela técnica de PCR em tempo real através do Kit Library Quantification- Illumina/Univeral (Kapa Biosystems). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento Miseq (Illumina), com o cartucho Miseq Kit V2 de 500 ciclos (Illumina) no Instituto Aggeu Magalhães- IAM-Fiocruz-Recife-PE. Os dados foram processados usando o *Trimmomatic* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103590/>) e montados utilizando a ferramenta *Velvet* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349386>) através do *Velvet optimiser* (<http://www.vicbioinformatics.com/software/velvetoptimiser.shtml>). Os resultados da montagem foram submetidos a outro programa de montagem, o *Cap 3*

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

4.12 ANÁLISE DO DNA PLASMIDIAL

As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando software Artemis Sanger (<http://www.sanger.ac.uk/science/tools/artemis>). E para a observação dos genes de resistência foram utilizados os sites *Resfinder* 2.1 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), Rapid Annotation using Subsystem Technology - RAST (<http://rast.nmpdr.org/>) e Clustal (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Os contigs dos plasmídeos obtidos por meio do sequenciamento foram submetidos ao banco de dados *Plasmidfinder*-1.3 (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) para determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial.

5 RESULTADOS

5.1 ARTIGO 1 : DIVERSIDADE DE GENES DE VIRULÊNCIA E DISSEMINAÇÃO CLONAL EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* COPRODUZINDO *bla*_{NDM-7} OU *bla*_{NDM-1} E *bla*_{KPC-2} PROVENIENTES DE COLONIZAÇÃO E INFECÇÃO NO BRASIL.

INTRODUÇÃO

A bactéria *Klebsiella pneumoniae* é considerada um dos principais patógenos oportunistas envolvidos em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), conhecido por sua alta frequência e diversidade de genes de resistência antimicrobiana (WYRES; HOLT, 2018). Em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu a *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos na lista de prioridade global de bactérias resistentes aos antimicrobianos, como patógeno crítico (SHRIVASTAVA et al., 2018). No Brasil, de acordo com o Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17, a *K. pneumoniae* é o bacilo Gram-negativo fermentador com maior percentual de resistência em pacientes hospitalizados em UTI adulto (ANVISA, 2019). O mecanismo mais importante de resistência nestes isolados é a produção de carbapenemases (especialmente KPC e NDM), capaz de inativar quase todos os β -lactâmicos e tem surgido como resultado ao uso inadequado ou abusivo desses antimicrobianos, limitando as opções terapêuticas para tratamento clínico (LIU et al., 2019; RARO et al., 2020).

O primeiro relato da enzima KPC-2 ocorreu na Carolina do Norte – EUA em 1996 (YIGIT et al., 2001), em um isolado de *K. pneumoniae*, enquanto no Brasil, a KPC-2 também teve seu primeiro relatado em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de quatro pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) em Recife-PE no ano de 2006 (MONTEIRO et al., 2009). No caso da metalo- β -lactamase (NDM-1) foi descrita pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* de um paciente sueco que havia sido hospitalizado em Nova Delhi na Índia, em 2008 (YONG et al., 2009). Cinco anos após sua primeira detecção no mundo, foi descrita pela primeira vez no Brasil no ano de 2013 em um isolado de *Providencia rettgeri* em Porto Alegre (região sul) (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). No entanto, os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1} têm se disseminado nos últimos anos, inclusive em isolados de colonização que podem facilitar a transmissão desses patógenos entre pacientes em ambientes de saúde (AIRES et al., 2017; SOLGI et al., 2017; WU et al., 2019; VIVAS et al., 2020).

Além da resistência é importante determinar os fatores que estão implicados na virulência de isolados de *K. pneumoniae*, como por exemplo, produção de cápsula e hipermucoviscosidade (genes: *cps*, *magA* e *rmpA*), lipopolissacarídeo (*wabG*), adesinas (*fimH* e *mrkD*), sistemas de aquisição de ferro (*entB* e *irp2*) e outros (WANG et al., 2020). Estes podem determinar a gravidade de uma infecção, como também, a capacidade de uma cepa colonizadora progredir para a infecção, determinando seu potencial patogênico (MARTIN; BACHMAN, 2018). No entanto, a investigação de genes de virulência entre isolados resistentes é raro, principalmente em portadores do gene *bla_{NDM}*, considerando sua recente disseminação mundial. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi analisar o perfil genético de virulência de isolados multi-droga resistentes de *Klebsiella pneumoniae* portadores do gene *bla_{NDM}*, provenientes de colonização e infecção, e analisar a disseminação clonal desses isolados provenientes de um hospital público do Recife-PE, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

ISOLADOS BACTERIANOS

Foram analisados dezenove isolados de *K. pneumoniae* (selecionados de acordo com a presença do gene *bla_{NDM}*) resistentes a um ou mais carbapenêmicos, provenientes de infecção e colonização de um hospital público do Recife-PE, Brasil, entre outubro de 2017 e novembro de 2018. Os isolados bacterianos foram conservados em estoque congelado com glicerol 15% a -70°C.

SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA

A concentração inibitória mínima (CIM) para os antimicrobianos: Amicacina; Amoxicilina-ácido clavulânico; Ampicilina; Ampicilina-Sulbactam; Aztreonam; Cefazolina; Cefepime; Cefalotina; Cefoxitina; Ceftazidima; Ceftriaxona; Cefuroxima; Ciprofloxacina; Colistina; Ertapenem; Gentamicina; Imipenem; Levofloxacina; Meropenem; Piperacilina-tazobactam e Trimetoprim-sulfametaxazol foi determinada através do equipamento automatizado BD PhoenixTM. E o perfil de susceptibilidade foi interpretado de acordo com as diretrizes fornecidas pelo Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2019).

EXTRAÇÃO DE DNA, CONDIÇÕES DE PCR PARA GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA

A extração de DNA total foi realizada através de kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega), e os procedimentos foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado por meio do espectrofotômetro NanoDrop 2000c UV-Vis. Para a amplificação por PCR dos genes de resistência (*bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*) e virulência (*cps*, *magA*, *rmpA*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* e *irp2*) foram utilizados os iniciadores e as temperaturas de anelamento descritos na Tabela 1. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 20 ng do DNA genômico, 1,0 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 8 mM de dNTP (Ludwig Biotec), 25 mM de MgCl₂, 10 µmol dos iniciadores e tampão 5x. Em cada partida de amplificação foram inclusos um controle negativo sem DNA e um positivo. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) acrescidos de 1µL de SYBR Safe DNA gel stain (Invitrogen) a cada 10mL de gel, em voltagem constante de 100V. Os géis foram visualizados em transiluminador (Bio Rad) e fotografados em sistema de foto documentação (Photocap, Vilber Lourmat).

PURIFICAÇÃO DOS AMPLICONS E SEQUENCIAMENTO DOS GENES DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA

Produtos de PCR de isolados representativos para os genes de resistência e virulência, foram purificados através do kit ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega) e sequenciados pelo método de Sanger et al. (1977), para a confirmação dos genes identificados. As sequências foram analisadas usando o programa BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). Após a comparação do BLAST, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas em proteínas com o Sequence Manipulation Suite (http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html) usando a ferramenta Translation Map.

TESTE DA CORDA PARA HIPERMUCOVISCOSIDADE

As cepas testadas foram inoculadas em placas de ágar sangue de carneiro a 5% e incubadas a 37 ° C por 24h. A hipermucoviscosidade foi definida pelo teste da corda. Sendo o teste da corda positivo quando a formação de cordões viscosos for ≥ 5 mm de comprimento

quando uma alça bacteriológica for usada para esticar a colônia cultivada no meio (FANG et al., 2004).

Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes nos isolados de *K. pneumoniae*.

Gene	Primer	Sequência (5`- 3`)	Temperatura de anelamento	Tamanho do amplicon (pb)	Referências
bla_{KPC}	KPC-1a KPC-1b	TGTCAGTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	800	Yigit et al. (2001)
bla_{NDM}	NDM-F NDM-R	TAAAATACCTTGAGCGGGC AAATGGAACTGGCGACC	52°C	439	Poirel et al. (2011)
Cps	cps -F cps -R	TCCCAATTGTGACCGAAATC GCTCGCGGCACCAGCTGA	63°C	437	Hennequin e forestier (2007)
MagA	magA-F magA-R	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	54°C	1283	Turton et al. (2010)
RmpA	rmpA -F rmpA -R	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTTCA	54°C	536	Al-jailawi et al., (2014)
WabG	wabG- F wabG-R	CGGACTGGCAGATCCATATC ACCATCGGCCATTTGATAGA	53°C	683	Brisse et al., (2009)
FimH	fim-H F fim-H R	TCCACAGTCGCCAACGCTTC GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	62°C	903	Stahlhut et al., (2009)
MrkD	mrkD- F mrkD- R	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	60°C	226	Sahly et al., (2008)
EntB	entB- F entB -R	ATTTCTCAACTTCTGGGGC AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	57°C	371	El Fertas Aissani et al., (2013)
irp2	irp2 F irp2 R	ATTTCTGGCGCACCATCT GCGCCGGGTATTACGGACTTC	65°C	1000	Guilvout et al., (1993)
NA	ERIC-1 ERIC-2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	36°C	NA	Duan et al., (2009)

Notas: NA, Não Aplicável; F (1a, F), sequência forward; R (1b, R), sequência reverse.

TIPAGEM MOLECULAR ATRAVÉS DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE DE SEQUÊNCIAS DE CONSENSO INTERGÊNICAS REPETITIVAS ENTEROBACTERIANA (ERIC-PCR)

Para avaliar a relação clonal entre os isolados, ERIC-PCR foi realizado conforme descrito por Duan et al. 2009 e Cabral et al. 2012 (Tabela 1). O software DARWIN 6.0 foi

usado para gerar o dendrograma. A cepa de referência K74-A3 (Alves et al., 2021) portadora do gene *bla*_{NDM-7} foi incluída para análises comparativas afim de se investigar possíveis relações clonais com esse isolado positivo para o gene *bla*_{NDM-7}.

RESULTADOS

ORIGEM DA AMOSTRA E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Foram observados dezenove isolados de *K. pneumoniae* portadoras do gene *bla*_{NDM} dos seguintes espécimes clínicos: swab retal 52,6% (n= 10), urina 26,3% (n= 5) e sangue 21% (n= 4). Analisando o perfil de resistência aos antimicrobianos destes isolados bacterianos foi observado que 94,7% (n= 18) apresentaram resistência simultânea aos três carbapenêmicos testados (ertapenem, imipenem e meropenem), com exceção do K30-A3 que foi sensível ao meropenem. Além disto, todos os isolados foram resistentes as fluoroquinolonas (tabela 2). Também foi visto que amicacina e colistina foram os antimicrobianos de melhor atividade para inibir os isolados de *K. pneumoniae* testados, sendo que apenas o isolado K45-A3 proveniente de colonização, apresentou resistência para ambos (Tabela 2).

DETERMINAÇÃO DOS GENES *bla*_{KPC} E *bla*_{NDM}

Todos os 19 isolados clínicos selecionados para esse estudo eram portadores do gene *bla*_{NDM} e as análises de PCR mostraram que 89,5 % (n= 17) foram também portadores do gene *bla*_{KPC}. O sequenciamento do produto de PCR de isolados representativos identificou as variantes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1} e *bla*_{NDM-7}.

GENES DE VIRULÊNCIA E HIPERMUCOVISCOSIDADE

Todos os 19 isolados de *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{NDM} apresentaram os genes *wabG* e *entB* envolvidos na produção de lipopolissacarídeo e na biossíntese de enterobactina, respectivamente. Grande proporção dos isolados (94,7%, n=18) foram positivos para o *cps* que está associado à produção de cápsula polissacarídica, como também para o *fimH* e *mrkD* (94,7%, n=18 para ambos), que codificam adesinas fimbriais do tipo I e III respectivamente, sugerindo uma relação entre os dois genes (Tabela 2). Destes, apenas o K39-A3 foi negativo para o *fimH* e o K09-A3 foi negativo para *mrkD*. O gene *irp2* envolvido na síntese do sideróforo yersiniabactina estava presente em 47,3% (n=9) dos isolados, sendo seis

provenientes de infecção e três de colonização (Tabela 2). Nenhum isolado apresentou os genes *magA* (gene associado a mucoviscosidade A e específico para o sorotipo capsular K1) e *rmpA* (regulador do fenótipo mucóide A), como também, não apresentaram o fenótipo hipermucoviscoso.

ERIC-PCR

Pela análise de ERIC-PCR foram encontrados 10 perfis genéticos diferentes entre os 19 isolados de *K. pneumoniae* analisados (Figura 1). O isolado K74-A3 (Alves et al., 2021) utilizado como cepa de referência por apresentar a variante *bla*_{NDM-7}, apresentou relação clonal (100% de similaridade) com os isolados K70-A3 (*bla*_{NDM-1}) e K75-A3 (*bla*_{NDM-7}), sendo chamado de perfil E10. O K75-A3 apresentou os mesmos genes de resistência e virulência do isolado K74-A3 (Alves et al., 2021), sendo diferentes quanto ao tipo de amostra, um proveniente de infecção (K74-A3) e outro de colonização (K75-A3) de pacientes diferentes, o intervalo na data da coleta foi de apenas dois dias e estavam em setores hospitalares distintos. Além disto, oito isolados foram relacionados com 100% de similaridade (perfil E2), no qual cinco destes isolados (K24, K27, K30, K34, K37) apresentaram os mesmo genes de resistência e virulência, e três destes (K30, K34, K37) diferiram apenas quanto ao perfil de resistência. O isolado K16 apresentou mais de 80% de similaridade com os isolados do perfil E2, compondo o perfil E2a (Tabela 2).

Figura 1. Dendrograma gerado a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR utilizando o software Darwin 6.0, ilustrando a relação entre os perfis dos 19 isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil. O isolado bacteriano K74-A3 (Alves et al., 2021) foi utilizado como cepa de referência para o gene bla_{NDM-7}.

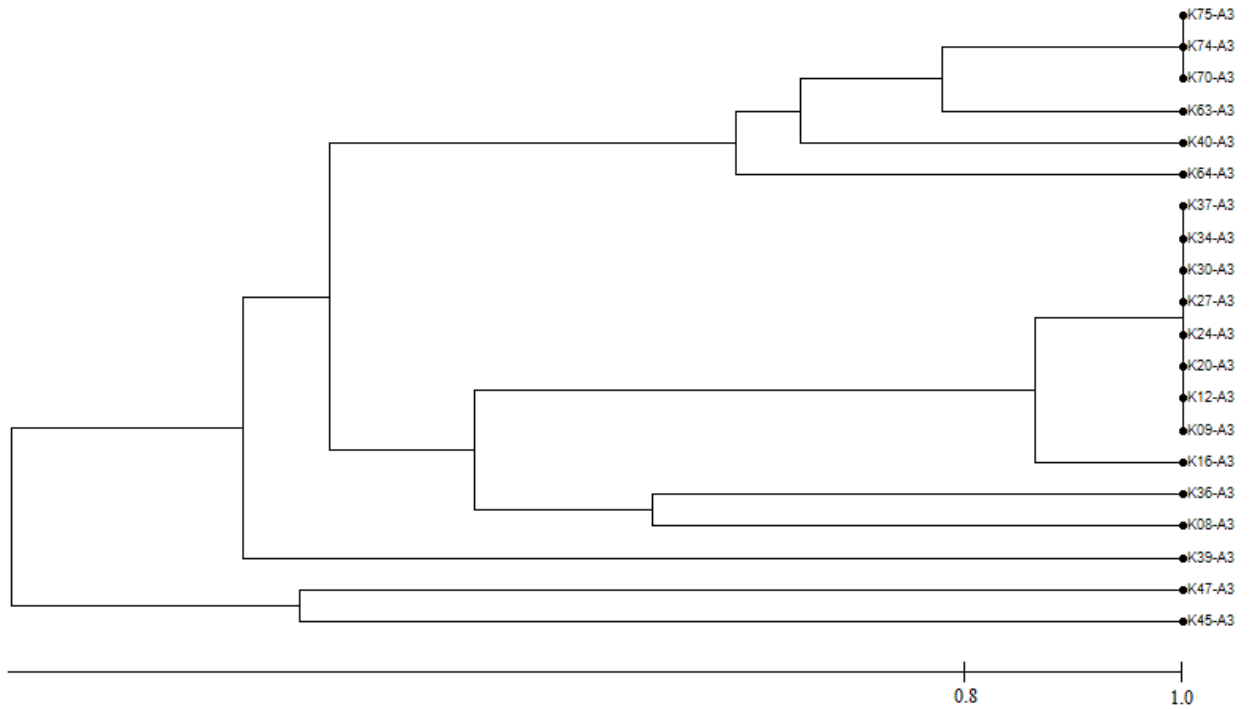


Tabela 2. Caracterização fenotípica, epidemiológica, genotípica e origem dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil.

Isolados	Data da Colheita	Tipo da Amostra	Setor Hospitalar	Genes de Virulência	Genes de Resistência	ERIC – PCR	Perfil de Resistência
K08-A3	11/10/2017	Urina	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E1	AMC; AMP; ATM; CFL; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K09-A3	14/11/2017	Sangue	EG	<i>wabG, cps, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K12-A3	29/11/2017	Sangue	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K16-A3	03/01/2018	Urina	Cardiologia	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{NDM}</i>	E2a	AMC; AMP; ATM; CFL; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT.
K20-A3	15/01/2018	Swab retal	UCO1	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CFL; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K24-A3	02/02/2018	Urina	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CFL; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K27-A3	15/02/2018	Urina	CM	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CFL; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K30-A3	20/02/2018	Sangue	UCO1	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; PIT; SUT.
K34-A3	09/03/2018	Swab retal	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K36-A3	15/03/2018	Swab retal	UCO2	<i>wabG, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E3	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K37-A3	09/03/2018	Swab retal	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E2	AMC; AMP; ATM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K39-A3	21/03/2018	Swab retal	Cardiologia	<i>wabG, cps, mrkD, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E4	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K40-A3	22/03/2018	Urina	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E5	AMC; AMP; ATM; CFL; COM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K45-A3	23/04/2018	Swab retal	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E6	AMI; AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; COL; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K47-A3	23/04/2018	Swab retal	UCO2	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E7	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT.

K63-A3	09/09/2018	Sangue	UCI (NEO)	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E8	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K64-A3	17/09/2018	Swab Retal	UCO 1	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E9	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K70-A3	17/09/2018	Swab Retal	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH, entB, irp2</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E10	AMC; AMP; ATM; CPM; CFO; CAZ; CRO; CRX; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.
K75-A3	09/11/2018	Swab Retal	UTI	<i>wabG, cps, mrkD, fimH entB</i>	<i>bla_{KPC}, bla_{NDM}</i>	E10	AMP; APS; CFZ; CPM; CFO; CAZ; CRO; CIP; ERT; GEN; IPM; LVX; MPM; PIT; SUT.

Notas: AMI, Amicacina; AMC, Amoxicilina-ácido clavulânico; AMP, Ampicilina; APS, Ampicilina-Sulbactam; ATM, Aztreonam; CFZ, Cefazolina; CPM, Cefepime; CFL, Cefalotina; CFO, Cefoxitina; CAZ, Ceftazidima; CRO, Ceftriaxona; CRX, Cefuroxima; CIP, Ciprofloxacina; CM, Clínica Médica; COL, Colistina; EG, Emergência Geral; ERT, Ertapenem; GEN, Gentamicina; IPM, Imipenem; LVX, Levofloxacina; MPM, Meropenem; PIT, Piperacilina-tazobactam; SUT, Trimetoprim-sulfametaxazol; UCI (NEO), Unidade Cuidados Intermediários Neonatal; UCO 1 e 2, Unidade Coronariana 1 e 2; UTI, Unidade de Terapia Intensiva.

DISCUSSÃO

Nova Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) e *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) pertencem aos dois principais grupos de carbapenemases produzidos pela maioria das cepas da ordem Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos. O primeiro relato da associação dos genes *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2} em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil foi no Rio de Janeiro em 2017 (AIRES et al., 2017). No entanto, é comum encontrar ambos os genes nas enterobactérias (PEREIRA et al., 2015; FIRMO et al., 2020; FLORES et al., 2020), aumentando a resistência dessas espécies bacterianas (FU et al., 2019). Todos os isolados de *K. pneumoniae* do presente estudo expressaram o fenótipo Multidroga Resistente (MDR), que pode ser justificado pela associação dos genes (*bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}) na maioria deles ~89,5% (n=17). Como também pela possível associação com outros mecanismos de resistência, como visto por Scavuzzi et al (2019).

Os antimicrobianos com melhor atividade contra isolados de *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{NDM} desse estudo foram amicacina e colistina, corroborando com um estudo anterior (OLIVEIRA et al., 2020). Apenas o isolado K45-A3 proveniente de colonização (swab retal) de um paciente da UTI demonstrou resistência aos fármacos acima citados, além da resistência aos carbapenêmicos. Este dado é preocupante, pois pacientes colonizados com *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos funcionam como reservatórios possibilitando a disseminação dessas cepas entre pacientes, além de favorecer a transferência horizontal de genes de resistência intra e interespecies. Essa forma de disseminação foi detectada em um estudo realizado em dois hospitais universitários no Irã, onde ocorreu a disseminação clonal de isolados de *K. pneumoniae* provenientes de colonização intestinal, alguns pacientes apresentaram colonização com mais de uma espécie de enterobactéria. Além de que alguns dos isolados envolvidos na disseminação co-albergavam as carbapenemases *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM-1} ou *bla*_{NDM-7} (SOLGI et al., 2017).

Neste estudo foi observada a disseminação clonal de cepas de *K. pneumoniae* portadoras do gene *bla*_{NDM-7} (perfil E10 pela ERIC-PCR) entre os pacientes de diferentes setores do hospital. Até onde sabemos este é o primeiro relato de *K. pneumoniae* proveniente de colonização albergando simultaneamente *bla*_{NDM-7} e *bla*_{KPC-2} no Brasil. O perfil genético E2 foi o grupo clonal com maior número de isolados e estava relacionado com a disseminação do gene *bla*_{NDM-1} no hospital de estudo. A presença destes clones representa um desafio terapêutico, limitando a antibioticoterapia, bem como aponta a necessidade de medidas preventivas adequadas de controle de infecções, a fim de se evitar sua disseminação para

outros hospitais e para a comunidade e até mesmo para outros países, devido às viagens internacionais (AL-MARZOOQ et al., 2015).

A associação de determinantes de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae* torna a bactéria ainda mais patogênica (TURTON et al., 2018; LIU et al., 2019). Todos os isolados deste estudo apresentaram os genes *wabG*, envolvido na síntese do lipopolissacarídeo (LPS) e *entB* que está relacionado a produção de enterobactina, considerado o sistema primário de absorção de ferro utilizado por *K. pneumoniae* (EL-FERTAS AISSANI et al., 2013). Um estudo realizado em cidades da Turquia também observou frequência semelhante do *wabG* em isolados de *K. pneumoniae* portadores do *bla_{NDM-1}* (CANDAN; AKSÖZ, 2015). O *wabG* é responsável por proteger as bactérias contra defesas humorais do hospedeiro, já foi visto que cepas de *K. pneumoniae* sem este gene tem modelos de infecções atenuados em camundongos, indicando que esse gene pode ser um marcador de virulência nesses isolados (JUNG et al., 2013; LLOBET et al., 2015).

Com relação ao *entB*, o estudo de Nava et al (2019) demonstrou sua presença, como também dos genes *fimH* e *mrkD* em todos os isolados de *K. pneumoniae* MDR ou extensivamente resistente a medicamentos (XDR) co-albergando *bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}*. No presente estudo, os genes *fimH* e *mrkD* também estavam presentes na maioria dos isolados de *K. pneumoniae* portadora de *bla_{NDM}*. A principal importância clínica das fímbrias tipo I (*fimH*) e tipo III (*mrkD*), está na adesão dos microrganismos em superfícies bióticas (primeiro passo no desenvolvimento de colonização e infecção) e abióticas (cateteres, tubos endotraqueais, equipamentos para ventilação de pacientes), além da formação de biofilme (STRUVE et al., 2009). Outro gene muito frequente nos isolados deste estudo foi o *cps* responsável pela produção de cápsula polissacarídica, que tem por função impedir a fagocitose e opsonização das bactérias por células imunológicas do hospedeiro, além de impedir a ação do sistema complemento e atenuar a ativação do sistema imune (PACZOSA et al., 2016).

Não foi observado nos dados do presente estudo diferença na distribuição de genes de virulência entre isolados de infecção e colonização, com exceção para o gene *irp2*, que foi mais frequente nos isolados provenientes de infecção, diferentemente do que foi encontrado em um estudo com isolados de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (*bla_{NDM-1}* e *bla_{KPC-2}*) envolvidas em surtos intra e inter-hospitalares provenientes de pacientes transplantados em Porto Alegre – RS, Brasil (RARO et al., 2020). A presença do gene *irp2* mais frequentemente encontrado nos isolados provenientes de infecção pode ser justificado pelo sideróforo Yersiniabactina está mais relacionado a infecções invasivas por permitir a

captação de ferro de proteínas de transporte do hospedeiro, potencializando a permanência do patógeno no organismo e facilitando sua disseminação e sobrevivência, corroborando com Holden e Bachman (2015).

Portanto, pode-se concluir que os isolados de *K. pneumoniae* portadores dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC-2}*, analisados nesse estudo, possuem um importante arsenal genético de virulência, inclusive a presença de genes com comprovada capacidade de aumentar a patogenicidade dessas bactérias como o gene *wabG* e *irp2*, relacionados a infecções mais graves e invasivas (JUNG et al., 2013; HOLDEN; BACHMAN, 2015; LLOBET et al., 2015). Destacando que esses genes estavam presentes não apenas nos isolados de infecção, mas também nos isolados de colonização (swab retal), o que pode favorecer o estabelecimento de infecções graves no paciente imunodeprimido, tornando-as intratáveis. Adicionalmente é preocupante a disseminação intra-hospitalar da variante *bla_{NDM-7}* e sua presença em um paciente colonizado, que pode servir como reservatório deste gene e possibilitar sua disseminação para outros hospitais e para a comunidade. Estes resultados alertam para a necessidade urgente de implantação de medidas preventivas e de controle de infecção hospitalar para evitar a disseminação dessas cepas virulentas e MDR impedindo surtos.

REFERÊNCIAS

AIRES, Caio Augusto Martins et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e01048-16, 2017.

AL-JAILAWI, Majid H.; ZEDAN, Tamara H.; JASSIM, Kifah A. Multiplex-PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 26, p. 112-7, 2014.

AL-MARZOOQ, Farah; NGEOW, Yun Fong; TAY, Sun Tee. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing dual carbapenemases (NDM-1 and OXA-232) and 16S rRNA methylase (*armA*) isolated from a Malaysian patient returning from India. **International journal of antimicrobial agents**, v. 45, n. 4, p. 445-446, 2015.

ALVES, Weverton de Oliveira et al. Emergence of *bla_{NDM-7}* and association with *bla_{KPC-2}*, *bla_{CTX-M15}*, *aac*, *aph*, *mph(A)*, *catB3* and virulence genes in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* with different plasmids in Brazil. **Braz J Microbiol** [submetido].

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais de infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017. Brasília 24 de abril de 2019. [Internet]. Disponível em:

https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude?category_id=189.

BRISSE, Sylvain et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, 2009.

CABRAL, Adriane Borges et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CANDAN, Esra Deniz; AKSÖZ, Nilüfer. *Klebsiella pneumoniae*: characteristics of carbapenem resistance and virulence factors. **Acta Biochimica Polonica**, v. 62, n. 4, 2015.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 2019.

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

EL FERTAS-AISSANI, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, n. 5, p. 209-216, 2013.

FANG, Chi-Tai et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 697-705, 2004.

FIRMO, Elza Ferreira 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**, v. 21, p. 255-261, 2020.

FLORES, Claudia et al. Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella pneumoniae* Co-occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, 2020.

FU, Li et al. Co-carrying of KPC-2, NDM-5, CTX-M-3 and CTX-M-65 in three plasmids with serotype O89: H10 *Escherichia coli* strain belonging to the ST2 clone in China. **Microbial pathogenesis**, v. 128, p. 1-6, 2019.

GUILVOUT, I. et al. High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5488-5504, 1993.

HENNEQUIN, Claire; FORESTIER, Christiane. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339-347, 2007.

HOLDEN, Victoria I.; BACHMAN, Michael A. Diverging roles of bacterial siderophores during infection. **Metallomics**, v. 7, n. 6, p. 986-995, 2015.

JUNG, Sung-Geun et al. Removal of pathogenic factors from 2, 3-butanediol-producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related *wabG* gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1997-2007, 2013.

LIU, Xin et al. Diversity and frequency of resistance and virulence genes in *bla*KPC and *bla*NDM co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 2819, 2019.

LLOBET, Enrique et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 46, p. E6369-E6378, 2015.

MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.

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

NAVA, Roseane Galdioli et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the *bla*NDM-1-encoding gene in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 101-103, 2019.

OLIVEIRA, Érica Maria de 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**, v. 53, 2020.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PEREIRA, Polyana Silva et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial drug resistance**, v. 21, n. 2, p. 234-236, 2015.

POIREL, Laurent et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934-936, 2011.

RARO, Otávio Hallal Ferreira et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC-2 or blaNDM-1. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1563, 2020.

SAHLY, H. et al. Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029-3034, 2008.

SANGER, Frederick et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **nature**, v. 265, n. 5596, p. 687, 1977.

SCAVUZZI, Alexsandra Maria Lima et al. Emergence of bla NDM-1 associated with the aac (6')-Ib-cr, acrB, cps, and mrkD genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SHRIVASTAVA, Saurabh RamBihariLal et al. World health organization releases global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics. **Journal of Medical Society**, v. 32, n. 1, p. 76, 2018.

SOLGI, H. et al. Molecular characterization of intestinal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among inpatients at two Iranian university hospitals: first report of co-production of bla NDM-7 and bla OXA-48. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, n. 11, p. 2127-2135, 2017.

STAHLHUT, Steen G. et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941-1950, 2009.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016-5024, 2009.

TURTON, Jane F. et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 5, p. 541-547, 2010.

TURTON, Jane F. et al. Virulence genes in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from the UK during 2016, including among carbapenemase gene-positive hypervirulent K1-ST23 and ‘non-hypervirulent’ types ST147, ST15 and ST383. **Journal of medical microbiology**, v. 67, n. 1, p. 118-128, 2018.

VIVAS, Roberto et al. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-and New Delhi metallo-beta-lactamase-positive *K. pneumoniae* in Sergipe, Brazil, and combination therapy as a potential treatment option. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, 2020.

WANG, Guoying et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 2020.

WU, Wenjing et al. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

WYRES, Kelly L.; HOLT, Kathryn E. *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria. **Current opinion in microbiology**, v. 45, p. 131-139, 2018.

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

YONG, Dongeun et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 20.

5.2 ARTIGO 2 (SHORT COMMUNICATION): EMERGÊNCIA DO bla_{NDM-7} E ASSOCIAÇÃO COM bla_{KPC-2}, bla_{CTX-M15}, aac, aph, mph(A), catB3 E GENES DE VIRULÊNCIA EM ISOLADO CLÍNICO DE *Klebsiella pneumoniae* PORTADOR DE DIFERENTES PLASMÍDEOS NO BRASIL.

INTRODUÇÃO

A Nova Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) confere resistência a todos os β -lactâmicos exceto ao aztreonam e desde seu primeiro relato em isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, tem sido identificada em vários países. A maior parte do transporte do bla_{NDM} ocorre através de plasmídeos conjugativos com uma variedade de replicons, que facilita sua rápida disseminação entre diferentes espécies (WU et al.,2019).

Até o momento, existem 24 variantes distintas de NDM com diferentes níveis de atividade enzimática (WU et al., 2019). Na Alemanha, foi relatado que transformantes de *E.coli* com o NDM-7 apresentaram valores de CIMs mais altos para β -lactâmicos quando comparados aos transformantes com NDM-1 (GOTTIG et al., 2013). Enquanto no Brasil, estudos do nosso grupo de pesquisa tem demonstrado a associação de diferentes mecanismos de resistência e virulência em isolados de *K. pneumoniae* portadores de *bla*_{NDM-1} (SCAVUZZI et al., 2019). Entretanto, anteriormente a variante *bla*_{NDM-7} não havia sido detectada no Brasil, apesar de estar disseminada em algumas regiões da Ásia. *K. pneumoniae* Multidroga Resistente (MDR) está frequentemente envolvido em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), e a alta frequência e diversidade dos fatores de resistência e virulência presentes em *K. pneumoniae* coproduzindo *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} tornam as cepas resistentes a vários antibióticos que limitam as opções terapêuticas (XIN et al., 2019; FIRMO et al., 2020). O objetivo deste estudo foi caracterizar fenotipicamente e geneticamente um isolado de *K. pneumoniae* MDR de um paciente com sepse em um hospital de Recife-PE, Brasil.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi analisado um isolado de *K. pneumoniae* (K74-A3) de um paciente do sexo feminino que foi admitida no setor de emergência geral de um hospital público de Recife-PE, Brasil, em 08/10/2018. O isolado foi selecionado para o estudo por está envolvido em sepse e ser MDR, apresentando resistência a todos os β -lactâmicos. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados através do sistema automatizado BD PhoenixTM. A cultura foi preservada em glicerol a 20% a -70°C. A susceptibilidade a várias classes de antimicrobianos: Amicacina; Ampicilina; Ampicilina-Sulbactam; Cefazolina; Cefepime; Cefoxitina; Ceftazidima; Ceftriaxona; Ciprofloxacina; Colistina; Ertapenem; Gentamicina; Imipenem; Levofloxacina; Meropenem; Piperacilina-tazobactam; Tigeciclina e Trimetoprim-sulfametaxazol foi interpretada de acordo com os critérios do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2019).

O DNA genômico do isolado K74-A3 foi extraído usando o kit Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega). Os genes que codificam resistência aos carbapenêmicos (*bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}) e os genes de virulência (*magA*, *rmpA*, *fimH*, *mrkD*, *irp2* e *cps*) foram investigados por PCR. A descrição dos primers e condições de amplificação utilizadas são apresentadas na

(Tabela 1). Controles negativos e positivos foram incluídos em cada PCR. Os produtos amplificados foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1%.

Tabela 1. Primers utilizados na PCR e sequenciamento do produto de PCR para detecção de genes de resistência, virulência e IncS no isolado de *K. pneumoniae*.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Temp. ^(a)	Tamanho do amplicon (bp) ^(b)	Referência
bla_{NDM}	NDM-F NDM-R	GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC CGGAATGGCTCATCACGATC	52°C	439	Poirel <i>et al</i> 2011
bla_{KPC}	KPC-1a KPC-1b	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	800	Yigit <i>et al</i> 2001
Cps	cps -F cps -R	TCCCAATTGTGACCGAAATC GCTCGCGGCACCAGCTGA	63°C	437	Hennequin and Forestier 2007
magA	magA-F magA-R	GGTGCTCTTTACATCATTGC GCAATGGCCATTTGCGTTAG	54°C	1283	Turton <i>et al</i> 2010
rmpA	rmpA -F rmpA -R	ACTGGGCTACCTCTGCTTCA CTTGCATGAGCCATCTTTCA	54°C	536	Al-jailawi <i>et al</i> 2014
wabG	wabG- F wabG-R	CGGACTGGCAGATCCATATC ACCATCGGCCATTTGATAGA	53°C	683	Brisse <i>et al</i> 2009
fimH	fim-H F fim-H R	TCCACAGTCGCCAACGCTTC GCTCAGAATCAACATCGGTAAC	62°C	903	Stahlhut <i>et al</i> 2009
mrkD	mrkD- F mrkD- R	CCACCAACTATTCCCTCGAA ATGGAACCCACATCGACATT	60°C	226	Sahly <i>et al</i> 2008
irp2	irp2 F irp2 R	ATTTCTGGCGCACCATCT GCGCCGGGTATTACGGACTTC	65°C	1000	Guilvout <i>et al</i> 1993
entB	entB- F entB -R	ATTTCTCAACTTCTGGGGC AGCATCGGTGGCGGTGGTCA	57°C	371	El Fertas Aissani <i>et al</i> 2013

(a) Temp, temperatura de anelamento; (b) pares de base.

Os amplicons foram purificados usando o ReliaPrep™ DNA Clean-Up and Concentration System (Promega). Em seguida, foram quantificados em NanoDrop e sequenciados. As sequências foram analisadas usando o software Chromas e comparadas às sequências depositadas nos bancos de dados GenBank. Após a comparação do BLAST, as sequências de nucleotídeos foram traduzidas em proteínas usando a ferramenta Translation Map (http://www.bioinformatics.org/sms2/trans_map.html).

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit de extração plasmidial PureYield Plasmid Miniprep System (Promega). O DNA plasmidial extraído foi quantificado em Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). As

bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina) e quantificadas através da qPCR. O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento Miseq (Illumina). Os dados foram processados com a ferramenta Trimmomatic e as montagens de *novo* foram realizadas com a ferramenta Velvet. As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando software Artemis Sanger. Para a observação dos genes de resistência foi utilizada a plataforma *Resfinder* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) e para determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial o banco de dados *Plasmidfinder* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>).

RESULTADOS

O isolado K74-A3 exibiu resistência a todos os fármacos testados, exceto a amicacina, colistina e tigeciclina (**Tabela 2**). As análises de PCR e sequenciamento dos amplicons demonstraram a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-7} e dos genes de virulência *cps*, *mrkD*, *fimH*. Os genes *magA*, *rmpA* e *irp2* não foram encontrados. O sequenciamento revelou mutações pontuais no gene *bla*_{NDM} nas posições 388 (G → A) e 460 (A → C) configurando o gene *bla*_{NDM-7}. A sequência de nucleotídeos foi depositada no GenBank, sob o número de acesso: **MW036197**.

Tabela 2. Caracterização fenotípica, genotípica e origem do isolado clínico K74-A3 proveniente de Recife-PE, Brasil.

Identificação/ Data da coleta (dd/mm/aaaa)	Fonte de isolamento/ Seção	Genes de Virulência	Inc Grupos	Perfil de Resistência				Genes de Resistência (Provável relação descrita na literatura)
				Grupo Farmacológico	Antimicrobianos	MIC (mg/L)	Interpre- tação	
K74-A3/ (07/11/2018)	Sangue/ EG	<i>cps</i> <i>wabG</i> <i>fimH</i> <i>mrkD</i> <i>entB</i>	IncX3 IncFIB IncQ1 ColRNAI ColpVC	Aminoglicosídeos	Gentamicina	>8	R	<i>aac(3)-IVa</i> <i>aph(3')-Ia</i> <i>aph(4)-Ia</i> <i>aac(6')ib-cr</i>
				Cefalosporina	Cefazolina	>8	R	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{KPC-2}</i> <i>bla_{NDM-7}</i>
					Cefepime	>16	R	
					Cefoxitina	>16	R	
					Ceftazidima	>16	R	
					Ceftriaxona	>4	R	
				Carbapenênicos	Imipenem	>8	R	<i>bla_{KPC-2}</i> <i>bla_{NDM-7}</i>
					Meropenem	>32	R	
					Ertapenem	>1	R	
				Penicilinas	Ampicilina	>16	R	<i>bla_{CTX-M-15}</i> <i>bla_{KPC-2}</i> <i>bla_{NDM-7}</i>
					Ampicilina-Sulbactam	>16/8	R	
					Piperacilina-tazobactam	>64/4	R	
				Fluoroquinolonas	Levofloxacin	>4	R	<i>aac(6')ib-cr</i>
					Ciprofloxacina	>2	R	
				Sulfonamida	Sulfametoxazol-trimetoprim	>2/38	R	ND
				Macrolídeos	ND	ND	ND	<i>mph(A)</i>
				Fenicol	ND	ND	ND	<i>catB3</i>

EG-Emergência Geral; R-Resistência; ND-Não determinado.

O sequenciamento total do DNA plasmidial do K74-A3 mostrou tamanho de 123.132 pb, com 102 contigs, 133 CDS (sequência de codificação) e média de 50.97% de GC (guanina e citosina). Adicionalmente foram observados cinco diferentes plasmídeos identificados como: IncX3, IncQ1, IncFIB, ColRNAI, ColpVC, como também os genes de resistência *bla_{CTX-M15}*, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*, *aac(6')ib-cr*, *mph(A)* e *catB3*, além de confirmar a presença do gene *bla_{NDM-7}*, seu ambiente genético é mostrado na **Figura 1(a)**.

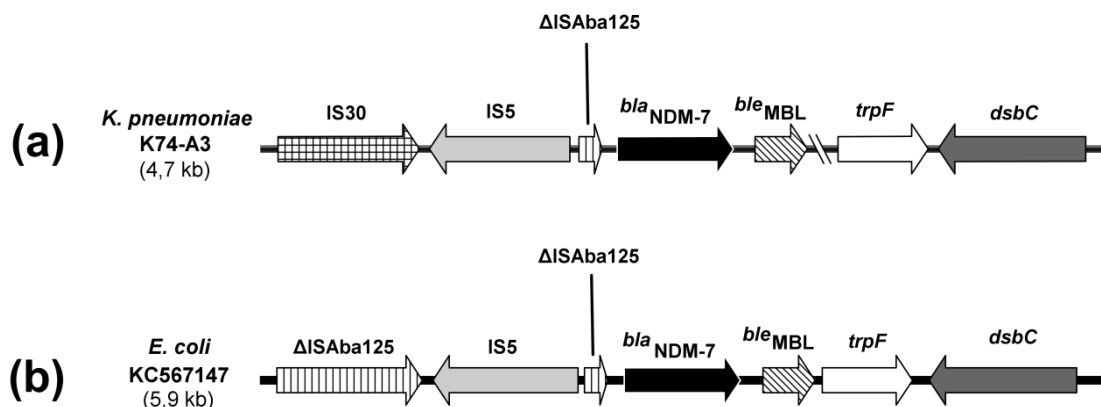


Figura 1. Representação esquemática do ambiente genético de *bla*_{NDM-7}. (a) Sequência do ambiente genético (4,7kb) do isolado K74-A3 do presente estudo. Nesta o *bla*_{NDM-7} é representado em preto, upstream estão a sequência de inserção Δ ISAba125 interrompida pela inserção de IS5, que resulta em uma transposase truncada, seguida de IS5 e IS30, sequências de inserção 5 e 30 respectivamente. Downstream estão o *ble*_{MBL} gene que codifica uma proteína de resistência a bleomicina; *trpF*, gene que codifica suposta isomerase fosforibosilantranilato e *dsbC*, gene que codifica uma proteína da superfamília oxiredutase DcbC. (b) Sequência do ambiente genético (5,9 kb) de *E. coli* que alberga o *bla*_{NDM-7} no IncX3 (KC567147) (Gottig et al., 2013). As linhas verticais representam lacunas que esquematizam o término de um contig e o início de outro contig.

DISCUSSÃO

O primeiro relato do NDM-7 foi descrito na França em 2012, em um isolado de *E. coli* recuperado de uma mulher com repetidas infecções no trato urinário com histórico de viagem para Myanmar (Ásia) (CUZON et al., 2013). Desde então, o *bla*_{NDM-7} tem emergido em países como Austrália, Filipinas, Japão, Coréia do Sul, China, Mianmar, Nepal, Índia, Emirados Árabes Unidos, Gabão, Alemanha, França, Espanha e Canadá (MIZUNO et al., 2014; CHEN et al., 2016; WANG et al., 2016; MOUSSOUNDA et al., 2017; RAGUPATHI et al., 2017; PÉREZ-VÁZQUEZ et al., 2019; Sugawara et al., 2019; WU et al., 2019).

No Brasil, Silva *et al* (2019), identificaram a presença do *bla*_{NDM-1} em todos os isolados (n= 81) de diferentes espécies bacterianas provenientes de vários estados. Esta disseminação somada à ausência de detecção prévia de outras variantes levaram esse estudo a sugerir a predominância do *bla*_{NDM-1} no país, também foi observado que a *K. pneumoniae* foi a espécie bacteriana produtora de *bla*_{NDM-1} mais frequente e a disseminação deste gene no Brasil não parece estar relacionada a expansão clonal desta bactéria (AIRES et al., 2017). No presente estudo, através do sequenciamento plasmidial do isolado de *K. pneumoniae* foi visto a presença da variante *bla*_{NDM-7} situada em um ambiente genético semelhante ao determinado no isolado de *E. coli* albergando o *bla*_{NDM-7} no plasmídeo incX3 auto transferível proveniente

da Alemanha (GOTTIG et al., 2013). O IncX3 parece ser o tipo mais comum de plasmídeo portador do *bla*_{NDM} (WU et al., 2019), levando a acreditar em sua participação na aquisição e mobilidade desta variante emergente no país.

O perfil MDR encontrado neste estudo em K74-A3 pode ser justificado pela associação de diferentes β -lactamases (*bla*_{NDM-7}, *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M15}), genes de resistência a aminoglicosídeos (*aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia* e *aph(4')-Ia*) e quinolonas (*aac(6')ib-cr*), além do acúmulo de diferentes plasmídeos (IncX3, Q1, IncFIB, ColRNAI e ColpVC). Isolados bacterianos causando um surto em Madri na Espanha também apresentaram vasto arsenal genético de resistência (PÉREZ-VÁZQUEZ et al., 2019). De notável interesse todos possuíam a variante *bla*_{NDM-7} no plasmídeo IncX3, sendo a maioria *K. pneumoniae*, apenas um desses isolados era *E. coli*, sugerindo o compartilhamento deste plasmídeo entre as espécies. Um estudo realizado no Canadá também indicou a transferência horizontal do IncX3 com *bla*_{NDM-7} entre diferentes *Enterobacteriaceae*, curiosamente um dos pacientes havia viajado recentemente para Índia (local endêmico) (CHEN et al., 2016).

Além da coprodução dos genes *bla*_{NDM-7} e *bla*_{KPC-2}, o isolado K74-A3 também possui diferentes fatores de virulência, que podem tornar a bactéria mais patogênica devido às seguintes capacidades: prevenção da fagocitose devido à produção da cápsula (*cps*), proteção contra defesas humorais pela ação de lipopolissacarídeo (*wabG*), adesão em superfícies abióticas e formação de biofilme devido à presença de fímbrias tipo I e III (*fimH* e *mrkD*) e aquisição de ferro do meio por secreção de enterobactina (*entB*), aumentando assim a permanência do patógeno in vivo (PACZOSA; MECSAS 2016). Achados semelhantes foram observados por Pérez-Vázquez et al 2019.

CONCLUSÃO

A emergência da variante *bla*_{NDM-7} no isolado de *K. pneumoniae*, juntamente com os genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M15}, *aac(3)-IVa*, *aph(3')-Ia*, *aph(4)-Ia*, *aac(6')ib-cr*, *emph(A)*, *catB3* e dos plasmídeos IncX3, IncFIB, IncQ1, ColRNAI e ColpVC, mostram o potencial de mutação genética relacionada à resistência nessa espécie bacteriana. Adicionalmente, o surgimento de *bla*_{NDM-7} no Brasil representa uma ameaça aos pacientes e sistemas de saúde, limitando ainda mais as opções terapêuticas, além de favorecer a disseminação desse gene no Brasil, como também para outros países, devido ao papel de viagens intercontinentais. Desta forma, medidas eficazes de controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por bactérias portadoras de *bla*_{NDM} devem ser tomadas, evitando a disseminação desse gene e dessas bactérias MDR.

REFERÊNCIAS

- AIRES, Caio Augusto Martins et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, 2017.
- AL-JAILAWI, Majid H.; ZEDAN, Tamara H.; JASSIM, Kifah A. Multiplex-PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 26, n. 1, p. 112-7, 2014.
- BRISSE, Sylvain et al. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, p. e4982, 2009.
- CHEN, L. et al. Molecular characterization by using next-generation sequencing of plasmids containing blaNDM-7 in Enterobacteriaceae from Calgary, Canada. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1258-1263, 2016.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2019) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twentieth-nine Information Supplement M100 CLSI, Wayne, PA, USA.
- CUZON, Gaelle; BONNIN, Remy A.; NORDMANN, Patrice. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61322, 2013.
- DA SILVA, Isadora Rodrigues et al. Distribution of clinical NDM-1-producing Gram-negative bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394-399, 2019.
- EL FERTAS-AISSANI, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, n. 5, p. 209-216, 2013.
- FIRMO, Elza Ferreira 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**, v. 21, p. 255-261, 2020.
- GÖTTIG, Stephan et al. Detection of NDM-7 in Germany, a new variant of the New Delhi metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 8, p. 1737-1740, 2013.
- GUILVOUT, I. et al. High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. **Journal of Bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5488-5504, 1993.
- HENNEQUIN, Claire; FORESTIER, Christiane. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339-347, 2007.
- LIU, Xin et al. Diversity and frequency of resistance and virulence genes in blaKPC and blaNDM co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. **Infection and drug resistance**, v. 12, p. 2819, 2019.

MIZUNO, Yasutaka; YAMAGUCHI, Tetsuo; MATSUMOTO, Tetsuya. A first case of New Delhi metallo- β -lactamase-7 in an *Escherichia coli* ST648 isolate in Japan. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 20, n. 12, p. 814-816, 2014.

MOUSSOUNDA, Mesmin et al. Emergence of blaNDM-7–Producing Enterobacteriaceae in Gabon, 2016. **Emerging infectious diseases**, v. 23, n. 2, p. 356, 2017.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PÉREZ-VÁZQUEZ, María et al. Emergence of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Spain: phylogeny, resistome, virulence and plasmids encoding bla NDM-like genes as determined by WGS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 12, p. 3489-3496, 2019.

POIREL, Laurent et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934-936, 2011.

RAGUPATHI, NK Devanga et al. First Indian report of IncX3 plasmid carrying blaNDM-7 in *Escherichia coli* from bloodstream infection: potential for rapid dissemination. **New microbes and new infections**, v. 17, p. 65-68, 2017.

SAHLY, H. et al. Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029-3034, 2008.

SCAVUZZI, Alessandra Maria Lima et al. Emergence of bla NDM-1 associated with the aac (6')-Ib-cr, acrB, cps, and mrkD genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

STAHLHUT, Steen G. et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941-1950, 2009.

SUGAWARA, Yo et al. Spreading patterns of NDM-producing Enterobacteriaceae in clinical and environmental settings in Yangon, Myanmar. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 63, n. 3, 2019.

TURTON, Jane F. et al. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 5, p. 541-547, 2010.

WANG, Lian-hui et al. Clinical isolates of uropathogenic *Escherichia coli* ST131 producing NDM-7 metallo- β -lactamase in China. **International journal of antimicrobial agents**, v. 48, n. 1, p. 41-45, 2016.

WU, Wenjing et al. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, 2019.

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

6 CONCLUSÕES

- Este é o primeiro estudo que relata a presença da variante *bla*_{NDM-7} em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de infecção e colonização no Brasil. Isto mostra o potencial de mutação genética relacionada à resistência nessa espécie bacteriana, como também, a importância da adoção de medidas de controle de infecções (cultura de vigilância, higienização das mãos, isolamento de contato e uso racional dos antimicrobianos) a fim de se evitar a disseminação desse gene e dessas bactérias MDR;
- Foi observada a disseminação clonal de dois grupos de *K. pneumoniae* em diferentes setores do hospital de estudo e entre pacientes colonizados e infectados, esse dado mostra a capacidade de disseminação destes isolados entre os pacientes hospitalizados, sendo necessário o desenvolvimento de estratégias que possam reduzir a entrada e propagação de enterobactérias resistentes nos hospitais e UTIs;
- O vasto arsenal de virulência (*cps*, *wabG*, *fimH*, *mrkD*, *entB* e *irp2*) observado em isolados de *K. pneumoniae* coproduzindo *bla*_{NDM-1} e *bla*_{KPC-2}, provenientes tanto de infecção como de colonização, pode aumentar a patogenicidade dessas bactérias e potencializar infecções graves tornando-as invasivas e intratáveis;
- Este estudo confirma a coprodução de *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC} em *K. pneumoniae* com diferentes plasmídeos (IncX3, Q1, IncFIB, ColRNAI e ColpVC) em Recife-PE. A presença destes genes e plasmídeos em isolados provenientes tanto de infecção quanto de colonização mostram o acúmulo de genes de resistência aos carbapenêmicos, como também o potencial da transmissão desses plasmídeos entre diferentes isolados bacterianos.

6.1 DIVULGAÇÃO DOS DADOS OBTIDOS

A presença dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} detectada por PCR nos 20 isolados de *K. pneumoniae* analisados nesse estudo, bem como a relação clonal pela ERIC-PCR, técnicas não realizadas nos hospitais, foram divulgadas periodicamente ao laboratório de análises clínicas e a CCIH do hospital público em estudo, para conhecimento do perfil molecular dessas bactérias e a adoção de medidas de prevenção e controle da resistência bacteriana. Os dados desse estudo também serão divulgados através da publicação de dois artigos científicos em periódicos indexados.

REFERÊNCIAS

- AIRES, Caio Augusto Martins et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 4, p. e01048-16, 2017.
- AL-JAILAWI, Majid H.; ZEDAN, Tamara H.; JASSIM, Kifah A. Multiplex-PCR assay for identification of *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Pharm Sci Rev Res**, v. 26, p. 112-7, 2014.
- AL-MARZOOQ, Farah; NGEOW, Yun Fong; TAY, Sun Tee. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* producing dual carbapenemases (NDM-1 and OXA-232) and 16S rRNA methylase (armA) isolated from a Malaysian patient returning from India. **International journal of antimicrobial agents**, v. 4, n. 45, p. 445-446, 2015.
- ALMEIDA, A. C. et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing blaKPC-2. **International journal of antimicrobial agents**, v. 42, n. 4, p. 369-370, 2013.
- AMBLER, Richard P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.
- ANDERSON, E. S. et al. Clonal distribution of resistance plasmid-carrying *Salmonella typhimurium*, mainly in the Middle East. **Epidemiology & Infection**, v. 79, n. 3, p. 425-448, 1977.
- ANDRADE, Leonardo Neves; DARINI, Ana Lúcia Costa. Bacilos gram-negativos produtores de beta-lactamases: que bla bla bla é esse?. **Journal of Infection Control**, v. 6, n. 1, p. 16-25, 2017.
- ANVISA - **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 17: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2017. Brasília, 24 de abril de 2019. [Internet]. Disponível em: https://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/index.php/publicacoes/item/boletim-seguranca-do-paciente-e-qualidade-em-servicos-de-saude?category_id=189.
- AZEVEDO, S.M.M. **Farmacologia dos Antibióticos Betalactâmicos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014
- BACH, Sandrine; DE ALMEIDA, Alzira; CARNIEL, Elisabeth. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. **FEMS microbiology letters**, v. 183, n. 2, p. 289-294, 2000.
- BACHMAN, Michael A. et al. Interaction of lipocalin 2, transferrin, and siderophores determines the replicative niche of *Klebsiella pneumoniae* during pneumonia. **MBio**, v. 3, n. 6, p. e00224-11, 2012.

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

BAKHSHI, Bitá; AFSHARI, Nasim; FALLAH, Fatemeh. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as a reliable evidence for suspected Shigella spp. outbreaks. **brazilian journal of microbiology**, v. 49, n. 3, p. 529-533, 2018.

BALM, M. N. D. et al. Emergence of Klebsiella pneumoniae co-producing NDM-type and OXA-181 carbapenemases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 9, p. E421-E423, 2013.

BARGUIGUA, Abouddihaj et al. First report of a K lebsiella pneumoniae strain coproducing NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in M orocco. **Apmis**, v. 121, n. 7, p. 675-677, 2013.

BEHZADI, P.; BEHZADI, E. Environmental microbiology. 2007.

BI, Dexi et al. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a 'resistance-disarmed' model organism. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 10, p. 2770-2774, 2015.

BIEDENBACH, D. et al. Dissemination of NDM metallo- β -lactamase genes among clinical isolates of Enterobacteriaceae collected during the SMART global surveillance study from 2008 to 2012. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 826-830, 2015.

BORER, Abraham et al. Risk factors for developing clinical infection with carbapenem-resistant Klebsiella pneumoniae in hospital patients initially only colonized with carbapenem-resistant K pneumoniae. **American journal of infection control**, v. 40, n. 5, p. 421-425, 2012.

BREILH, Dominique et al. Carbapenems. **Journal of Chemotherapy**, v. 25, n. 1, p. 1-17, 2013.

BRISSE, Sylvain et al. Virulent clones of Klebsiella pneumoniae: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. **PloS one**, v. 4, n. 3, 2009.

BRISSE, Sylvain et al. wzi gene sequencing, a rapid method for determination of capsular type for Klebsiella strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 12, p. 4073-4078, 2013.

BRISSE, Sylvain; GRIMONT, Francine; GRIMONT, Patrick AD. The genus klebsiella. **The Prokaryotes: Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass**, p. 159-196, 2006.

BRUNTON, Laurence L.; KNOLLMANN, Björn C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman-13**. Artmed Editora, 2018.

BUSH, Karen. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1277, n. 1, p. 84-90, 2013.

BUSH, Karen; JACOBY, George A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.; MEDEIROS, Antone A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

CABRAL, Adriane Borges et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 1, p. 70-77, 2017.

CABRAL, Adriane Borges et al. Detection of bla KPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 94-95, 2015.

CABRAL, Adriane Borges et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CABRAL, Adriane Borges et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CAI, Shanshan et al. Both TRIF-and MyD88-dependent signaling contribute to host defense against pulmonary *Klebsiella* infection. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 10, p. 6629-6638, 2009.

CARATTOLI, Alessandra et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of microbiological methods**, v. 63, n. 3, p. 219-228, 2005.

CARRARA-MARRONI, Floristher Elaine et al. Emergence and spread of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in a Brazilian teaching hospital. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 3, n. 4, p. 304, 2015.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CASSETTARI, Valéria C. et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **Jornal de pediatria**, v. 82, n. 4, p. 313-316, 2006.

CATALÁN-NÁJERA, Juan Carlos; GARZA-RAMOS, Ulises; BARRIOS-CAMACHO, Humberto. Hypervirulence and hypermucoviscosity: two different but complementary *Klebsiella* spp. phenotypes?. **Virulence**, v. 8, n. 7, p. 1111-1123, 2017.

CERDEIRA, Louise T. et al. Small IncQ1 and Col-like plasmids harboring blaKPC-2 and non-Tn4401 elements (NTEKPC-IIId) in high-risk lineages of *Klebsiella pneumoniae* CG258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02140-18, 2019.

CERQUEIRA, Gustavo C. et al. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. 1135-1140, 2017.

CHEN, Liang et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 12, p. 686-696, 2014.

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

CHEN, Zhongju et al. First report in China of Enterobacteriaceae clinical isolates coharboring bla NDM-1 and bla IMP-4 drug resistance genes. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 167-170, 2015.

CHENG, H. Y. et al. RmpA regulation of capsular polysaccharide biosynthesis in *Klebsiella pneumoniae* CG43. **Journal of bacteriology**, v. 192, n. 12, p. 3144-3158, 2010.

CHMELNITSKY, Inna et al. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene blaKPC-2 carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 8, p. 2962-2965, 2008.

CHO, Sun Young et al. *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-5 and OXA-181 carbapenemases, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 21, n. 6, p. 1088, 2015.

CHUANG, Yi-Ping et al. Genetic determinants of capsular serotype K1 of *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. **The Journal of infectious diseases**, v. 193, n. 5, p. 645-654, 2006.

CLEGG, Steven; MURPHY, Caitlin N. Epidemiology and virulence of *Klebsiella pneumoniae*. **Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management**, p. 435-457, 2017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. **CLSI supplement M100**, 2019.

CRESS, Brady F. et al. Masquerading microbial pathogens: capsular polysaccharides mimic host-tissue molecules. **FEMS microbiology reviews**, v. 38, n. 4, p. 660-697, 2014.

DA SILVA, Isadora Rodrigues et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394-399, 2019.

DASH, Nihar et al. High incidence of New Delhi metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Sharjah, United Arab Emirates. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 1, p. 52-56, 2014.

DI PILATO, Vincenzo et al. Complete genome sequence of the first KPC-type carbapenemase-positive *Proteus mirabilis* strain from a bloodstream infection. **Genome Announc.**, v. 4, n. 3, p. e00607-16, 2016.

DOI, Yohei et al. Co-production of NDM-1 and OXA-232 by *Klebsiella pneumoniae*. **Emerging infectious diseases**, v. 20, n. 1, p. 163, 2014.

DOMENICO, Philip et al. Polysaccharide capsule-mediated resistance to opsonophagocytosis in *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 62, n. 10, p. 4495-4499, 1994.

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

DWORKIN, M. et al. *The Prokaryotes Ecophysiological and Biochemical Aspects*, vol. 2. 2006.

EILERTSON, Brandon et al. CG258 *Klebsiella pneumoniae* isolates without β -lactam resistance at the onset of the carbapenem-resistant Enterobacteriaceae epidemic in New York City. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 74, n. 1, p. 17-21, 2019.

EL FERTAS-AISSANI, R. et al. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie**, v. 61, n. 5, p. 209-216, 2013.

FANG, Chi-Tai et al. A novel virulence gene in *Klebsiella pneumoniae* strains causing primary liver abscess and septic metastatic complications. **Journal of Experimental Medicine**, v. 199, n. 5, p. 697-705, 2004.

FANG, Chi-Tai et al. The function of *wzy_K1* (*magA*), the serotype K1 polymerase gene in *Klebsiella pneumoniae* *cps* gene cluster. 2010.

FANG, Renchi et al. Difference in biofilm formation between carbapenem-resistant and carbapenem-sensitive *Klebsiella pneumoniae* based on analysis of *mrkH* distribution. **Microbial Pathogenesis**, v. 152, p. 104743, 2021.

FERNANDES, R.; AMADOR, P. E PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**. v.24, p.7-17, 2013.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: an unsolvable problem? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.

FIRMO, Elza Ferreira 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**, v. 21, p. 255-261, 2020.

FIRMO, Elza Ferreira et al. In vitro activity of polymyxin B in combination with meropenem, amikacin and gentamicin against *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates coharboring AMEs, *bla*NDM-1 and *bla*KPC-2. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, 2020.

FIRON, N.; OFEK, I.; SHARON, N. Carbohydrate-binding sites of the mannose-specific fimbrial lectins of enterobacteria. **Infection and immunity**, v. 43, n. 3, p. 1088-1090, 1984.

FISCHBACH, Michael A. et al. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 44, p. 16502-16507, 2006.

FRIEDLÄNDER, Carl. Ueber die Schizomyceten bei der acuten fibrösen Pneumonie. **Virchows Archiv**, v. 87, n. 2, p. 319-324, 1882.

GAGETTI, Paula et al. Resistance to β -lactams in enterococci. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 51, n. 2, p. 179-183, 2019.

GERLACH, Gerald-F.; CLEGG, STEVEN; ALLEN, BRADLEY L. Identification and characterization of the genes encoding the type 3 and type 1 fimbrial adhesins of *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 171, n. 3, p. 1262-1270, 1989.

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

GNIADEK, Thomas J.; CARROLL, Karen C.; SIMNER, Patricia J. Carbapenem-resistant non-glucose-fermenting Gram-negative bacilli: the missing piece to the puzzle. **Journal of clinical microbiology**, v. 54, n. 7, p. 1700-1710, 2016.

GOMEZ, Sonia A. et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1520-1524, 2011.

GUILVOUT, I. et al. High-molecular-weight protein 2 of *Yersinia enterocolitica* is homologous to AngR of *Vibrio anguillarum* and belongs to a family of proteins involved in nonribosomal peptide synthesis. **Journal of bacteriology**, v. 175, n. 17, p. 5488-5504, 1993.

HANSEN, Dennis S. et al. *Klebsiella pneumoniae* lipopolysaccharide O typing: revision of prototype strains and O-group distribution among clinical isolates from different sources and countries. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 1, p. 56-62, 1999.

HANTKE, K. et al. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 7, p. 3677-3682, 2003.

HENNEQUIN, C.; ROBIN, F. Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 35, n. 3, p. 333-341, 2016.

HENNEQUIN, Claire; FORESTIER, Christiane. Influence of capsule and extended-spectrum beta-lactamases encoding plasmids upon *Klebsiella pneumoniae* adhesion. **Research in microbiology**, v. 158, n. 4, p. 339-347, 2007.

HENRIKSEN, Anne Santerre; SMART, Jennifer I.; HAMED, Kamal. Susceptibility to ceftibiprole of respiratory-tract pathogens collected in the United Kingdom and Ireland during 2014–2015. **Infection and Drug Resistance**, v. 11, p. 1309, 2018.

HOLT, Kathryn E. et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 27, p. E3574-E3581, 2015.

HORNICK, DOUGLAS B. et al. Adherence to respiratory epithelia by recombinant *Escherichia coli* expressing *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial gene products. **Infection and immunity**, v. 60, n. 4, p. 1577-1588, 1992.

HSIEH, Pei-Fang et al. Serum-induced iron-acquisition systems and TonB contribute to virulence in *Klebsiella pneumoniae* causing primary pyogenic liver abscess. **Journal of Infectious Diseases**, v. 197, n. 12, p. 1717-1727, 2008.

HSU, Chun-Ru et al. The role of *Klebsiella pneumoniae* rmpA in capsular polysaccharide synthesis and virulence revisited. **Microbiology**, v. 157, n. 12, p. 3446-3457, 2011.

IVERSEN, Carol et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. **BMC evolutionary biology**, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2007.

IZQUIERDO, Luis et al. The *Klebsiella pneumoniae* wabG gene: role in biosynthesis of the core lipopolysaccharide and virulence. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 24, p. 7213-7221, 2003.

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

JEONG, Seok Hoon et al. Clonal and horizontal spread of the blaOXA-232 gene among Enterobacteriaceae in a Korean hospital. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 82, n. 1, p. 70-72, 2015.

JUNG, Sung-Geun et al. Removal of pathogenic factors from 2, 3-butanediol-producing *Klebsiella* species by inactivating virulence-related wabG gene. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 97, n. 5, p. 1997-2007, 2013.

KAZI, M. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae at a tertiary care laboratory in Mumbai. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 3, p. 467-472, 2015.

KILIC, Abdullah; BAYSALLAR, Mehmet. The first *Klebsiella pneumoniae* isolate co-producing OXA-48 and NDM-1 in Turkey. **Annals of laboratory medicine**, v. 35, n. 3, p. 382-383, 2015.

KLIN, Kimberly A. et al. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 6, p. 580-592, 2009.

KNAPP, Sylvia et al. Toll-like receptor 2 plays a role in the early inflammatory response to murine pneumococcal pneumonia but does not contribute to antibacterial defense. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 5, p. 3132-3138, 2004.

KOLLEF, Marin H. Prevention of hospital-associated pneumonia and ventilator-associated pneumonia. **Critical care medicine**, v. 32, n. 6, p. 1396-1405, 2004.

KUMARASAMY, Karthikeyan K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 597-602, 2010.

KUNTAMAN, Kuntaman et al. Occurrence and characterization of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli: A collaborative study of antibiotic-resistant bacteria between Indonesia and Japan. **International Journal of Urology**, v. 25, n. 11, p. 966-972, 2018.

LAWLOR, Matthew S. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* virulence determinants using an intranasal infection model. **Molecular microbiology**, v. 58, n. 4, p. 1054-1073, 2005.

LAWLOR, Matthew S.; HANDLEY, Scott A.; MILLER, Virginia L. Comparison of the host responses to wild-type and *cpsB* mutant *Klebsiella pneumoniae* infections. **Infection and immunity**, v. 74, n. 9, p. 5402-5407, 2006.

LAWLOR, Matthew S.; O'CONNOR, Christopher; MILLER, Virginia L. Yersiniabactin is a virulence factor for *Klebsiella pneumoniae* during pulmonary infection. **Infection and immunity**, v. 75, n. 3, p. 1463-1472, 2007.

LEE, Chang-Ro et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 895, 2016.

LEE, Chen-Hsiang et al. Sialic acid involved in hypermucoviscosity phenotype of *Klebsiella pneumoniae* and associated with resistance to neutrophil phagocytosis. **Virulence**, v. 5, n. 6, p. 673-679, 2014.

LEE, Ching-Chi et al. Bacteremia due to extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: role of carbapenem therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 9, p. 3551-3556, 2010.

LI, Wei et al. Increasing occurrence of antimicrobial-resistant hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. **Clinical infectious diseases**, v. 58, n. 2, p. 225-232, 2014.

LIANG, Wen-juan et al. Emergence and mechanism of carbapenem-resistant *Escherichia coli* in Henan, China, 2014. **Journal of infection and public health**, v. 11, n. 3, p. 347-351, 2018.

LIMA, Giselle Jucá 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**, v. 53, 2020.

LING, Moi Lin et al. Risk factors for acquisition of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in an acute tertiary care hospital in Singapore. **Antimicrobial resistance and infection control**, v. 4, n. 1, p. 26, 2015.

LIU, Xin et al. Diversity and frequency of resistance and virulence genes in *bla*KPC and *bla*NDM co-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from China. **Infection and Drug Resistance**, v. 12, p. 2819, 2019.

LLOBET, Enrique et al. Deciphering tissue-induced *Klebsiella pneumoniae* lipid A structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 46, p. E6369-E6378, 2015.

LOPES, Ana Catarina Souza et al. Occurrence and analysis of *irp2* virulence gene in isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. from microbiota and hospital and community-acquired infections. **Microbial pathogenesis**, v. 96, p. 15-19, 2016.

- LOPES, Ana Catarina S. et al. blaCTX-M-2 and blaCTX-M-28 extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 163-167, 2010.
- LOPEZ, J. A. et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 1, p. 52-56, 2011.
- MAMLOUK, Kelthoum et al. Emergence and outbreaks of CTX-M β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* strains in a Tunisian hospital. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 11, p. 4049-4056, 2006.
- MARGATE, Emmily et al. KPC-producing *Serratia marcescens* in a home-care patient from Recife, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 57, n. 4, p. 359-360, 2015.
- MARTIN, Rebekah M.; BACHMAN, Michael A. Colonization, infection, and the accessory genome of *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, p. 4, 2018.
- MEACHAM, Kiersten J. et al. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5224-5226, 2003.
- MELO, Rita de Cássia Andrade et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 virulence genes in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife-PE, Brazil. **Current microbiology**, v. 69, n. 6, p. 824-831, 2014.
- MERINO, S. et al. Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* resistance to complement-mediated killing. **Infection and immunity**, v. 60, n. 6, p. 2529-2535, 1992.
- MERLE, Nicolas S. et al. Complement system part II: role in immunity. **Frontiers in immunology**, v. 6, p. 257, 2015.
- MIETHKE, Marcus; MARAHIEL, Mohamed A. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 71, n. 3, p. 413-451, 2007.
- MOMTAZ, Hassan et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2013.
- MONTEIRO, Jussimara et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.
- MÜLLER, Silke I.; VALDEBENITO, Marianne; HANTKE, Klaus. Salmochelin, the long-overlooked catecholate siderophore of *Salmonella*. **Biometals**, v. 22, n. 4, p. 691-695, 2009.
- MUNOZ-PRICE, L. Silvia et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 785-796, 2013.
- NAVA, Roseane Galdioli et al. New sequence type in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring the blaNDM-1-encoding gene in Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 79, p. 101-103, 2019.

NAVON-VENEZIA, Shiri et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 818-820, 2009.

NORDMANN, Patrice et al. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 12, p. 588-595, 2011.

NORDMANN, Patrice; NAAS, Thierry; POIREL, Laurent. Global spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent. The difficult-to-control spread of carbapenemases producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014.

NOVICK, Richard P. Plasmid incompatibility. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 4, p. 381, 1987.

OLIVE, D. Michael; BEAN, Pamela. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, p. 1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, Érica Maria de 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**, v. 53, 2020.

ØRSKOV, I.; ØRSKOV, F. 4 serotyping of *Klebsiella*. In: **Methods in microbiology**. Academic Press, p. 143-164, 1984.

PACZOSA, Michelle K.; MECSAS, Joan. *Klebsiella pneumoniae*: going on the offense with a strong defense. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 80, n. 3, p. 629-661, 2016.

PAN, Yi-Jiun et al. Capsular polysaccharide synthesis regions in *Klebsiella pneumoniae* serotype K57 and a new capsular serotype. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 7, p. 2231-2240, 2008.

PAPP-WALLACE, Krisztina M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, 2011.

PASTERAN, Fernando G. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 7, p. 1178, 2008.

PATEL, Payal K.; RUSSO, Thomas A.; KARCHMER, Adolf W. Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. In: **Open Forum Infectious Diseases**. Oxford University Press, 2014. p. ofu028.

PAVEZ, Mónica; MAMIZUKA, Elsa M.; LINCOPAN, Nilton. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702-2702, 2009.

PEREIRA, Polyana Silva et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial drug resistance**, v. 21, n. 2, p. 234-236, 2015.

PEREZ-LOPEZ, Araceli et al. Mucosal immunity to pathogenic intestinal bacteria. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 3, p. 135, 2016.

PFALLER, M. A. et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. Supplement_2, p. S156-S167, 2001.

PHAN, H. T. T. et al. Illumina short-read and minion long-read whole genome sequencing to characterise the molecular epidemiology of an ndm-1-serratia marcescens outbreak in Romania. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 3, 2017.

PITOUT, JohannDD; NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurente. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5973-5884, 2015.

PODSCHUN, Rainer; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical microbiology reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POIREL, Laurent et al. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 2, p. 934-936, 2011.

QIN, Shangshang et al. High incidence and endemic spread of NDM-1-positive *Enterobacteriaceae* in Henan Province, China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4275-4282, 2014.

RAMIREZ, Maria S. et al. Plasmid-mediated antibiotic resistance and virulence in gram-negatives: the *Klebsiella pneumoniae* paradigm. **Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery**, p. 459-474, 2015.

RAMIREZ, Paula; BASSI, Gianluigi L.; TORRES, Antonio. Measures to prevent nosocomial infections during mechanical ventilation. **Current opinion in critical care**, v. 18, n. 1, p. 86-92, 2012.

RANJBAR, Reza et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. **Iranian journal of pathology**, v. 12, n. 1, p. 25, 2017. RATHORE, Sudarshan Singh et al. Biofilm of *Klebsiella pneumoniae* minimize phagocytosis and cytokine expression by macrophage cell line. **BioRxiv**, p. 623546, 2019.

RAVICHITRA, K. N. et al. Isolation and antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* from pus, sputum and urine samples. **Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci**, v. 3, n. 3, p. 115-119, 2014.

RECHENCHOSKI, Daniele Zendrini et al. Antimicrobial activity evaluation and comparison of methods of susceptibility for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacter* spp. isolates. **brazilian journal of microbiology**, v. 48, n. 3, p. 509-514, 2017.

REYES, Jorge Aníbal et al. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 2020.

RODRIGUES, Carla et al. KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Portugal linked to previously circulating non-CG258 lineages and uncommon genetic platforms (Tn4401d-IncFIA and Tn4401d-IncN). **Frontiers in microbiology**, v. 7, p. 1000, 2016.

ROSEN, David A. et al. Molecular variations in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* FimH affect function and pathogenesis in the urinary tract. **Infection and immunity**, v. 76, n. 7, p. 3346-3356, 2008.

RUSSO, Thomas A. et al. Aerobactin mediates virulence and accounts for increased siderophore production under iron-limiting conditions by hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and immunity**, v. 82, n. 6, p. 2356-2367, 2014.

RUSSO, Thomas A. et al. Aerobactin, but not yersiniabactin, salmochelin, or enterobactin, enables the growth/survival of hypervirulent (hypermucoviscous) *Klebsiella pneumoniae* ex vivo and in vivo. **Infection and immunity**, v. 83, n. 8, p. 3325-3333, 2015.

RUSSO, Thomas A. et al. Identification of biomarkers for differentiation of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* from classical *K. pneumoniae*. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 9, p. e00776-18, 2018.

SAHLY, H. et al. Extended-spectrum β -lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 9, p. 3029-3034, 2008.

SALAZAR-OSPINA, L.; VANEGAS, J. M.; JIMÉNEZ, J. N. High intermittent colonization by diverse clones of β -lactam-resistant Gram-negative bacilli suggests an excessive antibiotic use and different sources of transmission in haemodialysis patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 107, p. 76-86, 2021.

SÁNCHEZ-LÓPEZ, Javier; CANTÓN, Rafael. Current status of ESKAPE microorganisms in Spain: Epidemiology and resistance phenotypes. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 32, n. Suppl 2, p. 27, 2019.

SANGER, Frederick et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. **nature**, v. 265, n. 5596, p. 687, 1977.

SATTAR, Haseeb et al. Co-existence of bla NDM-1 and bla KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Pakistan. **Journal of chemotherapy**, v. 28, n. 4, p. 346-349, 2016.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima et al. Emergence of blaNDM-1 associated with the aac (6')-Ib-cr, acrB, cps, and mrkD genes in a clinical isolate of multi-drug resistant *Klebsiella pneumoniae* from Recife-PE, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima et al. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2-harboursing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **Journal of global antimicrobial resistance**, v. 19, p. 181-182, 2019.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima et al. Occurrence of qnrB1 and qnrB12 genes, mutation in *gyrA* and *ramR*, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of blaKPC-2. **Journal of medical microbiology**, v. 66, n. 4, p. 477-484, 2017.

SCAVUZZI, Aleksandra Maria Lima et al. Ultrastructural changes caused by polymyxin B and meropenem in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaKPC-2 gene. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 12, p. 1370-1377, 2016.

SEBGHATI, Tricia A. Schurtz et al. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. **Infection and immunity**, v. 66, n. 6, p. 2887-2894, 1998.

SEIFFERT, Salome N. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. **International journal of antimicrobial agents**, v. 44, n. 3, p. 260-262, 2014.

SIDJABAT, Hanna E. et al. Dominance of IMP-4-producing *Enterobacter cloacae* among carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Australia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 7, p. 4059-4066, 2015.

SMALLA, Kornelia et al. Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 66, n. 11, p. 4854-4862, 2000.

SMILLIE, Chris et al. Mobility of plasmids. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 434-452, 2010.

STAHLHUT, Steen G. et al. Population variability of the FimH type 1 fimbrial adhesin in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of bacteriology**, v. 191, n. 6, p. 1941-1950, 2009.

STANDIFORD, Louis R. et al. TLR4-dependent GM-CSF protects against lung injury in Gram-negative bacterial pneumonia. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 302, n. 5, p. L447-L454, 2012.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* type 1 fimbriae by detection of phase variation during colonization and infection and impact on virulence. **Infection and immunity**, v. 76, n. 9, p. 4055-4065, 2008.

STRUVE, Carsten; BOJER, Martin; KROGFELT, Karen Angeliki. Identification of a conserved chromosomal region encoding *Klebsiella pneumoniae* type 1 and type 3 fimbriae and assessment of the role of fimbriae in pathogenicity. **Infection and immunity**, v. 77, n. 11, p. 5016-5024, 2009.

SUÁREZ, Cristina; GUDIOL, Francesc. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SUAY-GARCÍA, Beatriz; PÉREZ-GRACIA, María Teresa. Present and future of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) infections. **Antibiotics**, v. 8, n. 3, p. 122, 2019.

TADA, Tatsuya et al. Pseudomonas aeruginosa clinical isolates in Nepal coproducing metallo- β -lactamases and 16S rRNA methyltransferases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 9, p. e00694-17, 2017.

TANG, H.-L. et al. Correlation between Klebsiella pneumoniae carrying pLVPK-derived loci and abscess formation. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 29, n. 6, p. 689-698, 2010.

TAVARES, Carolina Padilha et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 82, n. 4, p. 326-330, 2015.

TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

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

TROSKY, Jennifer E.; LIVERMAN, Amy DB; ORTH, Kim. Yersinia outer proteins: Yops. **Cellular microbiology**, v. 10, n. 3, p. 557-565, 2008.

TURTON, Jane F. et al. PCR characterization and typing of Klebsiella pneumoniae using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. **Journal of medical microbiology**, v. 59, n. 5, p. 541-547, 2010.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 60, n. 3, p. 470-482, 2007.

WU, Chien-Chen et al. Regulation of the Klebsiella pneumoniae Kpc fimbriae by the site-specific recombinase KpCI. **Microbiology**, v. 156, n. 7, p. 1983-1992, 2010.

WU, Wenjing et al. NDM metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. e00115-18, 2019.

XU, Qi et al. Fecal Carriage and Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Inpatient Children in a Pediatric Hospital of Shanghai. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4405, 2020.

YE, Y. et al. The phenotypic and genotypic characterization of Enterobacter sakazakii strains from infant formula milk. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 6, p. 2315-2320, 2010.

YEH, Kuo-Ming et al. Capsular serotype K1 or K2, rather than magA and rmpA, is a major virulence determinant for Klebsiella pneumoniae liver abscess in Singapore and Taiwan. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 2, p. 466-471, 2007.

YEH, Kuo-Ming et al. Revisiting the importance of virulence determinant magA and its surrounding genes in Klebsiella pneumoniae causing pyogenic liver abscesses: exact role in serotype K1 capsule formation. **The Journal of infectious diseases**, v. 201, n. 8, p. 1259-1267, 2010.

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

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

YOSHIDA, KANAKO et al. Induction of interleukin-10 and down-regulation of cytokine production by *Klebsiella pneumoniae* capsule in mice with pulmonary infection. **Journal of medical microbiology**, v. 50, n. 5, p. 456-461, 2001.

YOSHIDA, Kanako et al. Role of bacterial capsule in local and systemic inflammatory responses of mice during pulmonary infection with *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of medical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 1003-1010, 2000.

ZAVASCKI, Alexandre P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting?. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. e539-e540, 2010.

ZHAO, Zhi-chang et al. Fecal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a Chinese university hospital. **American journal of infection control**, v. 42, n. 5, p. e61-e64, 2014.

ZHENG, Beiwen et al. Complete nucleotide sequences of two KPC-2-encoding plasmids from the same *Citrobacter freundii* isolate. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 2, p. 531-533, 2018.

ZOU, Dayang et al. Complete sequences of two novel bla NDM-1-harboring plasmids from two *Acinetobacter townei* isolates in China associated with the acquisition of Tn 125. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 9405, 2017.

APÊNDICE A

SUBMISSÃO DO SHORT COMMUNICATION À BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY - EMERGENCE OF *bla*_{NDM-7} AND ASSOCIATION WITH *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M15}, *aac*, *aph*, *mph(A)*, *catB3* AND VIRULENCE GENES IN A CLINICAL ISOLATE OF *Klebsiella pneumoniae* WITH DIFFERENT PLASMIDS IN BRAZIL - .

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Emergence of <i>bla</i> _{NDM-7} and association with <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>aac</i> , <i>aph</i> , <i>mph(A)</i> , <i>catB3</i> and virulence genes in a clinical isolate of <i>Klebsiella pneumoniae</i> with different plasmids in Brazil.
Article Type:	Short Communication
Section/Category:	Bacterial Fungal and Virus Molecular Biology
Funding Information:	
Abstract:	Abstract: To characterize phenotypically and genetically an isolate of <i>K. pneumoniae</i> Multidrug Resistant (MDR) from a patient with septicemia in a hospital in Recife-PE, Brazil, the resistance and virulence genes were investigated by PCR and sequencing of the amplicons and the plasmid DNA was sequenced. The K74-A3 isolate was resistant to all β -lactams, including carbapenems, as well as to aminoglycosides and quinolones. By PCR analysis and sequencing, the variant <i>bla</i> _{NDM-7} associated with <i>bla</i> _{KPC-2} and the <i>cps</i> , <i>fimH</i> and <i>mrkD</i> virulence genes were identified. Plasmid DNA analysis revealed the presence of <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>aac</i> (3)-IVa, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aph</i> (4)-Ia, <i>aac</i> (6')ib-cr, <i>mph(A)</i> and <i>catB3</i> , in addition to the plasmids IncX3, IncFIB, IncQ1, ColRNAI and ColpVC. To our knowledge, this is the first report of the <i>bla</i> _{NDM-7} gene in Brazil and we suggest that this variant are located in IncX3. These data show the potential for resistance-related genetic mutation in <i>K. pneumoniae</i> . These results alert us to the risk of spreading an isolate with a vast genetic arsenal of resistance, in addition to the presence of several plasmids that favor the horizontal transfer of these genes.
Corresponding Author:	Weverton de Oliveira Alves UFPE: Universidade Federal de Pernambuco BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UFPE: Universidade Federal de Pernambuco

Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Weverton de Oliveira Alves
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Weverton de Oliveira Alves
	Alexsandra Maria Lima Scavuzzi
	Elizabeth Maria Bispo Beltrão
	Érica Maria de Oliveira
	Crhisllane Rafaele dos Santos Vasconcelos
	Antônio Mauro Rezende
	Ana Catarina de Souza Lopes
Order of Authors Secondary Information:	
Author Comments:	