



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

GISELLE JUCÁ DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE GENÉTICO DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MULTIDROGA RESISTENTE: gene bla_{kpc} , transposon e grupo de incompatibilidade
plasmidial**

**Recife
2018**

GISELLE JUCÁ DE LIMA

**CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE GENÉTICO DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*
MULTIDROGA RESISTENTE: gene *bla_{KPC}* , transposon e grupo de incompatibilidade
plasmidial**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Microbiologia

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

Coorientadora: Dr^a.Alexsandra Maria Lima Scavuzzi

**Recife
2018**

Catálogo na fonte:
Bibliotecário: Aécio Oberdam, CRB4:1895

L732c Lima, Giselle Jucá de.
Caracterização do ambiente genético de *Klebsiella pneumoniae* multidroga resistente: gene *bla_{kpc}*, transposon e grupo de incompatibilidade plasmidial / Giselle Jucá de Lima. – Recife: o autor, 2018.
77 f.; 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.
Inclui referências e apêndices.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Plasmídeos. 3. Transposon. I. Lopes, Ana Catarina de Souza (orientadora). II. Título.

616.988 CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2018 - 171)

GISELLE JUCÁ DE LIMA

CARACTERIZAÇÃO DO AMBIENTE GENÉTICO DE *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA RESISTENTE: gene *blaKpc*, transposon e grupo de incompatibilidade plasmidial

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre.

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

Aprovada em: 28/02/2018.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

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

Dr^a. Dyana Leal Vera (Examinadora Interna)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Danilo Elias Xavier (Examinador Externo)
Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ)

Dedico, a minha amada mãe,
Rosenilda Jucá de Lima.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao dono do Universo que me criou e me trouxe até aqui, Deus.

A minha mãe por todo seu amor prestado a mim em momentos difíceis e de lutas constantes, a ela sem dúvidas ofereço este trabalho.

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

A Dr^a Alessandra Maria Lima Scavuzzi pela sua coorientação.

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

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

A todos que compõe o grupo do laboratório, Elza, Elizabeth Beltrão, Érica, Renata e Sibelle por toda ajuda com os isolados e as técnicas utilizadas neste trabalho.

Aos amigos próximos Wanda Juliana Lopes, Fany Soares e Bárbara Karoline por sempre acreditarem no meu trabalho e dedicação.

Em especial a Carlos Alberto e Patricia Areias por todo apoio, incentivos e conhecimentos passado a mim durante essa vida acadêmica.

Ao colega do departamento de Medicina Tropical Neemias por todo apoio técnico.

Não podendo esquecer aqueles que estão distantes, mas sempre presentes com seus sábios conselhos a minha querida amiga Thaís Diniz Oliveira e Alexandre Campos Banari por sua sincera torcida, Graziela Caiado e Marina Cangiano por todo carinho e atenção.

Aos amigos de Pós-Graduação Luan Araújo por seu companheirismo e cumplicidade durante essa jornada e Gabriela Ingrid Rodrigues de Araújo por sua ajuda e colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que indiretamente colaboraram para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Eu sou a videira, vós as varas; quem está em mim, e eu nele, esse dá muitos frutos; porque sem mim nada podeis fazer.

João 15.v.5

RESUMO

Klebsiella pneumoniae produtora da enzima carbapenemase (KPC) tem sido agente de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) em diversos países, inclusive no Brasil. Em todos estudos o gene *blaKPC* foi encontrado em um elemento genético móvel, um transposon, pertencente a família Tn3 (*Tn4401*), comumente localizado em plasmídeos. Portanto, o objetivo deste estudo foi realizar a caracterização molecular de plasmídeos, grupo de incompatibilidade plasmidial (incs), transposon e ambiente genético de *blaKPC-2* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* multidroga resistentes provenientes de pacientes de dois hospitais de Recife-PE. Foram selecionados cinco isolados clínicos de *K. pneumoniae* multi-droga resistentes (MDR), suspeitos de serem produtores de KPC e os mesmos foram submetidos a análise do sequenciamento do DNA plasmidial e confirmação por PCR de genes de resistência a antimicrobianos identificados. Na análise do ambiente genético plasmidial, de todos os isolados, foi detectado o gene *blaKPC-2* inserido no transposon *Tn4401*, com uma deleção da sequência de inserção ISK_{pn7} e dos genes *istA*, *istB* e transposase (TnpA), revelando uma nova variante do *Tn4401*, semelhante à variante descrita recentemente em *E. aerogenes* em Recife-PE. Próximo ao gene *blaKPC-2* foram encontrados genes de mobilidade e replicação. As ferramentas de bioinformática detectaram um plasmídeo pequeno e mobilizável, pertencente ao grupo de incompatibilidade plasmidial IncQ. Para confirmação desse achado foram realizadas PCR uniplex para o IncQ, e os mesmos foram amplificados com sucesso em todos os isolados. Esse achado difere de estudos anteriores que geralmente encontravam o *blaKPC-2* em plasmídeos IncN, IncLM e IncA/C. No isolado K10R2, além da presença do IncQ, foi encontrado um gene de resistência ao metal pesado arsênio, juntamente a presença de regiões *tra* codificante a um plasmídeo conjugativo, porém não tipável, confirmando a presença de mais de um plasmídeo nessa bactéria. Todos esses achados revelam a dinâmica do ambiente genético plasmidial do gene *blaKPC-2* encontrado em uma nova variante do transposon *Tn4401* e em um plasmídeo, identificado como IncQ1. Enfatizando a continuada recombinação e evolução dos elementos genéticos móveis plasmídeos e transposons, potencializando assim a disseminação de diferentes genes de resistência em isolados de *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar

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

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae producer of enzyme carbapenemase KPC has been a conductor of infectious diseases related to health assistance in several countries, including Brazil, and in all studies the *bla*KPC gene was found inserted in a mobile genetic element, a transposon, belonging to the family Tn3 (Tn4401), commonly located in plasmids. This study aimed to perform the molecular characterization of plasmids, plasmid incompatibility group (Incs), transposon and *bla*KPC-2 genetic environment in multi-drug resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* from different patients from two hospitals in Recife-PE. Five multi-drug resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* were selected and subjected to analysis of plasmid DNA sequencing. The analysis of the plasmid genetic environment in all the isolates exhibited the *bla*KPC-2 gene inserted in a transposon *Tn4401*, with a deletion of the ISK_{pn7} insertion sequence, the *istA*, *istB* genes and the transposase (*TnpA*), revealing a new variant of *Tn4401*, similar to the variant described recently in *E. aerogenes* in Recife-PE. Next to the *bla*KPC-2 gene were found mobility and replication genes, bioinformatics tools detected a small, mobilizable plasmid belonging to the group of plasmid incompatibility IncQ. To confirm this finding, uniplex PCR for *incQ* was performed, and it was successfully amplified in all isolates. This finding differs greatly from previous studies that generally found *bla*KPC-2 in different plasmids as *incN*, *IncLM* and *IncA / C*. The K10R2 isolate, in addition to the presence of *IncQ*, was found a heavy metal resistance arsenic gene, moreover that there is the presence of *tra* regions specific to a conjugative plasmid but it was a non typing plasmid. It should be noted that the presence of more than one plasmid in a bacterial cell favors the further dispersion of resistance genes as well as may increase the pathogenic capacity of this bacterium. All of these findings reveal the dynamics of the plasmidial environment of the *bla*KPC-2 gene found in a new variant of transposon *Tn4401* and in a plasmid identified as *IncQ*. Emphasizing the continuous recombination and evolution of the mobile genetic elements plasmids and transposons, thus potentiating the dissemination of different resistance genes in *K. pneumoniae* isolates in the hospital environment.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Plasmids. Transposon.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - <i>K. pneumoniae</i> inoculada em ágar MacConkey	18
Figura 2 - Grupo dos β - lactâmicos.....	20
Figura 3 - Imagem ilustrativa das principais resistências desenvolvidas pelas bactérias aos antimicrobianos.	21
Figura 4 - Representação esquemática do transposon Tn4401	29
Figura 5 - Representação esquemática do ambiente genético envolvendo os genes blaKPC-2, blaKPC-3 e blaKPC-15.	30
Figura 6 - Representação esquemática das variantes do transposon Tn4401 a, b e c.	31
Quadro 1 Classificação das beta-lactamases segundo Ambler e Jacoby	25

Artigo 1

Figura 1 - Dendrograma gerado da ERIC-PCR para discriminar a relação clonal entre os isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> utilizando o software DARWIN6.0 utilizando o coeficiente Jaccard.....	46
Figura 2 - Comparação do plasmídeo RSF1010 IncQ1 (M28829.1) com os isolados de <i>K. pneumoniae</i> K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 e K1.....	52
Figura 3 - Região <i>oriV</i> de todos os isolados semelhante ao íteron gênico do RSF1010.....	53
Figura 4 - Eletroforese em gel de agarose à 1% do produto da PCR de isolados de <i>K pneumoniae</i> para o IncQ1.....	54

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - .. Tabela com depósitos de IncQ no banco de dados do GenBank com diferentes tamanhos e células bacterianas hospedeiras e genes acessórios.....27
- Tabela 2** - Origem, fonte de isolamento e perfil de resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* de Recife-PE, Brasil, 2016.37
- Tabela 3** - Primers utilizados na PCR para detecção do gene de resistência blaKPC, ERIC-PCR e gupo de incompatibilidade plasmidial IncQ.....38

Artigo 1

- Tabela 1** - Origem, fonte de isolamento e perfil de resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* de Recife-PE, Brasil, 2016..... 44
- Tabela 2** - Primers utilizados na PCR para detecção do gene de resistência blaKPC, ERIC-PCR e gupo de incompatibilidade plasmidial45
- Tabela 3** - Características das sequências de DNA plasmidiais dos isolados de *K. pneumoniae* analisados nesse estudo e análise comparativa com o plasmídeo RSF1010- IncQ.....48
- Tabela 4** - Tabela com depósitos de IncQ no banco de dados do GenBank com diferentes tamanhos e células bacterianas hospedeiras e genes acessórios comparado aos isolados deste estudo..50

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	Porcentagem
μM	Micromolar
°C	Graus Celsius
μg	Micrograma
μL	Microlitro
AMC	Amoxicilina-clavulanato
AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
APS	Ampicilina/sulbactama
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CEFT	Ceftriaxona
CFL	Cefalotina
CFP	Cefepime
CFX	Cefotaxima
CFZ	Cefazolina
CFT	Cefotaxima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Instituto de Normas Clínicas e Laboratoriais do inglês “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
CPM	Cefepime

CRO	Ceftriaxona
CRX	Cefuroxima
CTX	Cefotaxima
CXM	Cefuroxima
DNA	Ácido desoxirribonucleico do inglês “Deoxyribonucleic Acid”
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
EDTA	Ácido etileno-diamino tetraacético
ERIC-PCR	“Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR”
ESBL	“Extended-spectrum β-lactamase”
ERT	Ertapenem
EUA	Estados Unidos da América
GC	Guanina e Citosina
GEN	Gentamicina
ISK	Sequencia de inserção
Incs	Incompatibilidade de plasmídeos
IPM	Imipenem
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
KPC	Klebsiella pneumoniae carbapenemase
LB	Luria-Bertani
LPS	Lipopolissacarídeo
MobA	Proteína de mobilidade A
MobB	Proteína de mobilidade B
MobC	Proteína de mobilidade C
MBLs	Metallo- β-lactamases
MDR	Multi Droga Resistente

MER	Meropenem mg – Miligrama
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
NAL	Ácido nalidíxico
NaCl	Cloreto de Sódio
ng	Nanograma
NpmA	rRNA adenine N-1-methyltransferase
NOR	Norfloxacino
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase chain reaction
PH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol POL
PIT	Piperacilina /Tazobactama
RNA_r	Ácido ribonucleico ribossomal
RepA	Proteína de replicação A
RepB	Proteína de replicação B
RepC	Proteína de replicação C
SMS	Sequence Manipulation Suite
SuIII	sulfonamida resistente.
Su	sulfonamida
STR	Estreptomicina
SULT	Sulfametoxazol-Trimetoprim T
Taq	Taq polimerase
TBE	Tris, EDTA, Ácido bórico
TE	Tris EDTA

TnpR	Transposase Resolvase
Tnp	Transposon
TOB	Tobramicina
Tris	Hidroximetilaminometano
TSB	Tryptic Soy Broth

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	18
2.2	Antimicrobianos β -lactâmicos.....	19
2.3	Resistência a antimicrobianos β - lactâmicos.....	21
2.3.1	betalactamases	22
2.3.1.1	<i>Carbapenemases</i>	23
2.4	Plasmídeos, transposons e ambiente genético de <i>blaKPC-2</i> em <i>Klebsiella pneumoniae</i>	25
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral.....	32
3.2	Objetivos específicos.....	32
4	MATERIAL E MÉTODOS	33
4.1	Isolados bacterianos	33
4.2	Extração do DNA total	33
4.3	PCR para o gene <i>blaKPC-2</i>	33
4.4	ERIC-PCR.....	34
4.5	Extração do DNA plasmidial.....	34
4.6	Sequenciamento do DNA plasmidial	35
4.7	Análise do DNA plasmidial.....	35
4.8	PCR In silico.....	36
4.9	PCR para o IncQ.....	36
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	39
6	RESULTADOS: Artigo1	40
7	CONCLUSÕES	63
8	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A - VISUALIZAÇÃO NO PROGRAMA ARTEMIS MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DO GENE BLAKPC-2 NOS ISOLADOS K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 E K1E	72
	APÊNDICE B - VISUALIZAÇÃO NO PROGRAMA ARTEMIS DAS REGIÕES CORRESPONDENTE AO INCQ	73
	APÊNDICE C - ALINHAMENTO DA REGIÃO ORIV DOS ISOLADOS DO PRESENTE ESTUDO COM O DE REFERENCIA AO INCQ RSF1010	76

1 INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes bacterianos responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que a depender do sítio anatômico afetado e do quadro imunológico do paciente, pode levar a um desfecho clínico desfavorável, ocasionando o óbito, uma vez que essa bactéria gram-negativa pode ser portadora de diversos genes de resistência e de virulência (RAVICHITRA et al., 2014; VUOTTO et al., 2014; MELO et al., 2014; SCAVUZZI et al., 2017). Os genes de resistência mais relevantes nessa espécie bacteriana são aqueles que codificam carbapenemases, como exemplo a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), pois além de degradarem os carbapenêmicos, inativam também todos os outros beta-lactâmicos, que são os principais fármacos utilizados no combate às IRAS por essas bactérias. Essa resistência é determinada principalmente pela transferência horizontal de genes bacterianos através de plasmídeos, que muitas vezes albergam transposons e integrons. Por isso a importância da determinação e classificação quanto ao tipo de plasmídeo presente nos isolados bacterianos (CALISTO et al., 2011; CHMELNITSKY et al., 2014). O gene *blaKPC-2* foi encontrado em *K. pneumoniae* em plasmídeos de diferentes tamanhos e sequência de nucleotídeos, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (Incs), em diferentes países, inclusive no Brasil. Os Incs mais prevalentes carreando *blaKPC-2* são L/M, IncFII e IncN e mais recentemente na China foi identificado o IncX (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; DING et al., 2016; SHEN et al., 2016).

No Brasil, são poucos estudos que caracterizam os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae*, principalmente porque alguns deles determinaram plasmídeos não tipáveis como o estudo de PEREIRA et al (2013). Já para os demais estados do Brasil o mesmo estudo indicou o IncN como prevalente. Antes disso, ANDRADE et al (2011) utilizando isolados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, identificaram os Incs FII, L/M e N. O trabalho de CUZON et al (2010), com isolados de diferentes países como Estados Unidos, Grécia, Suécia, Colômbia, Brasil e Israel revelou também a prevalência dos Inc L/M, FII e N, sendo no Brasil o IncL/M o mais prevalente. CHAPARRO et al (2014) identificaram, em dois isolados de São Paulo, o IncN, e recentemente NICOLETTI et al (2015) com isolados também de São Paulo identificaram o IncQ em *K. pneumoniae* carreando uma nova classe de carbapenemase, BKC-1 (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; CHAPARRO et al., 2014; NICOLETTI et al., 2015). Portanto, em Recife-PE, pelo nosso conhecimento, nenhum estudo conseguiu tipar os inc plasmidiais de *K. pneumoniae* (PEREIRA et al., 2013).

Adicionalmente, esses plasmídeos podem albergar diferentes isoformas do transposon

Tn4401, que contêm o gene *blaKPC-2*. Alguns estudos identificaram diferentes isoformas do transposon *Tn4401*, variando de a-i, decorrente de deleções *downstream* e *upstream* ao gene *blaKPC*, bem como a presença ou ausência das sequências de inserções *ISK_{pn7}* e *ISK_{pn6}* (NASS et al., 2008; CUZON et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; CHMELNITSKY et al., 2014; MARTINEZ et al., 2016; CERQUEIRA et al., 2017; BELTRÃO et al., 2017).

Considerando que o primeiro relato do gene *blaKPC-2* em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil ocorreu em Recife-PE (MONTEIRO et al., 2009) e que ainda não se conhece os tipos de incs plasmidiais dessa espécie em Recife-PE, ressalta-se a necessidade de estudos que busquem elucidar quais os tipos de plasmídeos, como também o ambiente genético plasmidial do gene *blaKPC-2* de isolados clínicos *K. pneumoniae* de origem hospitalar auxiliando assim na compreensão das disseminações, tornando-se uma alternativa para o desenvolvimento de novas estratégias destinadas a prevenir a propagação desses genes de resistência no ambiente hospitalar.

2 REVISÃO DE LITERATURA

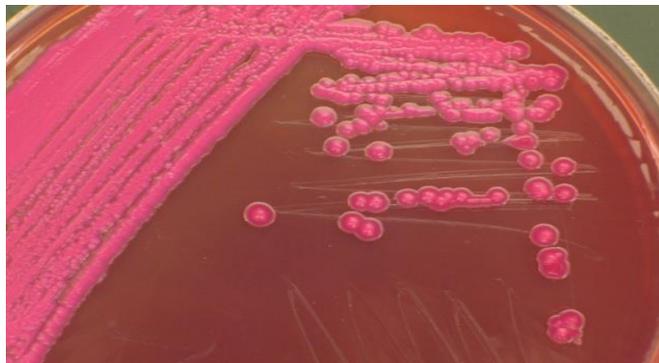
2.1 *Klebsiella pneumoniae*

Em 1883, Friedlander isolou bacilos capsulados de pulmões de pacientes que morriam de pneumonia, esses posteriormente foram nomeados como bacilos de Friedlander. Depois esse microrganismo recebeu um nome genérico de *Klebsiella*, que é o nome atualmente utilizado mundialmente (MURRAY et al., 2005; RAVICHITRA et al., 2014)

Klebsiella spp. são bacilos gram-negativos pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, anaeróbios facultativos, apresenta ausência de motilidade e presença de cápsula (KONEMAN et al., 2008). Algumas espécies como *K. terrigena* e *K. planticola* são relatadas em amostras clínicas isoladas de infecções respiratórias humanas (PODSCHUN et al., 1998). Porém, *K pneumoniae* e *K. oxytoca* são as espécies que se destacam como agentes infecciosos nos hospitais (OLIVEIRA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012; VASAIKAR et al., 2017).

Testes bioquímicos para produção de indol a partir do triptófano pode ser utilizado para diferenciar as espécies *K. pneumoniae* (indol negativa) e *Klebsiella oxytoca* (indol positiva), ambas as espécies imóveis (KONEMAN et al., 2008). Em meio ágar Eosina azul de metileno (EMB) as colônias de *K. pneumoniae* são mucoides, confluentes, com centro escuro-acinzentado. Por outro lado, no meio seletivo ágar MacConkey as colônias são grandes e vermelhas, com pigmento vermelho que se difunde para o ágar indicando a fermentação de lactose e produção de ácido (MURRAY et al., 2005; VERMELHO et al., 2007; KONEMAN et al., 2008) (Figura 1).

Figura 1. *K. pneumoniae* inoculada em ágar .



Fonte: American Society for Microbiology., 2005

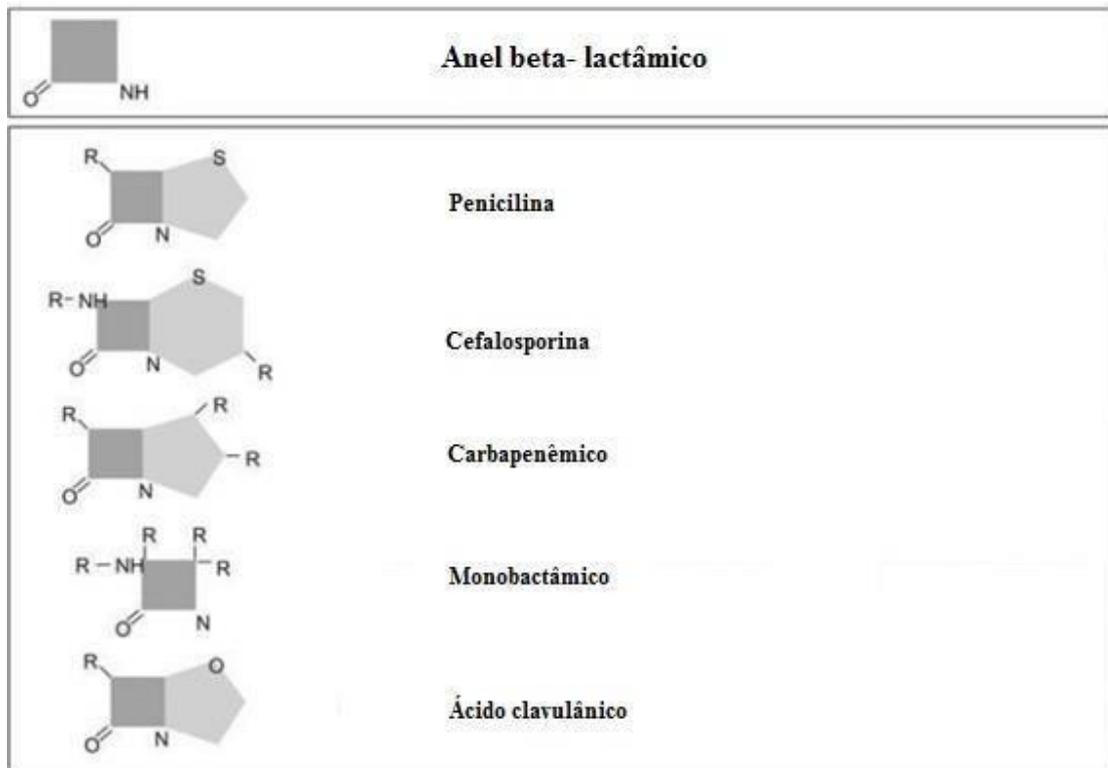
MacConkey

Na América latina, *K. pneumoniae* é o terceiro patógeno mais prevalente causando pneumonia e o segundo maior causador de bacteremia entre as infecções nosocomiais causadas por bacilos gram negativos fermentadores, atrás apenas da *Escherichia coli* (MARRA et al., 2006; VUOTTO et al., 2014). Além disso, a resistência aos antimicrobianos por *K. pneumoniae* está aumentando devido ao seu uso indiscriminado, principalmente aos β - lactâmicos e ao tratamento não adequado do paciente (FAIR et al., 2014; HYUN et al., 2017).

2.2 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os β - lactâmicos são um grupo de antimicrobianos que se define pela presença do anel beta-lactâmico que é composto de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TORTORA et al., 2012). Sendo uma classe de elevada importância médica São comumente utilizados na terapia clínica para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por bactérias gram-negativas, como a *K. pneumoniae* (THAKURIA et al., 2013) A família dos β - lactâmicos não é homogênea, isto é, apesar de todos possuírem o anel β - lactâmico, eles contêm diferentes tipos de cadeias lineares, diferenciando assim as suas características, espectros de ação e resistências às beta-lactamases (AZEVEDO et al., 2014) (Figura 2).

Figura 2. Grupo dos β - lactâmicos



Fonte: Adaptado de Suarez ; Gudiol et al (2009)

Os compostos dessa classe são as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Figura 2) (WALLACE et al., 2011). Esses antimicrobianos além de compartilharem uma estrutura em comum, eles compartilham o mesmo mecanismo de ação: a inibição da síntese da parede celular bacteriana formada por peptidoglicano, através da inibição irreversível da enzima transpeptidase (BRUNTON et al., 2012). Essa enzima também denominada como proteínas de ligação à penicilina (PBPs - penicillin- binding proteins) (MURRAY et al., 2005; TORTORA et al., 2012), catalisa a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana (SUAREZ et al., 2009; WALSH et al., 2012). A atividade dessas enzimas levam à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana, que conferem à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio (GUIMARÃES et al., 2013). Algumas modificações na molécula dos compostos originais resultam em um maior espectro antimicrobiano, mas o aparecimento gradual de resistência tem limitado a utilização empírica e eficaz desses compostos em determinadas situações (SUAREZ et al., 2009).

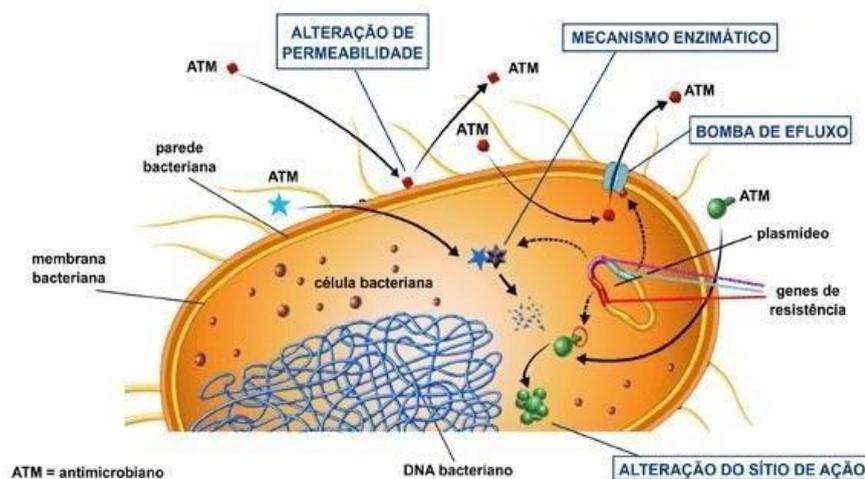
2.3 Resistência a antimicrobianos β - lactâmicos.

Os β - lactâmicos que atuam inibindo a última etapa da biossíntese do peptidoglicano da parede celular bacteriana, constituem a família mais numerosa de antimicrobianos sendo a mais utilizada na antibioticoterapia (AZEVEDO et al., 2014). Por causa disso é crescente o rápido aparecimento e disseminação de resistência a esses fármacos (MELO et al., 2012).

Uma vasta gama de processos bioquímicos e fisiológicos podem estar envolvidos nestes mecanismos de resistência, e o desenvolvimento de resistências aos antimicrobianos pelas bactérias são implacáveis (DAVIES; DAVIES et al., 2010). A resistência aos antimicrobianos pode ser desenvolvida de variadas formas, mas no caso dos β -lactâmicos, as bactérias conseguem evitar os seus efeitos devido a 4 mecanismos principais (Figura 3) (FERNANDES et al., 2013; AZEVEDO et al., 2014):

- Alteração do alvo do antimicrobiano, devido à perda total da afinidade ou a sua simples redução;
- Redução da quantidade de beta-lactâmico que consegue atingir o alvo, por redução da sua entrada, devido a alterações na permeabilidade (mutações ou perdas de porinas);
- Expulsão do antimicrobiano causado pelo bombeamento por um transportador de efluxo;
- Presença de mecanismos enzimáticos que inativam total ou parcialmente o beta-lactâmico e desenvolvimento de uma via metabólica alternativa envolvendo precursores

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



As seguintes estratégias moleculares também colaboram para o desenvolvimento de resistência aos β -lactâmicos por bactérias gram-negativas: 1. Produção de ESBL, também conhecidas como β -lactamases de largo espectro e KPC (produção da enzima carbapenemase) 2. Aquisição de genes que codificam ESBL de bactérias ambientais; 3. Expressão de genes de β -lactamases codificados por cromossomos; 4. Mobilização dos genes *bla* através de integrons e a transferência horizontal entre outras espécies de bactérias gram-negativas; 5. Disseminação de carbapenemases mediadas por plasmídeos.

2.3.1 beta-lactamases

Entre os principais mecanismos de resistência bacteriana aos antimicrobianos, estão os mecanismos enzimáticos. (SUAREZ et al., 2009). Um exemplo é a produção das enzimas beta-lactamases, que são enzimas plasmídicas ou cromossômicas, com capacidade de hidrolisar o anel β -lactâmico, impedindo desta forma que o fármaco interaja com as PBPs (FERNANDES et al., 2013).

As beta-lactamases podem ser classificadas de acordo com suas propriedades funcionais e moleculares (AMBLER et al., 1991). Segundo a classificação de Bush e Jacoby (2010), essa classificação organiza-se em três grupos funcionais (1, 2 e 3) e quatro grupos moleculares (A, B, C e D). Grupo 1, pertencentes à classe molecular C, β -lactamases que hidrolizam cefalosporinas e que são pouco inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, AmpC, MOX-1 e MIR-1); Grupo 2, pertencente às classes moleculares A e D engloba o maior número de β -lactamases, sendo dividido em doze subgrupos (2a, 2b, 2be, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f), dentre as principais têm-se: penicilinases do subgrupo 2a (por exemplo, PC-1); penicilinases e cefalosporinases do subgrupo 2b (por exemplo, TEM-1, TEM-2 e SHV) e ESBLs do grupo 2be (por exemplo, TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1 e VEB-1), penicilinases, cefalosporinases e β -lactamases de amplo espectro que geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, LEN, TEM, SHV, CAZ, CTX e OXA); e Grupo 3, classe molecular B, metalo- β -lactamases que hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenemas e que são inibidas pelo ácido clavulânico (por exemplo, IMP, VIM, CcrA) (HAEGGMAN et al., 2004; JEONG et al., 2004; BUSH; JACOBY, 2010). (Quadro 1)

No entanto, para cada nova classe de antimicrobiano utilizada, novas beta-lactamases emergem, sugerindo que os novos fármacos têm selecionado novas variantes de beta-lactamases, chegando a cerca de 900 tipos de beta-lactamases descritas até o ano de 2010

(BUSH; JACOBY, 2010; STIER et al.,2013).

Ao longo do tempo tem crescido a presença das enzimas de resistência aos β - lactâmicos pelas carbapenemases (YIGIT et al.,2001; THAKURIA et al., 2013).

2.3.1.1 Carbapenemases

A produção de carbapenemases tem como função resistência aos carbapenêmicos, principalmente em espécies da família Enterobacteriaceae. As carbapenemases descritas segundo a classificação funcional de Ambler, pertencem ao grupo A, B e D. (AMBLER et al., 1991; BERTONCHELI et al., 2008). As carbapenemases da classe A de Ambler e a classificação molecular de Bush-Jacoby 2f incluem as serino-carbapenemases (NMC/IMI, SME e KPC). Essas enzimas podem hidrolisar carbapenemas, assim como cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e aztreonam. (JACOBY et al., 2010).

O principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos por *K. pneumoniae* é a produção das enzimas carbapenemases. Uma vez que estas apresentam uma capacidade superior de hidrolizar o anel beta-lactâmico frente às outras beta-lactamases, elas possuem capacidade de hidrolizar no mínimo imipenem e/ou meropenem, junto com outros antimicrobianos β -lactâmicos (NORDMANN et al., 2002; QUEENAN et al., 2007).As duas classes mais comumente encontradas nas enterobactérias atualmente são as Metallo- betalactamases do tipo (IMP, NDM e VIM) e as serino carbapenemases (incluindo as do tipo KPC e as OXA-carbapenemases) (PINTO et al., 2014).

A enzima carbapenemase KPC, codificada por um gene denominado de *bla*KPC pertencente à classe A de Ambler foi encontrada primeiramente no microrganismo *K. pneumoniae* (YIGIT et al.,2001), sua disseminação converge com a disseminação do NDM, uma vez que também é disseminado através de plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade (RUBIN et al., 2014; SECO et al., 2016). Portanto, por se tratar de um gene de rápida disseminação logo pode ser encontrado em outros gram-negativos, tais como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter* spp. *Salmonella* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (QUEENAN et al., 2007 ; DUAN et al., 2009), apresentando uma maior prevalência em enterobactérias, com descrições pontuais da presença deste gene também, em não fermentadores (VILLEGAS et al., 2007; ROBLEDO et al., 2010; ALMEIDA et al., 2012; JÁCOME et al., 2012). No entanto, isolados de *K. pneumomiae* são até então os mais associados com a presença do *bla*KPC (NAAS et al., 2008; SHEN et al., 2009; CUZON et al., 2010; MARTINS et al., 2014).

Os primeiros relatos da enzima KPC foi em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada nos Estados Unidos (EUA) em 1996 (YIGIT et al., 2001) atualmente já se disseminou pelo mundo todo (THAKURIA et al., 2013; VILLA et al., 2017; BELDER et al., 2017). Embora seja descrita predominantemente em *K. pneumoniae*, enzimas do tipo KPC têm sido encontradas em diferentes espécies de Enterobacteriaceae, como também em bacilos gram-negativos não fermentadores como *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (THAKURIA et al., 2013).

No Brasil, os primeiros relatos de *K. pneumoniae* portadoras de gene *blaKPC* foram descritos em 2009, tornando-se endêmico em território nacional. O alelo *blaKPC-2* é o mais prevalente (MONTEIRO et al., 2009; CABRAL et al., 2012; PEREIRA et al., 2012).

Em um estudo realizado por CABRAL et al. (2012), em dois Hospitais públicos do Recife-PE, todos os isolados de *K. pneumoniae* apresentavam o gene de resistência *bhaSHV* e 41.7% apresentavam o gene *blaKPC* e pelo menos 11/52 isolados carregavam mais de um gene para carbapenemases. Entretanto, alguns isolados que carregavam esses genes de resistência não apresentavam resistência alguma aos carbapenêmicos. De fato, nem sempre a presença do gene de resistência pode estar sendo expresso e ativando a enzima carbapenemase, mas outros fatores podem estar associados a essa resistência como: co- presença de outros mecanismos de resistência, supressão genética que silencia o gene e número de plasmídeos de resistência albergados pelos isolados (PELEG et al., 2005).

Já posteriormente em um estudo realizado por SEIBERT et al. (2014), em um hospital escola no Rio grande do Sul, Brasil, os isolados de *K. pneumoniae* foram os microrganismos que apresentaram maior resistência aos carbapenêmicos (47 isolados; 62,0%), e do total de 47 isolados, 9 obtiveram confirmação do gene *blaKPC* por PCR. Esses resultados corroboram com o estudo realizado por ALMEIDA et al. (2012), na cidade de São Paulo – Brasil no qual, 40 amostras que possuíam o gene *blaKPC* apresentavam resistência aos carbapenêmicos desses 38 eram *K. pneumoniae*. Em um estudo realizado em Recife por MELO (2014), foram utilizados 44 isolados de *K. pneumoniae*, 22 foram positivas para o gene *blaKPC-2* juntamente a genes de virulência para sideroforos (*irp2*), *mrkD* e *fimH*. Esses dados evidenciam o grande poder de disseminação da KPC e um importante problema de saúde pública em expansão, exigindo esforço multidisciplinar para prevenção e controle, além de uma detecção laboratorial eficiente, uma vez que esse patógeno tem tido um crescente isolamento em nosocômios no mundo inteiro. Portanto torna-se importante e necessária a rápida detecção laboratorial desse mecanismo de resistência, assim como a adoção de medidas rigorosas de prevenção e controle de disseminação, como a implementação de precauções de contato e tratamento adequado.

Quadro 1 Classificação das beta-lactamases segundo Ambler e Jacoby

Fonte: DHILLON E CLARK (2012)

Classificação de Ambler	Classificação de Bush-Jacoby	Substrato Preferencial	Inibição pelo ácido Clavulânico	Enzimas representantes
A (Serino Penicilinases)	2 ^a	Penicilinas	+	PC1 em <i>S. aureus</i>
	2b	Penicilinas, Cefalosporinas de espectro estreito	+	TEM-1, TEM-2, SHV-1, SHV-11
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de espectro estreito e estendido	+	SHV-2 a SHV-6, TEM-3 a TEM-26, CTX-Ms
	2br	Penicilinas	-	TEM-30, SHV-72
	2c	Penicilinas, Carbenicilina	+	PSE-1
	2e	Cefalosporinas de espectro estendido	+	FEC-1, CepA
	2f	Penicilinas, cefalosporinas carbapenêmicos	+/-	KPC2 a KPC17, SMEs, NMC-A, GES-5
B (Metallo- β -lactamase)	3	Todos os β -lactâmicos, exceto o aztreonam	-	IMP _s , VIM _s , NDM-1, SPM
C (Cefalosporinases)	1	Cefalosporinas	-	AmpC, CMY _s , FOX _s , ACT _s , DHAs
D (Oxacilinases)	2d	Penicilinas, cloxacilina	+/-	OXA-1 a OXA-10

2.4 Plasmídeos, transposons e ambiente genético de *bla*KPC-2 em *Klebsiella pneumoniae*

Plasmídeos são um dos elementos genéticos móveis essenciais na disseminação dos genes de resistência aos diferentes antimicrobianos em *K. pneumoniae*. Esses genes de resistência são facilmente transportados em conjunto através da conjugação bacteriana, conferindo uma maior variabilidade genética a essas células hospedeiras bacterianas. (LIMA et al., 2014; PEREIRA et al., 2012). Os plasmídeos bacterianos são moléculas de DNA fita dupla que se replicam autonomamente na célula bacteriana hospedeira e podem variar de tamanho de 1kb a 180 kb (SOUZA LOPES et al., 2005; CARATTOLI et al., 2009; WANG et al., 2017). Os plasmídeos podem ser classificados de acordo com sua capacidade de transferência entre as células, permitindo diferencia-los em conjugativos, mobilizáveis e não conjugativos (FROST et al., 2005; ANDRADE et al., 2011).

Os plasmídeos mobilizáveis apenas codificam um sistema MOB mínimo que codificam os genes de mobilidade (*mobA*, *mobB*, *mobC*) e replicação (*repA*, *repB* e *repC*), e possuem um sítio de origem de transferência (*oriT*) (FRANCES G. et al., 2015).

Esses genes ligam-se a essa região específica *oriT* e podem ser transportados “in trans”, ou seja, através de um transposon conjugativo ou de um plasmídeo auxiliar conjugativo que transporta o plasmídeo mobilizável para outra célula bacteriana, exemplo: o plasmídeo RSF1010 é referência para plasmídeo mobilizável IncQ com 8684pb, apresenta os genes de mobilidade e replicação (*mobA*, *mobB*, *mobC*, *repA*, *RepB* e *repC*), *oriV*, *oriT*, além dos genes de resistência para estreptomicina e sulfonamida (SMALLA et al., 2000; POIREL et al., 2010; SMILLIE et al., 2010; FRANCES. G. et al., 2015). Esse plasmídeo tem diferentes subgrupos de acordo com as suas proteínas de replicação *repA*, *repC* e do sítio de origem de replicação *oriV* que possuem regiões consenso e diferentes entre os seus subgrupos, caracterizando assim a incompatibilidade entre a família IncQ. O subgrupo IncQ1 é um plasmídeo pequeno em torno de (5.1- 14.0 kb) (Tabela 1), com alta capacidade de replicação em diferentes células bacterianas hospedeiras e são bastantes mobilizáveis, isso faz dele altamente promíscuo, como esse tipo de plasmídeo é exposto a diversas células hospedeiras torna-se habilitado a crescer em uma variedade de condições, adquirindo diferentes genes de resistência (Tabela 1). Geralmente esse plasmídeo sofre recombinações com elementos genéticos móveis, incluindo outros plasmídeos e transposons (RAWLINGS et al., 2012).

Tabela 1 - Tabela com depósitos de IncQ no banco de dados do GenBank com diferentes tamanhos e células bacterianas hospedeiras e genes acessórios.

IncQ subgrupo	Plasmideo	tamanho	bactérias	Genes acessórios	Referências
IncQ1	R1162	±8680pb	<i>P. aeruginosa</i>	sulIII, strAB	Bryan et al. (1972) Barth (1974)
	R300B	±8680pb	<i>S. enteric serovar</i>	sulIII, strAB	
	R678	±14,000pb	<i>S. enteric serovar</i>	Sm, Su	Barth (1974)
	RSF1010	8684pb	<i>E. coli strain 3</i>	sulIII, strAB	Barth (1974)
	pIE1107	8520pb	NI	aph(3), sat3, Sul	Tietze (1998)
	pIE1115	10.687pb	NI	strAB, sulIII	Smalla et al. (2000)
	pIE1120	±9100pb	NI	tetA, strAB	Smalla et al. (2000)
	pIE1130	10,687pb	NI	aph(3),strAB,sulI I	Smalla et al. (2000)
	pDN1	5112pb	<i>Dichelobacter nodosus</i>	Nenhum	Whittle et al. (2000)
	pMS260	8124pb	<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	sulIII, strAB	Ito et al (2004)
			<i>Enterobacter</i>		Poirel et al. (2009)
	pCHE-A	7560pb	<i>cloacae</i>	blaGES-5	Yau et al. (2010)
	pSRC15	8688pb	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica serovar Typhimurium</i>	sulIII, strAB	

SulIII- sulfonamida resistente. Su- sulfonamida. aph(3) – Enzima modificadora de aminoglicosídeo. strAB- Estreptomomicina.; blaGES-5- beta lactamase blaGES-5.. NI- Não identificado.

Quanto aos plasmídeos conjugativos, eles codificam um conjunto completo de genes de transferência (MOB + T4SS), com operons gênicos *tra* que codificam o pili sexual (F), além da presença das regiões *oriV* e *oriT* in cis, onde ele mesmo transfere-se para a outra célula bacteriana (LOW et al., 2001; ZAHA, 2003; FRANCIÀ et al., 2004; CARATTOLI, 2009; CHRISTIE et al., 2009; LEAVITT et al., 2010; CUZÓN et al., 2011; FRANCES et al., 2015). Exemplo: o IncN (CHAPARRO et al., 2015).

Além da presença dos genes de resistência, os plasmídeos podem possuir genes acessórios que podem ser úteis para célula bacteriana hospedeira, como genes que conferem resistência aos metais pesados, ou mesmo determinantes de virulência que permitem a invasão e sobrevivência na célula animal (CARATTOLI et al., 2005; BENNETT et al., 2008).

Devido a vasta variedade desses plasmídeos os mesmos eram classificados seguindo critérios definidos pela espécie ou gênero da bactéria que eles foram descobertos, bem como a sua capacidade de conjugação. No entanto, esses critérios não eram satisfatórios, uma vez que os mesmos plasmídeos eram encontrados em diversas espécies bacterianas e houve um aumento dos plasmídeos não conjugativos (ZAHA et al., 2003). Portanto, o critério de classificação passou a ser baseado nos replicons representantes dos grupos de incompatibilidade plasmidial que é definido pela inabilidade de dois plasmídeos coexistirem na mesma célula bacteriana compartilhando o mesmo sítio de origem de replicação (*ori*) (SMILLE et al., 2010; CARATTOLI et al., 2013).

A exemplo, o gene *blaKPC*, codificante de carbapenemase de classe A, é considerado de grande importância clínica devido ao fato de ser um gene plasmidial e por estar sendo detectado em uma variedade de plasmídeos, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (Inc), incluindo IncFII, IncL/M, IncN, IncA/C e IncX em diferentes espécies de bactérias gram-negativas em diferentes países (CUZON et al., 2010; SHEN et al., 2016). No Brasil são poucos estudos que caracterizam os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae*, principalmente porque alguns deles determinaram plasmídeos não tipáveis como o estudo de PEREIRA et al (2013). Já para os demais estudos no Brasil indicaram o IncN como prevalente. Antes disso, ANDRADE et al (2011) utilizando isolados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, identificaram os Incs FII, L/M e N. O trabalho de CUZON et al (2010) com isolados de diferentes países como Estados Unidos, Grécia, Suécia, Colômbia, Brasil e Israel revelou também a prevalência dos Inc L/M, FII e N, sendo no Brasil o IncL/M prevalente. CHAPARRO et al (2014) identificaram em dois isolados de São Paulo o IncN e recentemente NICOLETTI et al (2015) com isolados de São Paulo identificaram o IncQ em *K. pneumoniae* carregando uma nova classe de

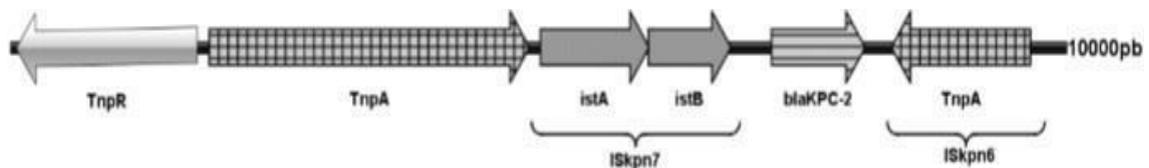
carbapenemase BKC-1.(CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; CHAPARRO et al., 2014; NICOLETTI et al., 2015).

Portanto, em Recife-PE, pelo nosso conhecimento, nenhum estudo conseguiu tipar os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae* (PEREIRA et al., 2013).

Os transposons, por sua vez, são moléculas de DNA fita dupla linear presentes em plasmídeo ou cromossomo e que podem se mover do plasmídeo para o cromossomo e vice-versa e entre plasmídeos (REILLY et al., 2013). Eles podem apresentar diferentes formas, distinguindo-se por sua estrutura, relação gênica e por seus mecanismos de transposição, ainda podem transportar uma variedade de genes de resistência (BENNETT et al., 2008). Este elemento gênico móvel não exige homologia para o sítio de inserção, embora alguns transposons tenham uma forte preferência por uma inserção em uma sequência de nucleotídeos particular. Além disso, eles são flanqueados por sequências de inserção (IS) que os difere de um outro elemento, pelo fato de codificar pelo menos uma função que altera o fenótipo da célula de uma forma previsível, por exemplo um transposon de resistência confere resistência a um antimicrobiano particular (BENNETT, 2008). Essas sequências de inserção são essenciais para a transposição do transposon. Os integrons e cassetes gênicos podem estar associados a eles também (BENNETT., 2008).

O gene *blaKPC* é carregado pelo transposon *Tn4401*, sugerindo um grande potencial de mobilidade desse gene entre as espécies bacterianas (NASS et al., 2008; MATASEJE et al., 2011; SHINTANI et al., 2015). O *Tn4401*, pertencente à família Tn3, apresenta um tamanho em torno de 10Kb e sua estrutura compreende duas sequências imperfeitas inversamente repetidas, duas transposases (*TnpA*), um gene de resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção (IS), a *ISKpn6* e o *ISKpn7*, além dos genes *istA* e o *istB* ambas proteínas ajudadoras na transposição do elemento gênico móvel (Figura 4) (NASS et al., 2008; CUZON et al., 2010).

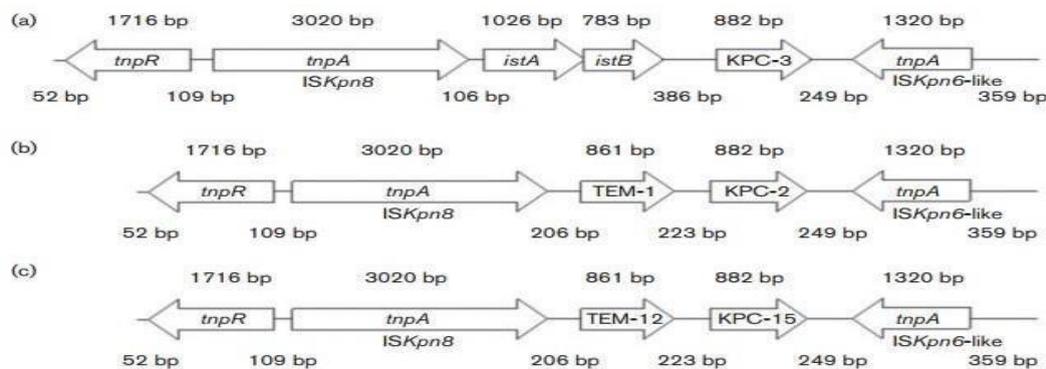
Figura 4 Representação esquemática do transposon Tn4401



Fonte: Naas e colaboradores (2008) adaptado de Beltrão (2017).

Em 2009, SHEN et al. já descreviam um transposon *Tn4401* onde ocorria a substituição do gene *ISKpn7* upstream ao gene *blaKPC-2*, pelo gene *ISKpn8*. Posteriormente, em um estudo realizado por WANG et al. (2014), com três isolados de *K. pneumoniae* portadoras do gene *blaKPC-2*, *blaKPC-3* e *blaKPC-15*, foram detectadas três isoformas do transposon *Tn4401*, variante “a, b e c”. A estrutura da variante “c” era semelhante a variante “a” e “b”. No entanto, o ambiente genético da variante “c” mostrou a substituição do *blaKPC-2* pelo *blaKPC-15*, bem como a substituição do *blaTEM-1* pelo *blaTEM-12*. Isso demonstra que essa variação leva a um aumento da variabilidade de genes de resistência entre isolados bacterianos (COSTA et al., 2015) (Figura 5).

Figura 5. - Representação esquemática do ambiente genético envolvendo os genes *blaKPC-2*, *blaKPC-3* e *blaKPC-15*.



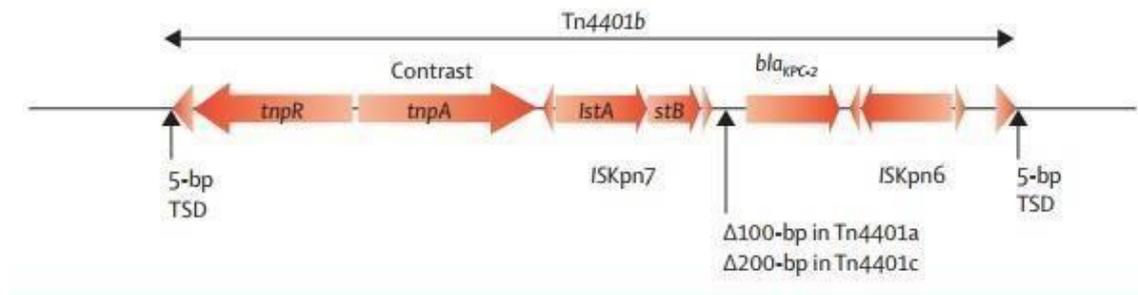
(a) Transposon *Tn4401* caracterizada pelos quatro genes a montante do do gene *blaKPC-3*, *istA*, *istB*, *TnpA*(*ISKpn8*), e *TnpR* e um gene *TnpA* (*ISKpn6*) a jusante do *blaKPC-3*. (b) A estrutura genética B com três genes, *blaTEM1*, *TnpA* e *tnpR*, a montante do gene *blaKPC-2*. (C) A estrutura genética C é idêntica à estrutura B, com exceção do gene *blaTEM12* próximo a uma nova variante *blaKPC-15*.

Fonte: WANG, 2014

Em um estudo realizado por CUZON et al. (2010), sobre a diversidade do transposon *Tn4401* nos isolados com *K. pneumoniae* portadores do gene *blaKPC* provenientes dos Estados Unidos, Grécia, Suécia, Israel, Colômbia e Brasil, demonstrou que nos Estados Unidos, na Grécia e na Suécia ocorreu uma deleção de 100pb codificando a variante (*Tn4401a*), no entanto, em Israel ocorreu uma deleção de 200pb (*Tn4401c*) (Figura 6), nos demais não ocorreu nenhuma deleção. Quanto ao tipo de grupo de incompatibilidade os isolados apresentaram ser do tipo L/M, N e FII. Posteriormente, ANDRADE et al (2011) realizou um estudo no Brasil, em São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, com *K. pneumoniae* portadores do gene *blaKPC* e os mesmos apresentaram *Tn4401a* e *Tn4401b*, esse último não tem deleção. Os Inc

encontrados foram os IncFII, L/M e N. Em Pernambuco, PEREIRA (2013) encontrou que o *Tn4401* pertencia a variante do tipo B, porém não foi tipável quanto ao grupo de incompatibilidade plasmidial. Recentemente, segundo TAVARES et al (2015), em um estudo em diversos estados brasileiros em diferentes enterobactérias detectou ainda mais variantes do *Tn4401*, onde ocorreu deleções na sequência de inserção ISKpn7 e de 100pb próximo ao gene *blaKPC-2* (*Tn4401a*) (Figura 6).

Figura 6. Representação esquemática das variantes do transposon Tn4401 a, b e c.



Fonte: Elaborado pela autora. (Adaptado)

Os genes e a sua orientação de transcrição são representados por setas horizontais. O transposon é delimitado por duas sequências invertidas representadas por triângulos. As linhas verticais representam as sequências invertidas e as deleções de 100pb (*Tn4401a*) e 200pb (*Tn4401c*).

Fonte: Nordmann, 2009.

Todos esses estudos evidenciam a evolução e o movimento dos genes de resistência, bem como identificam a localização desses genes, incluindo as características do ambiente genético ao qual os genes estão inseridos, de forma que isso pode facilitar a detecção de possíveis mecanismos adicionais de resistência aos antimicrobianos ali presentes. Entretanto, no Brasil e principalmente em Recife-PE, esses estudos ainda são raros.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular de plasmídeos, grupo de incompatibilidade plasmidial (incs), transposon e ambiente genético de *blaKPC-2* em isolados clínicos de *K. pneumoniae* multidroga resistentes provenientes de pacientes de dois hospitais de Recife- PE.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença do gene *blaKPC-2* e analisar a sequência de DNA plasmidial no qual o gene *blaKPC-2* esta inserido em isolados de *K. pneumoniae* MDR.
- Determinar os grupos de incompatibilidade (Inc) plasmidial dos isolados e realizar uma análise comparativa in silico entre os isolados do estudo, como também com outros plasmídeos depositados em banco de dados.
- Investigar a presença do *Tn4401* e determinar a variante desse transposon encontrado nos isolados e realizar uma análise comparativa in silico entre os isolados do estudo, como também com outros *Tn4401* depositados em banco de dados.
- Determinar a relação clonal dos isolados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Isolados bacterianos

Foram selecionados cinco isolados clínicos de *K. pneumoniae* MDR, resistentes aos carbapenêmicos (K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 e K1E), suspeitos de serem produtores de KPC, provenientes de diferentes pacientes de dois hospitais de Recife-PE, no ano de 2016 (Tabela 2). A identificação bioquímica e os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos foram realizados inicialmente nos hospitais pelo método automatizado VITEK® 2. Posteriormente, os mesmos foram submetidos a testes bioquímicos convencionais (SIM: Sulfeto, Indol e Motilidade; TSI: Tríplice açúcar-ferro; análise do aspecto da colônia em Ágar EMB) (KONEMAN et al., 2008), no Laboratório de Bacteriologia e Biologia Molecular (Departamento de Medicina Tropical, CCS, UFPE), para confirmação da identificação e pureza da cultura. Os isolados foram mantidos conservados em glicerol 15% a - 20°C. Para análise os isolados foram cultivados em Caldo BHI (Brain Heart Infusion) ou Luria Bertani (LB) por 18 horas a 37°C e semeadas em ágar nutriente.

4.2 Extração do DNA total

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído através do Kit Wizard® Genomic DNA Purification (PROMEGA) para gram-negativos, seguindo as orientações do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado pelo equipamento NanoDrop 2000c UV-vis Spectrophotometer.

4.3 PCR para o gene *blaKPC-2*

O gene de resistência *blaKPC-2* foi investigado com os primers descritos na tabela 3 (YIGIT et al., 2001). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por microtubo, 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 primers e tampão 1x. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, água Milli-Q estéril e um controle positivo, *K. pneumoniae* K1P (CABRAL et al., 2012). As amplificações do gene foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5

minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. Após a PCR, 5 µl do produto de amplificação é acrescido com 1 µl do Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,0 % em tampão TBE e voltagem constante de 100v. Utilizou-se um marcador de 100pb (Ludwig Biotec) como padrão de peso molecular e o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (ultra- violeta) e fotografados em sistema de foto documentação Photocap da Vilber Lourmat.

4.4 ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 3. (DUAN et al., 2009). 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 µM de cada primer, tampão 1X. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 92°C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minutos à 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C (CABRAL et al., 2012). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v. Os fragmentos amplificados pela ERIC-PCR estão de acordo com TENOVER et al (1995), para estimativa da relação clonal dos isolados, e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARWIN 6.0 utilizando o coeficiente Jaccard.

4.5 Extração do DNA plasmidial

A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit de extração plasmidial Qiagen Mini Kit Plamid (Qiagen), de acordo com especificações do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). Após isso o DNA plasmidial foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8 % em tampão TBE (Tris, EDTA, Ácido bórico) e voltagem constante de 70 V e

visualizados em transiluminador de luz UV para ser observada a qualidade do DNA e visualização das bandas de DNA plasmidial.

4.6 Sequenciamento do DNA plasmidial

Foram selecionados os cinco isolados de *K. pneumoniae* portadoras do gene *blaKPC-2* provenientes de amostras clínicas de dois hospitais em Recife- PE. O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). As bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina), que depende da sobreposição das sequências para reproduzir uma sequência contínua única denominada contig (BOUCK et al., 1998). A Quantificação das bibliotecas foram realizadas pela técnica de PCR em tempo real através do Kit Library Quantification- Illumina/ Universal (Kapa Biosystems). O sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento MiSeq (Illumina), com o cartucho MiSeq Kit V2 de 500 ciclos (Illumina) no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães- CPqAM-Fiocruz-Recife-PE. Essa ferramenta baseia-se no conceito de “sequenciamento por síntese” o qual requer que os sequimentos a serem submetidos ao processo de sequenciamento sejam convertidos em uma biblioteca especial, para que os mesmos sejam amplificados e imobilizados (CARVALHO et al., 2010). Os dados foram processados usando o *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL., 2014) e montados utilizando a ferramenta *Velvet* (ZERBINO; BIRNEY, 2008) através do *Velvet optimiser* (ZERBINO, 2011), os resultados dessa montagem foram ainda submetidos a outro programa de montagem, o *Cap 3* (HUANG; MADAN,1999) e a anotação foi realizada através do *Prokka* (SEEMANN, 2014). As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando software Artemis Sanger (CARVER et al., 2008).

4.7 Análise do DNA plasmidial

Foram utilizadas diversas ferramentas online de bioinformática gratuitas para as análises dos fragmentos obtidos (contigs) após o sequenciamento. Como exemplo a plataforma ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>), que identifica genes de resistência antimicrobiana adquiridos em sequências de DNA de bactérias (ZANKARI et al., 2012). Após essa etapa, os mesmos foram alinhados e comparados com os bancos de dados depositados no GenBank (Tabela 1). Outras ferramentas utilizadas foram: o Clustal water (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> - para alinhamento das sequências); 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 em Enterobacteriaceae (CARATTOLI et al., 2014).

4.8 PCR In silico

Foi utilizada a ferramenta de bioinformática SMS, Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>) e Primer-BLAST para realização da PCR in silico para todos os replicons definidos por CARATTOLI et al (2005). A análise de PCR In silico é um método complementar, útil e eficiente para testar uma ampla gama de primers garantindo a especificidade com a sequencia a ser amplificada.

4.9 PCR para o IncQ

Para a confirmação do IncQ, determinado pelo sequenciamento, foi realizada a PCR com os três primers descritos na tabela 3 (GÖTZ et al.,1996). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por microtubo, 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 primers e tampão 1x. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, com água Milli-Q estéril. As condições de ciclagem foram 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento com a temperatura específica de cada iniciador utilizado na reação para o IncQ (Tabela 3) e 1 minuto de extensão a 72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a uma temperatura de 72°C. Após a PCR, 5 µl do produto de amplificação é acrescido com 1 µl do Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,0 % em tampão TBE e voltagem constante de 100v. Utilizou-se um marcador de 100pb (Ludwig Biotec) como padrão de peso molecular e o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (ultra- violeta) e fotografados em sistema de foto documentação Photocap da Vilber Lourmat.

Tabela 2. Origem, fonte de isolamento e perfil de resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* de Recife-PE, Brasil, 2016.

Isolados	Fonte de Isolamento	Perfil ERIC	Perfil de resistência aos antimicrobianos
K3R2	Líquido peritoneal	P1	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, MER
K4R2	Ponta de Cateter	P2	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, MER
K6R2	Líquor	P3	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, MER
K10R2	Urina	P4	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, GEN, IPM, MER
K1E	Hemocultura	P5	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, GEN, IPM, MER

K - *Klebsiella pneumoniae*; R2 - Hospital público; E - Hospital particular; AMP - ampicilina; APS - ampicilina/sulbactam; CFL - cefalotina; CFZ - cefazolina; CFP - cefepime; CFX - ceftaxima, CAZ - ceftazidima; CRO - ceftriaxona; CXM - cefuroxima; CIP - ciprofloxacina; ERT - ertapenem; GEN - gentamicina, IPM - imipenem; MER - meropenem

Tabela 3. Primers utilizados na PCR para detecção do gene de resistência blaKPC, ERIC-PCR e gupo de incompatibilidade plasmidial IncQ.

Gene	Primer	Sequência (5` - 3`)	Temp.(a)	Referência
<i>blaKPC</i>	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63°C	YIGIT et al. (2001)
	KPC -1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>ERIC-1</i>	ERIC-F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC	36 °C	DUAN et al (2009)
<i>ERIC-2</i>	ERIC-R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
IncQ	<i>repB1</i>	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	62° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>repB 2</i>	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT		
IncQ	<i>oriV 1</i>	CTCCCGTACTAACTGTCACG	57° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>oriV 2</i>	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC		
IncQ	<i>oriT 1</i>	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	57° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>oriT 2</i>	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG		

Temp: temperatura de anelamento. Todos os primers estão descritos de acordo com as respectivas referências. F: forward e R: reverse sequence.

Fonte: (GÖTZ et al., 1996; YIGIT et al., 2001; DUAN et al., 2009)

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os isolados bacterianos provenientes de Recife-PE utilizados nesse estudo tiveram aprovação prévia, em estudo anterior, pelo comitê de ética com pesquisas com seres humanos (Plataforma Brasil), no ano de 2016 sob o número do Parecer: 1.424.034.

6 RESULTADOS

Artigo: Plasmídeo tipo IncQ1 transportando o gene de resistência *blaKPC-2* em isolados de *Klebsiella pneumoniae* em Recife-PE, Brasil.

Introdução

Klebsiella pneumoniae é um dos agentes bacterianos responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), que a depender do sítio anatômico afetado e do quadro imunológico do paciente, pode levar a um desfecho clínico desfavorável, ocasionando o óbito, uma vez que essa bactéria gram-negativa pode ser portadora de diversos genes de resistência e de virulência (RAVICHITRA et al., 2014; VUOTTO et al., 2014; MELO et al., 2014; SCAVUZZI et al., 2017). Os genes de resistência mais relevantes nessa espécie bacteriana são aqueles que codificam carbapenemases, como exemplo a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), pois além de degradarem os carbapenêmicos, inativam também todos os outros beta-lactâmicos, que são os principais fármacos utilizados no combate às IRAS por essas bactérias. Essa resistência é determinada principalmente pela transferência horizontal de genes bacterianos através de plasmídeos, que muitas vezes albergam transposons e integrons. Por isso a importância da determinação e classificação quanto ao tipo de plasmídeo presente nos isolados bacterianos (CALISTO et al., 2011; CHMELNITSKY et al., 2014). O gene *blaKPC-2* foi encontrado em *K. pneumoniae* em plasmídeos de diferentes tamanhos e sequência de nucleotídeos, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (Incs), em diferentes países, inclusive no Brasil. Os Incs mais prevalentes carregando *blaKPC-2* são L/M, IncFII e IncN e mais recentemente na China foi identificado o IncX (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; DING et al., 2016; SHEN et al., 2016).

No Brasil, são poucos estudos que caracterizam os Incs plasmidiais de *K. pneumoniae*, principalmente porque alguns deles determinaram plasmídeos não típicos como o estudo de PEREIRA et al (2013). Já para os demais estados do Brasil o mesmo estudo indicou o IncN como prevalente. Antes disso, ANDRADE et al (2011) utilizando isolados de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, identificaram os Incs FII, L/M e N. O trabalho de CUZON et al (2010), com isolados de diferentes países como Estados Unidos, Grécia, Suécia, Colômbia, Brasil e Israel revelou também a prevalência dos Inc L/M, FII e N, sendo no Brasil o IncL/M o mais prevalente. CHAPARRO et al (2014) identificaram em dois isolados de São Paulo, o IncN, e recentemente NICOLETTI et al (2015) com isolados também de São Paulo identificaram o

IncQ em *K. pneumoniae* carreando uma nova classe de carbapenemase, BKC-1 (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; CHAPARRO et al., 2014; NICOLETTI et al., 2015). Portanto, em Recife-PE, pelo nosso conhecimento, nenhum estudo conseguiu tipar os inc plasmidiais de *K. pneumoniae* (PEREIRA et al., 2013).

Adicionalmente, esses plasmídeos podem albergar diferentes isoformas do transposon *Tn4401*, que contêm o gene *blaKPC-2*. Alguns estudos identificaram diferentes isoformas do transposon *Tn4401*, variando de a-i, decorrente de deleções *downstream* e *upstream* ao gene *blaKPC*, bem como a presença ou ausência das sequências de inserções *ISKpn7* e *ISKpn6* (NASS et al., 2008; CUZON et al., 2010; PEREIRA et al., 2013; CHMELNITSKY et al., 2014; MARTINEZ et al., 2016; CERQUEIRA et al., 2017; BELTRÃO et al., 2017).

Considerando que o primeiro relato do gene *blaKPC-2* em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil ocorreu em Recife-PE (MONTEIRO et al., 2009) e que ainda não se conhece os tipos de incs plasmidiais dessa espécie em Recife-PE, ressalta-se a necessidade de estudos que busquem elucidar quais os tipos de plasmídeos, como também o ambiente genético plasmidial do gene *blaKPC-2* de isolados clínicos *K. pneumoniae* de origem hospitalar auxiliando assim na compreensão das disseminações, tornando-se uma alternativa para o desenvolvimento de novas estratégias destinadas a prevenir a propagação desses genes de resistência no ambiente hospitalar.

Material e Métodos

Isolados bacterianos- Foram selecionados cinco isolados clínicos (K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 e K1E) de *K. pneumoniae* que pelo método automatizado VITEK® 2 mostraram serem MDR e suspeitos de serem produtores de KPC. Os isolados foram provenientes de líquido peritoneal, sangue, urina, liquor e aspirado traqueal, advindos de pacientes dois hospitais de Recife-PE no ano de 2016. (Tabela 1)

Extração de DNA Total e PCR para o gene *blaKPC-2* - O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído através do Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, USA) para gram-negativos, seguindo as orientações do fabricante. Após a extração o DNA foi quantificado pelo equipamento NanoDrop 2000c UV-vis Spectrophotometer. Foi realizada a PCR convencional para o gene de resistência *blaKPC-2* utilizando os primers descritos na (Tabela 2) (YIGIT et al., 2001). As amplificações do gene foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1

minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. O produto de PCR foi corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,0 % em tampão TBE.

ERIC-PCR - Para determinar a relação clonal dos isolados foi realizado o método da ERIC-PCR utilizando os primers descritos na tabela 2 (DUAN et al., 2009). 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 µM de cada primer, tampão 1X. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 92°C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minutos à 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C (CABRAL *et al.*, 2012). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v. Os fragmentos amplificados pela ERIC-PCR estão de acordo com TENOVER et al (1995), para estimativa da relação clonal dos isolados, e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARWIN 6.0 utilizando o coeficiente Jaccard.

Extração do DNA plasmidial - A extração do DNA plasmidial foi realizada com o Kit de extração plasmidial Qiagen Mini Kit Plamid (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com especificações do fabricante. O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). O DNA plasmidial foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,8 % em tampão TBE (Tris, EDTA, Ácido bórico) e voltagem constante de 70 V e visualizados em transiluminador de luz UV para ser observada a qualidade do DNA e visualização das bandas de DNA plasmidial.

Sequenciamento do DNA plasmidial - O DNA plasmidial extraído foi quantificado em equipamento Nano Drop e pela plataforma fluorimétrica Qubit (ThermoFisher Scientific). As bibliotecas foram montadas utilizando o Kit TruSeq DNA PCR Free (Illumina), que depende da sobreposição das sequências para reproduzir uma sequência contínua única denominada contig (BOUCK et al., 1998). A Quantificação das bibliotecas foram realizadas pela técnica de

PCR em tempo real através do Kit Library Quantification- Illumina/ Universal (Kapa Biosystems). Após isso, o sequenciamento foi realizado utilizando o equipamento MiSeq (Illumina), com o cartucho MiSeq Kit V2 de 500 ciclos (Illumina). Os dados foram processados usando o *Trimmomatic* (BOLGER; LOHSE; USADEL., 2014) e montados utilizando a ferramenta *Velvet* (ZERBINO; BIRNEY, 2008) através do *Velvet optimiser* (ZERBINO, 2011), os resultados dessa montagem foram ainda submetidos a outro programa de montagem, o *Cap 3* (HUANG; MADAN, 1999) e a anotação foi realizada através do *Prokka* (SEEMANN, 2014). As sequências de DNA plasmidial foram analisadas utilizando software Artemis Sanger (CARVER et al., 2008).

Análise do DNA plasmidial - Foram utilizadas diversas ferramentas online de bioinformática gratuitas para as análises dos fragmentos obtidos (contigs) após o sequenciamento. Como exemplo, a plataforma ResFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk//services/ResFinder/>). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) e Clustal W do European Bioinformatics Institute (<http://www.cbi.ac.uk/>). Após essa etapa, os mesmos foram alinhados e comparados com os bancos de dados depositados no GenBank. O plasmidfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) foi utilizado para detectar o grupo de incompatibilidade plasmidial. Foram utilizadas também as ferramentas de bioinformática SMS, Sequence Manipulation Suite (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>) e Primer-BLAST para realização da PCR in silico, utilizando os primers para determinação de diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial, definidos por CARATTOLI et al (2005). Todas as sequências plasmidiais serão depositadas no GenBank.

PCR para o IncQ - Para a confirmação do IncQ, determinado pela análise do sequenciamento do DNA plasmidial, foi realizada a PCR com os três primers descritos na tabela 2 (GÖTZ et al., 1996). As reações de amplificação foram preparadas segundo GÖTZ et al. (1996). As condições de ciclagem foram 5 minutos a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de desnaturação a 94°C, 1 minuto de anelamento com a temperatura específica de cada iniciador utilizado na reação para o IncQ (Tabela 1) e 1 minuto de extensão a 72°C. A extensão final foi realizada por 10 minutos a uma temperatura de 72°C. O produto de PCR foi corado com Blue Green Loading Dye (LGC Biotechnology) e submetidos a eletroforese em gel de agarose (Promega) a 1,0 % em tampão TBE e o gel foi visualizado em transiluminador de luz UV (ultra-violeta) e fotografados em sistema de foto documentação Photocap da Vilber Lourmat.

Tabela 1. Origem, fonte de isolamento e perfil de resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* de

Recife-PE, Brasil, 2016.

Isolados	Fonte de Isolamento	Perfil ERIC	Perfil de resistência aos antimicrobianos
K3R2	Líquido peritoneal	P1	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, <u>MER</u>
K4R2	Ponta de Cateter	P2	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, MER
K6R2	Líquor	P3	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CXM, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, IPM, MER
K10R2	urina	P4	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, GEN, IPM, MER
K1E	Hemocultura	P5	AMP, APS, CFL, CFZ, CFP, CAZ, CRO, CFX, CIP, ERT, GEN, IPM, MER

K – *Klebsiella pneumoniae*; R2 – Hospital público; E – Hospital particular; AMP – ampicilina; APS - ampicilina/sulbactam; CFL – cefalotina; CFZ – cefazolina; CFP – cefepime; CFX – ceftaxidima; CAZ – ceftazidima; CRO – ceftriaxona; CXM – cefuroxima; CIP – ciprofloxacina; ERT – ertapenem; GEN – gentamicina, IPM – imipenem; MER – meropenem.

Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção do gene de resistência *blaKPC2*, ERIC-PCR e grupo de incompatibilidade plasmidial IncQ.

Gene	Primer	Sequência (5' - 3')	Temp. ^a	Referência
<i>blaKPC</i>	KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63°C	YIGIT et al. (2001)
	KPC -1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>ERIC-1</i>	ERIC-F	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC	36 °C	DUAN et al (2009)
<i>ERIC-2</i>	ERIC-R	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG		
IncQ	<i>repB1</i>	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	62° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>repB 2</i>	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT		
IncQ	<i>oriV 1</i>	CTCCCGTACTAACTGTCACG	57° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>oriV 2</i>	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC		
IncQ	<i>oriT 1</i>	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	57° C	GÖTZ et al (1996)
	<i>oriT 2</i>	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG		

Resultados

Caracterização fenotípica e molecular dos isolados

Os isolados de *K. pneumoniae* mostraram resistência aos β - lactâmicos, em especial aos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem) (Tabela 1), sendo sugestivos de serem produtores de KPC foi confirmada a presença do gene *blaKPC-2* através da PCR convencional e pela análise do sequenciamento do DNA plasmidial nos cinco isolados de *K. pneumoniae* analisados. O teste de genotipagem molecular pela ERIC-PCR mostrou que todos os isolados apresentaram perfis genéticos distintos, apresentando no máximo 40% de similaridade, não apresentando, portanto, relação clonal (Figura 1).

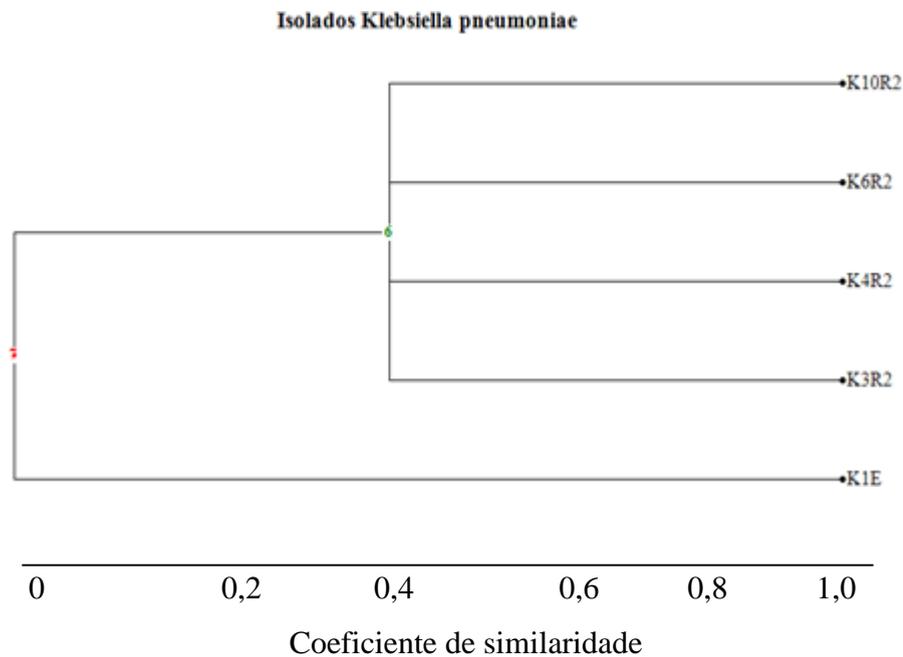


Figura 1- Dendrograma gerado da ERIC-PCR para discriminar a relação clonal entre os isolados de *Klebsiella pneumoniae* a construção do dendrograma foi feita utilizando o software DARWIN 6.0 utilizando o coeficiente Jaccard.

Análise geral do sequenciamento plasmidial

O sequenciamento do DNA plasmidial teve uma cobertura de aproximadamente 238 vezes. Em relação ao percentual de GC, todas as bactérias ficaram em torno de 52% a 58%. Todos os isolados apresentaram conteúdo genético plasmidial semelhante, inclusive com relação à presença do gene *blaKPC-2*. Deve-se ressaltar também a presença do gene de virulência para colicina, uma bacteriocina, que estava presente em três isolados (K3R2, K4R2 e K6R2). As bactérias K3R2 e K4R2 apresentaram o mesmo número de sequências codificantes (CDS) (Tabela 3) e se assemelham ao tamanho em pares de bases com uma diferença de 183pb para o K4R2. No entanto, K6R2, K10R2 e o K1E continham 70, 109 e 24 CDS, respectivamente (Tabela 3). Por outro lado, algumas proteínas como a proteína repressora F (*repF*) e as proteínas de mobilidade e replicação estavam presentes no DNA plasmidial de todas as bactérias (Tabela 3).

A sequência de DNA plasmidial de quatro isolados (K3R2, K4R2, K6R2 e K1E) não apresentaram o operon gênico *tra*, portanto não possuíam plasmídeos conjugativos. Porém, o K10R2 apresentou região *tra* com 100% de similaridade comparado com as sequências depositadas no GenBank, para os genes de conjugação *traG* (CP023937.1), *traJ* (JQ418542.1), *traL* (KY215945.1-IncI1), *traO* (KM406489.1), *traP* (KM406489.1),

traR (KM406489.1), *traU* (JQ418542.1 IncI1) e para proteína de superfície de exclusão tipo IncL (*exc-A*) (KM406489.1), indicando um plasmídeo conjugativo nesse isolado. Além disso, foi encontrada a presença do operon gênico que confere resistência ao metal pesado arsênio (*ArsD*), também no isolado K10R2, com 100% de similaridade ao gene *ArsD* (CP024565.1).

Tabela 3 – Características das sequências de DNA plasmidiais dos isolados de *K. pneumoniae* analisados nesse estudo e análise comparativa com o plasmídeo RSF1010- IncQ (M28829.1).

Isolados	K3R2	K4R2	K6R2	K10R2	K1E	M28829.1
Origem	Isolado	Isolado	Isolado	Isolado	Isolado	ND
Referência	Clínico	Clínico	Clínico	Clínico	Clínico	
Referência	Este estudo	Este estudo	Este estudo	Este Estudo	Este estudo	Scholz et. (1989)
Tamanho do DNA plasmidial sequenciado	27.508p	27.325 p	59.776 p	93.506p	84.800p	8.684 p
Conteúdo GC	57,95%	58,13%	55,35%	52.96%	53.84%	61%
CDS	31	31	70	109	94	40
Inc	IncQ1 NT	IncQ1 NT	IncQ1 NT	IncQ1 NT	IncQ1 NT	IncQ1 NT
Genes de resistência e virulência	<i>blaKPC-2</i>	<i>blaKP C-2</i> <i>ColE</i>	<i>blaKPC-2</i> <i>ColE</i>	<i>blaKPC-2</i>	<i>ArsD</i> <i>blaKPC-2</i>	<i>SM</i> <i>SU</i>
Proteínas de mobilidade, replicação e conjugação	MobA, mobB, mobC; repA, repB, repC, repF	MobA, mobB, mobC; repA, repB, repC, RepF	MobA, mobB, mobC; repA, repB, repC, repF	MobA, mobB e mobC; repA, repB, repC, traJ, traR, traO, traU, traP, traL, traG e repF	MobA, mobB, mobC; repA, repB, repC, repF	MobA, mobB, mobC; repA, repB, repC, RepF

. K – *Klebsiella pneumoniae*; R2 – Hospital público; E- Hospital particular; GC- Guanina e Citosina; p- pares de bases; CDS- sequencias codificantes; inc- grupo de incompatibilidade plasmidial; KPC- *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase; SM- Esteptomicina; SU- Sulfonamidas; MobA- Proteína de mobilidade A; MobB- Proteína de mobilidade B; MobC- Proteína de Mobilidade C; repA- Proteína de replicação A; repB- Proteína de replicação B e repC- Proteína de replicação C; ColE- Colicina. NT- Não tipável.

Análise do ambiente genético de *blaKPC* e grupo de incompatibilidade plasmidial (Inc).

A análise das sequências do DNA plasmidial de todos os isolados, utilizando os bancos de dados *Resfinder* e GenBank, confirmaram a presença do gene de resistência *blaKPC-2* (882pb). O gene foi identificado com 100% de similaridade quando comparados com a sequência depositada no GenBank (CP023186.1). O gene *blaKPC-2* foi observado em ambientes genéticos semelhantes para os cinco isolados bacterianos, inserido entre a sequência de inserção *ISKpn6* e aos genes correspondentes a uma transposase *TnpA* de 840pb, e uma resolvase *tnpR* (402- 558pb), evidenciando que o mesmo estava inserido no transposon *Tn4401* (Figura 2). Contudo, em 100% dos isolados observou-se, nesse transposon, a deleção de uma *TnpA*, da sequência de inserção *ISKpn7*, como também dos genes *istA* e *istB*. No mesmo contig onde estava localizado esse transposon foram encontrados os genes plasmidiais de mobilização (*mobA*, *mobB* e *mobC*) e replicação (*repA*, *repB* e *repC*), além da *repF*. Evidenciando um plasmídeo mobilizável no mesmo contig do gene *blaKPC*, indicando que esse gene para carbapememase KPC estava localizado nesse plasmídeo mobilizável. Os genes *oriV*, *oriT* e *repB* também foram encontrados inseridos no mesmo contig dos genes de replicação, mobilização e ao gene *blaKPC-2*. (Figura 2).

A ferramenta de bioinformática *plasmidfinder* confirmou a presença do plasmídeo pertencente ao grupo de incompatibilidade variante IncQ1. As PCRs in silico com o *Sequence Manipulation Site*, com todos os isolados bacterianos para os genes que caracterizam o IncQ1 (*oriV*- 436pb, *oriT*- 191 pb e *repB* - 1160pb) (GOTZ et al.,1996), (Tabela 2) foram positivos para todos os genes IncQ1. Análises comparativas entre os cinco isolados de *K. pneumoniae* desse estudo e amostras portadoras do IncQ1 e IncQ- like (plasmídeos como o IncQ), depositadas anteriormente no GenBank, tiveram entre 98% e 100 % de similaridade para o gene *oriV* (M21475.1), para o gene *oriT* (X04830.1) e para o gene *repB* (M28829.1). As proteínas de mobilização e replicação presentes em todos os isolados apresentaram 100% de similaridade com as proteínas *mobA*, *mobB*, *mobC*, *repA*, *repB* e *repC* presentes no depósito de referência ao IncQ1 RSF1010- M28829.1.

Alinhando os isolados com as sequências depositados no GenBank NC_002636.1, NC_012006, NC_002089, NC_002524, AF070999, NC_004973, NC_005312, NC_001740 para o IncQ1, obtivemos uma cobertura entre 52% e 78% e identidade entre 91% - 98% e o valor de E de 0.0. Já para o IncQ1 do RSF1010 (M28829.1) foi identificado aproximadamente uma cobertura de 58 % e identidade de 100%, com o valor de E 0.0. A baixa cobertura entre os

nossos isolados e os isolados do banco de dados é justificada pela ausência dos genes acessórios de resistência presentes nos isolados do banco de dados, como os genes de resistência para estreptomicina, sulfonamidas, tetraciclinas e o *bla*GES-5 (Tabela 4). Enquanto os nossos isolados apresentaram apenas o gene de resistência *bla*KPC-2 em um único contig que continha também genes codificantes ao IncQ1.

A PCR convencional/ uniplex para os genes do IncQ1 utilizando os primers descritos por Gotz et al (1996), também confirmaram esse resultado, pois os genes *repB*, *oriV* e *oriT* do plasmídeo IncQ1 foram amplificados com sucesso em todos os isolados analisados (Figura 4).

Tabela 4 - Tabela com depósitos de IncQ no banco de dados do GenBank com diferentes tamanhos e células bacterianas hospedeiras e genes acessórios comparado aos isolados deste estudo.

IncQ subgrupo	Plasmídeo	tamanho	bactérias	Genes	
				acessórios	Referências
IncQ1	R1162	±8680pb	<i>P. aeruginosa</i>	sulII, strAB	Bryan et al. (1972)
	R300B	±8680pb	<i>S. enteric serovar</i>	sulII, strAB	Barth (1974)
	R678	±14,000pb	<i>S. enteric serovar</i>	Sm, Su	Barth (1974)
	RSF1010	8684pb	<i>E. coli</i> strain 3	sulII, strAB	Barth (1974)
	pIE1107	8520pb	NI	aph(3), sat3, Sul	Tietze (1998) Smalla et al. (2000)
	pIE1115	10.687pb	NI	strAB, sulII	
	pIE1120	±9100pb	NI	tetA, strAB	Smalla et al.

pIE1130	10,687pb	NI	aph(3),strAB,sulII	Smalla et al. (2000)
pDN1	5112pb	<i>Dichelobacter</i>	Nenhum <i>nodosus</i>	Whittle et al. (2000)
pMS260	8124pb	<i>Actinobacillus</i>	sulII, strAB <i>pleuropneumoniae</i>	Ito et al (2004)
pCHE-A	7560pb	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>blaGES-5</i>	Poirel et al. (2009) Yau et al.
pSRC15	8688pb	<i>Salmonella enterica</i> subsp.	sulII, strAB <i>enterica serovar Typhimurium</i>	(2010)
K3R2	9699pb	<i>K. pneumoniae</i>	<i>blaKPC-2</i>	Este estudo
K4R2	9704pb	<i>K. pneumoniae</i>	<i>blaKPC-2</i>	Este estudo
K6R2	11129pb	<i>K. pneumoniae</i>	<i>blaKPC-2</i>	Este estudo
K10R2	8344pb	<i>K. pneumoniae</i>	<i>blaKPC-2</i> ,	Este estudo
K1E	9690pb	<i>K. pneumoniae</i>	<i>blaKPC-2</i>	Este estudo

SuIII- sulfonamida resistente. Su- sulfonamida. aph(3) – Enzima modificadora de aminoglicosídeo. strAB- Estreptomicina.; *blaGES-5*- beta lactamase *blaGES-5* e *blaKPC-2* ; *arsD*- arsênio. NI- Não identificado. K- Klebsiella

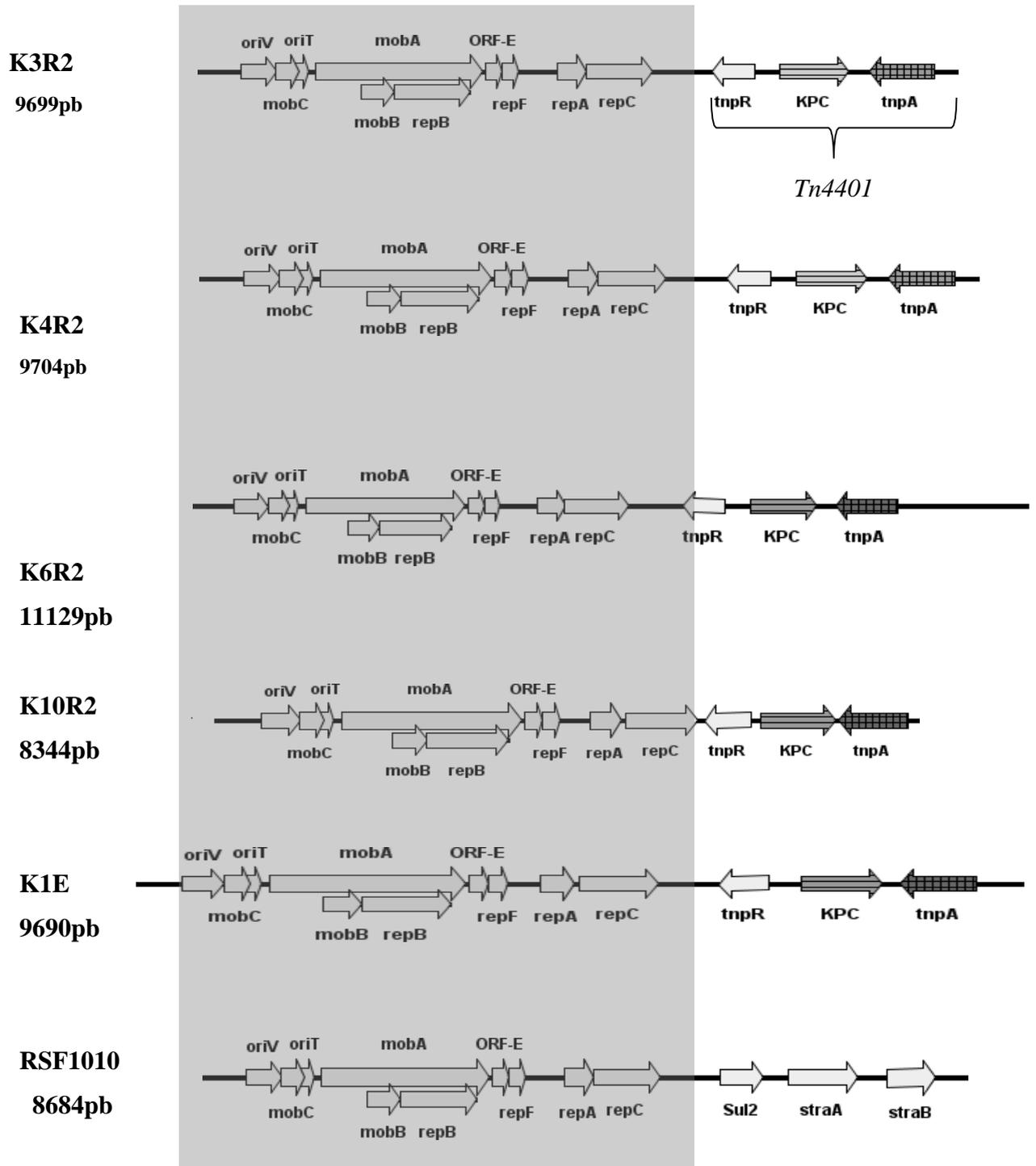
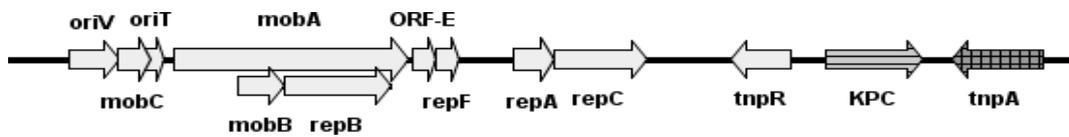


Figura 2. Comparação dos plasmídeos dos isolados de *K. pneumoniae* K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 e K1E do presente estudo, com o plasmídeo de referência RSF1010 IncQ1 (M28829.1). Mostrando que todos os isolados possuem os genes codificantes ao plasmídeo IncQ1 e o gene *bla*_{KPC-2} no mesmo contíg. No entanto não possuem os genes de resistência a sulfonamida e a estreptomicina A e B. pb- Pares de base.



Iterons

K3R _____

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

K4R2 _____

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

K6R2 _____

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

K10R2

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

K1E

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

RSF1010

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaactgcaaaccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatccatgattatctaagaataatc

Figura 3. Região *oriV* de todos os isolados de *K. pneumoniae* desse estudo, semelhante ao íteron gênico do RSF1010. Região *oriV* consistindo de sequencias repetidas de guanina e citosina , adenina e timina com pelo menos três iterons de 20pb cada um espaçados por 2 pb. (K3R2- 99% de identidade com o *oriV* do RSF1010; K4R2- 99%; K6R2- 99%; K10R2- 98%; K1E- 99%).

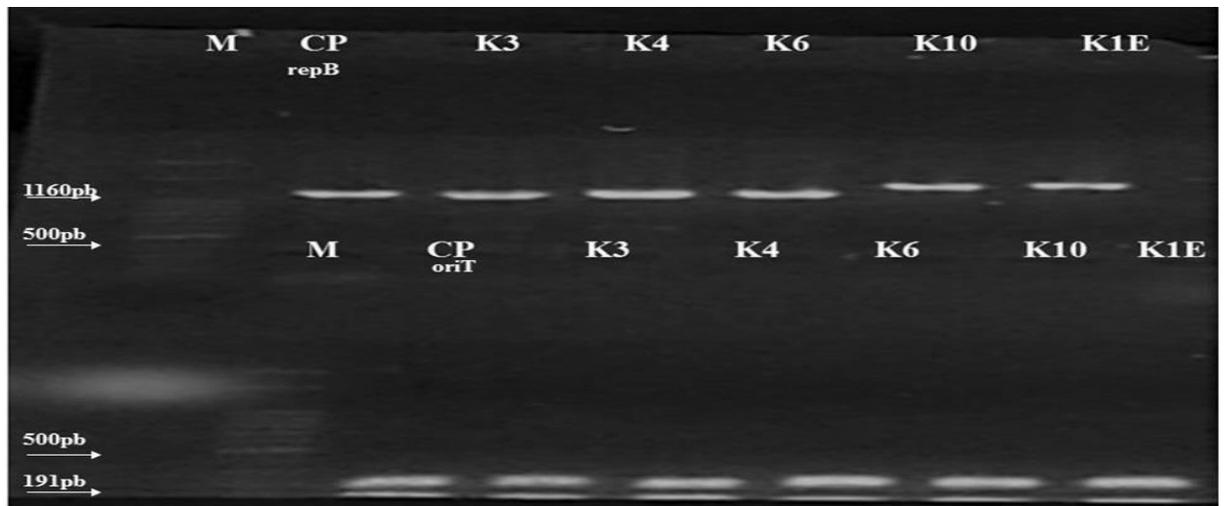


Figura 4. Eletroforese em gel de agarose à 1% do produto da PCR de isolados de *K. pneumoniae* para o IncQ1 para os genes *repB* (1160pb) e *oriT* (191pb). K – *Klebsiella pneumoniae*; E- Hospital particular; M- Marcador; CP- Controle positivo. Pb- Pare de bases.

Discussão

Klebsiella pneumoniae está entre um dos principais patógenos detectados em unidades hospitalares, causando infecções (SEIBERT et al., 2014), como também colonizando os pacientes (JONES et al., 2013). A presença dessa enterobactéria, mesmo que colonizando pacientes, pode aumentar o risco na disseminação de mecanismos de resistência dentro da unidade hospitalar.

Diante disso, o aumento da incidência de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos tem se tornado uma grande ameaça a saúde pública (GALETTI et al., 2016). Os genes de resistência a antimicrobianos são facilmente disseminados entre as enterobactérias, devido a sua grande maioria estarem inseridos em plasmídeos ou transposons (SHEN et al., 2009; CUZON et al., 2010). O gene *blaKPC* é encontrado associado a diferentes plasmídeos (ANDRADE et al., 2011). Contudo, pouco se sabe sobre o ambiente genético plasmidial desse gene no Brasil e principalmente em Recife- PE, onde ocorreram os primeiros relatos de KPC nesse país.

Os plasmídeos de todos os isolados bacterianos desse estudo apresentaram similaridades em relação aos seus genes de resistência, replicação e mobilidade. No entanto, a tipagem molecular pela ERIC-PCR, que é baseada em sequências repetitivas do cromossomo mostrou que todos os isolados continham perfis clonais distintos. Esses resultados evidenciam a presença de genes de resistência, tal como o *blaKPC-2* em diferentes isolados de *K. pneumoniae*.

O gene *blaKPC* é frequentemente encontrado inserido no transposon *Tn4401* com diferentes isoformas. A literatura descreveu até agora a presença de nove variantes diferentes do *Tn4401* (a-i) (NAAS et al., 2008; CHEN et al., 2011; CERQUEIRA et al., 2016), sendo as variantes “a” e “b” as mais comuns. Essas duas variantes apresentam as sequências de inserção ISK_{pn7} e ISK_{pn6} e os genes *istA* e *istB*, juntamente com o gene *blaKPC*. Dados esses que diferem em parte do presente estudo, no qual os transposons *Tn4401* dos cinco isolados de *K. pneumoniae* sequenciados não estavam presentes a sequência de inserção ISK_{pn7} e as sequências *TnpA*, *istA* e *istB*. Contudo, a sequência do gene *blaKPC*, a sequência de inserção ISK_{pn6} e uma transposase *TnpA* foram encontrados. Portanto, essa nova variante do *Tn4401* assemelha-se a variante “D” com pequenas diferenças onde há uma total deleção dos genes *istA* e *istB*, além do ISK_{pn7}, porém ele contém o gene *blaKPC* incompleto e possui a *TnpA* upstream ao *blaKPC*. Esses achados corroboram com os resultados também obtidos por nosso grupo de pesquisa com *Enterobacter aerogenes* em Recife-PE, Brasil (BELTRÃO et al. 2017),

dados ainda não publicados, onde essa nova variante do *Tn4401* foi encontrada transportando o gene *blaKPC* em plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade A/C e L/M. Portanto, esse transposon é uma nova variante do *Tn4401*, diferente das demais variantes já descritas na literatura.

Em relação aos grupos de incompatibilidade plasmidial, em *K. pneumoniae* são identificados mundialmente a predominância dos Incs A/C, L/M, N e FII, inclusive no Brasil (CUZON et al., 2010; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013;

CHAPARRO et al., 2014). Por outro lado, apenas um estudo realizado por PEREIRA et al. (2013) utilizou isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-Pernambuco, Brasil, porém não conseguiram tipar os plasmídeos. No entanto, no presente estudo foi identificado o plasmídeo do tipo IncQ1, que segundo SMALLA et al. (2000) é um plasmídeo pequeno que pode variar entre (5.1- 14.2 kb) que pode ser encontrado em diversas células bacterianas hospedeiras e não é conjugativo, mas é mobilizável e promíscuo, podendo ser transferido de uma bactéria para outra por plasmídeos conjugativos presentes na mesma célula bacteriana.

Em estudos anteriores, o plasmídeo IncQ e IncQ-like foram encontrados em diferentes isolados bacterianos como em *Escherichia coli*, *Salmonella enterica serovar*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*, no Canadá, Reino Unido e Alemanha, e os genes acessórios de resistência encontrados foram para resistência a estreptomicina, sulfonamida, tobramicina, canamicina, como também para cefalosporinas (*blaCMY-4* cefalosporinase) e a carbapenêmicos (*blaGES-5*) (RAWLINGS et al., 2001; POIREL et al., 2009; LOFTIE-EATON et al., 2012; KOTSAKIS et al., 2015). Recentemente, em um estudo de OLIVA et al (2017) com isolados clínicos de *Salmonella Typhimurium*, provenientes da Itália, apresentaram uma nova variante de IncQ transportando o gene de resistência para tetraciclina. No Brasil, são escassos estudos que relatem a presença do IncQ em isolados de *K. pneumoniae*. No entanto, o trabalho de NICOLETTI et al (2015) com isolados de *K. pneumoniae* provenientes de São Paulo, relataram o IncQ carreando a beta-lactamase, *blaBKC-1*. Portanto, o presente estudo descreve pela primeira vez a presença do gene *blaKPC-2* sendo carreado por plasmídeos do tipo IncQ nos cinco isolados de *K. pneumoniae* analisados. Esse dado é um indício de que esse tipo de plasmídeo foi um dos responsáveis pela disseminação do gene *blaKPC* entre *K. pneumoniae* em hospitais de Recife-PE, tendo em vista que foi a cidade onde ocorreu o primeiro relato de *blaKPC* no Brasil e que em seguida foram determinadas em várias outras espécies de enterobactérias portadoras de *blaKPC* em Recife, como por exemplo, *Serratia*, *Proteus mirabilis*, *E. aerogenes*, *E. cloacae* (CABRAL et al., 2012; CABRAL et al., 2015; MARGATE

et al., 2015). Anteriormente, nenhum estudo, tinha conseguido tipar os incs plasmidiais de *K. pneumoniae* em Recife-PE (PEREIRA et al., 2013), provavelmente dificultado porque os plasmídeos do tipo IncQ não estão descritos na metodologia de CARATTOLI et al (2005), pioneira nesse tipo de tipagem de plasmídeos bacterianos.

Considerando que vários estudos demonstram que o IncQ é um plasmídeo pequeno que pode variar entre 5.100 a 14.200 pb (SMALLA et al., 2000; POIREL et al., 2009; YAL et al., 2010) e que nesse estudo o tamanho do DNA plasmidial sequenciado de todos os isolados foi bem maior (27.508 pb - 93.506 pb), esses achados sugerem a presença de outros plasmídeos, não tipáveis, além do IncQ1, nos cinco isolados bacterianos analisados.

Entre os cinco isolados de *K. pneumoniae* desse estudo, o K10R2, proveniente de urina, mostrou algumas diferenças significativas em relação aos demais, seu DNA plasmidial apresentou um operon gênico correspondente a plasmídeos conjugativos como os genes *traJ*, *traR*, *traO*, *traU*, *traP*, *traL* e *traG*. Indicando, portanto, a presença de um plasmídeo conjugativo nesse isolado, porém não tipável com os replicons de CARATTOLI et al (2005) juntamente com o plasmídeo mobilizável IncQ na mesma célula bacteriana. Dessa forma isolados desse tipo contribuem ainda mais para a disseminação desses plasmídeos entre os isolados clínicos bacterianos

No mesmo isolado, K10R2, foi detectado também o gene de resistência ao metal arsênio *arsD*. A presença de gene de resistência à metal pesado pode permitir a bactéria viver em múltiplos ambientes, inclusive em ambientes contaminados com esses compostos (AMINOV; MACKIE, et al., 2007; POPOWSKA et al., 2013). Portanto, todos esses fatores juntos podem condicionar a essa bactéria ter uma vantagem na sua sobrevivência, uma vez que plasmídeos não carregam genes essenciais para o metabolismo bacteriano, mas estão envolvidos carregando e expressando genes adaptativos que conferirão alguma vantagem seletiva ao microrganismo (CARATTOLI et al., 2009). Como é o caso também do gene de virulência para a colicina (*col*), uma bacteriocina comumente encontrada em *E. coli* em plasmídeos Incs ColE (BRITO et al., 2004), que no presente estudo esse gene foi encontrado em três isolados de *K. pneumoniae*. Podendo conferir uma vantagem seletiva a esses isolados bacterianos, tendo em vista que as bacteriocinas matam outras bactérias, mas não a bactéria produtora, favorecendo a competição dessas bactérias produtoras de colicinas no ecossistema bacteriano.

Concluindo, os dados desse estudo demonstram pela primeira vez a presença do gene *blaKPC-2* em um plasmídeo IncQ, um plasmídeo mobilizável e promíscuo, como também uma nova variante do *Tn4401* em *K. pneumoniae*. Evidenciando também que o gene de resistência *arsD* estava localizado em elementos genéticos móveis, no DNA plasmidial sequenciado, o que

pode facilitar a sua disseminação.

Todos esses achados revelam a dinâmica do ambiente genético plasmidial do gene *blaKPC-2*, enfatizando a continuada recombinação e evolução de plasmídeos e tranposons, podendo potencializar assim a disseminação de diferentes genes de resistência em isolados de *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar, dificultando ainda mais possíveis medidas de controle dessa disseminação de resistência bacteriana.

Referências

- ADAMCZUK, M. et al. Diversity and Global Distribution of IncL/M Plasmids Enabling Horizontal Dissemination of β -Lactam Resistance Genes among the Enterobacteriaceae. *BioMed Research International*, 2015; v. **2015**.
- AMINOV, R., AND MACKIE, R. I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 2007; v. **271**, 147–161.
- ANDRADE LN et al. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 2011;v. **55**.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 2014; v. **30**, n. 15, p. 2114–2120.
- BELTRÃO, B.M.E. Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de blaKPC-2, blaSCO-1, sul2 e aph (3')-VII em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes*. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2017
- BRITO, Benito Guimarães de et al . Fatores de virulência presentes em amostras de *Escherichia coli* uropatogênicas - UPEC para suínos. *Cienc. Rural, Santa Maria*. 2004; v. **34**, n. 2, p. 645-652.
- CABRAL, A. B. et al. Detection of blaKPC-2 in *Proteus mirabilis* in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2015, v. **48**, n. 1, p. 94-95.
- CALISTO. F.A. G. Emergência de carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae*: o desafio de bactérias multirresistentes e virulentas. 2011. Dissertação. (Mestrado em Microbiologia aplicada) - Universidade de Lisboa, Lisboa.
- CARVER, T. et al. Artemis and ACT: Viewing, annotating and comparing sequences stored in a relational database. *Bioinformatics*, 2008; v. 24, n. 23, p. 2672–2676.
- CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *Journal of Microbiological Methods*, 2005; v. **63**, n. 3, p. 219–228.
- CERQUEIRA, G.C. Multi-institute analysis of carbapenem resistance reveals remarkable diversity, unexplained mechanisms, and limited clonal outbreaks, vol. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. v.**114**, 2017; n. 5, p. 1135-1140.
- CHAPARRO, P. J. P. Complete Nucleotide Sequences of Two blaKPC-2- Bearing IncN Plasmids Isolated from Sequence Type 442 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Four Years Apart. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2014; v. **58**. n. 05. p. 2958-2960.
- CHEN, L. et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (blaKPC) variants. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011;

v. **49**, n. 2, p. 579–585,

CHMELNITSKY, INNA. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae. Comparative genomics. 2014; v, **79**. n. 02, p. 255-260..

CUZON, NORDMANN. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produces β -Lactamase bla KPC-2. Gene. 2010; v. **16**. n. 09, p. 1349-1356.

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

FRANCES G. O'BRIEN et al. Origin-of-transfer sequences facilitate mobilisation of non-conjugative antimicrobial-resistance plasmids in *Staphylococcus aureus*. Nucleic Acids Research. 2016; v. **43**, n. 16.p. 7971–7983.

GALETTI R, Andrade LN, Chandler M, Varani ADM, Darini ALC. 2016. New small plasmid harboring blaKPC-2 in *Pseudomonas aeruginosa*. Antimicrob Agents Chemother. 2016; v. **60**. p. 3211–3214.

GOTZ, R. PUKALL. et al. Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. Applied and environmental microbiology. 1996; vol. **62**, n. 7. p. 2621-2628.

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

JONES, R. N. et al. Original article Susceptibility rates in Latin American nations : report from a regional resistance surveillance program. The Brazilian Journal Infectious Diseases, 2013; Salvador, v. **7**, n. 6, p. 672–681.

KOTSAKIS SD, TZOUVELEKIS LS, LEBESSI E, DOUDOULAKAKIS A, BOULI T, TZELEPI E, MIRIAGOU V. Characterization of a mobilizable IncQ plasmid encoding cephalosporinase CMY-4 in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 2015; v. **59**. p. 2964–2966.

LOFTIE-EATON W, RAWLINGS. Diversity, biology and evolution of IncQ- family plasmids. Plasmid. 2012; v. **67**. p. 15–34.

MARGATE, Emmily et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE, BRAZIL. Rev. Inst. Med. trop. 2015; .v. **57**, n. 4, p. 359-360.

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

MELO, R.C D.; BARROS, E. M. R.; LOUREIRO, N.G. MACIEL, M. A. V.; LOPES, C.S. et al Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2- Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife- PE, Current Microbiology An International Journal, 2014; v. **69**,

n.6, p. 824-831.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy* 2009; v. **53**. n. 01.p. 333-334.

MURRAY; GARDNER; RAWLINGS et al. Isolation of a New Broad-Host- Range IncQ-Like Plasmid, pTC-F14, from the Acidophilic Bacterium *Acidithiobacillus caldus* and Analysis of the Plasmid Replicon. *Journal of bacteriology*. 2001; v. **183**, n. 11. p. 3303–3309.

NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the betalactamase *bla*KPC gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008; v. **52**, n. 4,p.1257-1263.

NICOLETTI AG, Marcondes MFM, Martins WMBS, Almeida LGP, Nicolás MF, Vasconcelos ATR, Oliveira V, Gales AC. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; v. **59**.n. p. 5159–5164..

OLIVA M. et al. A novel group of IncQ1 plasmids conferring multidrug resistance. *Plasmid*. 2017; v. **89**. p. 22-26.

PEREIRA. S.P. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2012; v. **68**. n. p. 312-316.

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

POPOWSKA. M et al. Broad-host-range IncP-1 plasmids and their resistance potential. *Antimicrobial, Resistance and Chemotherapy*. 2013; v. **4**. p.44..

RAVICHITRA et al. Isolation and antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* from pus, sputum and urine sample. *International Journal of Current Microbiology and Applied Science*. 2014; v. **03**. n. 03. p. 115-119.

SCAVUZZI. A.L.M. 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 *bla* KPC-2. *Journal of Medical Microbiology*. 2017; v. **66**. n. 04. p. 477-484.

SEIBERT, G. et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. *Einstein*, 2014; v. **12**, n. 3, p. 282-286.

SEEMANN. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. *International Society for Computational Biology*. 2014; v. **30**.n. 14. p. 2068–2069.

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

SMILLIE,C. et al. Mobility of plasmids. *Microbiology and Molecular biology reviews*. 2010;

v. **74**. n. 03. p. 434-452.

VUOTTO, C. et al. Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*,” Pathogens, 2014; v.**3**,n.3,p.743-758.

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

7 CONCLUSÕES

Todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados no presente estudo apresentaram o plasmídeo do tipo IncQ1. Esse é o primeiro relato no mundo do IncQ1 carreando o gene de resistência *blaKPC-2*. Um plasmídeo não conjugativo, porém, mobilizável e promíscuo

O isolado K10R2 possuía genes codificantes para conjugação (*tra*), além das regiões codificantes do IncQ1. Evidenciando, portanto, a presença de pelo menos dois plasmídeos em uma mesma bactéria: um conjugativo (não tipável) e um mobilizável (identificado como IncQ1); podendo ter um potencial maior para a disseminação do gene de resistência *blaKPC-2*.

A detecção do gene de resistência ao metal pesado arsênio no isolado K10R2, isolado clínico proveniente de urina, evidenciou a disseminação de genes antes encontrados apenas em bactérias que habitavam em ambientes extremos, contaminados por esses tipos de compostos. Esse achado, pode conferir um potencial ainda mais patogênico e de resistência nesse isolado de *K. pneumoniae* e com grande potencial de disseminação entre outras bactérias, uma vez que está presente em plasmídeo.

Embora o gene *blaKPC-2* tenha sido codificado dentro do elemento *Tn4401*, como já bem descrito na literatura, foram encontradas características específicas, estruturais como a perda de *TnpA*, *ISKpn7*, dos genes *istA* e *istB*. O que sugere uma nova variante do transposon *Tn4401* em *K. pneumoniae*, já descrita anteriormente em *E. aerogenes* provenientes de Recife-PE. Estes achados enfatizam a continuada recombinação e evolução do elemento genético móvel *Tn4401*, principal responsável carreador do gene *blaKPC-2*.

As sequências de DNA plasmidial dos isolados do presente estudo, quando comparado com as sequências dos bancos de dados para o IncQ1, mostram diferenças em relação aos genes acessórios de resistência, enquanto a maioria dos depósitos de banco de dados apresentavam os plasmídeos IncQ carreando genes de resistência para estreptomicina e sulfonamidas. Os nossos isolados apenas apresentaram o gene de resistência *blaKPC-2*. Isso também difere dos estudos anteriores onde os principais Incs encontrados em *K. pneumoniae* portadoras de *blaKPC* foram IncLM, IncFII e o IncN.

A análise plasmidial quanto aos genes de virulência mostrou a presença de um gene para a bacteriocina, colicina (*col*) nos três isolados de *K. pneumoniae*. (K3R2, K4R2 e K6R2). Essa bacteriocina geralmente é encontrada em *E. coli* em Incs ColE. Esse resultado é importante tendo em vista que as bacteriocinas matam outras bactérias, mas não a bactéria produtora, o que pode favorecer a competição dessas bactérias produtoras de colicinas no ecossistema bacteriano.

Todos esses achados revelam a dinâmica do ambiente genético plasmidial do gene *blaKPC-*

2 encontrado em uma nova variante do transposon *Tn4401* e em um plasmídeo, identificado como IncQ. Enfatizando a continuada recombinação e evolução dos elementos genéticos móveis plasmídeos e transposons, potencializando assim a disseminação de diferentes genes de resistência em isolados de *K. pneumoniae* no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS

- AL-MARZOOQ F, MOHD YUSOF MY, TAY ST. Molecular Analysis of Antibiotic Resistance Determinants and Plasmids in Malaysian Isolates of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **PLOS One**. v. 10.n. 7.2015
- ALMEIDA, A.C.S. ; Cavalcanti, F.L.S. ; Vilela, M.A et al. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing na IncW plasmid harbouring the blaKPC- 2 gene in an intensive care unit patient. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V. 40, n. 4, p. 374-376. Ag 2012.
- AMBLER, P. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochemical Journal**, London, v. 276 (pt-1). p. 269-270. 1991.
- ANDRADE LN et al. Dissemination of blaKPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 55. 2011
- AZEVEDO, S.M.M. **Farmacologia dos Antibióticos Betalactâmicos**. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) Faculdade de Ciências da Saúde - Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2014
- BARTH. P. T. AND NIGEL J. GRINTER. Comparison of the Deoxyribonucleic Acid Molecular Weights and Homologies of Plasmids Conferring Linked Resistance to Streptomycin and Sulfonamides. **Journal of Bacteriology**. v. 120 n. 2.p. 618-630 Nov,1974.
- BELDER et al. Genetic Diversity of KPC-Producing *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Serratia marcescens*, and *Citrobacter freundii* Isolates from Argentina. **Microbial Drug Resistance**. n. 00. v.00. p. 1-8. 2017
- BELTRÃO, B.M.E. Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de blaKPC-2, blaSCO-1, sul2 e aph (3')-VII em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes*. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife- 2017.
- BENNETT. P. M. et al. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bactéria. **British Journal of Pharmacology**. v. 153. p. s347–s357. 2008.
- BERTONCHELI; M. C; HÖRNER. R. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences** vol. 44, n. 4. p. 577-599. 2008
- BOUCK, J.; MILLER, W.; GORRELL, J. H.; MUZNY, D.; GIBBS, R. A. Analysis of the Quality and Utility of Random Shotgun Sequencing at Low Redundancies. **Genome Res.**, v.10, p.1074-84, 1998.
- BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina

sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 969-976, Mar2010.

BRYAN, H. M et al. Transferable Drug Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 1. n. 1. p. 22-29. 1972

BRUNTON, L.L. Goodman & Gilman: **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12^a ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2012

CABRAL, A. B, 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, sep-oct. 2012.

CALISTO, F. “Emergência de Carbapenemases em *Klebsiella Pneumoniae*: O desafio de bactérias multirresistentes e virulentas,” Dissertação (Mestrado em Microbiologia Aplicada), Universidade de Lisboa, Lisboa (Portugal). 2011.

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

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

CARATTOLI A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**. Edinburgh, v, 303.n. 6-7. p. 298-304. 2013.

CARATTOLI, A. et al. In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 58. n. 7, p. 3895-3903. 2014.

CARVALHO e SILVA. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.40, n.3, p.735-744, mar, 2010

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

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

COSTA et al. Incidência de *Klebsiella* spp., resistotipagem e atividade antimicrobiana em isolados hospitalares. Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual da Paraíba-Campus I- Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Campina Grande- PB. 2015.

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

CHMELNITSKY, INNA. Mix and match of KPC-2 encoding plasmids in Enterobacteriaceae. **Comparative genomics**. vol, 79. n. 02, p. 255-260. 2014.

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

DAVIES, J. E DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.74, pp. 417-433- 2010

DHILLON, R. H.P.; CLARK, J. ESBLs: A Clear and Present Danger? **Critical care research and practice**, London, v. 2012, p. 1-11. Jan 2012.

DUAN, H.; CHAI, T.; LIU, J.; ZHANG, X.; QI, C.; GAO, J.; WANG, Y.; CAI, Y.; MIAO, Z.; YAO, M.; SCHLENKER, G.; Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, n. 5, p.511–517. jul, 2009.

FAIR and TOR. Antibiotics and Bacterial Resistance in the 21st Century. **Perspectives in Medicinal Chemistry** . v. 6 .p. 25–64 doi: 10.4137/PMC.S14459.

FERNANDES, R.; AMADOR, P. E PRUDÊNÇIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Reviews in Medical Microbiology**, v.24,n.1,p.7-17.Jan,2013.

FROST, L., Leplae, R., Summers, A., and Toussaint, A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. **Nat. Rev. Microbiol.** V.3. p. 722–732. 2005. doi: 10.1038/nrmicro1235

GOTZ, R. PUKALL. et al. Detection and Characterization of Broad-Host-Range Plasmids in Environmental Bacteria by PCR. **Applied and environmental microbiology**. vol. 62, n. 7. p. 2621-2628. 1996

GUIMARÃES, A.C.C.; Almeida, A.C.S.; Nicoletti, A.G, 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, jul,2013.

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

ITO. HIROYA et al. Analysis of the complete nucleotide sequence of an Actinobacillus pleuropneumoniae streptomycin–sulfonamide resistance plasmid, pMS260. **Plasmid**. V. 51, n. 1, P. 41-47. 2004.

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

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

MARRA, A. R.C. A. P.; PEREIRA, A. C.; GALES, L. C.; MENEZES, R. G. R.; CAL, J. M. A.; SOUZA, M. B.; EDMOND, C. F. ; WEY, S. B. Bloodstream infections with metallo--lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.50.n.1.p.388–390, Jan 2006.

MARTINS. S. B.M. ESTUDO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E VIRULÊNCIA EM ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE. 2014. **Dissertação**. (Mestrado em Biociências e biotecnologia em saúde). FIOCRUZ- Recife.

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

MATASEJE et al. Plasmid comparison and molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC from New York City and Toronto. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66. p. 1273-1277. 2011.

MATTHEW.T.REILLY et al. The Role Of Transposable Elements in Health and Diseases Of Central Nervous System. **The Journal of Neuroscience**. v 33.n.45. p. 17577–17586. 2013.

MELO, R.C D.; BARROS, E. M. R.; LOUREIRO, N.G. MACIEL, M. A. V.; LOPES, C.S. et al Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Recife- PE, **Current Microbiology An International Journal**, v. 69, n.6, p. 824-831. June, 2014, ISSN 0343-8651

MIRI HYUN et al. Changing trends in clinical characteristics and antibiotic susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The Korean Journal of Internal Medicine**. DOI: <https://doi.org/10.3904/kjim.2015.257>. 2017

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F. et al First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Journal of Antimicrobial Agents Chemotherapy** v. 53. n. 01.p. 333-334, Jan, 2009.

MURRAY; GARDNER; RAWLINGS et al. Isolation of a New Broad-Host-Range IncQ-Like Plasmid, pTC-F14, from the Acidophilic Bacterium *Acidithiobacillus caldus* and Analysis of the Plasmid Replicon. **Journal of bacteriology**. v. 183, n. 11. p. 3303–3309. 2001.

NASS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the betalactamase *blaKPC* gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 52, n. 4,p.1257-1263.Apr,2008.

NORDMANN, P.; POIREL, L et al. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 8, n. 6, p. 321-331, jun. 2002.

OLIVEIRA, F. P.; CIPULLO, P.; BURDMANN, E. A et al. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, São Paulo, v.21,n.4.p.444-452. 2006.

PELEG, A.Y.; Franklin, C. B. J.M.; Spelman, D.W et al. Dissemination of the metallo-â-Lactamase Gene blaIMP-4 among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia.

Clinical Infectious Disease. v.41. n.11. p. 1549-1556. 2005.

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

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 68 n. 2 p. 312-316. Out 2012.

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

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp as Nosocomial Pathogens : Epidemiology , Taxonomy , Typing Methods , and Pathogenicity Factors, **Clinical microbiology reviews**, Washington, v. 11, n. 4, p. 589-603,1998.

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

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

RAVICHITRA, K.N. et al. Isolation and antibiotic sensitivity of *Klebsiella pneumoniae* from pus, sputum and urine samples. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, Volume 3,number (3), pp. 115-119 , 2014,

ROBLEDO, I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, Mar 2010.

RUBIN, J. E. et al. NDM-1- producing Enterobacteriaceae from South Africa: moving towards endemicity. **Diagn microbiol. Infect Dis**, v. 79. n. 3,p. 378-380, jul 2014.

SCAVUZZI. A.L.M. 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 *bla* KPC-2. **Journal of Medical Microbiology.** v. 66. n. 04. p. 477-484. 2017

SEEMANN. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **International Society for Computational Biology.** v.30.n. 14. p. 2068–2069. 2014

SHINTANI M, SANCHEZ ZK AND KIMBARA K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology.** v.6.n. 242. p. 01-16. 2015

SMILLIE, C.; GARCILLÁN-BARCIA, M.P.; FRANCIÁ,M.V.; ROCHA, E.P.; DE LA CRUZ, F. Mobility of plasmids. **Microbiology and Molecular Biology Review.** v. 74. n.3.p. 434-452. 2010.

SECO. B.M.S et al. Persistência de plasmídeos que codificam carbapenemases do tipo New-Delhi- Metalo-b- lactamase- **Dissertação de mestrado-** Faculdade de Ciências Farmacêuticas

da Universidade de São Paulo. Departamento de análises clínicas e toxicológicas. 2016.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *K. pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein** (São Paulo), v.12.n.3, p. 282-286. Jul- Sep. 2014.

SHEN, P. et al. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing betalactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 10, p. 4333-4338, Out 2009.

SOUZA LOPES A.C. et al. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil. **Microbiol Res.** v. 160. p. 37-46. 2005

STIER, C.J. N. et al. Avaliação comparativa da região inguinal em relação à região retal para detecção de bactérias multirresistentes. **Dissertação** (Mestrado Profissional em Enfermagem), Universidade Federal do Paraná, 2013.

SUAREZ, C. E.; GUDIOL, F. Antibióticos Beta-lactamicos **Enfermedades Infecciosas Y Microbiologia Clinica**, v.27,n. 2, pp. 116-129. 2009.

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

TENOVER FC et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology.** v. 33. p. 2233-2239. 1995

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

TIETZE. E. Nucleotide Sequence and Genetic Characterization of the Novel IncQ- like Plasmid pIE1107. **Plasmid.** v. 39, n. 3, p. 165-181.1998.

TURTON, J. 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**, Edinburgh, v. 59, n. 5, p. 541-537, Maio 2010.

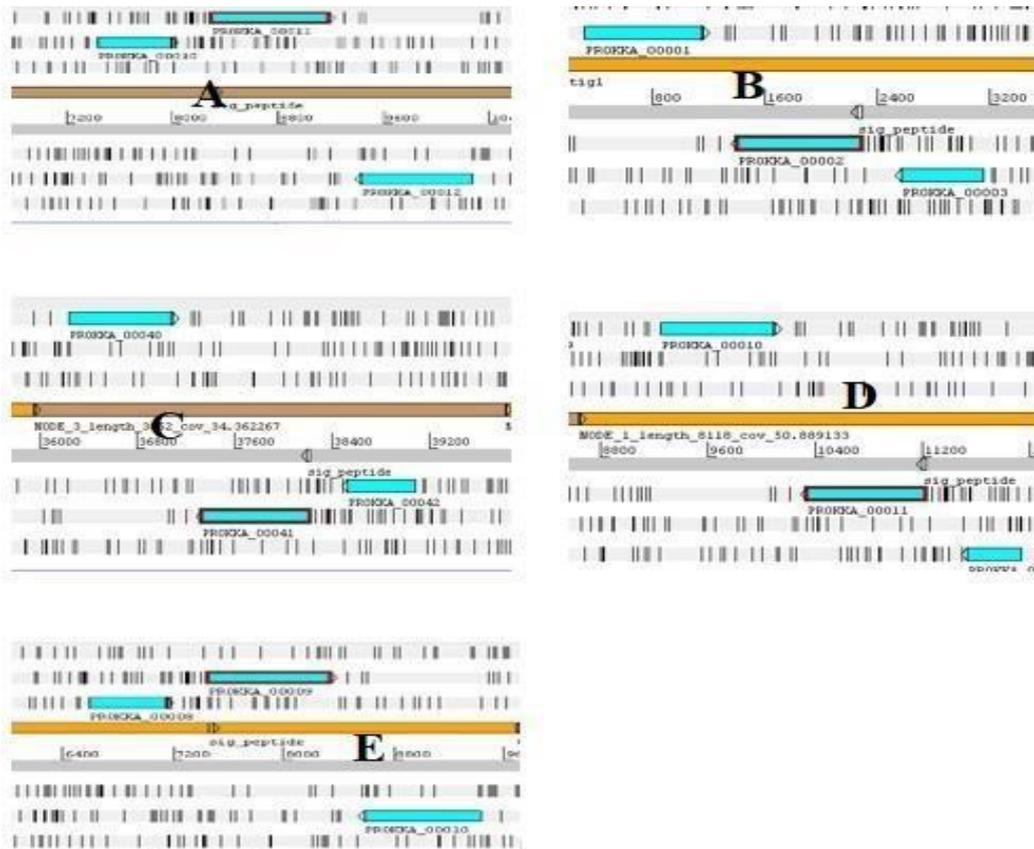
VASAIKAR S, Obi L, Morobe I, Bisi-Johnson. Molecular Characteristics and Antibiotic Resistance Profiles of *Klebsiella* Isolates in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. **International Journal of Microbiology.** 8486742: 1-7. 2017

VILLEGAS, M.V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 4, p.1553-1555. Apr, 2007.

VILLA et al. Diversity, virulence, and antimicrobial resistance of the KPCproducing *Klebsiella pneumoniae* ST307 clone. **Microbial Genomics.**v.3 DOI 10.1099/mgen.0.000110. 2017.

- VUOTTO, C. et al. “Antibiotic Resistance Related to Biofilm Formation in *Klebsiella pneumoniae*,” **Pathogens**,v.3,n.3,p.743-758,Setembro,2014.
- WALLACE, K. M. et al. Carbapenems: past, present, and future. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 55, n. 11, p. 4943-4960, Nov,2011.
- WALSH, T.; TOLEMAN, M A. The emergence of pan-resistant Gram-negative pathogens merits a rapid global political response. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.**, v. 67, n. 1, p. 1 - 3, oct, 2012.
- WANG et al. Characterization of the blaKPC-2 and blaKPC-3 genes and the novel blaKPC-15 gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Medical Microbiology**. v. 63. p. 981–987. 2014
- WANG et al . Spatial Distribution of high copy number plasmids in bacteria. **Plasmid**. v. 91. p. 2-8. 2017.
- WHITTLE. G. et al. Identification and Characterization of a Native *Dichelobacter nodosus* Plasmid, pDN1. **Plasmid**. v. 43, n.3, p. 230-234. 2000.
- YAU. S, et al. RSF1010-Like Plasmids in Australian *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and Origin of Their sul2-strA-strB Antibiotic Resistance Gene Cluster. **Microbial Drug Resistance** .v.16.n.4.p.249-252.2010.
- YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing B-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 4, p. 1151-1161, Apr,2001.
- ZAHA, A. *Biologia Molecular Básica*. 3a Edição. Editora **Mercado Aberto** Ltda, Porto Alegre - RS. 421 páginas. 2003.
- ZERBINO, D. R.; BIRNEY, E. Velvet: Algorithms for de novo short read assembly using de Bruijn graph. **Genome Research**, v. 18, n. 5, p. 821–829, 2008.
- ZERBINO, D. R. Using the Velvet de novo assembler for short-read sequencing technologies. **Curr. Protoc. Bioinforma**

APÊNDICE A - VISUALIZAÇÃO PELO PROGRAMA ARTEMIS, MOSTRANDO A LOCALIZAÇÃO DO GENE blaKPC-2 NOS ISOLADOS K3R2, K4R2, K6R2, K10R2 E K1

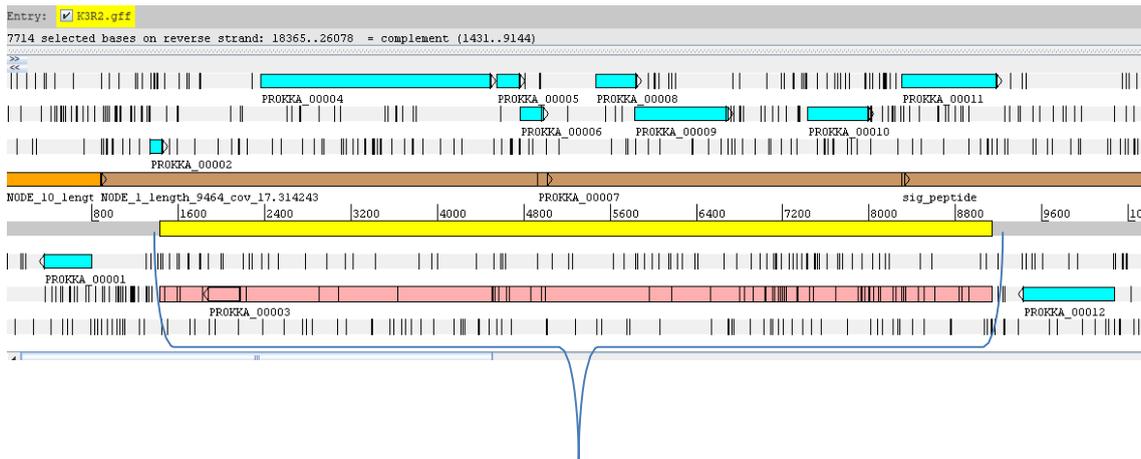


Visualização dos genes: blaKPC-2 (A) isolado K3R2 inserido no locus PROKKA 11 do contig NODE_1, (B) isolado K4R2 inserido no locus PROKKA_02 do contig NODE_ 1;(C) isolado K6R2 inserido no locus PROKKA 41 do contig NODE_3, (D) isolado K10R2 inserido no locus PROKKA_11 do contig NODE_1, (E) isolado K1 inserido no locus PROKKA_ 09 do contig NODE_1.

Fonte: Autor desta dissertação

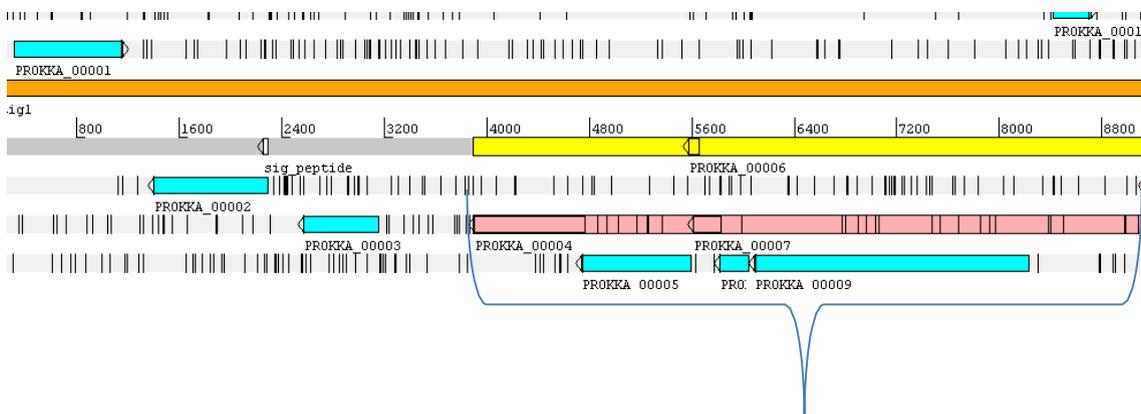
APÊNDICE B - VISUALIZAÇÃO NO PROGRAMA ARTEMIS DAS REGIÕES CORRESPONDENTE AO INCQ

K3R2



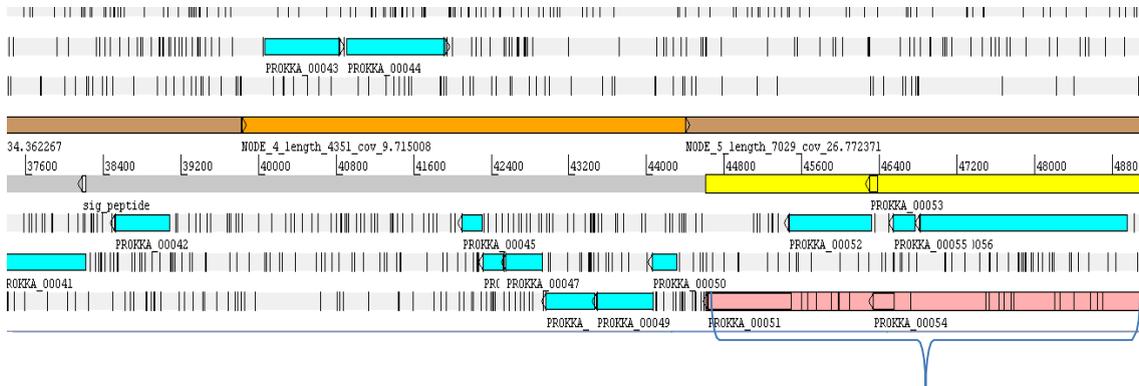
Região específica que contém os genes de replicação e mobilidade (*repA*, *repB*, *repC*, *mobA*, *mobB* e *mobC*), além dos genes do *IncQ1* (*oriV*, *oriT* e *repB*)- *NODE_1*. Comprimento do contig: 9699pb. PROKKA 11- *blaKPC-2*.

K4R2



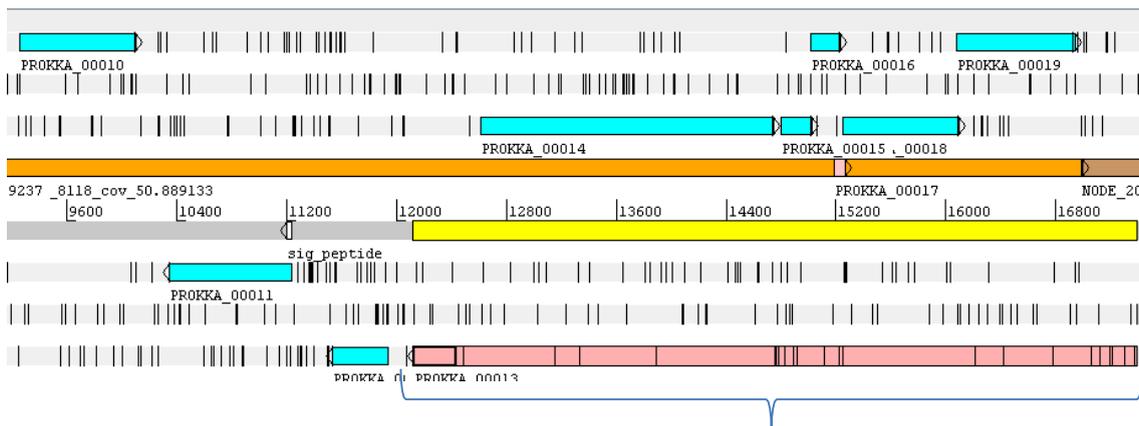
Região específica que contém os genes de replicação e mobilidade (*repA*, *repB*, *repC*, *mobA*, *mobB* e *mobC*), além dos genes do *IncQ1* (*oriV*, *oriT* e *repB*)- *NODE_1*. Comprimento do contig: 9704pb. PROKKA 2- *blaKPC-2*.

K6R2



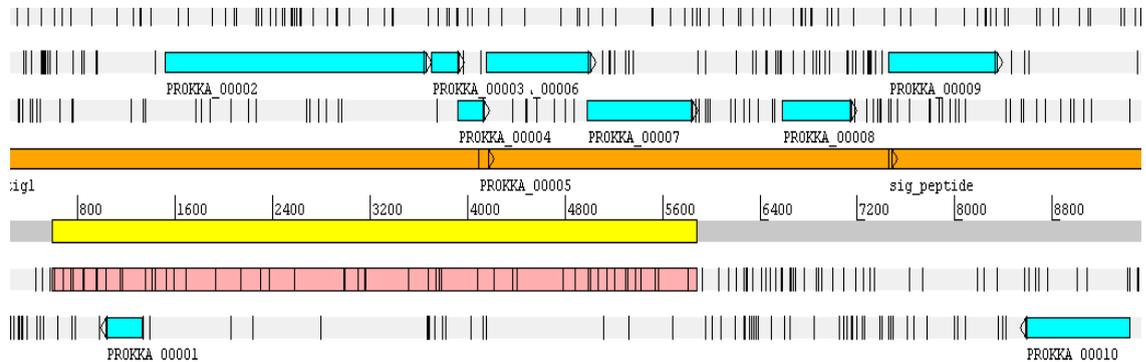
Região específica que contém os genes de replicação e mobilidade (*repA*, *repB*, *repC*, *mobA*, *mobB* e *mobC*), além dos genes do IncQ1 (*oriV*, *oriT* e *repB*)- NODE_5. Comprimento do contig: 7029pb. PROKKA 41- *bla*KPC-2, NODE_ 05.

K10R2



Região específica que contém os genes de replicação e mobilidade (*repA*, *repB*, *repC*, *mobA*, *mobB* e *mobC*), além dos genes do IncQ1 (*oriV*, *oriT* e *repB*)- NODE_1. Comprimento do contig: 8118pb. PROKKA 11- *bla*KPC-2, NODE_ 1.

K1



Região específica que contém os genes de replicação e mobilidade (*repA*, *repB*, *repC*, *mobA*, *mobB* e *mobC*), além dos genes do *IncQ1* (*oriV*, *oriT* e *repB*) - NODE_1. Comprimento do contig: 9690pb. PROKKA 09- *blaKPC-2* NODE_1.

Fonte: Autor desta Dissertação

APÊNDICE C - ALINHAMENTO DA REGIÃO ORIV DOS ISOLADOS DO PRESENTE ESTUDO COM O DE REFERENCIA AO INCQ RSF1010

oriV K3R2

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatc
cactaggcgcggttatcagcgccttgtggggcgtgctgcccttcccgaatagcccggccagaggccgtagctggctt
atcgctgcgctaggctacacaccgcccaccgctgcgcggcagggggaaaggcgggcaaagcccgctaaacccacac
caaacccgcagaaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgc
agccccgcaggcctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtc
gtggtcgcgttcaaggt

oriV K4R2:

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatc
cactaggcgcggttatcagcgccttgtggggcgtgctgcccttcccgaatagcccggccagaggccgtagctggctt
atcgctgcgctaggctacacaccgcccaccgctgcgcggcagggggaaaggcgggcaaagcccgctaaacccacac
caaacccgcagaaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgc
agccccgcaggcctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtc
gtggtcgcgttcaaggt

oriV K6R2:

ctcccgtaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
cgccccaaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatc
cactaggcgcggttatcagcgccttgtggggcgtgctgcccttcccgaatagcccggccagaggccgtagctggctt
atcgctgcgctaggctacacaccgcccaccgctgcgcggcagggggaaaggcgggcaaagcccgctaaacccacac
caaacccgcagaaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgc
agccccgcaggcctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtc
gtggtcgcgttcaaggt

oriV K10R2:

ctcccgtactaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
 cgccccaaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatc
 cactaggcgcggttatcagcgccttgtggggcgctgctgcccttgcccaatatgccggccagaggccgtagctggtct
 attcgtgcgctaggctacacaccgccccaccgctgcgcggcagggggaaaggcgggcaaagcccgctaaacccacac
 caaaccccgagaaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgc
 agccccgcaggcctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtc
 gtggtcgcgttcaaggt.

ORIV K1

ctcccgtactaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtca
 cgccccaaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatc
 cactaggcgcggttatcagcgccttgtggggcgctgctgcccttgcccaatatgccggccagaggccgtagctggtct
 attcgtgcgctaggctacacaccgccccaccgctgcgcggcagggggaaaggcgggcaaagcccgctaaacccacac
 caaaccccgagaaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgc
 agccccgcaggcctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtc
 gtggtcgcgttcaaggt

RSF1010: GenBank: M21475.1

actaactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgccccctgcaataactgtcacgaaccctgcaataactgtcacgcccc
 aaacctgcaaacccagcaggggcgggggctggcgggggtgttgaaaaatccatcatgattatctaagaataatccactagg
 cgcggttatcagccttgtggggcggtgctgcccttgcccaatatgccggccagaggccgtagctggtctattcgtgcg
 ctaggctacacaccgccccaccgctgcgcgcagggggaaaggcgggcaaagccgtaaacccacaccaaaccccgag
 aaatacgtggagcgttttagccgcttttagcggcctttccccctaccggaagggtgggggcgcgtgtgcagccccgcagg
 cctgtctcggtcgatcattcagcccggctcatccttctggcgtggcggcagaccgaacaaggcgcggtcgtggtcgcgttca
 agt