



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

LAMARTINE RODRIGUES MARTINS

**ESTUDO MOLECULAR DE MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIALES PROVENIENTES DE
COLONIZAÇÃO E DE INFECÇÃO EM PACIENTES COM E SEM COVID-19 EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DE RECIFE-PE.**

LAMARTINE RODRIGUES MARTINS

**ESTUDO MOLECULAR DE MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIALES PROVENIENTES DE
COLONIZAÇÃO E DE INFECÇÃO EM PACIENTES COM E SEM COVID-19 EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DE RECIFE-PE.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Medicina Tropical do
Centro de Ciências Médicas da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos para a obtenção
do título de Mestre em Medicina Tropical.

Área de concentração: Medicina Tropical.

Mestrando: Lamartine Rodrigues Martins

Orientadora: Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes

Coorientadora: Dra. Elizabeth Maria Bispo Beltrão

RECIFE

2023

M386e	Martins, Lamartine Rodrigues. Estudo molecular de mecanismos enzimáticos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos e relação clonal de isolados clínicos de enterobactérias provenientes de colonização e de infecção em pacientes com e sem covid-19 em um hospital público de Recife-PE / Lamartine Rodrigues Martins. – 2023. 123 p. : il. Orientadora: Ana Catarina de Souza Lopes. Coorientadora: Elizabeth Maria Bispo Beltrão Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas. Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical. Recife, 2023. Inclui referências. 1. Células clonais. 2. Covid-19. 3. Hospital. 4. Genes MDR. 5. Blandm. Lopes, Ana Catarina de Souza (orientador). II. Título.
616.988	CDD (23.ed.) UFPE (CCS 2023 - 142)

LAMARTINE RODRIGUES MARTINS

**ESTUDO MOLECULAR DE MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE RESISTÊNCIA
AOS ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E RELAÇÃO CLONAL DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE ENTEROBACTERIALES PROVENIENTES DE
COLONIZAÇÃO E DE INFECÇÃO EM PACIENTES COM E SEM COVID-19 EM
UM HOSPITAL PÚBLICO DE RECIFE-PE.**

Aprovada em: 24/02/2023.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Líbia Cristina Rocha Vilela Moura (Presidente da Banca/Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Maria Betânia Melo de Oliveira (Examinadora Interna) Universidade Federal de
Pernambuco (UFPE)

Profa. Dra. Sibele Ribeiro de Oliveira (Examinadora Externa) Centro Universitário Tabosa de
Almeida (Asces-Unita)

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico todo amor as mulheres da minha família materna que nunca faltaram, a minha mãe Janaina Martins Boulitreau, a minha querida avó Maria Bernadete Martins Boulitreau e tia avó Dulcila que cito para dedicar a todas as suas filhas, a minha doce “Avó Beata” Beatriz *in memoriam*, as minhas primas Maria Helena, Maria Inês, Morgana e Maysa e a sua tia Carminha, as minhas tias Eveline Mercês Martins Boulitreau e Georgina Martins Boulitreau e a minha madrinha Sineide Josefa de Lima. Pessoas que são fundamentais em minha vida.

Ao meu pai, por sempre apoiar meus sonhos e estudos, dedico aos anos que não pudemos estar juntos.

Ao meu querido irmão Mattheus Rodrigues Martins, por ser quem é.

As minhas primas mais novas, Sabrina, Giovanna, Gabrielle e Laura.

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

A minha coorientadora Dr^a Maria Elizabeth Bispo Beltrão, por todo conhecimento repassado, por horas dedicadas a melhor realização possível deste trabalho, por toda amizade dedicada e por todos os momentos que podemos rir.

A Coordenação da Pós-graduação na pessoa da Professora Dr^a Heloísa Ramos Lacerda de Melo, pelos esforços e dedicação para o melhoramento do curso.

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

Às amigas que fiz no laboratório, da Medicina Tropical, CCM-UFPE, Mitaliene, Alessandra, Camila e Raquel.

Às amigas do nosso grupo de pesquisa Maria Izabely Silva Pimentel e Érica Maria de Oliveira, por quem nutro profunda admiração, sou grato por todo companheirismo risadas e momentos de autoajuda.

A Josineide de Barros e Fernanda Gomes Beserra do Laboratório de Microbiologia do hospital de estudo pelo apoio na disponibilidade dos isolados, laudos e dados dos pacientes, além da parceria com os dados da pesquisa e a CCIH do hospital.

Ao amigo Igor Vasconcelos Rocha pela amizade e apoio nas quantificações de DNA.

Ao corpo técnico do programa e em especial ao Walter e Neemias pela presteza no desempenho da função.

Aos demais familiares, tios e primos e primas, gratidão por todos vocês.

Dedico especialmente aos meus amigos da AME, Alyson, Roxana e Regina, figuras que são essenciais, dedico a Regina que é sem sombra de dúvidas um presente para a caminhada terrestre.

Agradeço a Plataforma de Sequenciamento LABBE/CCB na UFPE pelo uso das instalações para o sequenciamento dos produtos de PCR, em especial a Dr^a Heidi Lacerda e ao Prof Dr. Valdir de Queiroz Balbino.

As ferramentas de busca de artigos online (Sci-hub).

Aos meus professores da Graduação em especial a Ana Cecília e Sibele Oliveira.

A Universidade Federal de Pernambuco, através do Centro de Ciências Médicas na Área de Medicina Tropical pela oportunidade de cursar esta Pós-Graduação.

Agradeço a cada um que marcou minha vida, positivamente ou não, toda minha gratidão.

“Que se deve entender por infinito? “O que não tem começo nem fim: o desconhecido; tudo o que é desconhecido é infinito”.” (KARDEC, 2013, p. 55)

RESUMO

A pandemia do SARS-CoV-2 trouxe consigo várias problemáticas relacionadas a internação de pacientes em hospitais, pois muitos pacientes são colonizados e desenvolvem coinfeções por bactérias gram-negativas, que podem ou não estar relacionadas a cepas clonais. Este estudo investigou a presença dos principais genes e enzimas de resistência aos antibióticos betalactâmicos, bem como a relação clonal entre os isolados clínicos da ordem Enterobacterales, obtidos de pacientes com e sem covid-19 em um hospital no nordeste brasileiro, entre 2021 e 2022. Foram analisados 45 isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos. O DNA dos isolados foi extraído e submetido a PCR e sequenciamento de amplicons (*bla*_{NDM}). Dentre os isolados clínicos as espécies mais frequentemente isoladas foram *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* e *Proteus mirabilis*. Ocorreu a detecção de *bla*_{NDM} (46,66%), *bla*_{KPC} (35,55%) e a copresença de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} (17,79%). A tipagem pela ERIC-PCR mostrou disseminação multiclonal e alta variabilidade genética nos isolados. O principal gene de resistência detectado foi o *bla*_{NDM}, com presença de variantes dos *bla*_{NDM-5} e *bla*_{NDM-7}, sendo o primeiro relato de *bla*_{NDM-5}, em cepas de *P. mirabilis* e do complexo *E. cloacae* nas Américas e fora da Ásia respectivamente. Portanto, nesse estudo foram descritas várias espécies de Enterobacterales, resistentes aos carbapenêmicos, colonizando e como agentes de infecções em pacientes com ou sem covid-19, predominando a *K. pneumoniae*. Destaca-se que houve mais detecções de *bla*_{NDM} em relação ao *bla*_{KPC}, o que mostra um aumento da disseminação e de mutações do gene *bla*_{NDM} em Enterobacterales em Recife-PE, Brasil, como também novas variantes desse gene, nunca detectadas no continente americano.

Palavras-chaves: Células Clonais; covid-19; Hospital; Genes MDR; *bla*_{NDM}.

ABSTRACT

The SARS-CoV-2 pandemic brought with it several problems related to the hospitalization of patients, as many patients are colonized and develop co-infections by gram-negative bacteria, which may or may not be related to clonal strains. This study investigated the presence of the main beta-lactam antibiotic resistance genes and enzymes, as well as the clonal relationship between clinical isolates of the Enterobacterales order, obtained from patients with and without covid-19 in a hospital in northeastern Brazil, between 2021 and 2022. 45 clinical isolates resistant to carbapenems were analyzed. The DNA of the isolates was extracted and subjected to PCR and amplicon sequencing (*bla*_{NDM}). Among the clinical isolates, the most frequently isolated species were *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*. There was detection of *bla*_{NDM} (46.66%), *bla*_{KPC} (35.55%) and both (17.79%) (17.79%). Typing by ERIC-PCR showed multiclonal dissemination and high genetic variability in the isolates. The main resistance gene detected was *bla*_{NDM}, with the presence of variants of *bla*_{NDM-5} and *bla*_{NDM-7}, being the first report of *bla*_{NDM-5} in strains of *P. mirabilis* and the *E. cloacae* complex in the Americas and outside Asia respectively. Therefore, in this study, several species of Enterobacterales were described, resistant to carbapenems, colonizing and as agents of infections in patients with or without covid-19, predominantly *K. pneumoniae*. It is noteworthy that there were more detections of *bla*_{NDM} compared to *bla*_{KPC}, which shows an increase in the dissemination and mutations of the *bla*_{NDM} gene in Enterobacterales in Recife-PE, Brazil, as well as new variants of this gene, which until now have never been detected on the American continent.

Keywords: Clone Cells; covid-19; Hospital; Genes, MDR; *bla*_{NDM}.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- <i>Klebsiella pneumoniae</i> crescida em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).....	18
Figura 2- <i>Klebsiella pneumoniae</i> crescida em ágar MacConkey	20
Figura 3- <i>Serratia marcescens</i> cultivada em meio de cultura ágar MacConkey e ágar BHI. ...	24
Figura 4- <i>Proteus</i> spp. crescido em ágar Sangue.....	25

Artigo

Figura 1 a - Relação entre os perfis dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil	58
Figura 1 b - Relação entre os perfis dos isolados clínicos de <i>S. marcescens</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil	58
Figura 1 c - Relação entre os perfis dos isolados clínicos de <i>P. mirabilis</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil	58
Figura 1 d - Relação entre os perfis dos isolados de <i>P. stuartii</i> resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil	58

LISTA DE TABELAS

Quadro 1 - Características bioquímicas do gênero <i>Klebsiella</i>	20
Quadro 2 - Características bioquímicas do gênero <i>Enterobacter</i>	22
Quadro 3 - Características bioquímicas do gênero <i>Serratia</i>	24
Quadro 4 - Características bioquímicas do gênero <i>Proteus</i>	25
Quadro 5 - Características bioquímicas do gênero <i>Providencia</i>	27
Quadro 6 - Características bioquímicas da espécie <i>M. morganii</i>	28
Quadro 7 - Classificação das betalactamases	30
Quadro 8 - Primers que serão utilizados na PCR e sequenciamento dos genes.	41

Artigo

Tabela 1 - Origem das amostras, perfil de resistência e ERIC-PCR de isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de diferentes sítios de infecção de pacientes com covid-19 em um hospital público de Recife-PE, Brasil.....	50
Tabela 2 - Origem das amostras, perfil de resistência e ERIC-PCR de isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de diferentes sítios de infecção de pacientes sem covid-19 em um hospital público de Recife-PE, Brasil	52
Tabela 3 - Colonização (swab retal) em pacientes com e sem covid-19, origem das amostras, testes fenotípicos de resistência, genes de resistência, motivo de alta dos pacientes, perfil de resistência e ERIC-PCR	54
Tabela 4 - Comparação entre pacientes com e sem covid-19 oriundos de infecção e colonização por isolados clínicos de Enterobacterales	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.2	SARS-CoV-2	15
2.3	ENTEROBACTERIALES.....	16
2.4	<i>KLEBSIELLA</i> SPP	17
2.5	<i>ENTEROBACTER</i> SPP.....	20
2.6	<i>SERRATIA</i> SPP.....	22
2.7	<i>PROTEUS</i> SPP.	24
2.8	<i>PROVIDENCIA</i> SPP.....	26
2.10	ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E BETALACTAMASES.....	29
2.11	RESISTÊNCIA MEDIADA POR CARBAPENEMASES	33
2.11.1	serino carbapenemases: kpc, ges e oxa.	33
2.11.2	metalo-betalactamases.....	34
2.11.3	tipagem molecular e relação clonal.....	36
3	DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS	38
3.1	OBJETIVO GERAL.....	38
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	38
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1	ISOLADOS BACTERIANOS	39
4.2	TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	39
4.3	EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL.....	39
4.4	CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>BLA_{KPC}</i> , <i>BLA_{GES}</i> , <i>BLA_{VIM}</i> , <i>BLA_{IMP}</i> E <i>BLA_{NDM}</i>	40
4.5	ERIC-PCR	42
4.6	ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE	42
4.7	SEQUENCIAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	42
5	RESULTADOS	43
6	CONCLUSÕES.....	69

REFERÊNCIAS	70
APÊNDICE A – ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS.....	83
APÊNDICE B – TABELAS E FIGURA – ARTIGO 1	107
APÊNDICE C – MATERIAL SUPLEMENTAR – ARTIGO 1	115
ANEXO A - REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA CAAE	118
ANEXO B - CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO	123

1 INTRODUÇÃO

As espécies da ordem Enterobacterales estão comumente associadas a surtos em pacientes internados em ambientes hospitalares, causando infecções pulmonares, sanguíneas, urinárias, de feridas ou ainda relacionadas a choques sépticos (YI e KIM, 2021; OMBELET *et al.*, 2022). A pandemia de covid-19 resultou em colapso e superlotação de hospitais, o que possibilitou a transmissão de cepas multidrogarresistentes (MDR) e o agravamento dos quadros nas redes de saúde pública e privada mundialmente, levando milhões de indivíduos a óbito (LAI *et al.*, 2021; CANTÓN *et al.*, 2020; MACEDO *et al.*, 2022; COSTA *et al.*, 2022).

A resistência aos carbapenêmicos é uma das principais problemáticas enfrentadas no ambiente hospitalar, visto que estes são opções de última escolha. Tais antimicrobianos funcionam como uma reserva estratégica de fármacos para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas. No entanto, devido ao uso indiscriminado no mundo, surgiram uma ampla gama de enzimas de resistência carbapenemases, comumente encontradas nos gêneros: *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e *Escherichia*. Dentre as carbapenemases, destacam-se a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e a New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM), que conferem resistência a todos os beta-lactâmicos, ressaltando que a NDM não degrada os monobactâmicos (HAJI *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2022).

A alta variabilidade genética da ordem Enterobacterales, gerada por mutação e recombinação, possibilita uma maior capacidade adaptativa. Mundialmente, foram observadas altas taxas de variabilidade em cepas associadas à presença de genes para carbapenemases, de diferentes sítios infecciosos (MAHMOUD *et al.*, 2020; GHOSH *et al.*, 2022; KUNDU *et al.*, 2022). Diversas técnicas são utilizadas para determinar essa variabilidade genética bacteriana. Dentre elas, a técnica de “*enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR*” (ERIC-PCR), que determina o perfil genético e a relação clonal dos isolados bacterianos (DUAN *et al.*, 2009). No Brasil, alguns estudos identificaram uma alta variabilidade genética de diferentes espécies de Enterobacterales, principalmente em *Klebsiella pneumoniae*, seguido de *Proteus mirabilis* (FIRMO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; BELTRÃO *et al.*, 2022).

Diante das altas taxas de cepas MDRs associadas à resistência aos carbapenêmicos, agravadas durante a pandemia de covid-19, esse trabalho teve como objetivo investigar e

comparar a presença dos principais genes e enzimas de resistência aos carbapenêmicos, bem como a relação clonal entre os isolados clínicos da ordem Enterobacterales, provenientes de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19, de um hospital público no nordeste brasileiro entre 2021 e 2022.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SARS-CoV-2

O primeiro coronavírus descrito que teve características pandêmicas foi o SARS (*severe acute respiratory syndrome*) que causava a síndrome respiratória aguda grave descrito primeiramente em 2002 este vírus atingiu 29 países, revelando uma propensão para rápida disseminação. As autoridades de saúde demoraram um tempo até que medidas severas fossem tomadas para que seu espalhamento fosse contido, em 2012 foi isolado o MERS-CoV (*Middle East respiratory syndrome* coronavírus) proveniente de animais (BÁEZ-SANTOS; JOHN; MESECAR., 2015).

Em dezembro de 2019 foi isolado em Wuhan na China continental, uma nova estirpe que recebeu o nome de SARS-CoV-2. Em janeiro do ano seguinte já se sabia a sequência do novo coronavírus, no final do mesmo mês diversos países, já haviam relatado o isolamento do SARS-CoV-2, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou que a epidemia se tratava de uma emergência internacional (LANA *et al.*, 2020). Declarando como pandemia em 11 de março de 2020 (OMS, 2020). O SARS-CoV-2 é pertencente à família *Coronaviridae*, ao gênero *Betacoronavirus* e ao subgênero *Sarbecovirus*, corresponde ao sétimo coronavírus humano descrito (KHALIL; KHALIL, 2020).

A ocorrência de infecções respiratórias em pacientes com covid-19, em um hospital universitário da Alemanha foi majoritariamente causada por Enterobacterales, com destaque para a *Klebsiella* spp. (ROTHER *et al.*, 2021). Farfour *et al.* (2020), descreveram que a presença de cepas de *Escherichia coli*, em um hospital francês, portadoras dos genes *bla_{NDM}* e *bla_{CTX-M-15}*, em pacientes que estavam com covid-19 positivos por PCR, demonstrou as dificuldades adicionais no manejo dos pacientes coinfectados. Lai *et al.* (2021) em um estudo na China descreveram o acréscimo em todos os grupos de antibióticos utilizados de modo profilático ou de tratamento para pacientes com covid-19, observando ainda a presença de variadas carbapenemases. Na Itália em um estudo realizado por Grasselli *et al.* (2021), em que se avaliou a evolução de pacientes com pneumonia por SARS-CoV-2, foi relatado uma coinfeção decorrente de Enterobacterales em 238/389 pacientes, correlacionando níveis de resistência aos carbapenêmicos com a presença de carbapenemases.

Em pacientes com covid-19, no Canadá, que necessitaram de ventilação mecânica ou Oxigenação por membrana extracorpórea, foi verificada a presença de bactérias gram-negativas causando infecções MDR (TAN *et al.*, 2022). Na Guiana Francesa foi registrado o acréscimo

de cepas de Enterobacterales isoladas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) (NGOULA *et al.*, 2022), na Espanha, foram descritas cepas portadoras dos genes *bla_{VIM}*, *bla_{KPC}* e *bla_{OXA-48}*, de pacientes internados (PINTADO *et al.*, 2021). No Brasil há relatos que demonstram a produção de carbapenemases por cepas oriundas de pacientes com diagnóstico de covid-19, além de apresentar um aumento substancial na quantidade de isolados portadores de *bla_{NDM}*, após a pandemia (MONTEIRO *et al.*, 2022), demonstrando a severidade e as novas complicações para o desfecho do tratamento clínico de pacientes com covid-19 e sem, visto que a de antibióticos de modo profilático, pode acabar por aumentar a pressão seletiva dentro dos ambientes hospitalares.

2.2 ENTEROBACTERALES

A ordem Enterobacterales é composta por um grupo grande e diversificado de bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos e não formadores de esporos, sendo constituída de sete clados: *Enterobacter-Escherichia*, *Erwinia-Pantoea*, *Pectobacterium-Dickeya*, *Hafnia-Edwardsiella*, *Proteus-Xenorhabdus*, *Yersinia-Serratia*, *Budvicia* (ADEOLU *et al.*, 2016), que se subdividem em espécies, estas podem estar envolvidas em Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), causando infecções nos mais variados sítios. As principais *Enterobacterales* envolvidas em IRAS são as espécies de *Escherichia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Serratia* e *Enterobacter*, patógenos originários da microbiota intestinal, estando presentes também nas unidades hospitalares (PARAJULI *et al.*, 2017, ZILBERBERG *et al.*, 2017).

Diante da atual taxa de resistência bacteriana aos antimicrobianos (GLAS, 2022; ANVISA, 2022), a infecção causada por estes microrganismos pode aumentar a morbidade em especial para pacientes com Síndrome da Respiração Aguda Grave (SRAG), levando a necessidade de fármacos cada vez mais específicos que eliminem os patógenos o mais brevemente possível (BARDI *et al.*, 2021). Contudo se, por um lado se têm diversos antibióticos com variados mecanismos de ação, por outro as bactérias possuem diversos mecanismos de inibição dos princípios ativos, tais como: enzimas, bombas de efluxo, perca de porinas entre outros, podendo ocorrer a transmissão horizontal dos genes que carregam. (NORDMANN; POIREL, 2020; LEPE; MARTINEZ, 2020).

A transmissibilidade dos genes de resistência aos antimicrobianos pode se dar de três diferentes formas: pela transdução, conjugação e transformação todos esses mecanismos podem

ser utilizados para que diferentes espécies transmitam os diferentes genes envolvidos na resistência bacteriana (KONEMAN *et al.*, 2017).

Garcia-Vidal *et al* (2020) definiram coinfeções e superinfecções com relação ao momento de diagnóstico, onde aqueles que foram admitidos e nas primeiras 24h após a admissão por covid-19, e diagnosticados com infecções foram categorizados em coinfeções. Já aqueles que após 48h receberam diagnóstico, foram categorizados como superinfecções adquiridas no hospital, afirmam que as coinfeções aumentam substancialmente os níveis de morbi-mortalidade no ambiente hospitalar e que são quadros comuns em outras viroses respiratórias. Predominantemente os quadros de coinfeção bacteriana tem como principal agente da ordem *Enterobacterales* a *K. pneumoniae*, mas também são reportados isolados de *Proteus spp.*, *Enterobacter spp.* e *Citrobacter spp.*, já quanto a resistência a antimicrobianos os isolados de *E. coli* foram os que mais frequentemente eram MDR (MIRZAEI *et al.*, 2020; HOQUE *et al.*, 2021).

A presença de espécies bacterianas da ordem *Enterobacterales* foi previamente descrita em pacientes com diagnóstico de covid-19 e Pneumonia Associada a Ventilação Mecânica (PAV) e/ou infecção da corrente sanguínea e/ou infecção da corrente sanguínea relacionada à cateter e/ou pneumonia adquirida no hospital a presença das espécies bacterianas da ordem *Enterobacterales*, sendo identificadas espécies de *Klebsiella spp* e *Escherichia coli* (GRASSELLI *et al.*, 2021; TAN *et al.*, 2022; NGOULA *et al.*, 2022). Foram identificadas cepas bacterianas em pacientes com covid-19 que foram admitidos em UTIs. As cepas mais comuns foram *K. pneumoniae*, *K. aerogenes*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii*, *C. farmeri* *C. braakii* e *Enterobacter cloacae* (MARIN-CORRAL *et al.*, 2021; PINTADO *et al.*, 2021; MONTEIRO *et al.*, 2022).

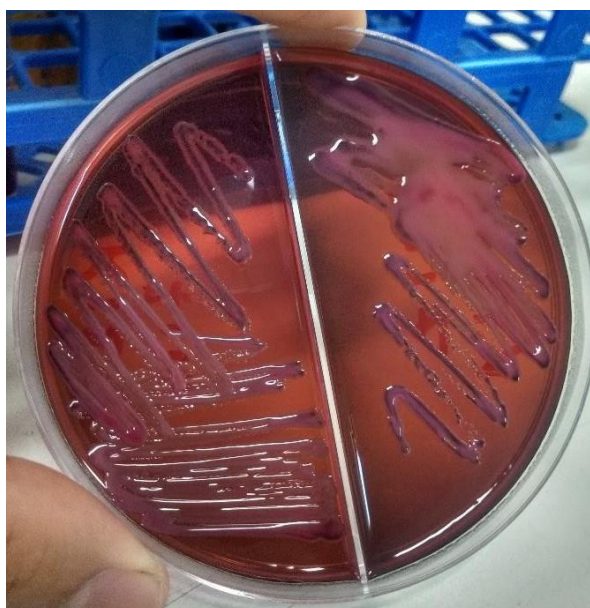
2.3 KLEBSIELLA SPP.

O gênero *Klebsiella* foi descrito pela primeira vez no século 19 por Edwin Klebs, um microbiologista alemão, que o descreveu como bacilo de Friedlander, conhecido por causar uma grave pneumonia, por vezes fatais. As bactérias do gênero *Klebsiella* são conhecidas por serem patógenos oportunistas, que aderem facilmente a mucosa do trato respiratório e que acometem pacientes imunossuprimidos ou em internação hospitalar. Atualmente são conhecidas seis espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *K. granulomatis*, *K. variicola*, *K. quasipneumoniae* e *K. michiganensis*. A espécie *K. pneumoniae* compreende as subespécies:

pneumoniae, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*; enquanto *K. quasipneumoniae* compreende as subespécies: *quasipneumoniae* e *similipneumoniae* (KONEMAN *et al.*, 2017; LPSN, 2019).

A principal representante deste gênero é a *K. pneumoniae*, (**Figura 1**) tida como patógeno oportunista e segundo a Boletim número 25 da ANVISA sobre segurança do paciente e qualidade dos serviços de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) o principal patógeno da ordem *Enterobacterales* multirresistente é a *K. pneumoniae*, sendo ainda o principal patógeno isolado nas UTIs dos hospitais do Brasil chegando a índices de multirresistência de 60%.

Figura 1: *Klebsiella pneumoniae* crescida em ágar Eosina Azul de Metileno (EMB).



Fonte: Autor

Dois diferentes isolados de *Klebsiella pneumoniae* pacientes distintos, os dois isolados são procedentes de secreção traqueal.

Em humanos, *K. pneumoniae* normalmente coloniza as superfícies mucosas da orofaringe e do trato gastrointestinal, cerca de 38% dos indivíduos transportam essa bactéria nas fezes e de 1% a 6% na nasofaringe (KONEMAN *et al.*, 2017), a prevalência de isolamento pode chegar a ocorrer em 20% dos pacientes hospitalizados. Nos pacientes com infecções decorrentes de *K. pneumoniae* 49% dos isolados são provenientes da própria microbiota (GORRIE *et al.*, 2017). No ambiente hospitalar, estão envolvidas em casos de PAV (CAVALCANTI *et al.*, 2019; CABRAL *et al.*, 2012), choque séptico (ZHANG *et al.*, 2018), diarreia (SHAHUNJA *et al.*, 2020), infecções de corrente sanguínea (PROTONOTARIOU *et al.*, 2018; CAVALCANTI *et al.*, 2019; IMAI *et al.*, 2019; PICCIRILLI *et al.*, 2020), sepse neonatal (DING *et al.*, 2019; MUKHERJEE *et al.*, 2021), infecções do trato urinário (ITU) (CABRAL *et al.*, 2012; MAZZARIOL *et al.*, 2017; KESHI 2019;) e infecções de pele, feridas

e tecidos moles (CABRAL *et al.*, 2012; CAVALCANTI *et al.*, 2019; BAVISKAR *et al.*, 2019). Como patógeno oportunista, são um problema entre neonatos, idosos e indivíduos imunocomprometidos hospitalizados e que apresentam sérias doenças de base, como *diabetes mellitus* e doença pulmonar obstrutiva crônica (KONEMAN *et al.*, 2017).

As espécies de *Klebsiella* são constantemente associadas a IRAS e junto de tal fato constituem uma severa preocupação para a saúde pública, pois estão associadas a níveis elevados de morbimortalidade, em especial pneumonias e septicemias (KONEMAN *et al.*, 2017). Em um estudo realizado por Borer *et al.* (2015) foi descrita uma taxa atribuível de mortalidade para infecções causadas por *K. pneumoniae* em 50% dos pacientes acometidos. A elevada taxa de resistência e a dificuldade em controlar a disseminação no ambiente hospitalar é em parte devida à facilidade de transmissão de genes carregados em plasmídeos (TRABULSI *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2018).

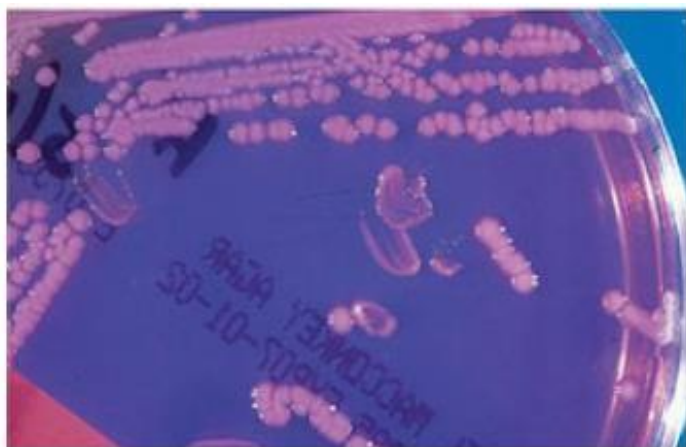
Os principais genes de resistência aos betalactâmicos isolados por Oliveira *et al.* (2019) em cepas de *K. pneumoniae* em um hospital em Recife-PE foram *bla_{KPC}* (88,8%) e *bla_{NDM}* (59,2%), porém outros trabalhos (SPYROPOULOU *et al.*, 2015; FIRMO *et al.* 2020; FLORES *et al.*, 2020) também descrevem outras enzimas envolvidas nos casos de infecção ou em colonização por *Klebsiella* como GES, VIM, IMP e OXA-48, chegando a delinear a coocorrência de duas ou mais enzimas identificadas em uma única cepa bacteriana, identificando duas cepas pandroga resistentes e a ocorrência de cepas clonais disseminadas no ambiente hospitalar.

O gênero possui características bioquímicas bem descritas conforme apresentado no **quadro 1** e as subespécies podem ser facilmente identificadas com base nestas características. No meio de cultura Ágar Sangue e Ágar MacConkey (**Figura 2**), comumente é descrita com característica mucoide e no Ágar MacConkey com colônias grandes e rosas ou roxas, característica essa que permite a conclusão de que a bactéria fermenta a lactose presente no meio de cultura e produz ácido, alterando a cor do meio de cultura. O aspecto mucoide é devido a cápsula de polissacarídeos que *in vivo* é um fator de virulência (TRABULSI *et al.*, 2015; KONEMAN *et al.*, 2017; OLIVEIRA, 2019). A *K. aerogenes*, anteriormente descrita como *Enterobacter aerogenes*, após reclassificação taxonômica, foi descrita como pertencente ao gênero *Klebsiella* (LIFEMAP, 2023).

Quadro 1: Características bioquímicas do gênero *Klebsiella*.

Provas Bioquímicas	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>K. ozaenae</i>	<i>K. aerogenes</i>
Indol	-	+	-	-
Ureia	+	+	-	-
Lisina	+	+	-	+
Arginina	-	-	-	-
Ornitina	-	-	-	+
DNase	-	-	-	-
Gelatinase	-	-	NA	NA
Glicose	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+
Citrato	+	+	-	+
H ₂ S	-	-	-	-
Motilidade	-	-	-	+

“+” Prova bioquímica positiva, “-” Prova bioquímica negativa e “NA” Não se Aplica. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

Figura 2: *Klebsiella pneumoniae* crescida em ágar MacConkey.

Fonte: KONEMAN *et al.* (2017).

Observar característica mucoide e coloração rosa, característica do gênero *Klebsiella*.

2.4 ENTEROBACTER SPP.

Durante anos a elevada produção de gás por variadas cepas do gênero *Enterobacter* fez com que as estirpes fossem conhecidas como *Aerobacter aerogenes*, tal designação do gênero mudou apenas nos anos de 1960, quando Hormaeche e Edwards (1960) identificaram diversas espécies e reclassificaram outras tantas. Segundo o *List of Prokaryotic names with Standing in*

Nomenclature (LPSN) atualmente existem 22 espécies de *Enterobacter* (MURRAY *et al.*, 2014; TRABULSI *et al.*, 2015; KONEMAN *et al.*, 2017).

A espécie que predomina em infecções humanas é a *E. cloacae* (ZHANG *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2018; FERRY *et al.*, 2020) atingindo vários órgãos e tendo uma elevada capacidade de adesão sobre equipamentos médicos e soluções parenterais. Essa espécie encontra-se bem distribuída no solo, na água, no esgoto e nos vegetais, fazendo parte da microbiota comensal intestinal sendo classificada como patógeno oportunista, envolvida em infecções do trato urinário, do trato respiratório e infecções cutâneas, podendo causar meningite e septicemia. (TRABULSI *et al.*, 2015; OUCHENIR *et al.*, 2017; KONEMAN *et al.*, 2017; NORI *et al.*, 2020; MARTINEZ-GUERRA *et al.*, 2021).

Segundo o documento Boletim número 25 da ANVISA sobre segurança do paciente e qualidade dos serviços de saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) as espécies de *Enterobacter* corresponde ao segundo gênero de *Enterobacterales* mais isolado na UTI, assim como a segunda espécie em percentual de multirresistência. Em um trabalho realizado em Recife-PE Cabral *et al.* (2017) caracterizam cepas de *E. cloacae* sob a ótica da presença de clones e quais os genes de resistência estavam presentes, os pesquisadores identificaram a presença dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* em amostras de hemocultura, urina, secreção traqueal e culturas de vigilância, chegando a localizar cepas que simultaneamente foram positivas para dois genes ao mesmo tempo. Além disso foi observada a presença de clones bacterianos espalhados por todos os setores do hospital investigado, incluindo os isolados da UTI neonatal que foram caracterizados com o mesmo perfil genético.

A caracterização genética em amostras de *E. cloacae* nos trabalhos de Wang *et al.* (2018) e Hu *et al.* (2020) demonstraram a presença de *bla_{KPC-2}*, *bla_{NDM-1}*, *bla_{NDM-5}*, *bla_{VIM-1}*, *bla_{VIM-4}*, *bla_{VIM-26}* e *bla_{IMP}* e *bla_{IMP-4}*, sendo todos isolados MDR, onde também foi descrito a presença de clones bacterianos em amostras provenientes de um hospital terciário, de múltiplos sítios e variados setores.

A PAV em pacientes com covid-19 foi registrada no estudo de Rouzé *et al.* (2021) onde foram isolados em 54 pacientes a bactéria *Enterobacter* spp. sendo o segundo mais prevalente em infecções respiratórias neste estudo. O perfil de multirresistência durante infecções secundárias da covid-19 foi descrito por Gomez-Simmonds *et al.* (2020) que acompanharam 13 pacientes e identificaram em cepas de *E. cloacae* a presença do gene *bla_{NDM}* e a da enzima NDM em amostras de secreção traqueal. De dois pacientes, um evoluiu para alta e outro a óbito,

o paciente que recebeu alta por melhora era do sexo masculino, 48 anos, a paciente que evoluiu a óbito era do sexo feminino e tinha 86 anos. Em outro estudo, Nori *et al.* (2020) em Nova York, observaram que isolados de *E. cloacae* que causaram infecções respiratórias, sanguíneas e ITU carregavam o gene *bla_{NDM-1}*. Em estudo retrospectivo no Reino Unido foi encontrada uma cepa de *E. cloacae* em um paciente com PAV, além de duas outras cepas de pacientes com covid-19 (HUGHES *et al.*, 2020).

A identificação fenotípica pode ser realizada através de características bioquímicas, conforme descrito no **quadro 2**. Porém é importante observar que a identificação do gênero *Enterobacter* está em constante atualização e novos membros de importância clínica podem ser incluídos ou retirados, a partir de pesquisas taxonômicas que reclassificam e renomeiam tais espécies, como o caso da *E. aerogenes*, que atualmente se designa *K. aerogenes* (KONEMAN *et al.*, 2017; DAVIN-REGLI *et al.*, 2019; LIFEMAP, 2023).

Quadro 2: Características bioquímicas do gênero *Enterobacter*.

Provas Bioquímicas	<i>E. cloacae</i>	<i>E. sakazakii</i>	<i>E. gergoviae</i>
Indol	-	-	-
Ureia	+	-	+
Lisina	-	-	+
Arginina	+	+	-
Ornitina	+	+	+
Glicose	+	+	+
Lactose	+	+	+
Citrato	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Motilidade	+	+	+

“+” Prova bioquímica positiva e “-” Prova bioquímica negativa. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

2.5 *SERRATIA* SPP.

As espécies de *Serratia* não foram inicialmente descritas como patógenos, apenas em 1951, quando o primeiro surto causado pela espécie *S. marcescens* foi registrado (WHEAT; ZUCKERMAN; RANTZ, 1951). A partir deste período este gênero passou a ser monitorado e vem sendo descrito em infecções em humanos sobretudo em meningite infantil, endocardites, pneumonias, sepse, ceratite, conjuntivite, infecções do trato urinário, da corrente sanguínea e de feridas cirúrgicas (GRINBERG; BISHBURG; NAGARAKANTI, 2020; VEVE *et al.*, 2020; KIM *et al.*, 2020; FERREIRA *et al.*, 2022; BECHMANN *et al.*, 2022).

As espécies do gênero *Serratia* pertencem à família *Yersiniaceae* juntamente com os gêneros *Yersinia*, *Chania*, *Ewingella*, *Rahnella*, *Rouxiiella* e *Samsonia* (ADEOLU *et al.*, 2016). Segundo o LPSN taxonomicamente, existem 23 espécies e outras subespécies reconhecidas, destas, *S. marcescens* é a mais comumente associada a infecções em humanos (CRISTINA *et al.*, 2019).

Embora apresente uma virulência relativamente baixa, também é um causa de IRAS em pacientes imunocomprometidos, submetidos a dispositivos médicos e em ambientes hospitalares como nas UTIs (CRISTINA *et al.*, 2019; REDONDO-BRAVO *et al.*, 2019). No panorama brasileiro segundo o Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 25 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021) entre as Enterobacterales é o segundo patógeno mais resistente isolado de pacientes em UTIs e blocos cirúrgicos. Também foram descritos a disseminação clonal de *S. marcescens* coportadoras dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em um hospital do Recife-PE (FIRMO *et al.*, 2020). Em Palmas-TO foram descritos 54 isolados onde foram identificados a presença de *bla_{OXA-1}* (14,8%), *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{KPC}* (100%) e *bla_{TEM}* (100%), e todos os isolados foram MDR (FERREIRA *et al.*, 2020). Em Recife-PE foi descrito fora do ambiente hospitalar a presença do gene *bla_{KPC-2}* e *bla_{TEM-1}* (MARGATE *et al.*, 2015).

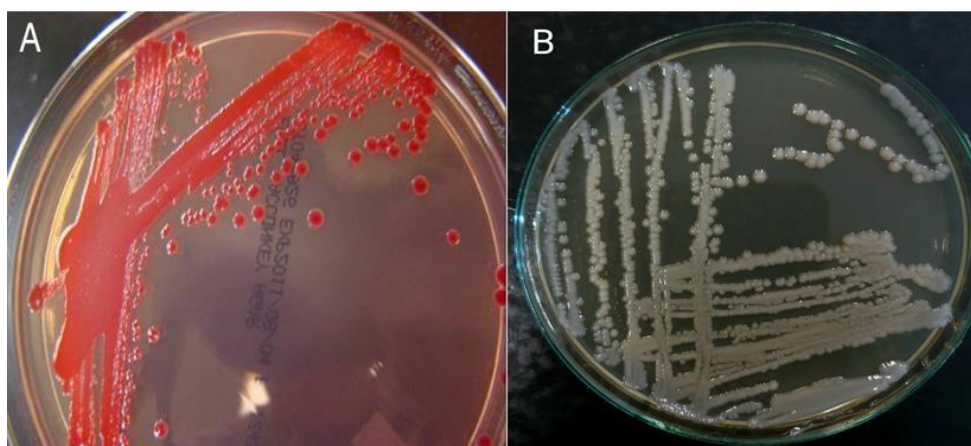
Em pacientes com covid-19 foram isoladas cepas de *S. marcescens* em amostras de secreção traqueal onde foram descritos os genes de resistência *bla_{VIM}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{KPC}* (PINTADO *et al.*, 2021). Outros autores (AMARSY *et al.*, 2020) descreveram isolados de *S. marcescens* provenientes de UTI em amostras de secreção traqueal, sendo todos os isolados MDR. As espécies de *Serratia* advindas de pacientes com covid-19 foram correlacionadas com a gravidade da doença e com o desenvolvimento de PAV (MA *et al.*, 2021).

A identificação das principais espécies de *Serratia* podem ser realizadas mediante características bioquímicas (**figura 3**), conforme descrito no **quadro 3**. Este microrganismo é uma bactéria gram-negativa, móvel, positiva para catalase, citrato, ornitina descarboxilase e lisina. Não produz dissulfeto de hidrogênio nem indol. Além disso, *S. marcescens* é capaz de fermentar sacarose e D-sorbitol, mas não fermenta L-arabinose, rafinose nem lactose. É a única entre as *Enterobacterales* que produz três enzimas hidrolíticas: lipase, gelatinase e DNase e é resistente a colistina e a cefalotina. São onipresentes no ambiente (MAHLEN, 2011; TRABULSI *et al.*, 2015; KONEMAN *et al.*, 2017).

Quadro 3: Características bioquímicas do gênero *Serratia*.

Provas Bioquímicas	<i>S. liquefaciens</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>S. rubideae</i>
Indol	-	-	-
Ureia	-	-	-
Lisina	+	+	+
Arginina	-	-	-
Ornitina	+	+	+
Glicose	+	+	-
Lactose	-	-	+
Citrato	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Motilidade	+	+	+
Gelatinase	+	+	+
Lipase	+	+	+
DNase	+	+	+
Pigmento Rosa/Vermelho/ Laranja	-	+	+

“+” Prova bioquímica positiva e “-” Prova bioquímica negativa. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

Figura 3: *S. marcescens* cultivada em meio de cultura ágar MacConkey e ágar BHI.

Fonte: A: MAHLEN, 2011; B: FIRMO, 2020.

Observar característica avermelhada na placa A, típica da espécie *S. marcescens*. Na placa B é possível visualizar o crescimento em meio BHI.

2.6 *PROTEUS* SPP.

A tribo ao que o gênero *Proteus* pertence é denominada *Proteeae*, compreendendo mais dois gêneros *Morganella* e *Providencia* (ADEOLU *et al.*, 2016). Tendo como principal representante a espécie *Proteus mirabilis*, no que diz respeito a infecções do trato urinário por IRAS ou na comunidade. O gênero possui cinco espécies nomeadas *P. vulgaris*, *P. mirabilis*,

P. myxofaciens, *P. penneri* e *P. hauseri*. Suas espécies são encontradas no solo, na água e em materiais contaminados por fezes. Em culturas realizadas nos laboratórios são observadas características de motilidade em placas com meio não inibidor do véu (swarming) (**Figura 4**) (TRABULSI *et al.*, 2015; KONEMAN *et al.*, 2017).

Figura 4: *Proteus* spp. crescido em ágar sangue.



Fonte: KONEMAN *et al.* (2017).

Observar característica do véu formado pelas colônias, muito comum entre as espécies crescidas em meios sem inibição.

A identificação pode ser realizada com base nas características bioquímicas conforme descrito no **quadro 4**.

Quadro 4: Características bioquímicas do gênero *Proteus*.

Provas Bioquímicas	<i>P. vulgaris</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>P. penneri</i>
Indol	+	-	-
Ureia	+	+	+
Lisina	-	-	-
Arginina	-	-	-
Ornitina	-	+	-
Glicose	+	+	-
Lactose	-	-	-
Citrato	-	+	-
H ₂ S	+	+	-
Motilidade	+	+	+

Fenilalanina	+	+	+
--------------	---	---	---

“+” Prova bioquímica positiva e “-” Prova bioquímica negativa. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

As infecções decorrentes de *P. vulgaris*, são mais frequentemente observadas em pacientes com imunossupressão, do trato urinário ou de feridas, principalmente aqueles que receberam regimes de antibióticos prolongados. O gênero *Proteus* possui diversas cepas resistentes ao imipenem, a espécie *P. mirabilis* é sensível a ampicilina e as cefalosporinas, porém o *P. vulgaris* é resistente (KONEMAN *et al.*, 2017). Esta resistência é devida a sua capacidade de degradar ureia, a urina torna-se alcalina e tal fator pode contribuir para o desenvolvimento de litíase renal (BURALL *et al.*, 2004).

Em um artigo produzido por Firmo *et al.* (2020) foi relatado que o *P. mirabilis* foi o segundo microrganismo mais isolado de amostras provenientes de urina, e apresentou o perfil de multirresistência. Além da presença dos genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, foram identificados também dois clones nos isolados. Bontron *et al.* (2019) investigaram a variabilidade nos níveis de resistência mediante a presença da *bla*_{VIM}, onde correlacionaram a presença de cópias dos genes ao nível de resistência (MIC) diante do imipenem. Em um estudo realizado em um hospital terciário que passava por um surto Protonotariou *et al.* (2020) descreveram isolados de *P. mirabilis* coprodutores de carbapenemase (VIM e TEM-2). Ao realizar a PCR foram encontrados os genes de resistência *bla*_{VIM} *bla*_{TEM-2} em todos os vinte e sete isolados, e foi evidenciado que estes possuíam relação clonal.

Isolados de *P. mirabilis* foram descritos carreando genes de virulência, principalmente em cepas que não eram portadoras dos genes de resistência pesquisados (*bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}), para a surpresa dos pesquisadores (BELTRÃO *et al.*, 2021). O acúmulo dos genes de virulência é esperado em cepas de que possuam genes de resistência, posto que os determinantes de virulência e resistência são convergentes (MELO *et al.*, 2014; MORALES-LEÓN *et al.*, 2021). Em três cepas de *P. mirabilis* oriundas de amostras de urina e ponta de cateter, ocorreu o primeiro registro de *bla*_{GES-1} no mundo (BELTRÃO; OLIVEIRA; LOPES, 2021), além do primeiro relato de *bla*_{OXA-10} no Brasil em amostras de secreção traqueal, urina e ponta de cateter (BELTRÃO *et al.*, 2021) oriundas de diferentes setores do mesmo hospital.

2.7 PROVIDENCIA SPP.

Atualmente são descritas cinco espécies do gênero *Providencia*: *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, *P. rustigianii* e *P. heimbachae*, as que possuem maior relevância clínica

são *P. alcalifaciens*, *P. stuartii*, *P. rettgeri*, todas as espécies são capazes de desaminar a fenilalanina, porém só a *P. rettgeri* é capaz de degradar ureia. Normalmente são isoladas em Infecções do Trato Urinário (ITU) e não são corriqueiramente isoladas em hospitais (KONEMAN *et al.*, 2017).

Em isolados bacterianos os genes de resistência *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-10}, *bla*_{CMY-2} e *bla*_{TEM-1} foram descritos em duas cepas bacterianas, sendo ainda identificadas bombas de efluxo e alterações no alvo dos antibióticos (PIZA-BUITRAGO *et al.*, 2020). Em um estudo de acompanhamento na Romênia, foram isoladas 77 cepas de *P. stuartii* de cinco hospitais terciários diferentes, das quais 66 eram MDR, e possuidoras do *bla*_{NDM}. Neste estudo, foi observada a presença de clones bacterianos em diferentes hospitais (MOLNAR *et al.*, 2019).

Durante um surto de *P. rettgeri* em um hospital da Coreia do Sul as cepas isoladas possuíam concomitantemente dois genes de resistência *bla*_{NDM-1} e *bla*_{PER}, sendo todas MDR, e procedentes unicamente de ITU em pacientes que faziam o uso de cateter vesical, onde a similaridade genética chegou a 90% (SHIN *et al.* 2018).

Durante o processamento e análise de 8317 amostras foram descritas 400 cepas de *Proteaeae*, dessas, 107 cepas em do gênero *Providencia*, provenientes de diferentes setores e origens, onde existia a presença dos genes *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{KPC}, em alguns isolados essa presença foi relatada simultaneamente (RUS *et al.*, 2020)

Para a identificação das espécies do gênero *Providencia* são adotadas as características bioquímicas descritas no **quadro 5**.

Quadro 5: Características bioquímicas do gênero *Providencia*.

Provas Bioquímicas	<i>P. alcalifaciens</i>	<i>P. stuartii</i>	<i>P. rettgeri</i>
Indol	+	+	+
Ureia	-	-	+
Lisina	-	-	-
Glicose	+	-	-
Lactose	-	-	-
Citrato	+	+	+
H ₂ S	-	-	-
Motilidade	+	+	+
Fenilalanina	+	+	+

“+” Prova bioquímica positiva e “-” Prova bioquímica negativa. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

2.8 MORGANELLA MORGANII

As espécies de *Morganella* spp. são pertencentes a família *Morganellaceae* e entre as suas principais características bioquímicas destacam-se a oxidase negativa e a negatividade dos testes para a descarboxilação da arginina e para o teste Voges–Proskauer, além da anaerobiose facultativa (ADEOLU *et al.*, 2016; ZARIC *et al.*, 2021). Tais cepas são tidas como patógenos oportunistas, normalmente envolvidas em IRAS, principalmente em feridas pós-operatórias e infecções do trato urinário de pacientes imunocomprometidos, possuindo ainda um registro elevado de taxas de mortalidade no ambiente hospitalar (ZARIC *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2016).

Em isolados clínicos de cepas de *M. morganii* são registrados a presença de genes de resistência aos carbapenêmicos, como os genes *bla_{NDM}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{OXA-48}* oriundos de pacientes internados ou em tratamento para doenças como câncer (GOU *et al.*, 2019; SUGITA *et al.*, 2021; XIANG *et al.*, 2021). Em um estudo realizado em dois hospitais terciários da China, sendo os isolados oriundos em sua maioria de uroculturas, secreção de feridas e culturas de escarro, apresentaram resistência a diversas classes de antibióticos, como aminoglicosídeos, flouroquinolonas, sulfonamidas, betalactâmicos em especial os monobactâmicos (XIANG *et al.*, 2021).

Para a identificação da espécie *M. morganii* são adotadas as características bioquímicas descritas no **quadro 6**.

Quadro 6: Características bioquímicas da espécie *M. morganii*

Provas Bioquímicas	<i>M. morganii</i>
Indol	+
Voges-Proskauer	-
Ureia	+
Glicose	+
Lactose	-
Citrato	-
H ₂ S	-
Motilidade	+
Fenilalanina	+

Lisina	-
--------	---

“+” Prova bioquímica positiva e “-” Prova bioquímica negativa. Adaptada de KONEMAN *et al.* (2017).

2.9 ANTIMICROBIANOS BETALACTÂMICOS E BETALACTAMASES

A classe de antibióticos betalactâmicos possuem uma estrutura química em comum, o anel betalactâmico, que confere a atividade bactericida. Esse anel é composto por três carbonos e um nitrogênio a diferenciação é dada através da cadeia lateral, que por sua vez define o espectro de ação e as propriedades farmacológicas, apresentando significativa eficácia terapêutica e baixa toxicidade (BERTRAM; ANTHONY, 2017).

A resistência verificada aos antimicrobianos betalactâmicos pode ser conferida em geral por quatro mecanismos distintos: Modificação das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), penetração reduzida do fármaco, efluxo do antimicrobiano e inativação enzimática por uma betalactamase. A produção de betalactamases é o mecanismo mais comum de resistência. Estas enzimas degradam os anéis betalactâmicos dos fármacos inativando-os, pois a hidrólise, por uma betalactamase bacteriana produz o ácido peniciloico, que não possui atividade bactericida (BERTRAM; ANTHONY, 2017).

A proposta de Ambler (1980) categorizou as diversas enzimas em quatro classes, A, B, C e D. de acordo com as estruturas primárias, segundo este modelo as classes A, C e D incluem enzimas que hidrolisam seus substratos formando uma enzima acil através de uma serina do sítio ativo, enquanto as betalactamases de classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um íon zinco de sítio ativo para facilitar a hidrólise de betalactâmicos (BUSH e JACOBY, 2010). Já proposta de classificação de Bush e Jacoby, (2010) leva em conta a capacidade hidrolítica, isto é a capacidade funcional e considera apenas os agrupamentos funcionais, visando um direcionamento para o clínico e para o microbiologista, uma vez que auxiliam a correlacionar as propriedades de uma enzima específica com o perfil de resistência aos antimicrobianos observado em um isolado clínico.

A classificação atualizada de Bush e Jacoby (2010) subdivide as enzimas em quatro grupo (1 a 4) e seis subgrupos (“a” a “f”) essa classificação leva em conta as características bioquímicas e funcionais. No quadro 7 adaptado de Bush e Jacoby (2010) e Rocha (2017) é possível observar a classificação.

Quadro 7: Classificação das betalactamases, de acordo com Bush e Jacoby (2010) e Ambler (1980).

Grupos de Bush-Jacoby	Classificação de Ambler	Características hidrolíticas	Inibição			Principais enzimas
			Ácido clavulânico	Tazobactam	EDTA	
2a	A	Penicilinas	Sim	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalodrina, cefazolina e cefalotina	Sim	Sim	Não	SHV-1, TEM-1,-2 e -90
2be	A	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Sim	Sim	Não	PER-1, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas, cefalodrina, cefazolina e cefalotina	Fraca	SI	Não	TEM-30, SHV-10 e 26
2ber	A	Penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Fraca	Fraca	SI	TEM-50, 68 e 89
2c	A	Carbenicilina	Sim	SI	Não	CARB-3, PSE-1
2e	A	Cefalosporinas	Sim	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e cefamicinas	Fraca	Fraca	Não	IMI-1, KPC-2 e 3, GES- 2, SME-1 e BKC-1
3a	B	Todos os β -lactâmicos	Não	Não	Sim	IMP-1, NDM-1, VIM-1
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Não	Sim	CphA, Sfh-1
1	C	Cefalosporinas e cefamicinas	Não	Não	Não	AmpC, CMY-2
1e	C	Penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas e monobactâmicos	Não	Não	SI	CMY-37, GC1
2ce	D	Carbenicilina, cefepime e cefpiroma	Sim	Sim	SI	RTG-4
2d	D	Cloxacilina ou oxacilina	Variável	SI	Não	OXA-1 e OXA-10

2de	D	Penicilinas e cefalosporinas	Variável	SI	SI	OXA-11 e OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos e cloxacilina ou oxacilina	Variável	SI	SI	OXA-23 e OXA-48
ND	ND	Não sequenciadas. Não agrupáveis				

Fonte: Adaptado de Bush e Jacoby (2010) e Rocha (2017).

ND Não determinado; SI Sem informação.

2.10 RESISTÊNCIA MEDIADA POR CARBAPENEMASES

2.11.1 *serino carbapenemases: kpc, ges e oxa.*

As serino carbapenemases correspondem a classe A de Ambler, por possuírem um grupo de enzimas que tem uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo que podem degradar praticamente todos os antimicrobianos beta-lactâmicos, tornando-os inativos (ROCHA, 2017). Sendo a principal representante a enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), que foi descrita pela primeira vez por Yigit *et al.* (2001) em amostras de *K. pneumoniae* de um hospital da Carolina do Norte. O gene *bla_{KPC}* é plasmidial, porém ao contrário de outras carbapenemases, possui rara integração com o cromossomo (CHEN *et al.*, 2015).

A enzima KPC é a que possui maior importância clínica e epidemiológica e atualmente existem 153 variantes desta enzima, a mais comumente detectada no mundo e no Brasil é a KPC-2 (ANVISA, 2020; <http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#KPC>, 2023), a qual é endêmica e no Brasil, em Recife-PE foram descritas cepas portadoras de KPC-2 (FIRMO *et al.*, 2020; BELTRÃO *et al.*, 2021). A disseminação nas diversas espécies da ordem das *Enterobacterales* ou dos não fermentadores foi facilitada pois elemento genético móvel (plasmídeo) permite a disseminação em diferentes espécies. A elevação do padrão de resistência e dos níveis de morbimortalidade observada em serviços hospitalares onde existe a disseminação dessa carbapenemase é um dos desafios enfrentados na prática clínica. (OLIVEIRA., 2020; ROCHA, 2017).

Um outro gene também relacionado a produção de carbapenemase é o gene *bla_{GES}* (betalactamase - Guiana Extended Spectrum). A família GES foi descrita pela primeira vez na França em 1998 em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente de swab retal de uma paciente previamente internada na Guiana Francesa, daí a origem do nome GES (POIREL *et al.*, 2000). Sendo inicialmente classificadas como beta-lactamases de Espectro Estendido (ESBL), esta característica confere a capacidade de resistência desde as penicilinas às cefalosporinas de terceira geração. Em adicional, a enzima GES confere a capacidade de hidrolisar o imipenem (BELTRÃO; OLIVEIRA; LOPES 2021). Existem 57 variantes de GES que foram descritas até a data (Janeiro de 2023), classificadas em ordem de sequência numérica em *bla_{GES-1}* até *bla_{GES-49}* (NAAS *et al.*, 2017) (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=A#GES>). O gene *bla_{GES}* já foi descrito no Brasil em várias espécies de bactérias gram-negativas, incluindo *K. pneumoniae* e *P. mirabilis* (RIBEIRO, *et al.*, 2014a; BELTRÃO; OLIVEIRA; LOPES, 2021), *Kluyvera*

intermedia (RIBEIRO *et al.*, 2014b), *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli*. Contudo, sua frequência é maior em *Pseudomonas aeruginosa*.

As oxacilinases pertencem a classe D de Ambler, porém também são *Serino Carbapenemases* como observado nas betalactamases de classe A e C (BERT; BRANGER; LAMBERT-ZECHOVSKY, 2002). Contudo, devido à elevada capacidade de hidrolisar cloxacilina, oxacilina e meticilina, as beta-lactamases de classe D também são conhecidas como oxacilinases (OXAs). Essas enzimas caracterizam-se por serem relativamente menos eficazes contra as cefalosporinas de primeira geração e serem pouco inibidas pelos principais inibidores de beta-lactamase da classe A, como o ácido clavulânico e tazobactam. Além disso, apresentam baixa atividade hidrolítica contra os carbapenêmicos e sua atividade *in vitro* pode ser inibida por concentrações elevadas de NaCl (Cloreto de sódio) (PATEL; BONOMO, 2013; EVANS; AMYES, 2014).

Mais de 1085 tipos de oxacilinases já foram relatados (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=D#OXA>). Essas enzimas são as principais causas de resistência aos carbapenêmicos entre isolados de *A. baumannii* (PITOUT *et al.*, 2019). Elas são divididas filogeneticamente em dois grupos, o grupo I está presente principalmente em *A. baumannii* e inclui quatro subgrupos (Ia-Id) e o grupo II, que consiste nas variantes relacionadas ao OXA-48 (carbapenemases tipo OXA-48). Dados recentes mostram que 27% das *Enterobacterales* produtoras de carbapenemase foram positivos para carbapenemases do tipo OXA-48 (em comparação com 55% de KPCs e 26% NDMs). Essas carbapenemases são encontradas com mais frequência em certas áreas como no Oriente Médio, norte da África, Bélgica e Espanha (JONGE *et al.*, 2016; KARLOWSKY *et al.*, 2017; PITOUT *et al.*, 2019).

2.11.2 metalo-betalactamases

As enzimas da classe B de Ambler correspondem às metalo-betalactamases (MBLs), que possuem zinco no local ativo, essas carbapenemases possuem uma enorme versatilidade e são capazes de hidrolisar carbapenêmicos e outros betalactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, as MBLs não são inibidas por ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam ou por avibactam (NXL-104). Sendo apenas inativados por quelantes como o Ácido Etilenodiamino Tetra-acético (EDTA) ou derivados de tiol (ROCHA, 2017, KONEMAN *et al.*, 2017). Sendo a New Deli Metallo•betalactamase (NDM) a principal representante entre *Enterobacterales* encontrada em hospitais de Recife-PE (BELTRÃO *et al.*, 2022).

NDM possui 42 variantes (<http://bldb.eu/BLDB.php?prot=B1#NDM>, 2022), sendo detectada em 2008, em um paciente que retornava da Índia para a Suécia, em uma cepa de *K. pneumoniae* (YONG *et al.*, 2009). No Brasil, o primeiro relato de NDM foi em 2013 em uma *P. rettgeri* na região sul do país (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). Os genes codificadores destas enzimas estão localizadas dentro de uma variedade de estruturas, sendo comumente integrados aos cassetes. Estes integrons quando associados a plasmídeos ou a transposons, têm a transferência através da conjugação facilitada (QUEENAN E BUSH, 2007; MOHAMED *et al.*, 2019).

As MBLs mais relatadas em isolados clínicos incluem seis subclasses Verona-Imipenemase (VIM) 83 variantes, Imipenamases (IMP) 98 variantes, German Imipenemase (GIM) três variantes, Seoul imipenemase (SIM) duas variantes e São Paulo metalo-betalactamase (SPM) uma variante (ANVISA, 2020; <http://bldb.eu/BLDB.php?prot=B1#NDM>, 2022). A primeira VIM descrita foi na Itália no ano de 1997 (LAURETTI *et al.*, 1999; CORNAGLIA *et al.*, 2000), até o momento, 76 variantes desta enzima foram relatadas em todos os continentes, tornando-se uma das mais prevalentes MBLs mediadas por plasmídeos. Embora originalmente identificado em *Pseudomonas aeruginosa*, as enzimas VIM tornaram-se endêmicas nas espécies de *Enterobacterales*, principalmente em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Enterobacter spp.* (PERILLI *et al.*, 2013; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; MOHAMMED *et al.*, 2016; BOCANEGRA-IBARIAS *et al.*, 2017; MATSUMURA *et al.*, 2017; PROTONOTARIOU *et al.*, 2018).

As IMPs foram descritas pela primeira vez em 1988, em um hospital no Japão (WATANABE *et al.*, 1990). E em 1993 foi identificada em isolados de *S. marcescens* no mesmo país (ITO; ARAKAWA; OHSUKA, 1995). Desde então, o gene *bla*_{IMP} propagou-se mundialmente e até o presente 90 variantes foram identificadas segundo o BLDB (Beta-Lactamase DataBase). Esse gene tem sido detectado principalmente em *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp.* e em vários *Enterobacterales* que já foram identificadas em diversos países do mundo causando surtos ou casos esporádicos, a maior prevalência foi encontrada no sudeste da Ásia, Japão e Taiwan (WALSH *et al.*, 2005; ZHAO *et al.*, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ- LÓPEZ, 2014). No Brasil a presença de IMP-1 foi detectada em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes hospitais em São Paulo (LINCOPAN *et al.*, 2005; PENTEADO *et al.*, 2009). Atualmente, as carbapenemases VIM e IMP são descritas em cinco continentes e são amplamente distribuídas nos serviços hospitalares (PEREIRA, 2015). Em

2008 ocorreu o primeiro relato de um novo tipo de MBL, foi o tipo Nova Delhi metallo-betalactamase (NDM) de uma paciente que retornava da Índia para a Suécia (YONG *et al.*, 2009). Sendo o primeiro relato de NDM no Brasil por meio da identificação em uma amostra de *P. rettgeri* em 2013 na região sul do país (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013).

2.11.3 tipagem molecular e relação clonal

Os surtos de doenças infecciosas são comumente resultantes da exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente. Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência e características bioquímicas e genéticas semelhantes (PFALLER *et al.*, 2001; BAKHSHI; AFSHARI; FALLAH, 2018). No entanto, grandes variações genéticas não são distinguidas nos testes microbiológicos e bioquímicos tradicionais, desta forma, a aplicação de tecnologias modernas e avançadas, como ferramentas de diagnóstico molecular e impressões digitais moleculares, pode ser uma escolha apropriada em investigações epidemiológicas moleculares (MEACHAM *et al.*, 2003; BEHZADI; BEHZADI 2007; MOMTAZ *et al.*, 2013).

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

A disseminação de clones resistentes e de genes no ambiente hospitalar pode ocorrer devido ao contato com os profissionais de saúde e devido à transferência de pacientes entre unidades hospitalares. Isto foi observado por Cassettari *et al.*, (2006) uma vez que isolados apresentando padrões moleculares idênticos foram observados em diferentes enfermarias e

alguns isolados apresentaram padrões idênticos à cepa isolada das mãos de profissionais de saúde. Desta forma, além de ser importante no reconhecimento de surtos de infecções, na determinação da fonte de infecção, a tipagem molecular também auxilia na detecção de transmissão cruzada de patógenos (OLIVE; BEAN, 1999). Mundialmente são observadas altas taxas de variabilidade genética em cepas associadas a presença de genes de carbapenemases, que são de diferentes sítios infecciosos ou não, como amostras de urina provenientes de pacientes com câncer (MAHMOUD *et al.*, 2020), com pielonefrite, cistite aguda ou crônica (GHOSH *et al.*, 2021), ou ainda em amostras de sangue, secreção traqueal e cultura de secreções (KUNDU *et al.*, 2022). Portanto, no presente estudo será importante definir se os isolados de Enterobacterales analisados apresentam heterogeneidade genética ou são clones de uma mesma cepa.

3 DEFINIÇÃO DOS OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a presença dos principais genes e enzimas de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, bem como a relação clonal, entre os isolados clínicos da ordem *Enterobacterales* derivados de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19 provenientes de um hospital público de Recife entre os anos de 2021 e 2022.

3.2 Objetivos Específicos

- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *Enterobacterales* de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19.
- Comparar a presença dos genes de resistência nos isolados provenientes de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19;
- Investigar a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{IMP} em isolados de *Enterobacterales* de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19;
- Comparar a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{IMP} entre as diferentes espécies de *Enterobacterales*;
- Comparar os resultados do teste rápido CarbaNG com a PCR convencional para a identificação dos genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{IMP} nos isolados clínicos provenientes de infecção do estudo;
- Determinar a relação clonal dentre os isolados de cada espécie de *Enterobacterales* do estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ISOLADOS BACTERIANOS

Para o presente estudo foram analisados 45 isolados de *Enterobacterales* resistentes a um ou mais carbapenêmicos, provenientes de pacientes com ou sem covid-19, com resultado de PCR, respectivamente, positivo ou negativo para Sars-Cov-2, de um hospital público Recife-PE entre 2021 e 2022. A identificação bioquímica e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram inicialmente realizados nos hospitais, através do sistema automatizado BD Phoenix M50. Em seguida, no Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana, da área de Medicina Tropical-CCM, UFPE, todos os isolados foram submetidos à identificação bioquímica convencional utilizando os meios de cultivo TSI – Tríplice açúcar-ferro; Ágar EMB, Ureia, Lisina. Os testes bioquímicos foram realizados após a análise do cultivo em Ágar EMB, tais cultivos permitiram a confirmação da espécie do isolado e a pureza da colônia. (KONEMAN *et al.*, 2017). Os isolados bacterianos foram conservados em estoque congelado com glicerol 15% acrescido de Caldo BHI (Broth Heart Infusion) a -20 °C. Para reativação os isolados foram submetidos a um cultivo em caldo BHI, incubados a 35 °C $\pm$ 2 °C por um período de 24h a 48h e um posterior semeio em Ágar EMB, para segmento das análises genéticas.

4.2 TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos foi determinada através do sistema automatizado BD Phoenix M50. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com os critérios preconizados pelo BrCast 2021 e 2022. Foram testados os seguintes antimicrobianos: amicacina, ampicilina, ampicilina-sulbactam, cefazolina, cefepima, ceftazidima, ceftazidima-avibactam, ceftriaxona, ciprofloxacina, colistina, ertapenem, fosfomicina com G6P, gentamicina, imipenem, levofloxacina, linezolida, meropenem, piperacilina-tazobactam, polimixina-b e trimetoprim-sulfametoxazol.

4.3 EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL

A extração de DNA total foi realizada através de kit comercial Wizard genomic DNA purification kit (Promega), e o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante. O DNA extraído foi quantificado através do equipamento Nanodrop e estocado a -20 °C. Após a quantificação, o DNA extraído foi diluído para uma concentração de uso de 20ng/ μ para a técnica de PCR convencional e a 100ng/ μ L para a ERIC-PCR.

4.4 CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES *BLA_{KPC}*, *BLA_{GES}*, *BLA_{VIM}*, *BLA_{IMP}* E *BLA_{NDM}*.

Os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{VIM}*, *bla_{IMP}* e *bla_{NDM}* foram investigados com os *primers* descritos na Quadro 8. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: 1µL de DNA genômico a 20ng/µL, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 10 nM de dNTP (Promega), 25 nM de MgCl₂ e 10 nM dos *primers*.

As condições de amplificação para o gene *bla_{KPC}* 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 e 10 min 72 °C para extensão final. Para a amplificação do gene *bla_{GES}* foram utilizadas as seguintes condições: 3 min a 93 °C para desnaturação inicial; seguido de 40 ciclos de 1 min à 93 °C, 1 min à 55 °C e 1 min à 72 °C, e 7 min à 72 °C para extensão final. As amplificações dos genes de MBL 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, para anelamento dos *primers*: 1 minuto à 60 °C para *bla_{IMP}* 1 minuto à 62 °C para *bla_{VIM}* e para extensão, 1 minuto à 68 °C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68 °C. A amplificação do gene *bla_{NDM}* foi realizada com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo em cada ciclo de 1 minuto à 95 °C para desnaturação, 1 minuto à 62 °C para anelamento do *primer* e 1 minuto à 72 °C para extensão e 10 min 72 °C para extensão final. As amplificações para o gene *bla_{OXA-48}* foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos, consistindo, cada ciclo de 1 minuto a 94 °C para desnaturação, para anelamento dos *primers*: 1 minuto a 62 °C e 1 minuto à 72 °C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de extensão final de 10 minutos a 72 °C.

Em cada partida de amplificação foi incluído seu respectivo controle positivo e negativo para o gene *bla_{KPC}*: isolado de *K. pneumoniae* K1P (CABRAL *et al.*, 2012), para o gene as MBLs VIM e IMP: as cepas de referência de PS6-A (*bla_{IMP}*) e PS4-A (*bla_{VIM}*) (OLIVEIRA, *et al.*, 2019), para o NDM a cepa de referencia PS4-A (*bla_{NDM}*) (OLIVEIRA, *et al.*, 2019).

Quadro 8. *Primers* utilizados na PCR e sequenciamento dos genes investigados.

<i>Primers</i>	Genes	Sequência oligonucleotídica (5'-3')	Temp.*	Tamanho do amplicon (pb)	Referência
KPC-1a KPC-1b	<i>bla_{KPC}</i>	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	798	Yigit <i>et al.</i> (2001)
NDM-Fm NDM-Rm	<i>bla_{NDM}</i>	GGTTTGGCGATCTGGTTTT CGGAATGGCTCATCACGATC	52 °C	621	Nordmann <i>et al.</i> (2011)
VIM- F VIM-R	<i>bla_{VIM}</i>	CAGATTGCCGATGGTGTGG AGG TGGGCCATTGAGCCAGA	62 °C	532	Cabral <i>et al.</i> (2012)
IMP-F IMP-R	<i>bla_{IMP}</i>	GGAATAGAG TGG CTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC T	60 °C	232	Cabral <i>et al.</i> (2012)
OXA-48-F OXA-48-R	<i>bla_{OXA}</i>	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	53 °C	743	Poirel <i>et al.</i> (2004)
GES-F GES-R	<i>bla_{GES}</i>	GAAACCAAACGGGAGACGC CTTGACCGACAGAGGCAACT	60 °C	207	Nordmann <i>et al.</i> (2011)
ERIC-1 ERIC-2	NA	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAA C AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAG CG	36 °C	NA	Duan <i>et al.</i> (2009)

Tabela de genes pesquisados e condições de temperatura e tamanho do fragmento. *Temperatura de anelamento;
NA: Não aplicável.

4.5 ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os *primers* descritos no Quadro 8. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25µL por tubo, compreendendo: 1µL de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega), 10nM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52mM de MgCl₂ e 0,4µmol dos *primers*. 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 minuto à 72 °C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C (CABRAL *et al.*, 2012). Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100V. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram realizadas com auxílio do software DARwin.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE

Cinco microlitros dos produtos de amplificação da PCR já acrescidos de 1µL do corante SYBR Safe (Invitrogen) para cada 10mL de gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M) em uma voltagem constante de 100v. Para análise foi utilizado um marcador de 100pb (Promega) como padrão de peso molecular. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados pelo sistema de Photocap da Vilber Lourmat.

4.7 SEQUENCIAMENTO DE GENES DE RESISTÊNCIA

Os produtos de PCR positivos para os genes de resistência foram purificados através de Kit comercializável SV Total DNA Isolation System (Promega) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER, *et al.*, 1977) utilizando-se os *primers* descritos no **quadro 8**. 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/>), e foram depositadas no GenBank. Sob a seguinte sequência OQ747773; OQ747774; OQ747775; OQ747776; OQ747777; OQ355358 e OQ421192.

5 RESULTADOS

Ocorrência de *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-5}, *bla*_{NDM-7} e *bla*_{KPC-2} em isolados de clínicos de Enterobacterales com alta variabilidade genética, provenientes de colonização e infecção em pacientes com ou sem covid-19, provenientes de um hospital de Recife-PE, Brasil.

Introdução

As espécies da ordem Enterobacterales estão comumente associadas a surtos em pacientes internados em ambientes hospitalares, causando infecções pulmonares, sanguíneas, urinárias, de feridas ou ainda relacionadas a choques sépticos (YI e KIM, 2021; OMBELET *et*

al., 2022). A pandemia de covid-19 resultou em colapso e superlotação de hospitais, o que possibilitou a transmissão de cepas multidrogarresistentes (MDR) e o agravamento dos quadros nas redes de saúde pública e privada mundialmente, levando milhões de indivíduos a óbito (LAI *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2021; CANTÓN *et al.*, 2020; MACEDO *et al.*, 2022).

A resistência aos carbapenêmicos é uma das principais problemáticas enfrentadas no ambiente hospitalar, visto que estes são opções de última escolha. Tais antimicrobianos funcionam como uma reserva estratégica de fármacos para o tratamento de infecções por bactérias gram-negativas. No entanto, devido ao uso indiscriminado no mundo, surgiram uma ampla gama de enzimas de resistência carbapenemases, comumente encontradas nos gêneros: *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* e *Escherichia*. Dentre as carbapenemases, destacam-se a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) e a New Delhi metalloβ-lactamase (NDM), que conferem resistência a todos os β-lactâmicos, ressaltando que a NDM não degrada os monobactâmicos (HAJI *et al.*, 2021; SILVEIRA *et al.*, 2021; COSTA *et al.*, 2021).

A alta variabilidade genética da ordem Enterobacterales, gerada por mutação e recombinação, possibilita uma maior capacidade adaptativa. Mundialmente, foram observadas altas taxas de variabilidade em cepas associadas à presença de genes para carbapenemases, de diferentes sítios infecciosos (MAHMOUD *et al.*, 2020; GHOSH *et al.*, 2022; KUNDU *et al.*, 2022). Diversas técnicas são utilizadas para determinar essa variabilidade genética bacteriana. Dentre elas, a técnica de “*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus-PCR*” (ERIC-PCR), que determina o perfil genético e a relação clonal dos isolados bacterianos (DUAN *et al.*, 2009). No Brasil, alguns estudos identificaram uma alta variabilidade genética de diferentes espécies de Enterobacterales, principalmente em *Klebsiella pneumoniae*, seguido de *Proteus mirabilis* (FIRMO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020; BELTRÃO *et al.*, 2022).

Diante das altas taxas de cepas MDRs associadas a resistência aos carbapenêmicos, agravadas durante a pandemia de covid-19, esse trabalho teve como objetivo investigar e comparar a presença dos principais genes e enzimas de resistência aos carbapenêmicos, bem como a relação clonal entre os isolados clínicos da ordem Enterobacterales, provenientes de colonização e infecção em pacientes com e sem covid-19, de um hospital público no nordeste brasileiro entre os anos de 2021 e 2022.

Material e Métodos

Isolados bacterianos

Foram selecionados e analisados 45 isolados clínicos da ordem Enterobacterales, por serem resistentes a um ou mais carbapenêmicos. Esses isolados foram provenientes de diferentes pacientes com resultado de RT-PCR positivo ou negativo para SARS-CoV-2, de um hospital público de Recife-PE entre os anos de 2021 e 2022. Tais amostras foram de diferentes sítios de infecção ou de colonização (swab retal), obtidos por demanda espontânea do laboratório do hospital de estudo. A identificação bioquímica das espécies dos isolados foi realizada através do sistema automatizado BD Phoenix™. Os isolados foram mantidos em estoque congelado a -70°C com glicerol a 15% e Brain Heart Infusion (BHI). Paralelamente, na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) recolheu-se dados sobre tempo de permanência no ambiente hospitalar, desfecho clínico.

Susceptibilidade antimicrobiana

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) para os antimicrobianos: amicacina; amoxicilina-ácido clavulânico; ampicilina; ampicilina+sulbactam; cefazolina; cefepime; cefalotina; cefotaxima; cefoxitina; ceftazidima; ceftazidima-avibactam; ceftriaxona; cefuroxima; ciprofloxacina; colistina; ertapenem; fosfomicina com G6P; gentamicina; imipenem; levofloxacina; meropenem; piperacilina-tazobactam; polimixina B; trimetoprim-

sulfametoxazol, foi determinada através do equipamento automatizado BD Phoenix™. E o perfil de susceptibilidade foi interpretado de acordo com o BRcast (2022).

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

O DNA genômico foi extraído através de kit comercial “Wizard genomic DNA purification” (Promega). Para realização da técnica de PCR, para detecção os genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{GES}*, *bla_{OXA-48-LIKE}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP}*, utilizando os primers descritos na literatura (POIREL et al., 2004; DONG *et al.*, (2008) CABRAL et al., 2012; MATASEJE et al., 2012; SCAVUZZI et al., 2019). As amplificações consistiram em uma temperatura inicial de 95 °C por 5 minutos, 35 ciclos compostos de 1 minuto a 95 °C, 1 minuto para anelamento com temperatura descrita por Beltrão et al. (2022), e 1 minuto a 72 °C. Após os 35 ciclos, ocorreu uma extensão final de 10 minutos a 72 °C. Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M), adicionado de CyberSafe (Thermofisher, Reino Unido) e voltagem constante de 100v. Os géis foram visualizados em transiluminador de luz ultravioleta.

Para o sequenciamento foram selecionados 10 isolados positivos para o gene *bla_{NDM}* que não apresentavam relação clonal pela ERIC-PCR sendo também escolhido isolados de cada espécie em que o *bla_{NDM}* foi detectado por PCR. Os amplicons foram purificados pelo kit SV Gel e PCR Clean-Up System (Promega, EUA) e sequenciados pelo método de terminação de cadeia de desoxirribonucleotídeo (SANGER et al., 1977). As sequências de nucleotídeos foram analisadas pelos programas Bioedit (HALL, 2017), BLAST e ClustalW, do Instituto Europeu de Bioinformática. As sequências de nucleotídeos foram depositadas no GenBank com os números de acesso: OQ421192, OQ355358, OQ747773, OQ747774, OQ747775, OQ747776 e OQ747777.

ERIC-PCR

A tipagem molecular para determinar a variabilidade genética e relação clonal dos isolados foi realizada pela técnica de ERIC-PCR, com o par de *primer* descrito na literatura (DUAN *et al.*, 2009). As condições de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µL por tubo, compreendendo: DNA genômico a 100ng/µL, 1,0U da enzima Taq DNA polimerase (Promega, EUA), dNTP 2mM (Promega, EUA), MgCl₂ 25mM e 10 µmoL de *primers*. Um controle negativo foi incluído em cada partida de amplificação. A técnica consistiu em uma temperatura inicial de 95 °C por 3 minutos e 35 ciclos, compostos de 1 minuto à 92 °C, 1 minuto para anelamento com temperatura de 36 °C, e 8 minutos à 72 °C, após os 35 ciclos, foi realizado um ciclo de extensão final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% em tampão Tris, Ácido Bórico e EDTA (TBE). A análise dos fragmentos amplificados por ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram realizadas nos softwares GelAnalyzer (LAZAR; HORVATH-LAZAR, 2010) e DARwin 6.0 (PERRIER; JACQUEMOUD-COLLET, 2006). **(Material suplementar, Tabela 1)**

Resultados

Origem dos isolados

Dentre os 45 isolados analisados no presente estudo, *K. pneumoniae* foi a espécie mais frequentemente isolada (n=18/45), seguida por *S. marcescens* (n=8/45) e *P. mirabilis* (n=7/45). Esses isolados clínicos foram oriundos de infecção (n=33/45) tendo como origem swab retal (n=12/45), ponta de cateter (n=8/45), hemocultura (n=6/45), urocultura (n=5/45) e outros (n=14) **(Tabelas 2 e 3)** e colonização (n=12/45) **(Tabela 3)**.

Todos os isolados clínicos provenientes de colonização (swab retal) apresentaram resistência aos carbapenêmicos (Ertapenem, Imipenem e Meropenem). Já os obtidos de infecções (n=32), apresentaram resistência ao meropenem e aos demais carbapenêmicos testados, com exceção de uma cepa de *S. marcescens* (S6A2) **(Tabelas 1, 2 e 3)**.

Genes de resistência detectados

Dentre os seis genes de resistência das carbapenemases neste estudo, foram detectados os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. O *bla_{NDM}* foi detectado com maior frequência (n=21; 46,66%). Enquanto o gene *bla_{KPC}* (35,55%). Oito cepas (17,77%) foram coportadoras de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*.

O gene *bla_{NDM}* foi encontrado com maior frequência em isolados de *K. pneumoniae*, seguido de *P. mirabilis* e *P. rettgeri*. E o gene *bla_{KPC}* foi mais frequentemente detectado em isolados de *S. marcescens* e *K. pneumoniae*. Adicionalmente, 17,77% dos isolados estudados coalbergavam os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, principalmente em *P. stuartii* e *P. mirabilis* (**Material suplementar figura 1**).

A incidência dos genes por espécie demonstra, que a *K. pneumoniae* (n=18) foi o principal isolado portador do gene *bla_{NDM}* (n=14, 77,77%), nessa espécie também foram registrados o gene *bla_{KPC}* (n=3, 16,66%) e a co-presença de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (n=1, 5,55%). Nos isolados de *P. mirabilis* (n=7) foram registrados os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, a incidência foi de respectivamente 28,57% (n=2) e 42,86% (n=3), a co-presença de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* foi 28,57% (n=2). A *P. stuartii* (n=5) deteve os genes *bla_{NDM}* (n=1; 20%) e a co-presença de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* (n=4; 80%). Os isolados de *E. cloacae* (n=2), detiveram os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, de modo concomitante (n=1) e o gene *bla_{NDM}* isoladamente (n=1). Todos os isolados de *S. marcescens* (n=8), detinham o gene *bla_{KPC}*. E os isolados de *P. rettgeri* (n=3), *K. aerogenes* (n=1) e *Morganella morganii* (n=1), detiveram o gene detinham o gene *bla_{NDM}*. (**Material suplementar figura 1**)

Sequenciamento dos *amplicons* do gene *bla_{NDM}*

Para o sequenciamento foram selecionados 10 isolados positivos para o gene *bla_{NDM}* que não apresentavam relação clonal pela ERIC-PCR sendo também escolhido isolados de cada espécie em que o *bla_{NDM}* foi detectado por PCR. Foram identificados quatro isolados carreando o gene *bla_{NDM}*-1, cinco carreando a variante *bla_{NDM}*-5 e um carreando o *bla_{NDM}*-7. Dos cinco isolados que carreavam o gene *bla_{NDM}*-5, dois foram da espécie *K. pneumoniae* (K40-A5 e K42-A5), dois de *P. mirabilis* (P1-A4 e P5-A4) e um de *E. cloacae* (EC1A1). A variante *bla_{NDM}*-7 foi detectada em um isolado de *K. pneumoniae* (K61-A5) (**Tabela 2**).

Teste Rápido Carba-NG comparação técnica de PCR

Os resultados de especificidade e sensibilidade dos testes rápidos, quando comparados ao teste molecular (PCR) para o gene *bla_{KPC}*, foi respectivamente 92,30% e 91,66%. E para o gene *bla_{NDM}* foi de 91,66% e 92,30%. Em se tratando da detecção da positividade simultânea

para mais de uma carbapenemase os valores de especificidade e sensibilidade são respectivamente 96,15% e 14,29%, revelando uma discrepância entre a detecção das enzimas e a presença de mais de uma carbapenemase, que é seguida pelos testes utilizando os ácidos Fenilborônico e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (**Material suplementar tabela 2 e tabela 3**).

Tabela 1: Origem das amostras de pacientes com covid-19, perfil de resistência e ERIC-PCR de isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de diferentes sítios de infecção em um hospital público de Recife-PE, Brasil.

Isolado/ Paciente	Data da Coleta	Setor	Origem da amostra	Genes de resistência detectados	*Perfil de Resistência (CIM)	¹ Perfil de ERIC- PCR
K1-A5/P1	25/05/2021	UTI SRAG	Sangue	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E3
K3-A5/P3	29/05/2021	UTI SRAG	Sangue	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E1
K4-A5/P3	02/06/2021	UTI SRAG	P. Cateter	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (4) / MER (32) / PPT (>64/4).	KP-E1
K39-A5/P11	29/09/2021	UTI SRAG	P. Cateter	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / POLB (8) / SUT (>2/38).	KP-E11
K41-A5/P13	05/10/2021	UTI	Sec. de Ferida	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E2
K56-A5/P15	09/12/2021	Clínica Vascular	Tecido	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E13
P1-A4/P19	17/05/2021	UTI SRAG	Sangue	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E5
P3-A4/P21	13/06/2021	UTI SRAG	P. Cateter	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E2
P4-A4/P22	02/07/2021	Enfermaria covid	Urina	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E4
P5-A4/P23	14/07/2021	UTI SRAG	Urina	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E7

S2-A2/P26	09/06/2021	UTI SRAG	Frag. Ósseo	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (>32) PPT (>64/4).	SM-E1
S4-A2/P28	20/08/2021	Clínica Geral	P. Cateter	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E2
S7-A2/P31	20/11/2021	Cirurgia Vascular	Tecido	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E1
PS1-A2/P19	18/05/2021	UTI SRAG	P. Cateter	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PS1-E5
PS3-A2/P35	30/08/2021	Cardio	Prótese (MI)	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PS3-E4
PR1-A2/P38	30/08/2021	Clínica Vascular	Frag. Ósseo	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR1-E1
PR2-A2/P39	04/10/2021	UTI	P. Cateter	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR2-E2
PR3-A2/P38	13/10/2021	UTI	Sec. de Ferida	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR3-E3
EC1-A1/P40	29/06/2021	UTI SRAG	Urina	<i>bla_{KPC}</i>	AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMI (4) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	EC1-E1

K1-A5; K3-A5; K4-A5; K39-A5; K41-A5 e K56-A5 – *Klebsiella pneumoniae*; P1-A4; P3-A4; P4-A4 e P5-A4 – *Proteus mirabilis*; S2-A2; S4-A2 e S7-A2 – *Serratia marcescens*; PS1-A2 e PS3-A5 – *Providencia stuartii*; PR1-A2 e PR3-A2 – *Providencia rettgeri*; EC1-A1 *Enterobacter cloacae*. ***Antimicrobianos que as bactérias foram resistentes:** (AMI) Amicacina; (AMP) Ampicilina; (AMP+SUL) Ampicilina+Sulbactam; (CFZ) Cefazolina; (CEF) Cefepima; (CET) Ceftazidima; (CAV) Ceftazidima-Avibactam; (CTX) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (COL) Colistina; (ERT) Ertapenem; (FG6) Fosfomicina com G6P; (GEN) Gentamicina; (IMP) Imipenem; (LVX) Levofloxacina; (MER) Meropenem; (PPT) Piperacilina+Tazobactam; (POLB) Polimixina B; (SUT) Trimetroprim+Sulfametoxazol. **¹ERIC-PCR:** KP = *Klebsiella pneumoniae*; PM = *Proteus mirabilis*; SM = *Serratia marcescens*; PS = *Providencia stuartii*; PR = *Providencia rettgeri*; EC = *Enterobacter cloacae*.

Tabela 2: Origem das amostras de pacientes sem covid-19, perfil de resistência e ERIC-PCR de isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de diferentes sítios de infecção de pacientes em um hospital público de Recife-PE, Brasil

Isolado/ Paciente	Data da Coleta	Setor	Origem da amostra	PCR para genes de Resistência	*Perfil de Resistência CIM	¹ Perfil de ERIC-PCR
K25-A5/P8	06/07/2021	Emergência Cardio	Urina	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KA-E1
K59-A5/P16	22/12/2021	UCO 2	Urina	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E15
K61-A5/P18	09/12/2021	Clínica Vascular	Frag. Ósseo	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E16
P6-A4/P24	06/07/2021	UTI	Sec. Traqueal	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E6
P7-A4/P12	16/07/2021	UTI	P. de Cateter	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E1
S1-A2/P25	09/06/2021	UTI SRAG	Sangue	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E2
S5-A2/P29	04/10/2021	UTI	Sec. Traqueal	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E4
S6-A2/P30	10/10/2021	UTI	L. Cavitário	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / PPT (>64/4).	SM-E3
S8-A2/P32	25/11/2021	UTI	Sangue	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / LVX (2) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E5
MM1-A1/P33	20/09/2021	UTI SRAG	Sec. Traqueal	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	MM-E1
PS2-A2/P12	09/08/2021	UTI	P. Cateter	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E2
PS4-A2/P36	17/11/2021	UTI	Tecido	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E1

PS5-A2/P37	18/01/2022	CARDIO	Tecido	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (16) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E3
EC2-A1/P41	20/12/2021	Clínica Cardio covid	Sangue	<i>bla_{NDM}</i> e <i>bla_{KPC}</i>	AMI (16) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (4) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	EC-E2

K25-A5; K59-A5 e K61-A5 – *Klebsiella pneumoniae*; P6-A4 e P7-A4 – *Proteus mirabilis*; S1-A2; S5-A2; S6-A2 e S8-A2 – *Serratia marcescens*; MM1-A1 – *Morganella morganii*; PS2-A2; PS4-A5 e PS5-A5 – *Providencia stuartii*; EC2-A1 *Enterobacter cloacae*. ***Antimicrobianos que as bactérias foram resistentes:** (AMI) Amicacina; (AMP) Ampicilina; (AMP+SUB) Ampicilina+Sulbactam; (CFZ) Cefazolina; (CEF) Cefepima; (CET) Ceftazidima; (CAV) Ceftazidima-Avibactam; (CTX) Ceftriaxona; (CIP) Ciprofloxacina; (COL) Colistina; (ERT) Ertapenem; (FG6) Fosfomicina com G6P; (GEN) Gentamicina; (IMP) Imipenem; (LVX) Levofloxacina; (MER) Meropenem; (PPT) Piperacilina+Tazobactam; (POLB) Polimixina B; (SUT) Trimetoprim+Sulfametoxazol. **¹ERIC-PCR:** KA = *Klebsiella aerogenes*; KP = *Klebsiella pneumoniae*; PM = *Proteus mirabilis*; SM = *Serratia marcescens*; MM = *Morganella morganii*; PS = *Providencia stuartii*; EC = *Enterobacter cloacae*.

Tabela 3: Colonização (swab retal) em pacientes com e sem covid-19, origem das amostras, testes fenotípicos de resistência, genes de resistência, motivo de alta dos pacientes, perfil de resistência e ERIC-PCR.

Isolado/ Paciente	Data de Coleta	Origens das amostras	¹ Fenótipo de Resistência	² Genes de resistência	RT-PCR para Sars- CoV-2	Motivo de Alta	³ Perfil de resistência CIM	⁴ ERIC- PCR
K2-A5/P2	18/05/2021	UTI SRAG 2	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	MELHORA	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E4
K5-A5/P4	02/06/2021	UTI SRAG 2	KPC	<i>bla_{KPC}</i>	POS	MELHORA	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E5
K17-A5/P5	22/06/2021	UTI SRAG 2	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	ÓBITO	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E6
K18-A5/P6	22/06/2021	UTI SRAG 2	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	MELHORA	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E7
K24-A5/P7	09/07/2021	UTI SRAG 2	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	MELHORA	IMP (>8) / MER (>32).	KP-E8
K26-A5/P9	05/08/2021	UTI	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	ÓBITO	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E9
K27-A5/P14	07/07/2021	UTI	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	ÓBITO	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E10
K40-A5/P12	15/07/2021	UTI	MBL	<i>bla_{KPC};</i> <i>bla_{NDM};</i>	NEG	ÓBITO	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E2
K42-A5/P14	07/10/2021	UTI	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	MELHORA	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E14
K60-A5/P17	16/12/2021	Cardio	KPC	<i>bla_{KPC}</i>	NEG	MELHORA	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E15
P2-A4/P20	02/06/2021	UTI SRAG	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	MELHORA	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E3

Comparação entre pacientes com e sem covid-19 oriundos de infecção e colonização.

Dados dos pacientes com infecção bacteriana, com ou sem covid-19, demonstram que percentualmente o gene *bla*_{KPC} foi mais frequentemente detectado em pacientes sem covid-19, enquanto o gene *bla*_{NDM} foi mais detectado em pacientes com covid-19. Com relação a colonização ocorreu semelhança do percentual entre os isolados provenientes de pacientes com e sem covid-19 (**Tabela 4**). Demonstrando a ampla disseminação do gene *bla*_{NDM}, em relação ao gene *bla*_{KPC}, em todos os agrupamentos.

Tabela 4: Comparação entre pacientes com e sem covid-19 oriundos de infecção e colonização por isolados clínicos de Enterobacterales.

Infecção e covid-19 “+”		Infecção e covid-19 “-”	
<i>bla</i> _{KPC}	31,58%	<i>bla</i> _{KPC}	50%
<i>bla</i> _{NDM}	52,63%	<i>bla</i> _{NDM}	21,43%
<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	15,80%	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	28,57%
Colonização e covid-19 “+”		Colonização e covid-19 “-”	
<i>bla</i> _{KPC}	28,57%	<i>bla</i> _{KPC}	20%
<i>bla</i> _{NDM}	71,42%	<i>bla</i> _{NDM}	60%
<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	--	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	20%

Tipagem molecular dos isolados clínicos por ERIC-PCR e relação com dados dos pacientes.

Foram identificados diferentes perfis genéticos por ERIC-PCR nos isolados clínicos de Enterobacterales. Analisando os isolados de *K. pneumoniae* (n=18), foram identificados 16 perfis genéticos, denominados KP-E1 até KP-E16. Ao analisar a relação clonal, observou-se que no perfil KP-E1, os isolados K3-A5 e K4-A5, provenientes de infecção, apresentaram 100% de similaridade. Ambos os isolados de *K. pneumoniae* (K3-A5 e K4-A5) foram obtidos de um mesmo paciente, colhidos a partir de amostras e datas distintas (Tabela 2). O perfil KP-E2 foi composto por dois isolados (K40-A5 e K41-A5) com similaridade de 100% entre eles. Um terceiro perfil KP-E11 (K39-A5), apresentou mais de 80% de similaridade. Esses três isolados (K40-A5, colonização, K41-A5 e K39-A5 ambas de infecção) foram obtidos a partir de pacientes distintos (P11, P12 e P13), internados nos setores UTI (P12 e P13) e UTI SRAG (P11). A paciente P12 foi internada no dia 01/07/2021 e em 15/07/2021 o isolado K40-A5 foi identificado do swab retal. Essa paciente evoluiu a óbito no dia 28/08/2021. Outra paciente, P13, foi admitida no hospital no dia 28/07/2021 e em 05/10/2021 foi isolado o K41-A5 de uma

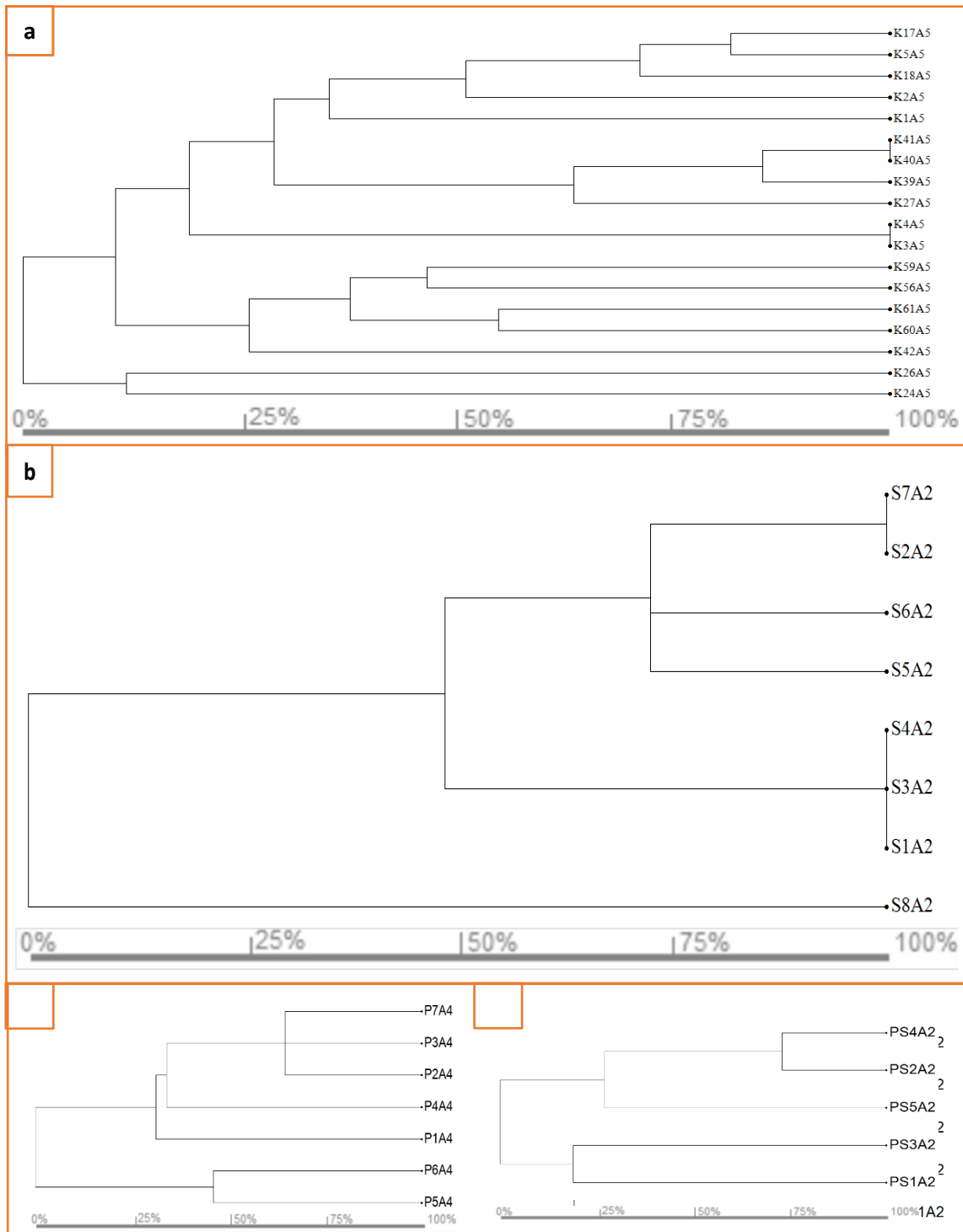
cultura de ponta de cateter. A paciente evoluiu a óbito no dia 19/10/2021. Um terceiro paciente (P11), que deu entrada no hospital no dia 27/08/2021, apresentou em 29/09/2021 o isolado K39-A5 identificado a partir de uma cultura de ponta de cateter. O paciente evoluiu a óbito no dia 15/11/2021 (**Figura 2a**).

Nas oito cepas de *S. marcescens* do estudo, foram identificados cinco perfis genéticos diferentes SM-E1, SM-E2, SM-E3, SM-E4 e SM-E5. Dois desses perfis foram compostos por isolados com relação clonal: o perfil SM-E1 composto pelos isolados S2-A2 e S7-A2 e o perfil SM-E2 composto pelos isolados S1-A2, S3-A2 e S4-A2 (**Figura 2b**). O perfil SM-E1 é composto por isolados que foram recuperados de dois pacientes (P26 e P31). Um paciente foi internado na UTI SRAG e o outro no setor de cirurgia vascular, respectivamente. O paciente P26 deu entrada no dia 15/05/2021, com recuperação do isolado de *S. marcescens* S2-A2 em um fragmento ósseo no dia 09/06/2021. No entanto, o paciente evoluiu a óbito no dia 19/06/2021. O paciente P31, deu entrada no dia 14/06/2021 e o isolado S7-A2 foi obtido de uma cultura de tecido. No dia 25/11/2021, o paciente evoluiu com melhora e recebeu alta. Ambos os isolados foram positivos para o gene *bla_{KPC}*.

Os isolados de *S. marcescens* S1-A2, S3-A2 e S4-A2 foram oriundos dos pacientes P25, P27 e P28 respectivamente, formando o perfil SM-E2. O paciente P25 deu entrada no dia 08/05/2021 na UTI SRAG. Em 15/06/2021, houve recuperação do isolado S1-A2 de uma hemocultura. O paciente foi transferido no dia 17/05/2021. Por outro lado, o isolado S3-A2 da paciente P27 que deu entrada no dia 05/06/2021, teve origem em uma cultura de vigilância (Swab retal) realizada no dia 15/06/2021, na UTI SRAG. A paciente evoluiu com alta no dia 24/06/2021. O paciente P28, foi internado no Setor de Clínica Geral no dia 14/06/2021. Em 20/08/2021, obteve-se o isolado S4-A2 de uma ponta de cateter, com alta por melhora no dia 25/11/2021. Todas as cepas possuíam o gene *bla_{KPC}*.

Com relação as sete cepas de *P. mirabilis* e cinco cepas de *P. stuartii* todas apresentaram perfis genéticos distintos pela ERIC-PCR, o que demonstra um perfil multiclonal. Mesmo apresentando algum nível de similaridade genética (**Figura 1c e Figura 1d**), não foi verificada a presença de relação clonal entre os isolados.

Figura 1. Dendrograma gerado a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR utilizando o software Darwin 6.0. **a.** Relação entre os perfis dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil. **b.** Relação entre os perfis dos isolados clínicos de *S. marcescens* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de um hospital público de Recife-PE, Brasil. **c.** Relação entre os perfis dos isolados de *P. mirabilis* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil. **d.** Relação entre os perfis dos isolados de *P. stuartii* resistentes aos carbapenêmicos provenientes de Recife-PE, Brasil



Discussão

Infecções causadas por cepas de Enterobacterales estão situadas entre as principais problemáticas enfrentadas no ambiente hospitalar. No entanto, os níveis de resistência aumentam ao longo dos anos (GLASS, 2021; ANVISA, 2022). As cepas de *K. pneumoniae*, quando comparadas a outros estudos que foram realizados no período de pandemia de covid-19, estão no topo dos patógenos mais isolados de Infecções Relacionadas à Assistência à saúde (IRAS) (GOMEZ-SIMMONDS *et al.*, 2021; GRASSELLI *et al.*, 2021; PINTADO *et al.*, 2022). No presente estudo, a espécie que apresentou maior número de amostras resistentes aos carbapenêmicos foi a *K. pneumoniae*. Em recente levantamento de dados sobre os principais genes isolados de Enterobacterales na América do Sul, o principal isolado foi *K. pneumoniae* e o gene para carbapenemases mais frequentemente detectado foi o *bla_{KPC}*. Adicionalmente, as cepas de *S. marcescens*, *P. mirabilis* e *P. stuartii* foram relatadas com uma baixíssima frequência em comparação a *K. pneumoniae* (REYES *et al.*, 2020). Em estudo realizado na cidade de Recife-PE, Brasil, anteriormente ao período pandêmico da covid-19, foi observada grande semelhança entre as proporções das espécies de Enterobacterales isoladas, sendo *K. pneumoniae* a principal, seguida de *S. marcescens* e *P. mirabilis* (FIRMO *et al.*, 2020). Estes estudos demonstram que, no mundo, essas espécies se destacam como importantes causadores de IRAS.

As espécies de Enterobacterales isoladas, associadas aos genes de carbapenemases, descritas no presente estudo, demonstraram uma maior proporção de *bla_{NDM}* quando comparado ao gene *bla_{KPC}* nos isolados de *K. pneumoniae*, esses números são maiores do que os descritos na literatura (ZHANG *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2020; FIRMO *et al.*, 2020; DUAN *et al.*, 2022). Essa tendência de aumento dos isolados positivos para *bla_{NDM}* em relação a *bla_{KPC}*, permaneceu na maioria das espécies do estudo, com exceção de *M. morganii*, *E. cloacae* e *S. marcescens* que apresentaram mais KPC. Os dados do presente estudo referentes aos isolados de *S. marcescens* encontram-se em concordância com outros trabalhos que também observaram a detecção do gene *bla_{KPC}* em maior quantidade que o *bla_{NDM}* nessa espécie (FIRMO *et al.*, 2020; PRADO *et al.*, 2022).

No presente estudo ao analisar as cepas de *P. mirabilis* com relação a ocorrência dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*, observou-se divergência quando comparadas aos dados da literatura (FIRMO *et al.*, 2020; BELTRÃO *et al.*, 2022), uma vez que o principal gene detectado no presente trabalho foi o *bla_{NDM}*, e nos outros estudos citados foi o *bla_{KPC}*. Em outros trabalhos

relacionados aos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em *P. mirabilis*, não foi possível estabelecer uma comparação (MANOHAR *et al.*, 2017; JOHNNING *et al.*, 2018; TSHITSHI *et al.*, 2020 CHINNAM *et al.*, 2021; LI *et al.*, 2022), visto que apresentaram um número limitado de amostras e, por vezes, não reportaram a presença de *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}*.

Em relação às espécies de *P. rettgeri* e *P. stuartii*, os trabalhos na literatura ainda são limitados. Alguns dos estudos publicados são relatos de caso que não descrevem a presença de *bla_{KPC}* ou *bla_{NDM}*, enquanto outros são artigos de origem veterinária, tratando-se ainda das caracterizações de genomas de dois isolados (SAH *et al.*, 2019; PIZA-BUITRAGO *et al.*, 2020; CHEN *et al.*, 2022). No presente estudo, as cepas do complexo *E. cloacae* apresentaram o *bla_{KPC}* em um dos isolados, bem como foi identificada a presença concomitante de *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* em outro isolado. No que diz respeito aos genes, os dados da literatura demonstram que o gene *bla_{NDM}* é mais comumente detectado nessas espécies (JIN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018; GOMEZ-SIMMONDS *et al.*, 2020;). Além disso, em poucos estudos é descrito a presença do *bla_{NDM}* (JIN *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018 GOMEZ-SIMMONDS *et al.*, 2020). Adicionalmente, a substituição de *bla_{KPC}* por *bla_{NDM}* é relatada nesse estudo após o período pandêmico, onde a utilização exacerbada de antibióticos foi reportada e, possivelmente, contribuiu para o aumento da pressão seletiva de isolados que acumularam determinantes de resistência.

No presente estudo, além da *bla_{NDM-1}*, também foram detectadas as variantes *bla_{NDM-5}* e *bla_{NDM-7}*. Que no caso da *bla_{NDM-5}* é o primeiro relato em *P. mirabilis* nas américas, no complexo *E. cloacae* é o primeiro relato fora do continente asiático. Estas duas últimas variantes possuem espectro hidrolítico aumentado aos carbapenêmicos, quando comparados com o *bla_{NDM-1}* (NORDMANN; POIREL, 2014). Em estudo comparativo, foi levantada a hipótese de que a substituição dos aminoácidos é um dos responsáveis pelo aumento da hidrólise (RAHMAN *et al.*, 2014). Além disso, foi demonstrado que o acúmulo de outros genes de resistência pode influenciar juntamente com as variantes (RAHMAN *et al.*, 2014). No entanto, em dois estudos conduzidos na Índia, acerca da cinética da enzima NDM-5 e NDM-7, foi verificado que a troca realizada na posição E152A (Glutamato por Alanina) afetou negativamente a atividade de hidrólise da NDM-5 e NDM-7 contra betalactâmicos, inferindo que são resíduos chave para a atividade da carbapenemase (KUMAR *et al.*, 2017; KUMAR *et al.*, 2019).

Na Espanha, no Brasil e na China foram descritos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* portadores de *bla_{NDM-7}* associados ao *bla_{KPC-2}* (ESPINAL *et al.*, 2018; JOHNNING *et al.*, 2018;

PÉREZ-VÁZQUEZ *et al.*, 2019; RODRIGUES *et al.*, 2021; WANG *et al.*, 2022). O gene *bla*_{NDM-5} foi detectado em isolados de *E. coli*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, em três hospitais da China: dois terciários e uma UTI neonatal (WANG *et al.*, 2019; KONG *et al.*, 2019). Adicionalmente, foi evidenciada a presença do *bla*_{NDM-5} em cepas hipervirulentas em outros dois serviços terciários (LI *et al.*, 2020; YUAN *et al.*, 2019). No Japão, foi descrita a emergência de cepas de *K. aerogenes* portadoras de *bla*_{NDM-5} (KAYAMA *et al.*, 2022). Esses dados demonstram que as variantes do gene *bla*_{NDM} encontram-se distribuídas mundialmente.

A literatura descreve a presença de *bla*_{NDM-5} em várias espécies bacterianas distribuídas por diversos países do mundo. Entretanto, a presença desse gene em cepas de *P. mirabilis* e cepas do complexo *E. cloacae*, não foi descrita nas américas e fora do continente asiático, respectivamente. Estas informações se referem às pesquisas em bancos de dados mundiais (Pubmed/NCBI, Scielo, Google acadêmico e sequências de nucleotídeos depositadas na plataforma Nucleotide/NCBI) para manuscritos que relataram a presença dos isolados carreando *bla*_{NDM-5}. Surpreendentemente, os manuscritos identificaram o *P. mirabilis* com o gene *bla*_{NDM-5} fora do continente americano, com publicações na Europa e na Ásia. Além disso, as cepas do complexo *E. cloacae* foram relatadas apenas na Ásia. Este é o primeiro relato de *P. mirabilis* com o gene *bla*_{NDM-5} nas Américas e do complexo *E. cloacae* fora da Ásia. (JIN *et al.*, 2018; VALETIN *et al.*, 2018; SUN, XU e HE, 2019; CHEN *et al.*, 2021; LOUCIF *et al.*, 2022).

A busca por diagnósticos mais rápidos e precisos, principalmente no que diz respeito à presença de enzimas de resistência, leva os laboratórios de microbiologia a utilizarem testes rápidos como o Teste Rápido Carba-NG-5, que detecta as principais carbapenemases) KPC, NDM, VIM, OXA, IMP). Estudos direcionados em investigar a especificidade e sensibilidade do Carba-NG-5 para as carbapenemases, demonstram índices de 84,6% e 100%, respectivamente, quando comparados a técnica de PCR convencional em tempo real (XU *et al.*, 2022; ZHU *et al.*, 2021; KANAHASHI *et al.*, 2021; HUANG *et al.*, 2021; LIU *et al.*, 2021), em concordância com os achados no presente estudo. No entanto, em se tratando da co-positividade, foi observado em um estudo na Itália 100% de similaridade entre a técnica de PCR convencional e o teste Carba-NG-5, entretanto os testes foram realizados pelos próprios pesquisadores em condições ideais, de crescimento sem interferentes como tempo e fatores interpretativos (VASILAKOPOULOU *et al.*, 2021).

No presente estudo, os dados acerca da ERIC-PCR, demonstram uma grande variabilidade do perfil genético de *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *S. marcescens*, corroborando

com outros estudos realizados no Brasil (BELTRÃO *et al.*, 2022; FIRMO *et al.*, 2020; OLIVEIRA *et al.*, 2020). A alta variabilidade reportada e uma relação clonal mínima, podem ocasionar uma maior dificuldade terapêutica, uma vez que não houve circulação dominante de um mesmo perfil genético e fenotípico de resistência. Essas cepas possuem origens distintas, com diferentes variantes dos genes de resistência e, algumas vezes, tais variantes *bla*_{NDM-5} e *bla*_{NDM-7}, segundo Nordmann e Poirel (2014), possuem atividade enzimática aumentada contra os carbapenêmicos se comparadas a *bla*_{NDM-1}. Essa alta variabilidade genética pode favorecer a transferência de diferentes variantes dos genes de resistência que tenham atividade enzimática mais efetiva. Além disso, ocorreu a presença de três isolados com perfil de similaridade genética superior a 80% em três pacientes distintos. Este achado sugere que houve disseminação clonal entre pacientes internados em dois setores distintos.

Portanto, nesse estudo foram descritas várias espécies de Enterobacterales, resistentes aos carbapenêmicos, colonizando e como agentes de infecções em pacientes com covid-19 ou sem covid-19, predominando a *K. pneumoniae*. Destaca-se que houve mais detecções de *bla*_{NDM} em relação ao *bla*_{KPC}, e identificação de novas variantes no continente americano, *bla*_{NDM-5} e *bla*_{NDM-7} o que mostra um aumento da disseminação e de mutações do gene *bla*_{NDM} em Enterobacterales em Recife-PE, Brasil. A ocorrência da alta heterogeneidade genética dos isolados clínicos do presente estudo pode indicar diversas origens nas fontes de contaminação no ambiente hospitalar, principalmente quanto a *K. pneumoniae*.

Agradecimentos

Agradecemos a CAPES por ofertar a bolsa de mestrado. Somos especialmente gratos a Plataforma Multiusuário de Sequenciamento de DNA do CCB/UFPE-LABBE, Brasil, por sequenciar, especialmente ao **Prof. Dr. Valdir de Queiroz Balbino e Dra. Heidi Lacerda**. Também somos gratos **Josineide Ferreira de Barros, Biomédica chefe do setor de Microbiologia em Recife-PE, Brasil**. Agradecemos ainda a **Fernanda Gomes Beserra do setor de Microbiologia Hospitalar**.

Contribuições dos Autores

LRM: Concepção e projeto do estudo, realização de todos os experimentos laboratoriais, escrita do manuscrito e revisão do manuscrito em inglês; MISP e EMO: Concepção e projeto do estudo, aquisição de dados e revisão de texto em inglês; EMBB e ACSL: Concepção do projeto do estudo, análise de dados, correções textuais do manuscrito e revisão do manuscrito em inglês.

Conflito de Interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude. Acesso em: 14 fev. 2023.
- BELTRÃO, E. M. B. et al. Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil. **J Infect Chemother**, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2022.
- BRCast; Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br/>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2012;45(5):572–8.
- CANTÓN, N. R.; GIJÓN, D.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Antimicrobial resistance in ICUs: An update in the light of the COVID-19 pandemic. **Current Opinion in Critical Care**, v. 26, n. 5, p. 433–441, 2020.
- CHEN, W. et al. Occurrence of blaNDM-1-Positive *Providencia* spp. in a Pig Farm of China. **Antibiotics**, v. 11, n. 6, p. 1-8, 2022.
- CHINNAM, B. K. et al. Detection of β -Lactamase-Producing *Proteus mirabilis* Strains of Animal Origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 8, p. 1374–1379, 1 ago. 2021.
- COSTA, R. L. et al. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 64, n. 6, p. 1-10, 2021.
- DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v. 109, n. 5, p. 511-517, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>.
- DUAN, Q. et al. ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone Harboring blaNDM Replaced a blaKPC Clone in a Tertiary Hospital in China. **Antibiotics**, v. 11, n. 10, 2022.
- ESPINAL, P. et al. First Description of blaNDM-7 Carried on an IncX4 Plasmid in *Escherichia coli* ST679 Isolated in Spain. **Microb Drug Resist**, v. 24, n. 2, p. 113-119, 2018.

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

GHOSH, A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of β -lactamase-producing multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from asymptomatic hospitalized patients. **International Microbiology**, v. 25, n. 1, p. 27-45, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00187-9>.

GLASS. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/glass>. Acesso em: 14 fev. 2023.

GOMEZ-SIMMONDS, A. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales causing secondary infections during the COVID-19 crisis at a New York City hospital. **J Antimicrob Chemother**, v. 76, n. 2, p. 380-384, 2021.

GRASSELLI, G. et al. Hospital-Acquired Infections in Critically Ill Patients With Cancer. **Chest J**, v. 160, n. 2, p. 454-465, 2021.

HAJI, S. H.; AKA, S. T. H.; ALI, F. A. Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **PLOS ONE**, v. 16, n. November, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259005>.

HALL, T. BioEdit software 2017.

HINNAM, B.K. et al. Detection of b-Lactamase-producing proteus mirabilis strains of animal origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. **Journal of Food Protection**, v. 84, n. 8, p. 1374-1379, 2021. Available from: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-399>.

HUANG, Y-T. et al. Evaluating NG-Test CARBA 5 Multiplex Immunochromatographic and Cepheid Xpert CARBA-R Assays among Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Associated with Bloodstream Infection. **Microbiol Spectr.**, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2022.

JIN, C. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant enterobacter cloacae in 11 Chinese cities. **Front Microbiol**, v. 9, n. JUL, p. 1-8, 2018.

JOHNNING, A. et al. The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens-a critical genotype-phenotype analysis. **Microb Genomics**, v. 4, n. 11, 2018.

KANAHASHI, T. et al. Comparison of the Xpert Carba-R and NG-Test CARBA5 for the detection of carbapenemases in an IMP-type carbapenemase endemic region in Japan. **J Infect Chemother**, v. 27, n. 3, p. 503-506, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.11.001>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KAYAMA, S. et al. Emergence of bla NDM-5-Carrying *Klebsiella aerogenes* in Japan. **Microbiol Spectr**, v. 10, n. 3, p. 1-2, 2022.

KONG, Z. et al. First reported nosocomial outbreak of NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in China. **Infection and Drug Resistance**, v.12, p.3557-3566, 2019.

KUMAR, G. et al. E152A substitution drastically affects NDM-5 activity. *FEMS Microbiol Lett*, v. 364, n. 3, p. 1-6, 2017.

KUMAR, G. et al. Glutamic acid at position 152 and serine at position 191 are key residues required for the metallo- β -lactamase activity of NDM-7. **Int J Antimicrob Agents**, v. 55, n. 1, p. 105824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.005>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KUNDU, J. et al. Evaluation of ERIC-PCR and MALDI-TOF as typing tools for multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care center in India. **PLOS ONE**, v. 17, n. November, p. 1-13, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0271652>.

LAI, C.; CHEN, S.; KO, W.; HSUEH, P. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource center with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19. The COVID-19 resource center is hosted on **Elsevier** Connect, the company's public news and information. 2020;(Janeiro).

LAZAR Jr, I.; HORVATH-LAZAR, E. GelAnalyzer 2010.

LI, Q. et al. Emergence of NDM-5-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and SIM-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolated from aseptic body fluid in a large tertiary hospital, 2017–2018: Genetic traits of blaNDM-like and blaSIM-like genes. **Infection and Drug Resistance**, v.13, p.3075-3089, 2020.

LI, Y. et al. Genomic characteristics of clinical multidrug-resistant *Proteus* isolates from a tertiary care hospital in southwest China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, p. 977356, 2022.

LIU, Z. et al. Parallel Validation of the NG-Test Carba 5 and the Xpert Carba-R for Detection and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Causing Bloodstream Infections. **J Mol Diagnostics**, v. 23, n. 8, p. 1007-1014, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.009>. Acesso em: 14 fev. 2023.

MACEDO, V. et al. The health facility as a risk factor for multidrug-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients with COVID-19. *Clinics*, v. 77, n. October, 2022.

MAHMOUD, A. T. et al. Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from cancer patients. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 23, p. 211-216, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>.

MANOHAR, P. et al. The distribution of carbapenem- and colistin-resistance in Gram-negative bacteria from the Tamil Nadu region in India. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 7, p. 874–883, jul. 2017.

MATASEJE, L. F. et al. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). **J Antimicrob Chemother.** 2012;67(6):1359–67.

MONTEIRO, J. et al. NDM-producing Enterobacterales prevalence associated to Covid-19 in a tertiary hospital. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 27, n. 1, p. 1–5, 2023.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 821–830, set. 2014.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 9, p. 821-830, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12719>. Acesso em: 14 fev. 2023.

OLIVEIRA, É.M. et al. High plasmid variability, and the presence of incfIB, incq, inca/c, inchi1b, and incl/m in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with blaKPC and blaNDM from patients at a public hospital in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. 1-8, 2020.

OMBELET, S. et al. Blood culture surveillance in a secondary care hospital in Benin: epidemiology of bloodstream infection pathogens and antimicrobial resistance. **BMC Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07077-z>.

PÉREZ-VAZQUEZ, M. et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016-2017. **Eur Surveill**, v. 24, n. 6, p. 1-7, 2019.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. DARwin software 2006.

PINTADO, V. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections in COVID-19 patients. **Infect Dis (Auckl)**, v. 54, n. 1, p. 36-45, 2022.

PIZA-BUITRAGO, A. et al. Genome-based characterization of two Colombian clinical *Providencia rettgeri* isolates co-harboring NDM-1, VIM-2, and other β -lactamases. **BMC Microbiol**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2020.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* **Antimicrob Agents and Chemother.** 2004;48(1):15–22.

PRADO, G. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. **Int J Antimicrob Agents**, v. 59, n. 1, 2022.

RAHMAN, M. et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. **Int J Antimicrob Agents**, v. 44, n. 1, p. 30-37, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003>. Acesso em: 14 fev. 2023.

REYES, J. A. et al. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. **Brazilian J Infect Dis**, v. 24, n. 3, p. 231-238, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>. Acesso em: 14 fev. 2023.

RODRIGUES, Y. C. et al. The Spread of NDM-1 and NDM-7-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Driven by Multiclonal Expansion of High-Risk Clones in Healthcare Institutions in the State of Pará, Brazilian Amazon Region. **Antibiotics (Basel, Switzerland)**, v. 10, n. 12, p. 1527, 14 dez. 2021.

SAH, R. et al. Detection of Pan drug resistance OXA-48 producing *Providencia* in an ICU patient for the first time in Nepal. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2019.

SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. **Nature** 1977;265:687–95.

SCAVUZZI, A. M. L. et al. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2 harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. **J Glob Antimicrob Resist**. 2019, 13(6): 612-632. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.09.009

SILVEIRA, M. C. et al. Genetic Basis of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated From Bloodstream in Brazil. **Frontiers in Medicine**, v. 8, 2021.

TSHITSHI, L. et al. Extended spectrum beta-lactamase-resistant determinants among carbapenem-resistant enterobacteriaceae from beef cattle in the NorthWest Province, South Africa: A critical assessment of their possible public health implications. **Antibiotics**, v. 9, n. 11, p. 1-19, 2020.

VASILAKOPOULOU, A. et al. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, p. 942, 27 abr. 2021.

WANG, M.G. et al. Transmission and molecular characteristics of blaNDM-producing *Escherichia coli* between companion animals and their healthcare providers in Guangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.77, n.2, p.351-355, 2022.

WANG, Z. et al. Outbreak of blaNDM-5-Harboring *klebsiella pneumoniae* ST290 in a tertiary hospital in China. **Microbial Drug Resistance**, v.25, n.10, p.1443-1448, 2019.

XU, Y. et al. A Rapid Carbapenemase Genes Detection Method with Xpert Carba-R from Positive Blood Cultures Compared with NG-Test Carba 5 and Sequencing. **Infect Drug Resist.**, v. 15, p. 7719-7725, dez. 2022.

YI, J.; KIM, K. H. Identification and infection control of carbapenem-resistant Enterobacterales in intensive care units. **Acute Critical Care**, v. 36, n. 3, p. 175-184, 2021.

YUAN, Y. et al. BlaNDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v.8, n.1, p.6-9, 2019.

ZHANG, Y. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 62, n. 2, p. 1-11, 2018.

ZHU, Y. et al. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis. **Ann Transl Med.**, v. 9, n. 9, p. 769, 2021.

6 CONCLUSÕES

- A presença dos genes de resistência *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC}, observada nos isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de colonização e infecção, em pacientes com e sem covid-19, foi verificada com maior frequência em cepas de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, respectivamente. O perfil de resistência tanto para cepas oriundas de pacientes colonizados e com infecção foi bastante semelhante, tanto em relação à resistência fenotípica, quanto a presença de genes de resistência.
- As cepas oriundas de pacientes com covid-19, de infecção ou colonização, carregaram o gene *bla*_{NDM} em maior frequência.
- Todos os isolados do presente estudo possuíram a presença de uma ou mais carbapenemases advindas de pacientes com ou sem covid-19. O sequenciamento demonstrou que este é o primeiro estudo que identificou a presença de *bla*_{NDM-5} em *P. mirabilis* e *E. cloacae*, respectivamente, nas Américas e fora da Ásia.
- A comparação entre a PCR e o teste rápido Carba-5-NG demonstrou elevada sensibilidade e especificidade do teste para as cepas que possuíam uma única carbapenemase. Na presença de mais de uma, ocorreu uma queda significativa da sensibilidade, fato este que pode dificultar o diagnóstico correto.
- A alta variabilidade genética por ERIC-PCR descrita no presente estudo é forte indicativo de variadas fontes de contaminação, uma vez que todas as espécies de Enterobacterales foram MDR e contaram com a presença de um ou mais genes de resistência.

REFERÊNCIAS

- ADELMAN, M.W. et al. Secondary Bacterial Pneumonias and Bloodstream Infections in Patients Hospitalized with covid-19. *LETTERS*, v. 18, n. 9, p. 1584–1587, 2021.
- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacterales’: Proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 2016.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em : https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/boletins-e-relatorios-das-notificacoes-de-iras-e-outros-eventos-adversos-1/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude/pernambuco/view. Acesso em 10 de jan. de 2023.
- KARDEC, ALLAN. Livro dos Espíritos. 93. ed. [s.l: s.n.]. v. 1
- AMARSY, R., PEAN DE PONFILL, G.R., BENMANSOUR, H.A., JACQUIER, H., MÉGARBANE, Since January 2020 Elsevier has created a covid-19 resource center with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus covid- 19. The covid-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company’ s public news and information. *Médecine et maladies infectieuses*, v.50, n. 8, p. 750-751 2020.
- AMBLER, R. P. The structure of B-lactamases. *Phil. trans. R. Soc. Lond*, v. 289, n. B, p. 321–331, 1980.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude. Acesso em: 14 fev. 2023.
- BÁEZ-SANTOS, Y. M.; JOHN, S. E. S.; MESECAR, A. D. The SARS-coronavirus papain-like protease: Structure, function and inhibition by designed antiviral compounds. *Antiviral Research*, v. 115, n. January, p. 21–38, 2015.
- BAKHSHI, B.; AFSHARI, N.; FALLAH, F. Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR analysis as reliable evidence for suspected *Shigella* spp. outbreaks. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 3, p. 529-533, 2018.
- BARDI, T. et al. Nosocomial infections associated to COVID-19 in the intensive care unit: clinical characteristics and outcome. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 40, n. 3, p. 495–502, 2021.
- BAVISKAR, A. S. et al. Nosocomial infections in surgical intensive care unit: A retrospective single-center study. *International Journal of Critical Illness and Injury Science*, v. 9, n. 1, p. 16–20, 2019.
- BECHMANN, L. et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatal intensive care unit associated with contaminated donor milk . *Infection Control & Hospital Epidemiology*, p. 1–7, 2022.
- BEHZADI, P.; BEHZADI, E. *Environmental microbiology*. 2007.

- BELTRÃO, E. M. B. et al. Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil. *J Infect Chemother*, v. 28, n. 3, p. 363-372, 2022.
- BELTRÃO, E. M. B.; DE OLIVEIRA, É. M.; LOPES, A. C. D. S. First report of blaGES-1 in *Proteus mirabilis* clinical isolates. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 54, p. 3–5, 2021.
- BERT, F.; BRANGER, C.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Identification of PSE and OXA β -lactamase genes in *Pseudomonas aeruginosa* using PCR-restriction fragment length polymorphism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 50, n. 1, p. 11–18, 2002.
- BERTRAM, K.; ANTHONY, T. *Basic & Clinical Pharmacology*. 13. ed. Porto Alegre: [s.n.]. v. 91
- BOCANEGRA-IBARIAS P. et al. Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PLoS One*, 12:e0179651, 2017.
- BONTRON, S. et al. Increased resistance to carbapenems in *proteus mirabilis* mediated by amplification of the blaVIM-1-carrying and IS26-associated class 1 integron. *Microbial Drug Resistance*, v. 25, n. 5, p. 663–667, 2019.
- BORER, A. et al. Attributable Mortality Rate for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 30, n. 10, p. 972–976, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde no 16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. ANVISA - Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde, v. 16, p. 83, 2016.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. MICROBIOLOGIA CLÍNICA PARA O CONTROLE DE INFECÇÃO RELACIONADA À ASSISTÊNCIA À SAÚDE. Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica, p. 161, 2020.
- BRCAST; Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2022. Disponível em: <http://brcast.org.br/>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- BURALL, L. S. et al. *Proteus mirabilis* Genes That Contribute to Pathogenesis of Urinary Tract Infection: Identification of 25 Signature-Tagged Mutants Attenuated at Least 100-Fold. *Infection and Immunity*, v. 72, n. 5, p. 2922–2938, 2004.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.
- CABRAL, A. B. et al. Clonal spread and accumulation of β -lactam resistance determinants in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* complex isolates from infection and colonization in patients at a public hospital in Recife, Pernambuco, Brazil. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 1, p. 70–77, 2017.
- CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2012;45(5):572–8.
- CANTÓN, N. R.; GIJÓN, D.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Antimicrobial resistance in ICUs: An update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care*, v. 26, n. 5, p. 433-441, 2020.

- CARVALHO-ASSEF AP. et al. Detection of NDM-1-CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemotherapy*, v. 58, (4), p. 2475–2476, 2014.
- CARVALHO-ASSEF AP. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *Journal Antimicrob Chemother*, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.
- CASSETTARI, V. C. et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. *Jornal de pediatria*, v. 82, n. 4, p. 313–316, 2006.
- CAVALCANTI, F. C. N. et al. Relationships between phagocytosis, mucoid phenotype, and genetic characteristics of *klebsiella pneumoniae* clinical isolates. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 52, p. 5–9, 2019.
- CHEN, D.; JI, Y. New insights into *Citrobacter freundii* sepsis in neonates. *Pediatrics International*, v. 61, n. 4, p. 375–380, 2019.
- CHEN, L. et al. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo- β -lactamase and quinolone resistance determinants in an ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. *Journal of Zhejiang University Science B*, v. 10, n. 5, p. 348–354, 2009.
- CHEN, L. et al. Genome sequence of a *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 isolate with prophage-encoded K. *pneumoniae* carbapenemase. *Genome Announcements*, v. 3, n. 3, 2015.
- CHEN, W. et al. Occurrence of blaNDM-1-Positive *Providencia* spp. in a Pig Farm of China. *Antibiotics*, v. 11, n. 6, p. 1–8, 2022.
- CHEN, X. et al. Clinical features and microbiological characteristics of hospital-and community-onset *escherichia coli* bloodstream infection. *Journal of Medical Microbiology*, v. 68, n. 2, p. 178–187, 2019.
- CHINNAM, B. K. et al. Detection of β -Lactamase-Producing *Proteus mirabilis* Strains of Animal Origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. *Journal of Food Protection*, v. 84, n. 8, p. 1374–1379, 1 ago. 2021.
- CHMELNITSKY, Inna et al. Plasmid-mediated qnrB2 and carbapenemase gene blaKPC-2 carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, v. 52, n. 8, p. 2962–2965, 2008.
- CORNAGLIA, G. et al. Hospital outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-1, a novel transferable metallo- β -lactamase. *Clinical Infectious Diseases*, v. 31, n. 5, p. 1119–1125, 2000.
- COSTA, R. L. da et al. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, v. 64, n. 6, p. 1–10, 2021.
- CRISTINA, M. L.; SARTINI, M.; SPAGNOLO, A. M. *Serratia marcescens* infections in neonatal intensive care units (NICUs). *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 16, n. 4, 2019.
- DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: update on taxonomy, clinical aspects, and emerging antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 32, n. 4, p. 1–32, 2019.

- DING, Y. et al. Systematic review of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae causing neonatal sepsis in China. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 18, n. 1, 2019.
- DONG, F.; et al. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. *Chinese Medical Journal*, v.121, p.1611-1616, 2008.
- DUAN, H. et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, v. 109, n. 5, p. 511-517, 2009. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>.
- DUAN, H.; et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. *Environmental Research*, v.109, p.511-517, 2009.
- DUAN, Q. et al. ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone Harboring blaNDM Replaced a blaKPC Clone in a Tertiary Hospital in China. *Antibiotics*, v. 11, n. 10, 2022.
- ESPINAL, P. et al. First Description of blaNDM-7 Carried on an IncX4 Plasmid in *Escherichia coli* ST679 Isolated in Spain. *Microb Drug Resist*, v. 24, n. 2, p. 113-119, 2018.
- FARFOUR, E. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales outbreak: Another dark side of covid-19. *American Journal of Infection Control*, v. 48, n. January, p. 1533–1536, 2020.
- FERREIRA, R. L. et al. Characterization of KPC-Producing *Serratia marcescens* in an Intensive Care Unit of a Brazilian Tertiary Hospital. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, n. May, p. 1–14, 2020.
- FERRY, A. et al. *Enterobacter cloacae* colonisation and infection in a neonatal intensive care unit: Retrospective investigation of preventive measures implemented after a multiclonal outbreak. *BMC Infectious Diseases*, v. 20, n. 1, p. 1–7, 2020.
- FIRMO, E. F. et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 21, p. 255–261, 2020.
- FLORES, C. et al. Genetic Relatedness of NDM-Producing *Klebsiella*. *Microbial Drug Resistance*, v. 00, n. 00, p. 1–8, 2020.
- GARCIA-VIDAL, C. et al. Incidence of co-infections and superinfections in hospitalized patients with covid-19: a retrospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 27, n. 1, p. 83–88, 2021.
- GHOSH, A. et al. Epidemiologic and molecular characterization of β -lactamase-producing multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from asymptomatic hospitalized patients. *International Microbiology*, v. 25, n. 1, p. 27-45, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00187-9>.
- GLASS. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System. Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/glass>. Acesso em: 14 fev. 2023.
- Global Antimicrobial Resistance and use Surveillance System (GLASS). Disponível em: <https://www.who.int/initiatives/glass>. Acesso em: 10 jan. 2023.

- GOMEZ-SIMMONDS, A. et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales causing secondary infections during the COVID-19 crisis at a New York City hospital. *J Antimicrob Chemother*, v. 76, n. 2, p. 380-384, 2021.
- GORRIE, C. L. et al. Gastrointestinal Carriage Is a Major Reservoir of *Klebsiella pneumoniae* Infection in Intensive Care Patients. *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 2, p. 208–215, 2017.
- GRASSELLI, G et al. Hospital-Acquired Infections in Critically Ill Patients With Cancer. *Chest Journal*, v. 160, n. 2, p. 454–465, 2021.
- GRINBERG, S.; BISHBURG, E.; NAGARAKANTI, S. R. Embolic *Serratia* aortic valve endocarditis. *IDCases*, v. 22, p. e00953, 2020.
- GUO, X. et al. Detection and genomic characterization of a *Morganella morganii* isolate from China that produces NDM-5. *Frontiers in Microbiology*, v. 10, n. MAY, p. 1–9, 2019.
- HAJI, S. H.; AKA, S. T. H.; ALI, F. A. Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PLOS ONE*, v. 16, n. November, 2021. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259005>.
- HALL, T. BioEdit software 2017.
- HINNAM, B.K. et al. Detection of β -Lactamase-producing *Proteus mirabilis* strains of animal origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. *Journal of Food Protection*, v. 84, n. 8, p. 1374-1379, 2021. Available from: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-399>.
- HOQUE, M. N. et al. Microbial co-infections in covid-19: Associated microbiota and underlying mechanisms of pathogenesis. *Microbial Pathogenesis*, v. 156, 2021.
- HORMAECHE, E., EDWARDS, P. R. Proposal for the rejection of the generic name *Cloaca castellani* and *Chalmers*, and proposal of *Enterobacter* as a generic name with designation of type species and of its type culture. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature And Taxonomy*, v. 10, n. 2, p. 75–76, 1960.
- HU, K. et al. Antibiotic susceptibility and molecular analyses of clinical *Enterobacter cloacae* isolates in Eastern Heilongjiang Province, China. *Annals of Cardiothoracic Surgery*, v. 9, n. 3, p. 1211–1219, 2020.
- HUANG, Y-T. et al. Evaluating NG-Test CARBA 5 Multiplex Immunochromatographic and Cepheid Xpert CARBA-R Assays among Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Associated with Bloodstream Infection. *Microbiol Spectr.*, v. 10, n. 1, p. 1-7, 2022.
- HUGHES, S. et al. Bacterial and fungal coinfection among hospitalized patients with covid-19: a retrospective cohort study in a UK secondary-care setting. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 26, n. January, p. 1395–199, 2020.
- IMAI, K. et al. Clinical characteristics in blood stream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*: a comparative study, Japan, 2014-2017. *BMC Infectious Diseases*, v. 19, n. 1, p. 1–10, 2019.
- ITO, H.; ARAKAWA, Y.; OHSUKA, S. et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo- β -lactamase gene *blaIMP* among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.39, n.4, p.824-829, 1995.
- IVERSEN, C. et al. The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov. *Cronobacter*

sakazakii subsp. sakazakii, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. malonaticus subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter* genomospecies 1. BMC evolutionary biology, v. 7, n. 1, p. 1-11, 2007.

JIN, C. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant enterobacter cloacae in 11 Chinese cities. Front Microbiol, v. 9, n. JUL, p. 1-8, 2018.

JOHNNING, A. et al. The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens-a critical genotype-phenotype analysis. Microb Genomics, v. 4, n. 11, 2018.

JONGE, BL. et al. In vitro susceptibility to ceftazidime-avibactam of carbapenem-nonsusceptible Enterobacteriaceae isolates collected during the INFORM global surveillance study (2012 to 2014). Antimicrob Agents Chemother, v. 60, p. 3163–3169, 2016.

KANAHASHI, T. et al. Comparison of the Xpert Carba-R and NG-Test CARBA5 for the detection of carbapenemases in an IMP-type carbapenemase endemic region in Japan. J Infect Chemother, v. 27, n. 3, p. 503-506, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.11.001>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KARLOWSKY, JÁ. et al. In vitro activity of imipenem against carbapenemase positive Enterobacteriaceae isolates collected by the SMART global surveillance program from 2008 to 2014. J Clin Microbiol, v. 55, p. 1638 –1649, 2017.

KAYAMA, S. et al. Emergence of bla NDM-5-Carrying Klebsiella aerogenes in Japan. Microbiol Spectr, v. 10, n. 3, p. 1-2, 2022.

KESHI, L. et al. Analysis of drug resistance of extended-spectrum betalactamases-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in children with urinary tract infection. Saudi Medical Journal, v. 40, n. 11, p. 1111–1115, 2019.

KHALIL, O. A. K.; KHALIL, S. DA S. SARS-CoV-2: taxonomia, origem e constituição. Revista de Medicina, v. 99, n. 5, p. 473–479, 2020.

KIM, E. J. et al. Outbreak investigation of Serratia marcescens neurosurgical site infections associated with a contaminated shaving razors. Antimicrobial Resistance and Infection Control, v. 9, n. 1, p. 1–7, 2020.

KONEMAN, E.W.; PROCOP. G.W.; CHURCH, D.L.; HALL, G.S.; JANDA, W.M.; SCHRECKENBERGER P.C.; WOODS, G.L. COLOR ATLAS & TEXTBOOK of Diagnostic Microbiology. 7.ed. Philadelphia: Wolters Kluwer, 2017.

KONG, Z. et al. First reported nosocomial outbreak of NDM-5-producing Klebsiella pneumoniae in a neonatal unit in China. Infection and Drug Resistance, v.12, p.3557-3566, 2019.

KUMAR, G. et al. E152A substitution drastically affects NDM-5 activity. FEMS Microbiol Lett, v. 364, n. 3, p. 1-6, 2017.

KUMAR, G. et al. Glutamic acid at position 152 and serine at position 191 are key residues required for the metallo- β -lactamase activity of NDM-7. Int J Antimicrob Agents, v. 55, n. 1, p. 105824, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.005>. Acesso em: 14 fev. 2023.

KUNDU, J. et al. Evaluation of ERIC-PCR and MALDI-TOF as typing tools for multidrug resistant Klebsiella pneumoniae clinical isolates from a tertiary care center in India. PLOS

ONE, v. 17, n. November, p. 1-13, 2022. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0271652>.

LAI, C. et al. Increased antimicrobial resistance during the covid-19 pandemic. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 57, 2021.

LAI, C.; CHEN, S.; KO, W.; HSUEH, P. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource center with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID-19. The COVID-19 resource center is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. 2020;(Janeiro).

LANA, R. M. et al. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) emergency and the role of timely and effective national health surveillance. *Cadernos de Saude Publica*, v. 36, n. 3, p. 1–5, 2020.

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

LAZAR Jr, I.; HORVATH-LAZAR, E. GelAnalyzer 2010.

LEPE, J. A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L. Resistance mechanisms in Gram-negative bacteria. *Medicina Intensiva (English Edition)*, v. 46, n. 7, p. 392–402, 2022.

LI, Q. et al. Emergence of NDM-5-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and SIM-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolated from aseptic body fluid in a large tertiary hospital, 2017–2018: Genetic traits of blaNDM-like and blaSIM-like genes. *Infection and Drug Resistance*, v.13, p.3075-3089, 2020.

LI, Y. et al. Genomic characteristics of clinical multidrug-resistant *Proteus* isolates from a tertiary care hospital in southwest China. *Frontiers in Microbiology*, v. 13, p. 977356, 2022.

LIFEMAP – Disponível em <http://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/> Acesso em: 12 de outubro de 2023.

LINCOPAN, N. et al. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, (1), p. 516–519, 2005.

LIU, H. et al. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 50, p. 10–17, 2016.

LIU, L. H. et al. *Citrobacter freundii* bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 51, n. 4, p. 565–572, 2018.

LIU, Z. et al. Parallel Validation of the NG-Test Carba 5 and the Xpert Carba-R for Detection and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Causing Bloodstream Infections. *J Mol Diagnostics*, v. 23, n. 8, p. 1007-1014, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.009>. Acesso em: 14 fev. 2023.

LOUCIF, L. et al. Detection of NDM-5 and MCR-1 antibiotic resistance encoding genes in Enterobacterales in long-distance migratory bird species *Ciconia ciconia*, Algeria. *Science of The Total Environment*, v. 814, p. 152861, mar. 2022.

LPSN - List of Prokaryotic names withstanding in Nomenclature. Disponível em <http://www.bacterio.net/index.html>. Acesso em: 20 de Janeiro de 2023.

- MA, S. et al. Metagenomic analysis reveals oropharyngeal microbiota alterations in patients with covid-19. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2021.
- MACEDO, V. et al. The health facility as a risk factor for multidrug-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients with COVID-19. *Clinics*, v. 77, n. October, 2022.
- MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.
- MAHMOUD, A. T. et al. Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates recovered from cancer patients. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 23, p. 211-216, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>.
- MANOHAR, P. et al. The distribution of carbapenem- and colistin-resistance in Gram-negative bacteria from the Tamil Nadu region in India. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, n. 7, p. 874–883, jul. 2017.
- MARGATE, E. et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE, BRAZIL. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 57, n. 4, p. 359–360, 2015.
- MARTINEZ-GUERRA, B. A. et al. Antimicrobial resistance patterns and antibiotic use during hospital conversion in the covid-19 pandemic. *Antibiotics*, v. 10, n. 2, p. 1–9, 2021.
- MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. *Enf Infec y Microb Clin*, v. 32, p. 4-9, 2014.
- MATASEJE, L. F. et al. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(6):1359–67.
- MATSUMURA, Y. et al. Genomic epidemiology of global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*, v. 72, n. 8, p. 2249-2258, 2017.
- MAZZARIOL, A.; BAZAJ, A.; CORNAGLIA, G. Multi-drug-resistant Gram-negative bacteria causing urinary tract infections: a review. *Journal of Chemotherapy*, v. 29, n. 1, p. 2–9, 2017.
- MEACHAM, K. J. et al. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *Journal of clinical microbiology*, v. 41, n. 11, p. 5224-5226, 2003.
- MELO, R.C.A. et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. *Current Microbiology*, v. 69, n. 6, p. 824–831, 2014.
- MIRZAEI, R. et al. Bacterial co-infections with SARS-CoV-2. *IUBMB Life*, v. 72, n. 10, p. 2097–2111, 2020.
- MOHAMMED, H. et al. Spread of TEM, VIM, SHV, and CTX-M β -Lactamases in Imipenem-Resistant gram-Negative Bacilli Isolated from Egyptian Hospitals. *International Journal of Microbiology*, 2016.

MOLNÁR, S. et al. Dissemination of NDM-1 carbapenemase-producer *Providencia stuartii* strains in Romanian hospitals: a multicentre study. *Journal of Hospital Infection*, v. 103, n. 2, p. 165–169, 2019.

MOMTAZ, H. et al. Uropathogenic *Escherichia coli* in Iran: serogroup distributions, virulence factors and antimicrobial resistance properties. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2013.

MONTEIRO, J. et al. NDM-producing Enterobacterales prevalence associated to Covid-19 in a tertiary hospital. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 27, n. 1, p. 1–5, 2023.

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

MUKHERJEE, S. Neonatal Sepsis: The Impact of Carbapenem-Resistant and Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Medicine*, v. 8, n. June, 2021.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica* 7a edição. *Microbiologia*, p. 1808, 2014.

NGOULA, G.L. et al. Impact of Antibiotic Consumption on the Acquisition of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacterales Carriage during the COVID-19 Crisis in French Guiana. *Antibiotics*, v. 12, n. 1, p. 58, 2022.

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

NORDMANN, P.; POIREL, L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, v. 69, n. Suppl 7, p. S521–S528, 2019.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 20, n. 9, p. 821–830, set. 2014.

NORI, P. et al. Emerging Co-Pathogens: New Delhi Metallo-beta-lactamase producing Enterobacterales Infections in New York City covid-19 Patients. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 56, 2020.

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

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

OLIVEIRA, E. M. Investigação de genes para carbapenemases, grupos de incompatibilidade plasmidial e relação clonal de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos provenientes de colonização e infecção em um hospital de recife-pe. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) – Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, Recife, 2019.

OLIVEIRA, É.M. et al. High plasmid variability, and the presence of incfib, incq, inca/c, inci1b, and incl/m in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* with blakpc and blandm from

patients at a public hospital in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 53, p. 1-8, 2020.

OMBELET, S. et al. Blood culture surveillance in a secondary care hospital in Benin: epidemiology of bloodstream infection pathogens and antimicrobial resistance. *BMC Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 1-15, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07077-z>.

Organização Mundial da Saúde. (2020, 11 de março). WHO Director-General's opening remarks at the media briefing on covid-19 - 11 March 2020. Retirado de <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19--11-march-2020>

OUCHENIR, L. et al. The epidemiology, management, and outcomes of bacterial meningitis in infants. *Pediatrics*, v. 140, n. 1, p. 1–10, 2017.

PARAJULI, N. P. et al. High burden of antimicrobial resistance among gram negative bacteria causing healthcare associated infections in a critical care unit of Nepal. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 6, n. 1, p. 1–9, 2017.

PENTEADO, AP. et al. Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 63,(1), p. 87–91, 2009.

PEREIRA, PS. et al. Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 110, n. 4, p. 580-582, 2015.

PÉREZ-VAZQUEZ, M. et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016-2017. *Eur Surveill*, v. 24, n. 6, p. 1-7, 2019.

PERILLI, M. et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* harbouring blaKPC-3 and blaVIM-2 from central Italy. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 75, p. 218–221, 2013.

PERRIER, X.; JACQUEMOUD-COLLET, J. P. DARwin software 2006.

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

PICCIRILLI, A. et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST14 and ST512 causing bloodstream infections in ICU and surgery wards of a tertiary university hospital of Verona (northern Italy): co-production of KPC-3, OXA-48, and CTX-M-15 β -lactamases. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 96, n. 3, p. 114968, 2020.

PINTADO, V. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacterales* infections in COVID-19 patients. *Infect Dis (Auckl)*, v. 54, n. 1, p. 36-45, 2022.

PITOUT, J.D.D. et al. The Global Ascendency of OXA-48-Type Carbapenemases. *Clin Microbiol Rev*, 33(1), 2019.

PIZA-BUITRAGO, A. et al. Genome-based characterization of two Colombian clinical *Providencia rettgeri* isolates co-harboring NDM-1, VIM-2, and other β -lactamases. *BMC Microbiology*, v. 20, n. 1, p. 1–13, 2020.

POIREL, L. et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* *Antimicrob Agents and Chemother.* 2004;48(1):15–22.

PRADO, G. et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. *Int J Antimicrob Agents*, v. 59, n. 1, 2022.

PROTONOTARIOU, E. et al. Clonal outbreak caused by VIM-4-producing *Proteus mirabilis* in a Greek tertiary-care hospital. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 56, n. 2, 2020.

PROTONOTARIOU, E. et al. Hospital outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* ST147 clonal strain co-producing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases in a tertiary teaching hospital in Northern Greece. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 52, n. 3, p. 331–337, 2018.

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

RAHMAN, M. et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* from India. *Int J Antimicrob Agents*, v. 44, n. 1, p. 30-37, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003>. Acesso em: 14 fev. 2023.

RANJBAR, R. et al. Enterobacterial repetitive intergenic consensus polymerase chain reaction (ERIC-PCR) genotyping of *Escherichia coli* strains isolated from different animal stool specimens. *Iranian journal of pathology*, v. 12, n. 1, p. 25, 2017.

REDONDO-BRAVO, L. et al. *Serratia marcescens* outbreak in a neonatology unit of a Spanish tertiary hospital: Risk factors and control measures. *American Journal of Infection Control*, v. 47, n. 3, p. 271–279, 2019.

REYES, J. A. et al. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American *Enterobacterales*. *Brazilian J Infect Dis*, v. 24, n. 3, p. 231-238, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>. Acesso em: 14 fev. 2023.

RIBEIRO, V. B. et al. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 18, n. 2, p. 231–232, 2014a.

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

ROCHA, I. V.. Identificação de mecanismos de resistência antimicrobiana de bactérias Gram negativas prevalentes em superfícies e hemoculturas de unidades de terapia intensiva em Caruaru-PE. 2017. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2017.

RODRIGUES, Y. C. et al. The Spread of NDM-1 and NDM-7-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Driven by Multiclonal Expansion of High-Risk Clones in Healthcare Institutions in the State of Pará, Brazilian Amazon Region. *Antibiotics (Basel, Switzerland)*, v. 10, n. 12, p. 1527, 14 dez. 2021.

ROTHER, K. et al. Rates of bacterial co-infections and antimicrobial use in covid-19 patients: a retrospective cohort study in light of antibiotic stewardship. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v. 40, n. 4, p. 859–869, 2021.

- ROUZÉ, A. et al. Relationship between SARS-CoV-2 infection and the incidence of ventilator-associated lower respiratory tract infections: a European multicenter cohort study. *Intensive Care Medicine*, v. 47, n. 2, p. 188–198, 2021.
- RUS, M. et al. Distribution of NDM1 carbapenemase-producing protease strains on high-risk hospital wards. *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 4751–4761, 2020.
- SAH, R. et al. Detection of Pan drug resistance OXA-48 producing *Providencia* in an ICU patient for the first time in Nepal. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 8, n. 1, p. 1-7, 2019.
- SALAZAR-OSPINA, L.; VANEGAS, J. M.; JIMÉNEZ, J. N. High intermittent colonization by diverse clones of β -lactam-resistant Gram-negative bacilli suggests an excessive antibiotic use and different sources of transmission in haemodialysis patients. *Journal of Hospital Infection*, v. 107, p. 76-86, 2021.
- SANGER, F. et al. Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature*, v.265, n. 5596, p. 687, 1977.
- SCAVUZZI, A. M. L. et al. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2 harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019, 13(6): 612-632. DOI: 10.1016/j.jgar.2019.09.009
- SCAVUZZI, A. M. L. et al. Occurrence of qnrB1 and qnrB12 genes, mutation in gyrA and ramR, and expression of efflux pumps in isolates of *Klebsiella pneumoniae* carriers of blaKPC-2. *Journal of medical microbiology*, v. 66, n. 4, p. 477-484, 2017.
- SHIN, S. et al. Emergence of multidrug-resistant *Providencia rettgeri* isolates co-producing NDM-1 carbapenemase and PER-1 extended-spectrum β -lactamase causing a first outbreak in Korea. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 17, n. 1, p. 1–6, 2018.
- SILVEIRA, M. C. et al. Genetic Basis of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated From Bloodstream in Brazil. *Frontiers in Medicine*, v. 8, 2021.
- SPYROPOULOU, A. et al. A ten-year surveillance study of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care Greek university hospital: Predominance of KPC- over VIM- or NDM-producing isolates. *Journal of Medical Microbiology*, v. 65, n. 3, p. 240–246, 2016.
- SUGITA, K. et al. Molecular Analysis of bla KPC-2 -Harboring Plasmids: Tn 4401a Interplasmid Transposition and Tn 4401a -Carrying ColRNAI Plasmid Mobilization from *Klebsiella pneumoniae* to *Citrobacter europaeus* and *Morganella morganii* in a Single Patient . *mSphere*, v. 6, n. 6, p. 1–9, 2021.
- TAKISSIAN, J. et al. NG-test carba 5 for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacterales from positive blood cultures. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 63, n. 5, p. 17–20, 2019.
- TAN, C. et al. Bloodstream infection and ventilator-associated pneumonia in patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) supported by extracorporeal membrane oxygenation. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, v. 2019, p. 1–8, 2022.
- TORTORA, G.; FUNKE, B.; CASE, C. Livro - Tortora - Microbiologia. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

- TSHITSHI, L. et al. Extended spectrum beta-lactamase-resistant determinants among carbapenem-resistant enterobacteriaceae from beef cattle in the NorthWest Province, South Africa: A critical assessment of their possible public health implications. *Antibiotics*, v. 9, n. 11, p. 1-19, 2020.
- VASILAKOPOULOU, A. et al. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *Microorganisms*, v. 9, n. 5, p. 942, 27 abr. 2021.
- VEVE, M. P. et al. Epidemiology and outcomes of non-HACEK infective endocarditis in the southeast United States. *PLoS ONE*, v. 15, n. 3, p. 1–10, 2020.
- WALSH TR. et al. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? *Clin. Microbiol. Rev.*, v.18, n.2, p.306-325, 2005.
- WANG, M.G. et al. Transmission and molecular characteristics of blaNDM-producing *Escherichia coli* between companion animals and their healthcare providers in Guangzhou, China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.77, n.2, p.351-355, 2022.
- WANG, Q. et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Data from a Longitudinal Large-scale CRE Study in China (2012-2016). *Clinical Infectious Diseases*, v. 67, n. Suppl 2, p. S196–S205, 2018.
- WANG, Z. et al. Outbreak of blaNDM-5-Harboring *klebsiella pneumoniae* ST290 in a tertiary hospital in China. *Microbial Drug Resistance*, v.25, n.10, p.1443-1448, 2019.
- WATANABE M. I. S.; INOUE M. M. S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.35, p.147–151, 1991.
- WHEAT RP, ZUCKERMAN A, RANTZ LA. INFECTION DUE TO CHROMOBACTERIA: Report of Eleven Cases. *AMA Arch Intern Med*. 1951;88(4):461–466.
- XIANG, G. et al. Clinical Molecular and Genomic Epidemiology of *Morganella morganii* in China. *Frontiers in Microbiology*, v. 12, n. September, p. 1–11, 2021.
- XU, Q. et al. Fecal Carriage and Molecular Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae from Inpatient Children in a Pediatric Hospital of Shanghai. *Infection and Drug Resistance*, v. 13, p. 4405, 2020.
- XU, Y. et al. A Rapid Carbapenemase Genes Detection Method with Xpert Carba-R from Positive Blood Cultures Compared with NG-Test Carba 5 and Sequencing. *Infect Drug Resist.*, v. 15, p. 7719-7725, dez. 2022.
- YE, Y. et al. The phenotypic and genotypic characterization of *Enterobacter sakazakii* strains from infant formula milk. *Journal of dairy science*, v. 93, n. 6, p. 2315-2320, 2010.
- YI, J.; KIM, K. H. Identification and infection control of carbapenem-resistant Enterobacterales in intensive care units. *Acute Critical Care*, v. 36, n. 3, p. 175-184, 2021.
- YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.
- YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla NDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae*

sequence type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

YUAN, Y. et al. BlaNDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v.8, n.1, p.6-9, 2019.

ZARIC, R. Z. et al. Antimicrobial treatment of *Morganella morganii* invasive infections: Systematic review. *Indian Journal of Medical Microbiology*, v. 39, n. 4, p. 404–412, 2021.

ZHANG, Y. et al. Crossm Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 62, n. 2, p. 1–11, 2018.

ZHANG, Y. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 62, n. 2, p. 1-11, 2018.

ZHANG, Y. et al. Risk factors for carbapenem-resistant *K. pneumoniae* bloodstream infection and predictors of mortality in Chinese pediatric patients. *BMC Infectious Diseases*, v. 18, n. 1, p. 1–10, 2018.

ZHAO W-H, HU Z-Q. IMP-type metallo- β -lactamases in gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. *Crit Rev Microbiol*, v. 37, p. 214-226, 2011.

ZHU, Y. et al. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis. *Ann Transl Med.*, v. 9, n. 9, p. 769, 2021.

ZILBERBERG, M. D. et al. Carbapenem resistance, inappropriate empiric treatment and outcomes among patients hospitalized with Enterobacteriaceae urinary tract infection, pneumonia and sepsis. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, n. 1, p. 1–13, 2017.

APÊNDICE A – ARTIGO 1 - VERSÃO EM INGLÊS

Martins LR – Genes associated with HAIs.

Lamartine Rodrigues Martins^[1], Maria Izabely Silva Pimentel^[1], Érica Maria de Oliveira^[1], Moacir Batista Juca^[2], Elizabeth Maria Bispo Beltrão^[1], Ana Catarina de Souza Lopes^[3]

Authors

[1]. Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Medicina Tropical, Recife, PE, Brasil. [2]. Universidade Federal de Pernambuco e Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Programa de Pós-Graduação

Stricto Sensu em Saúde integral e Medicina Tropical, Recife, PE, Brasil. [3]. Universidade Federal de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Biológicas e Nutrição, Recife, PE, Brasil.

Corresponding Author: Lamartine Rodrigues Martins

e-mail: lamartine.martins@ufpe.br

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4916-4626>

ACKNOWLEDGMENTS

We thank CAPES for granting the master's scholarship. We are grateful to the Central Laboratory of the CCB/UFPE-LABCEN, Brazil, for the sequencing, especially Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes and Dr. Heidi Lacerda. We also thank Josineide Ferreira de Barros, biomedical head of the Hospital Microbiology sector in Recife-PE, Brazil. We also thank the biomedical Fernanda Gomes from the Hospital Microbiology sector in Recife-PE and the biomedical Igor Rocha Vasconcelos for all the support for the quantification.

ORCID NUMBER

Lamartine Rodrigues Martins: 0000-0002-4916-4626

Maria Izabely Silva Pimentel: 0000-0002-4968-4680

Érica Maria de Oliveira: 0000-0001-8780-3460

Moacir Batista Jucá: 0000-0003-3741-4197

Elizabeth Maria Bispo Beltrão: 0000-0002-9650-7900

Ana Catarina de Souza Lopes: 0000-0003-0277-108X

Lamartine Rodrigues Martins – Master's student, Medicina Tropical, lamartine.martins@ufpe.br.

Maria Izabely Silva Pimentel – Master's student, Medicina Tropical, izabelypimentel6@gmail.com.

Érica Maria de Oliveira – Msc and doctoral student, Medicina Tropical, erica-oliveira@outlook.com.

Moacir Batista Jucá – Dr, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, moacirjuca@hotmail.com.

Elizabeth Maria Bispo Beltrão – Dra., Medicina Tropical, bethbeltrao@gmail.com.

Ana Catarina de Souza Lopes – PhD, Professora Associada III e Pesquisadora, Medicina Tropical, ana.slopes@ufpe.br.

Occurrence of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-5}, *bla*_{NDM-7} and *bla*_{KPC-2} in clinical isolates of Enterobacterales with high genetic variability, from colonization and infection in patients with or without covid-19, from a hospital in Recife-PE, Brazil.

Abstract:

Introduction: The SARS-CoV-2 pandemic brought with it several problems related to the hospitalization of patients, as many patients are colonized and develop co-infections by gram-negative bacteria, which may or may not be related to clonal strains. This study investigated the presence of the main beta-lactam antibiotic resistance genes and enzymes, as well as the clonal relationship between clinical isolates of the Enterobacterales order, obtained from patients with and without covid-19 in a hospital in northeastern Brazil, between 2021 and 2022. **Methods:** 45 clinical isolates resistant to carbapenems were analyzed. The DNA of the

isolates was extracted and subjected to PCR and amplicon sequencing (*bla*_{NDM}). **Results:** Among the clinical isolates, the most frequently isolated species were *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens* and *Proteus mirabilis*. There was detection of *bla*_{NDM} (46.66%), *bla*_{KPC} (35.55%) and both (17.79%) (17.79%). Typing by ERIC-PCR showed multiclonal dissemination and high genetic variability in the isolates. The main resistance gene detected was *bla*_{NDM}, with the presence of variants of *bla*_{NDM-5} and *bla*_{NDM-7}, being the first report of *bla*_{NDM-5} in strains of *P. mirabilis* and the *E. cloacae* complex in the Americas and outside Asia respectively. **Conclusions:** Therefore, in this study, several species of Enterobacterales were described, resistant to carbapenems, colonizing and as agents of infections in patients with or without covid-19, predominantly *K. pneumoniae*. It is noteworthy that there were more detections of *bla*_{NDM} compared to *bla*_{KPC}, which shows an increase in the dissemination and mutations of the *bla*_{NDM} gene in Enterobacterales in Recife-PE, Brazil, as well as new variants of this gene, which until now have never been detected on the American continent.

Keywords: *bla*_{NDM}; covid-19; Hospital.

Occurrence of *bla*_{NDM-1}, *bla*_{NDM-5}, *bla*_{NDM-7} and *bla*_{KPC-2} in clinical isolates of Enterobacterales with high genetic variability, from colonization and infection in patients with or without covid-19, from a hospital in Recife-PE, Brazil.

Introduction

Species of the Enterobacterales order are commonly associated with outbreaks in hospitalized patients, causing pulmonary, blood, urinary, wound infections or can even be related to septic shock¹⁻². The covid-19 pandemic resulted in the collapse and overcrowding of hospitals, which allowed the transmission of multidrug-resistant strains (MDR) and the worsening of conditions in public and private health networks worldwide, resulting in the deaths of millions of individuals³⁻⁶.

Resistance to carbapenems is one of the main problems faced in the hospital environment since these are last choice options. Such antimicrobials function as a strategic reserve of drugs for the treatment of infections caused by gram-negative bacteria. However, due to indiscriminate use in the world, a wide range of carbapenem-resistant enzymes have emerged, commonly found in the genera: *Klebsiella*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas* and *Escherichia*. Among the carbapenemases, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) and New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) stand out, which confer resistance to all beta-lactams, emphasizing that NDM does not degrade monobactams⁶⁻⁸.

The high genetic variability of the Enterobacterales order, generated by mutation and recombination, enables a greater adaptive capacity. Worldwide, high rates of variability were observed in strains associated with the presence of genes for carbapenemases, from different sites of infection⁹⁻¹¹. Several techniques are used to determine this bacterial genetic variability. Among them, the enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR (ERIC-PCR) technique, which determines the genetic profile and clonal relationship of bacterial isolates¹². In Brazil, some studies have identified a high genetic variability of different species of Enterobacterales, mainly in *Klebsiella pneumoniae*, followed by *Proteus mirabilis*¹³⁻¹⁵.

In view of the high rates of MDR strains associated with resistance to carbapenems, during the covid-19 pandemic, this study aimed to investigate and compare the presence of the main genes and enzymes of carbapenem resistance, as well as the clonal relationship between the clinical isolates of the order Enterobacterales, from colonization and infection in patients with and without covid-19, of a public hospital in Recife-PE, northeastern Brazil, between 2021 and 2022.

Material and methods

Bacterial isolates

Forty-five clinical isolates from the Enterobacterales order were selected and analyzed due to their being resistant to one or more carbapenems. These isolates were from different patients with positive or negative RT-PCR results for SARS-CoV-2, from a public hospital in Recife-PE, between 2021 and 2022. Such samples were from different sites of infection or colonization (rectal swab, surveillance culture), obtained by spontaneous demand from the hospital laboratory. The biochemical identification of the species of the isolates was performed using the automated BD PhoenixTM system. The isolates were kept in frozen stock at -70 °C with 15% glycerol and Brain Heart Infusion (BHI).

Antimicrobial susceptibility

The minimum inhibitory concentration (MIC) for the antimicrobials: amikacin; amoxicillin-clavulanic acid; ampicillin; ampicillin/sulbactam; cefazolin; cefepime; cephalothin; cefotaxime; cefoxitin; ceftazidime; ceftazidime-avibactam; ceftriaxone; cefuroxime; ciprofloxacin; colistin; ertapenem; fosfomycin with G6P; gentamicin; imipenem; levofloxacin; meropenem; piperacillin-tazobactam; polymyxin B and trimethoprim-sulfamethoxazole was determined using the BD PhoenixTM automated equipment. And the susceptibility profile was interpreted according to the BRcast¹⁶.

DNA extraction, PCR for resistance genes and amplicon sequencing

Genomic DNA was extracted using a commercial kit “Wizard genomic DNA purification” (Promega). The PCR technique was conducted to detect the *bla*_{KPC}, *bla*_{GES}, *bla*_{OXA-48-LIKE}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} and *bla*_{IMP} resistance genes, using primers previously described¹⁷⁻²⁰. The amplifications consisted of an initial temperature of 95 °C for 5 minutes, 35 cycles comprising 1 minute at 95 °C, 1 minute for annealing at the temperature¹⁵, and 1 minute at 72 °C. After the 35 cycles, there was a final extension of 10 minutes at 72 °C. The PCR products were subjected to electrophoresis on a 1.0% agarose gel in TBE buffer (Tris-Borate 0.089M and EDTA

0.002M), added CyberSafe (Thermofisher, United Kingdom) and a constant voltage of 100v. The gels were visualized by using an ultraviolet light transilluminator.

For DNA sequencing were selected 10 positive isolates for the *bla_{NDM}* gene that did not show clonal relationship by ERIC-PCR and isolates from each species in which *bla_{NDM}* was detected by PCR were also chosen. The amplicons were purified by the SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA) and sequenced by the deoxyribonucleotide chain termination method²¹. Nucleotide sequences were analyzed by Bioedit²², BLAST and ClustalW programs from the European Institute of Bioinformatics. Nucleotide sequences were deposited in GenBank with accession numbers: OQ421192, OQ355358, OQ747773, OQ747774, OQ747775, OQ747776 e OQ747777.

ERIC-PCR

Molecular typing to determine the genetic variability and clonal relationship of the isolates was performed using the ERIC-PCR technique, with *primers* previously described¹². The amplification conditions were prepared in a total volume of 25 µl per tube, comprising: genomic DNA at 100ng/µl, 1.0U of Taq DNA polymerase enzyme (Promega, USA), 2mM dNTP (Promega, USA), 25mM MgCl₂ and 10 µmol of *primers*. A negative control was included in each amplification run. The technique consisted of an initial temperature of 95 °C for 3 minutes and 35 cycles, consisting of 1 minute at 92 °C, 1 minute at 36 °C, and 8 minutes at 72 °C, after the 35 cycles, a cycle of final extension of 16 minutes at 72 °C. The amplification products were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel in Tris, Boric Acid and EDTA (TBE) buffer. The analysis of the fragments amplified by ERIC-PCR and the construction of the dendrogram were performed using the software GelAnalyzer²³ and DARwin 6.0. (Supplementary material, Table 1).

Results

Origin of the isolates

Among the 45 isolates analyzed in the present study, *K. pneumoniae* was the most frequently isolated species (n=18/45), followed by *Serratia marcescens* (n=8/45) and *P. mirabilis* (n=7/45). These clinical isolates originated from infection (n=33/45) with sources including rectal swab (n=12/45), catheter tip (n=8/45), blood culture (n=6/45), urine culture (n=5/45) and others (n=14) (Tables 1 and 2) and colonization (n=12/45) (Table 3).

All the clinical isolates from colonization (rectal swab) showed resistance to carbapenems (Ertapenem, Imipenem and Meropenem). The ones obtained from infections showed resistance to meropenem and the other carbapenems tested, except for one strain of *S. marcescens* (S6A2) (Tables 1, 2, and 3).

Resistance genes detected

Among the six carbapenemase resistance genes analyzed in this study, the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were detected. The *bla*_{NDM} gene was detected more frequently (n=21; 46.66%) compared to the *bla*_{KPC} gene (35.55%). Eight strains (17.77%) were co-carriers of both *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}.

The *bla*_{NDM} gene was found more frequently in *K. pneumoniae* isolates, followed by *P. mirabilis* and *P. rettgeri*. And the *bla*_{KPC} gene was most commonly detected in *S. marcescens* and *K. pneumoniae* isolates. Additionally, 17.77% of the isolates studied carried both *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes, mainly in *P. stuartii* and *P. mirabilis* (**Supplementary material, figure 1**).

The incidence of the genes by species showed that *K. pneumoniae* (n=18) was the main isolate carrying the *bla*_{NDM} gene (n=14, 77.77%). This species also had the *bla*_{KPC} gene (n=3, 16.66%) and the co-presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} (n=1, 5.55%). In *P. mirabilis* isolates (n=7), the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes were detected at a rate of 28.57% (n=2) and 42.86% (n=3), respectively, with a co-presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} at 28.57% (n=2). *P. stuartii* (n=5) carried

the *bla*_{NDM} gene (n=1, 20%) and the co-presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} (n=4, 80%). The isolates of *E. cloacae* (n=2) carried the genes *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM}, concomitantly in one isolate and only the *bla*_{NDM} gene in the other. All isolates of *S. marcescens* (n=8) carried the *bla*_{KPC} gene, while isolates of *P. rettgeri* (n=3), *K. aerogenes* (n=1), and *Morganella morganii* (n=1) carried the *bla*_{NDM} gene. **(Supplementary material graphic 1).**

Sequencing of the *bla*_{NDM} gene amplicons

For DNA sequencing, 10 positive isolates for the *bla*_{NDM} gene that did not show clonal relationship by ERIC-PCR were selected and isolates from each species in which *bla*_{NDM} was detected by PCR were also chosen. Four isolates carrying the *bla*_{NDM-1} gene, five carrying the *bla*_{NDM-5} variant and one carrying the *bla*_{NDM-7} gene were identified. Of the five isolates that carried the *bla*_{NDM-5} gene, two were from *K. pneumoniae* (K40-A5 and K42-A5), two from *P. mirabilis* (P1-A4 and P5-A4) and one from *E. cloacae* (EC2-A1). The *bla*_{NDM-7} variant was detected in a *K. pneumoniae* isolate (K61-A5) **(Table 2).**

Carba-NG Rapid Test and PCR technical comparison

The results of specificity and sensitivity of rapid tests, when compared to the molecular test (PCR) for the *bla*_{KPC} gene, were 92.30% and 91.66%, respectively. And for the *bla*_{NDM} gene, it was 91.66% and 92.30%. Regarding the detection of simultaneous positivity for more than one carbapenemase, the values of specificity and sensitivity are 96.15% and 14.29%, respectively, revealing a discrepancy between the detection of enzymes and the presence of more than one carbapenemase, which is followed by tests using phenylboronic acid and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) **(Supplementary material Table 2 and Table 3)**

Comparison between patients with and without covid-19 resulting from infection and colonization.

Data from patients with bacterial infection, with or without covid-19, showed that the *bla*_{KPC} gene was more frequently detected in patients without covid-19, while the *bla*_{NDM} gene was more frequently detected in patients with covid-19. Regarding colonization, there was a similarity in the percentage of isolates from patients with and without covid-19 (Table 4). This demonstrates the widespread dissemination of the *bla*_{NDM} gene compared to the *bla*_{KPC} gene in all groups.

Molecular typing of clinical isolates by ERIC-PCR and relationship with patients' data

Different genetic profiles were identified by ERIC-PCR in the clinical isolates of Enterobacterales. On analyzing the *K. pneumoniae* isolates (n=18), 16 genetic profiles were identified, named KP-E1 to KP-E16. When analyzing the clonal relationship, it was observed that in the KP-E1 profile, the K3-A5 and K4-A5 isolates showed 100% similarity. Both *K. pneumoniae* isolates (K3-A5 and K4-A5) were obtained from the same patient, collected from different samples and dates (**Table 1**). The KP-E2 profile consisted of two isolates (K40-A5 and K41-A5) with 100% similarity between them. A third profile KP-E11 (K39-A5), showed more than 80% similarity. These three isolates (K40-A5, colonization, K41-A5 and K39-A5, both from infection) were obtained from different patients (P11, P12 and P13), admitted to the ICU sectors (P12 and P13) and SARS ICU (P11) sectors. Patient P12 was admitted on 07/01/2021 and on 07/15/2021 the K40-A5 isolate was identified from the rectal swab. This patient died on 08/28/2021. Another patient, P13, was admitted to the hospital on 07/28/2021 and on 10/05/2021 K41-A5 was isolated from a catheter tip culture. The patient died on 10/19/2021. A third patient (P11), who was admitted to the hospital on 08/27/2021, presented on 09/29/2021 the K39-A5 isolate identified from a catheter tip culture. The patient died on 11/15/2021 (**Figure 1a**).

In the eight strains of *S. marcescens* in the study, five different genetic profiles were identified SM-E1, SM-E2, SM-E3, SM-E4 and SM-E5. Two of these profiles consisted of isolates with clonal relationship: the SM-E1 profile comprised isolates S2-A2 and S7-A2 and the SM-E2 profile comprised isolates S1-A2, S3-A2 and S4-A2 (**Figure 1b**). The SM-E1 profile consists of isolates that were recovered from two patients (P26 and P31). One patient was admitted to the SARS ICU and the other to the vascular surgery sector, respectively. Patient P26 was admitted on 05/15/2021, with recovery of the *S. marcescens* S2-A2 isolate in a bone fragment on 06/09/2021. However, the patient died on 06/19/2021. Patient P31 was admitted on 06/14/2021 and isolate S7-A2 was obtained from tissue culture. On 11/25/2021, the patient evolved with improvement and was discharged. Both isolates were positive for the bla_{KPC} gene.

The *S. marcescens* isolates S1-A2, S3-A2 and S4-A2 came from patients P25, P27 and P28 respectively, forming the SM-E2 profile. Patient P25 was admitted to the SRAG ICU on 05/08/2021. On 06/15/2021, there was recovery of isolate S1-A2 from a blood culture. The patient was transferred on 05/17/2021. On the other hand, the S3-A2 isolate from patient P27 who was admitted on 06/05/2021, originated from a surveillance culture (rectal swab) performed on 06/15/2021, in the SARS ICU. The patient was discharged on 06/24/2021. Patient P28 was admitted to the General Practice Sector on 06/14/2021. On 08/20/2021, isolate S4-A2 was obtained from a catheter tip, with discharge due to improvement on 11/25/2021. All strains possessed the bla_{NDM} gene.

Regarding the seven strains of *P. mirabilis* and five strains of *P. stuartii*, all showed different genetic profiles by ERIC-PCR, which demonstrates a multiclonal profile. Even showing some level of genetic similarity (**Figure 1c and Figure 1d**), the presence of clonal relationship between the isolates was not verified.

Discussion

Infections caused by Enterobacterales strains are among the main problems faced in the hospital environment. However, levels of resistance have increased over the years^{25,26}. *K. pneumoniae* strains, when compared to other studies that were carried out during the covid-19 pandemic, are at the top of the most isolated pathogens of Health-Care Associated Infections (HAIs)²⁷⁻²⁹. In the present study, the species that presented the highest number of samples resistant to carbapenems was *K. pneumoniae*. In a recent survey of data on the main genes isolated from Enterobacterales in South America, the main isolate was *K. pneumoniae* and the most frequently detected gene for carbapenemases was bla_{KPC}. Additionally, strains of *S. marcescens*, *P. mirabilis* and *P. stuartii* have been reported at a very low frequency compared to *K. pneumoniae*³⁰. In a study carried out in the city of Recife-PE, Brazil, prior to the pandemic period of covid-19, great similarity was observed between the proportions of the isolates of Enterobacterales species, with *K. pneumoniae* being the main one, followed by *S. marcescens* and *P. mirabilis*¹³. These studies demonstrate that, worldwide, these species stand out as important causes of HAIs.

The isolates of Enterobacterales species, associated with carbapenemase genes, described in the present study, demonstrated a higher proportion of bla_{NDM} when compared to the bla_{KPC} gene in *K. pneumoniae* isolates, these numbers are higher than those given in the literature^{13,14,31,32}. This tendency towards an increase in the number of positive isolates for bla_{NDM} in relation to bla_{KPC} remained in most of the species studied, with the exception of *M. morganii*, *E. cloacae* and *S. marcescens*, which presented more KPC. The data from the present study referring to the *S. marcescens* isolates agree with other studies that also observed the detection of the bla_{KPC} gene in greater quantities than bla_{NDM} in this species^{13,33}.

In the present study, when analyzing the strains of *P. mirabilis* in relation to the occurrence of the bla_{KPC} and bla_{NDM} genes, divergence was observed when compared to data in the literature^{13; 34}, since the main gene detected in the present study was bla_{NDM}, and, in the

other studies cited, it was *bla*_{KPC}. In other papers related to the *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} genes in *P. mirabilis*, it was not possible to establish a comparison^{9; 35-37}, since they presented a limited number of samples and sometimes did not report the presence of *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM}.

Regarding the species of *P. rettgeri* and *P. stuartii*, studies published in the literature are still limited. Some of the published studies are case reports that do not describe the presence of *bla*_{KPC} or *bla*_{NDM}, while others are articles of veterinary origin, dealing with the characterization of the genomes of two isolates³⁸⁻⁴⁰. In the present study, the strains of the *E. cloacae* complex presented *bla*_{KPC} in one of the isolates, as well as the concomitant presence of *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} in another isolate. With regard to genes, data from the literature demonstrate that the *bla*_{NDM} gene is more commonly detected in these species^{28,42}. In addition, few studies describe the presence of *bla*_{NDM}^{28,41,42}. Additionally, the replacement of *bla*_{KPC} by *bla*_{NDM} is reported in this study after the pandemic period, where the exacerbated use of antibiotics was reported and this, possibly, contributed to the increase in the selective pressure of isolates that accumulated determinants of resistance.

In the present study, in addition to the *bla*_{NDM-1} variant, the *bla*_{NDM-5} and *bla*_{NDM-7} variants were also detected. Whereas in the case of *bla*_{NDM-5}, this is the first report on *P. mirabilis* in the Americas, while this is the first report outside the Asian continent on the *E. cloacae* complex. These last two variants have an increased hydrolytic spectrum to carbapenems, when compared to *bla*_{NDM-1}⁴³.

In a comparative study, the hypothesis was raised that the replacement of amino acids is one of those responsible for the increase in hydrolysis⁴⁴. Furthermore, it has been demonstrated that the accumulation of other resistance genes can have an influence along with the variants⁴⁴. However, in two studies conducted in India, concerning the kinetics of the NDM-5 and NDM-7 enzymes, it was verified that the exchange performed at position E152A

(Glutamate for Alanine) negatively affected the hydrolysis activity of NDM-5 and NDM-7 against beta-lactams, inferring that they are key residues for carbapenemase activity^{45,46}.

In Spain, Brazil, and China, isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli* carrying *bla*_{NDM-7} associated with *bla*_{NKPC-2} have been described⁴⁷⁻⁵⁰. The *bla*_{NDM-5} gene was detected in isolates of *E. coli*, *K. aerogenes*, *K. pneumoniae*, in three hospitals in China: two tertiary hospitals and one neonatal ICU^{51,52}. Additionally, the presence of *bla*_{NDM-5} was evidenced in hypervirulent strains in two others tertiary services^{53,54}. In Japan, the emergence of *K. aerogenes* strains carrying *bla*_{NDM-5} has been described⁵⁵. These data demonstrate that *bla*_{NDM-1} gene variants are distributed worldwide.

The search for faster and more accurate diagnoses, especially with regard to the presence of resistance enzymes, leads microbiology laboratories to use rapid tests such as the Carba-NG-5 Rapid Test, which detects the main carbapenemases (KPC, NDM, VIM, OXA, IMP). Studies aimed at investigating the specificity and sensitivity of Carba-NG-5 for carbapenemases, show rates of 84.6% and 100%, respectively, when compared to the conventional real-time PCR technique⁵⁶⁻⁶⁰, this is in agreement with the findings in the present study. However, in the case of co-positivity, a study in Italy observed 100% similarity between the conventional PCR technique and the Carba-NG-5 test. However, the tests were performed by the researchers themselves under ideal conditions, with no growth interferents such as time and interpretative factors⁶¹.

In the present study, the data about the ERIC-PCR, demonstrate a great variability of the genetic profile of *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* and *S. marcescens*, corroborating with other studies conducted in Brazil^{13,14,34}. The high variability reported, and a minimal clonal relationship may cause greater therapeutic difficulty, since there was no dominant circulation of the same genetic and phenotypic resistance profile. These strains have different origins, with different variants of the resistance genes and, sometimes, variants such as *bla*_{NDM-5} and *bla*_{NDM-}

⁷⁴³, have increased enzymatic activity against carbapenems compared to *bla*_{NDM-1}. This high genetic variability may favor the transfer of different variants of the resistance genes that may have a more effective enzymatic activity. In addition, there was the presence of three isolates with a genetic similarity profile of over 80% in three distinct patients. This finding suggests that clonal dissemination occurred among patients hospitalized in two distinct sectors.

Therefore, in this study, a description has been given of several species of Enterobacterales, resistant to carbapenems, predominantly *K. pneumoniae*, which are colonizing and act as agents of infections in patients with or without covid-19. The occurrence of the high genetic heterogeneity of the clinical isolates in the present study may indicate different origins in the sources of contamination in the hospital environment, mainly regarding *K. pneumoniae*. Additionally, it is noteworthy that there were more detections of *bla*_{NDM} in relation to *bla*_{KPC}, and that new variants in the American continent, *bla*_{NDM-5} and *bla*_{NDM-7}, have been identified. This shows there has been an increase in the dissemination and mutations of the *bla*_{NDM} gene in Enterobacterales in Recife-PE, Brazil, during covid-19 pandemic, probably due to the selective pressure generated by the increased use of antimicrobials during this period, altering the genetic resistance profile of these bacterial isolates.

References

1. Yi J, Kim KH. Identification and infection control of carbapenem-resistant Enterobacterales in intensive care units. *Acute Crit Care*. 2021;36(3):175–84.
2. Ombelet S, Kpossou G, Kotchare C, Agbobli E, Sogbo F, Massou F, et al. Blood culture surveillance in a secondary care hospital in Benin: epidemiology of bloodstream infection

pathogens and antimicrobial resistance. *BMC Infect Dis* [Internet]. 2022;22(1):1–15. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12879-022-07077-z>

3. Lai C, Chen S, Ko W, Hsueh P. Since January 2020 Elsevier has created a COVID-19 resource centre with free information in English and Mandarin on the novel coronavirus COVID- 19. The COVID-19 resource centre is hosted on Elsevier Connect, the company's public news and information. 2020;(January).
4. Cantón N R, Gijón D, Ruiz-Garbajosa P. Antimicrobial resistance in ICUs: An update in the light of the COVID-19 pandemic. *Curr Opin Crit Care*. 2020;26(5):433–41.
5. Macedo V, dos Santos G de S, da Silva RN, Couto CN de M, Bastos C, Viecelli E, et al. The health facility as a risk factor for multidrug-resistant gram-negative bacteria in critically ill patients with COVID-19. *Clinics*. 2022;77(October).
6. Costa RL da, Lamas C da C, Fernando, Luiz, Nogueira Simvoulidis CAE, , Lorena Pinto Monteiro Moreira, Renan Alexandre Baptista Bonancim JV, et al. Secondary infections in a cohort of patients with COVID-19 admitted to an intensive care unit: impact of gram-negative bacterial resistance. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2021;64(6):1–10.
7. Haji SH, Aka STH, Ali FA. Prevalence and characterisation of carbapenemase encoding genes in multidrug-resistant Gram-negative bacilli. *PLoS One* [Internet]. 2021;16(November). Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0259005>
8. Silveira MC, Rocha-de-Souza CM, de Oliveira Santos IC, Pontes L da S, Oliveira TRT e., Tavares-Teixeira CB, et al. Genetic Basis of Antimicrobial Resistant Gram-Negative Bacteria Isolated From Bloodstream in Brazil. *Front Med*. 2021;8(March):1–9.
9. Mahmoud AT, Ibrahem RA, Salim MT, Gabr A, Halby HM. Prevalence of some virulence factors and genotyping of hospital-acquired uropathogenic *Escherichia coli* isolates

recovered from cancer patients. J Glob Antimicrob Resist [Internet]. 2020; 23:211–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2020.08.003>

10. Ghosh A, Ghosh B, Mukherjee M. Epidemiologic and molecular characterization of β -lactamase-producing multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia coli* isolated from asymptomatic hospitalized patients. Int Microbiol [Internet]. 2022;25(1):27–45. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00187-9>

11. Kundu J, Kansal S, Rathore S, Kaundal M, Angrup A, Biswal M, et al. Evaluation of ERIC-PCR and MALDI-TOF as typing tools for multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from a tertiary care center in India. PLoS One [Internet]. 2022;17(11 November):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0271652>

12. Duan H, Chai T, Liu J, Zhang X, Qi C, Gao J, et al. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. Environ Res [Internet]. 2009;109(5):511–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2009.02.014>

13. Firmo EF, Beltrão EMB, Silva FRF da, Alves LC, Brayner FA, Veras DL, et al. Association of blaNDM-1 with blaKPC-2 and aminoglycoside-modifying enzyme genes among *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* and *Serratia marcescens* clinical isolates in Brazil. J Glob Antimicrob Resist. 2020;21:255–61.

14. Oliveira ÉM, Beltrão EMB, Scavuzzi AML, Barros JF, Lopes ACS. High plasmid variability, and the presence of incfIB, incq, inca/c, inchi1b, and incl/m in clinical isolates of *klebsiella pneumoniae* with blaKPC and blaNDM from patients at a public hospital in Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2020;53:1–8.

15. Beltrão EMB, Oliveira, EM, Scavuzzi AML, Firmo EF, Lopes ACS. Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil. Journal of infection and Chemotherapy. 2021; 28: 363-372.

16. BrCAST; Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos. 2022. Available from: <http://brcast.org.br/>
17. Poirel L, Héritier C, Tolun V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in Klebs. pneu. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2004;48(1):15–22.
18. Cabral AB, Melo R de C de A, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012;45(5):572–8.
19. Mataseje LF, Bryce E, Roscoe D, Boyd DA, Embree J, Gravel D, et al. Carbapenem-resistant gram-negative bacilli in Canada 2009-10: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program (CNISP). *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(6):1359–67.
20. Scavuzzi AML, Beltrão EMB, Firmo EF, Oliveira EM, Beserra FG, Lopes ACS. Emergence of blaVIM-2, blaNDM-1, blaIMP-7 and blaGES-1 in blaKPC-2 harbouring *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *J Glob Antimicrob Resist.* 2019, 13(6): 612-632. DOI: DOI:10.1016/j.jgar.2019.09.009
21. Sanger F, Air GM, Barrell BG, Brown NL, Coulson a R, Fiddes C a, et al. Nucleotide sequence of bacteriophage phi X174 DNA. *Nature* 1977;265:687–95.
22. Hall T. BioEdit software 2017.
23. Lazar Jr I, Horvath-Lazar E. GelAnalyzer 2010.
24. Perrier X, Jacquemoud-Collet JP. DARwin software 2006.
25. GLASS. Global Antimicrobial Resistance and Use Surveillance System. . Available from: <https://www.who.int/initiatives/glass>

26. ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Available from: https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/servicosdesaude/prevencao-e-controle-de-infeccao-e-resistencia-microbiana/copy_of_infeccao-relacionada-a-assistencia-a-saude
27. Pintado V, Ruiz-Garbajosa P, Escudero-Sanchez R, Gioia F, Herrera S, Vizcarra P, et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales infections in COVID-19 patients. *Infect Dis (Auckl)*. 2022;54(1):36–45.
28. Gomez-Simmonds A, Annavajhala MK, McConville TH, Dietz DE, Shoucri SM, Laracy JC, et al. Carbapenemase-producing Enterobacterales causing secondary infections during the COVID-19 crisis at a New York City hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2021;76(2):380–4.
29. Grasselli, G; Scaravilli, V; Mangioni, D; Scudeller, L; Alagna, L; Bartoletti, M; *et al.*. Hospital-Acquired Infections in Critically Ill Patients With Cancer. *Chest J*. 2021;160(2):454–65.
30. Reyes JA, Melano R, Cárdenas PA, Trueba G. Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American Enterobacterales. *Brazilian J Infect Dis [Internet]*. 2020;24(3):231–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>
31. Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018;62(2):1–11.
32. Duan Q, Wang Q, Sun S, Cui Q, Ding Q, Wang R, et al. ST11 Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Clone Harboring blaNDM Replaced a blaKPC Clone in a Tertiary Hospital in China. *Antibiotics*. 2022;11(10).

33. Prado G, Mendes ET, Martins RCR, Perdigão-Neto LV, Freire MP, Marchi AP, et al. Phenotypic and genotypic characteristics of a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* cohort and outbreak: describing an opportunistic pathogen. *Int J Antimicrob Agents*. 2022;59(1).
34. Beltrão EMB, Oliveira ÉM de, Scavuzzi AML, Firmo EF, Lopes AC de S. Virulence factors of *Proteus mirabilis* clinical isolates carrying blaKPC-2 and blaNDM-1 and first report blaOXA-10 in Brazil. *J Infect Chemother*. 2022;28(3):363–72.
35. Johnning A, Karami N, Hallback ET, Müller V, Nyberg L, Pereira MB, et al. The resistomes of six carbapenem-resistant pathogens-a critical genotype-phenotype analysis. *Microb Genomics*. 2018;4(11).
36. Tshitshi L, Manganyi MC, Montso PK, Mbewe M, Ateba CN. Extended spectrum beta-lactamase-resistant determinants among carbapenem-resistant enterobacteriaceae from beef cattle in the North West Province, South Africa: A critical assessment of their possible public health implications. *Antibiotics*. 2020;9(11):1–19.
37. Chinnam BK, Nelapati S, Tumati SR, Bobbadi S, Peddada VC, Bodempudi B. Detection of b-Lactamase-producing proteus mirabilis strains of animal origin in Andhra Pradesh, India and Their Genetic Diversity. *J Food Prot [Internet]*. 2021;84(8):1374–9. Available from: <https://doi.org/10.4315/JFP-20-399>
38. Sah R, Khadka S, Shrestha GS, Acharya S, Aryal D, Shrestha P, et al. Detection of Pan drug resistance OXA-48 producing *Providencia* in an ICU patient for the first time in Nepal. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):1–7.
39. Chen W, Liu Z, Lin H, Yang J, Liu T, Zheng J, et al. Occurrence of blaNDM-1-Positive *Providencia* spp. in a Pig Farm of China. *Antibiotics*. 2022;11(6):1–8.

40. Piza-Buitrago A, Rincón V, Donato J, Saavedra SY, Duarte C, Morero J, et al. Genome-based characterization of two Colombian clinical *Providencia rettgeri* isolates co-harboring NDM-1, VIM-2, and other β -lactamases. *BMC Microbiol.* 2020;20(1):1–13.
41. Zhang Y, Wang Q, Yin Y, Chen H, Jin L, Gu B, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Infections: Report from the China CRE Network. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018;62(2):1–11.
42. Jin C, Zhang J, Wang Q, Chen H, Wang X, Zhang Y, et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant enterobacter cloacae in 11 Chinese cities. *Front Microbiol.* 2018;9(JUL):1–8.
43. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect* [Internet]. 2014;20(9):821–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12719>
44. Rahman M, Shukla SK, Prasad KN, Ovejero CM, Pati BK, Tripathi A, et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2014;44(1):30–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.03.003>
45. Kumar G, Issa B, Kar D, Biswal S, Ghosh AS. E152A substitution drastically affects NDM-5 activity. *FEMS Microbiol Lett.* 2017;364(3):1–6.
46. Kumar G, Issa B, Biswal S, Jain D, Bhattacharjee A, Ghosh AS. Glutamic acid at position 152 and serine at position 191 are key residues required for the metallo- β -lactamase activity of NDM-7. *Int J Antimicrob Agents* [Internet]. 2020;55(1):105824. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2019.10.005>

47. Espinal P, Miró E, Segura C, Gómez L, Plasencia V, Coll P, et al. First Description of blaNDM-7 Carried on an IncX4 Plasmid in *Escherichia coli* ST679 Isolated in Spain. *Microb Drug Resist.* 2018;24(2):113–9.
48. Pérez-Vazquez M, Oteo-Iglesias J, Sola-Campoy J, Carrizo-Manzoni VBH, Aracil B, Alhambra A, Martínez-Martínez GL, et al. Characterization of Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Spain, 2016–2017. 2019;63(6):2016–7.
49. Rodrigues YC, Lobato ARF, Quaresma AJPG. The Spread of NDM-1 and NDM-7-Producing *Klebsiella pneumoniae* Is Driven by Multiclonal Expansion of High-Risk Clones in Healthcare Institutions in the State of Pará, Brazilian. 2021;1–13.
50. Wang MG, Fang C, Liu K Di, Wang LL, Sun RY, Zhang RM, et al. Transmission and molecular characteristics of blaNDM-producing *Escherichia coli* between companion animals and their healthcare providers in Guangzhou, China. *J Antimicrob Chemother.* 2022;77(2):351–5.
51. Wang Z, Li M, Shen X, Wang L, Liu L, Hao Z, et al. Outbreak of blaNDM-5-Harboring *klebsiella pneumoniae* ST290 in a tertiary hospital in China. *Microb Drug Resist.* 2019;25(10):1443–8.
52. Kong Z, Cai R, Cheng C, Zhang C, Kang H, Ma P, et al. First reported nosocomial outbreak of NDM-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in China. *Infect Drug Resist.* 2019;12:3557–66.
53. Li Q, Zhu J, Kang J, Song Y, Yin D, Guo Q, et al. Emergence of NDM-5-producing carbapenem-resistant *klebsiella pneumoniae* and sim-producing hypervirulent *klebsiella pneumoniae* isolated from aseptic body fluid in a large tertiary hospital, 2017–2018: Genetic traits of blandm-like and blasim-like genes as . *Infect Drug Resist.* 2020;13:3075–89.

54. Yuan Y, Li Y, Wang G, Li C, Chang YF, Chen W, et al. *Bla* NDM-5 carried by a hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* with sequence type 29. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019;8(1):6–9.
55. Kayama S, Yu L, Kawakami S, Yahara K, Hisatsune J, Yamamoto M, et al. Emergence of *bla* NDM-5 -Carrying *Klebsiella aerogenes* in Japan . *Microbiol Spectr*. 2022;10(3):1–2.
56. Xu Y, Song W, Huang P, Mei Y, Zhang Y, Xu T. A Rapid Carbapenemase Genes Detection Method with Xpert Carba-R from Positive Blood Cultures Compared with NG-Test Carba 5 and Sequencing. *Infect Drug Resist*. 2022;15(December):7719–25.
57. Zhu Y, Jia P, Li X, Wang T, Zhang J, Zhang G, et al. Carbapenemase detection by NG-Test CARBA 5—a rapid immunochromatographic assay in carbapenem-resistant Enterobacterales diagnosis. *Ann Transl Med*. 2021;9(9):769–769.
58. Kanahashi T, Matsumura Y, Yamamoto M, Tanaka M, Nagao M. Comparison of the Xpert Carba-R and NG-Test CARBA5 for the detection of carbapenemases in an IMP-type carbapenemase endemic region in Japan. *J Infect Chemother* [Internet]. 2021;27(3):503–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2020.11.001>
59. Huang Y-T, Kuo Y-W, Lee N-Y, Tien N, Liao C-H, Teng L-J, et al. Evaluating NG-Test CARBA 5 Multiplex Immunochromatographic and Cepheid Xpert CARBA-R Assays among Carbapenem-Resistant Enterobacterales Isolates Associated with Bloodstream Infection . *Microbiol Spectr*. 2022;10(1):1–7.
60. Liu Z, Bai L, Liu J, Lei J, Gao X, Tenover FC, et al. Parallel Validation of the NG-Test Carba 5 and the Xpert Carba-R for Detection and Characterization of Carbapenem-Resistant Enterobacterales Causing Bloodstream Infections. *J Mol Diagnostics* [Internet]. 2021;23(8):1007–14. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2021.05.009>.

61. VASILAKOPOULOU A, et al. Detection of KPC, NDM and VIM-Producing Organisms Directly from Rectal Swabs by a Multiplex Lateral Flow Immunoassay. *Microorganisms*. 2021 Apr 27;9(5):942.

APÊNDICE B – TABELAS E FIGURA – ARTIGO 1

Table 1: Origin of the samples, resistance profile and ERIC-PCR of clinical isolates of Enterobacterales from different infection sites of patients with covid-19 in a public hospital in Recife-PE, Brazil.

Isolate/ Patient	Collection date	Hospital sector	Source samples	Resistance genes detected	*Resistance profile (CIM)	¹ ERIC-PCR profile
K1-A5/P1	25/05/2021	ICU SARS	Blood	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E3
K3-A5/P3	29/05/2021	ICU SARS	Blood	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E1
K4-A5/P3	02/06/2021	ICU SARS	Catherter tip	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (4) / MER (32) / PPT (>64/4).	KP-E1
K39-A5/P11	29/09/2021	ICU SARS	Catherter tip	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / POLB (8) / SUT (>2/38).	KP-E11
K41-A5/P13	05/10/2021	ICU	Wound secretion	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E2
K56-A5/P15	09/12/2021	Vascular Clinic	Tissue	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E13
P1-A4/P19	17/05/2021	ICU SARS	Blood	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E5
P3-A4/P21	13/06/2021	ICU SARS	Catherter tip	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E2
P4-A4/P22	02/07/2021	covid ward	Urine	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E4
P5-A4/P23	14/07/2021	ICU SARS	Urine	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E7
S2-A2/P26	09/06/2021	ICU SARS	Bone fragment	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (>32) PPT (>64/4).	SM-E1

S4-A2/P28	20/08/2021	General clinic	Catherter tip	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E2
S7-A2/P31	20/11/2021	Vascular surgery	Tissue	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E1
PS1-A2/P19	18/05/2021	ICU SARS	Catherter tip	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PS1-E5
PS3-A2/P35	30/08/2021	Cardiology	Prótese (MI)	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PS3-E4
PR1-A2/P38	30/08/2021	Vascular Clinic	Bone fragment	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR1-E1
PR2-A2/P39	04/10/2021	ICU	Catherter tip	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR2-E2
PR3-A2/P38	13/10/2021	ICU	Wound secretion	<i>bla_{NDM}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	PR3-E3
EC1-A1/P40	29/06/2021	ICU SARS	Urine	<i>bla_{KPC}</i>	AMP+SUL (>16/8) / CEF (8) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMI (4) / LVX (>4) / PPT (>64/4) / SUT (2/38).	EC1-E1

K1-A5; K3-A5; K4-A5; K39-A5; K41-A5 e K56-A5 – *Klebsiella pneumoniae*; P1-A4; P3-A4; P4-A4 e P5-A4 – *Proteus mirabilis*; S2-A2; S4-A2 e S7-A2 – *Serratia marcescens*; PS1-A2 e PS3-A5 – *Providencia stuartii*; PR1-A2 e PR3-A2 – *Providencia rettgeri*; EC1-A1 *Enterobacter cloacae*. Resistant Antimicrobials: (AMI) Amikacin; (AMP) Ampicillin; (AMP+SUL) Ampicillin + Sulbactam; (CFZ) Cefazolin; (CEF) Cefepime; (CET) Ceftazidime; (CAV) Ceftazidime-Avibactam; (CTX) Ceftriaxone; (CIP) Ciprofloxacin; (COL) Colistin; (ERT) Ertapenem; (FG6) Fosfomycin with G6P; (GEN) Gentamicin; (IMP) Imipenem; (LVX) Levofloxacin; (MER) Meropenem; (PPT) Piperacillin + Tazobactam; (POLB) Polymyxin B; (SUT) Trimethoprim + Sulfamethoxazole. 2ERIC-PCR: The following acronyms refer to: KP = *Klebsiella pneumoniae*; PM = *Proteus mirabilis*; SM = *Serratia marcescens*; PS = *Providencia stuartii*; PR = *Providencia rettgeri*; EC = *Enterobacter cloacae*.

Table 2: Origin of the samples, resistance profile and ERIC-PCR of clinical isolates of Enterobacterales from different sites of infection of patients without covid-19 in a public hospital in Recife-PE, Brazil.

Isolate/ Patient	Collection date	Hospital sector	Source samples	Resistance genes detected	*Resistance profile (CIM)	¹ ERIC-PCR profile
K25-A5/P8	06/07/2021	Emergency Cardio	Urine	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KA-E1
K59-A5/P16	22/12/2021	UCO 2	Urine	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E15
K61-A5/P18	09/12/2021	Vascular Clinic	Bone fragment	<i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E16
P6-A4/P24	06/07/2021	ICU	Tracheal secretion	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E6
P7-A4/P12	16/07/2021	ICU	Catheter tip	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E1
S1-A2/P25	09/06/2021	ICU SARS	Blood	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E2
S5-A2/P29	04/10/2021	ICU	Tracheal secretion	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E4
S6-A2/P30	10/10/2021	ICU	Cavity Fluid	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / PPT (>64/4).	SM-E3
S8-A2/P32	25/11/2021	ICU	Blood	<i>bla_{KPC}</i>	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / LVX (2) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E5
MM1-A1/P33	20/09/2021	ICU SARS	Tracheal secretion	<i>bla_{KPC}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	MM-E1
PS2-A2/P12	09/08/2021	ICU	Catheter tip	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E2
PS4-A2/P36	17/11/2021	ICU	Tissue	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E1
PS5-A2/P37	18/01/2022	Cardiology	Tissue	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>	AMI (16) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (>64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (2) / MER (32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PS-E3

Table 3: Colonization (rectal swab) in patients with and without covid-19, origin of samples, phenotypic resistance tests, resistance genes, reason for patient discharge, resistance profile and ERIC-PCR.

Isolate/ Patient	Collection date	Hospital sector	¹ Resistance Phenotype	² Resistance genes	RT-PCR for Sars- CoV-2	Reason for discharge	³ Perfil de resistência CIM	*ERIC- PCR
K2-A5/P2	18/05/2021	ICU SARS	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	IMPROVEMENT	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E4
K5-A5/P4	02/06/2021	ICU SARS	KPC	<i>bla_{KPC}</i>	POS	IMPROVEMENT	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E5
K17-A5/P5	22/06/2021	ICU SARS	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	DEATH	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E6
K18-A5/P6	22/06/2021	ICU SARS	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	IMPROVEMENT	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E7
K24-A5/P7	09/07/2021	ICU SARS	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	IMPROVEMENT	IMP (>8) / MER (>32).	KP-E8
K26-A5/P9	05/08/2021	ICU	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	DEATH	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E9
K27-A5/P14	07/07/2021	ICU	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	DEATH	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E10
K40-A5/P12	15/07/2021	ICU	MBL	<i>bla_{KPC}</i> ; <i>bla_{NDM}</i> ;	NEG	DEATH	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	KP-E2
K42-A5/P14	07/10/2021	ICU	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	NEG	IMPROVEMENT	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E14
K60-A5/P17	16/12/2021	Cardiology	KPC	<i>bla_{KPC}</i>	NEG	IMPROVEMENT	AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CFZ (>8) / CEF (>16) / CET (>16) / CAV (R) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	KP-E15
P2-A4/P20	02/06/2021	ICU SARS	MBL	<i>bla_{NDM}</i>	POS	IMPROVEMENT	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / GEN (>8) / IMP (>8) / MER (>32) / PPT (>64/4) / SUT (>2/38).	PM-E3
S3-A2/P27	15/06/2021	ICU SARS	Negativo	<i>bla_{KPC}</i>	POS	IMPROVEMENT	AMI (>32) / AMP (>16) / AMP+SUL (>16/8) / CEF (>16) / CET (>16) / CTX (>4) / CIP (>2) / ERT (>1) / FG6 (64) / GEN (>8) / IMP (>8) / LVX (>4) / MER (>32) / PPT (>64/4).	SM-E2

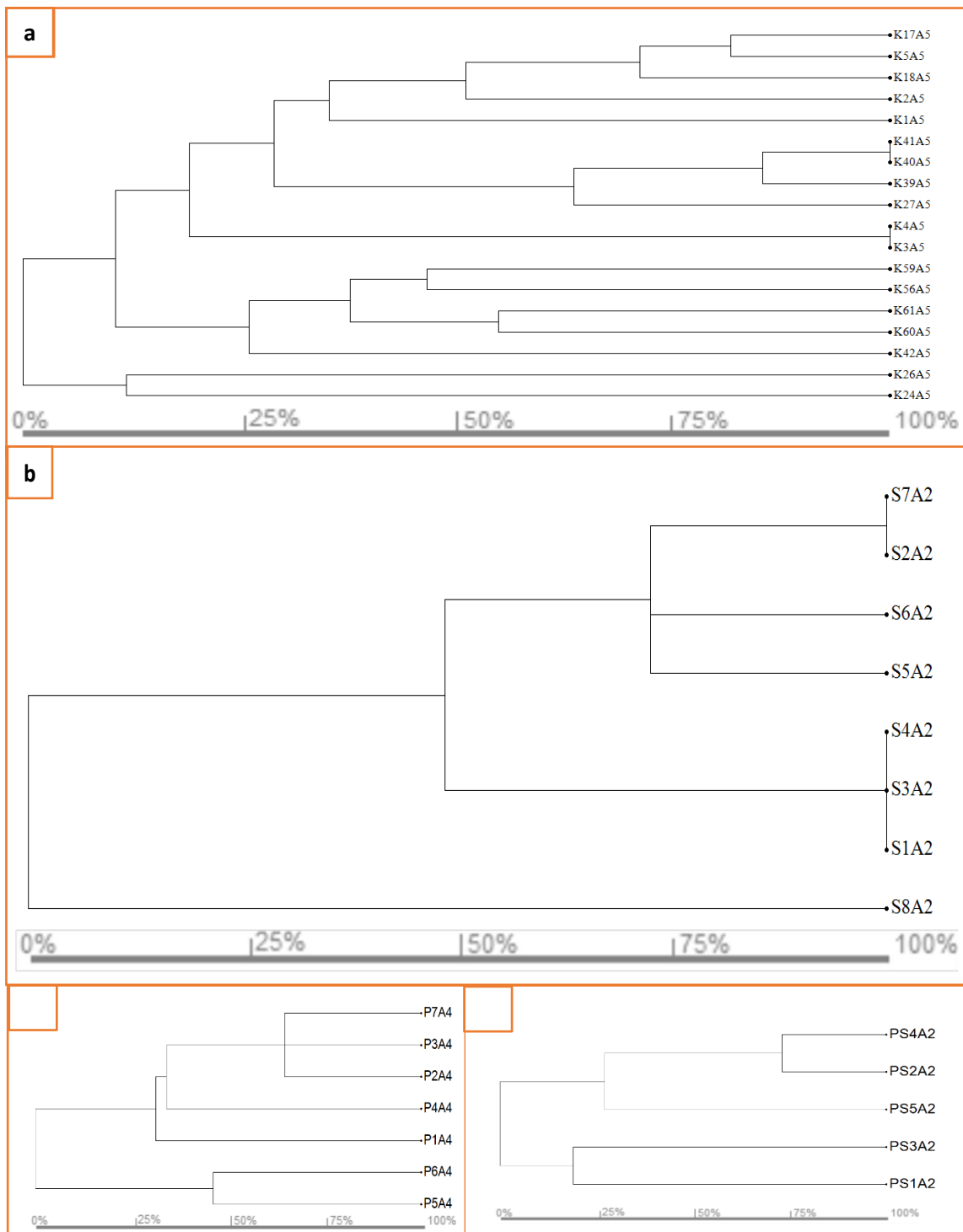
K2-A5; K5-A5; K17-A5; K18-A5; K24-A5; K26-A5; K27-A5; K40-A5; K42-A5 e K60-A5 – *Klebsiella pneumoniae*; P2-A4 – *Proteus mirabilis*; S3-A2 – *Serratia marcescens*; Phenotype of Resistance: Phenylboronic acid (AFB) and Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) were used for the phenotypic identification of KPC and MBL enzymes,

respectively. ²Resistance genes: were detected using PCR technique. ³Resistant Antimicrobials: (AMI) Amikacin; (AMP) Ampicillin; (AMP+SUB) Ampicillin + Sulbactam; (CFZ) Cefazolin; (CEF) Cefepime; (CET) Ceftazidime; (CAV) Ceftazidime-Avibactam; (CTX) Ceftriaxone; (CIP) Ciprofloxacin; (COL) Colistin; (ERT) Ertapenem; (FG6) Fosfomycin with G6P; (GEN) Gentamicin; (IMP) Imipenem; (LVX) Levofloxacin; (MER) Meropenem; (PPT) Piperacillin + Tazobactam; (POLB) Polymyxin B; (SUT) Trimethoprim + Sulfamethoxazole. ⁴ERIC-PCR: The acronyms refer to the following: KP = *Klebsiella pneumoniae*; PM = *Proteus mirabilis*; SM = *Serratia marcescens*.

Table 4: Comparison between patients with and without covid-19 resulting from infection and colonization by clinical isolates of Enterobacterales.

Infection and covid-19 “+”		Infection and covid-19 “-”	
<i>bla</i> _{KPC}	31,58%	<i>bla</i> _{KPC}	50%
<i>bla</i> _{NDM}	52,63%	<i>bla</i> _{NDM}	21,43%
<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	15,80%	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	28,57%
Colonization and covid-19 “+”		Colonization and covid-19 “-”	
<i>bla</i> _{KPC}	28,57%	<i>bla</i> _{KPC}	20%
<i>bla</i> _{NDM}	71,42%	<i>bla</i> _{NDM}	60%
<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	--	<i>bla</i> _{KPC} / <i>bla</i> _{NDM}	20%

Figure 1. Dendrogram generated from the results obtained by ERIC-PCR using Darwin 6.0 software. **a.** Relationship between the profiles of clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems from a public hospital in Recife-PE, Brazil. **b.** Relationship between the profiles of clinical isolates of *S. marcescens* resistant to carbapenems from a public hospital in Recife-PE, Brazil. **c.** Relationship between the profiles of carbapenem-resistant *P. mirabilis* isolates from Recife-PE, Brazil. **d.** Relationship between the profiles of carbapenem-resistant *P. stuartii* isolates from Recife-PE, Brazil.



APÊNDICE C – MATERIAL SUPLEMENTAR – ARTIGO 1

Table 1 - Sequence of the *primers* for PCR and sequencing of the amplicons that were used in the study.

Gene	Primer sequence	Tamanho dos amplicons	Fragment size	Ref
<i>bla</i> _{KPC}	TGTCAGTGTATCGCCGTC CTCAGTGTCTACAGAAAACC	882pb	63°C	20
<i>bla</i> _{GES}	ATCAGCCACCTCTCAATGG TAGCATCGGGACACATGAC	860pb	55°C	19
<i>bla</i> _{NDM}	TAAAATACCTTGAGCGGGC AAATGGAAACTGGCGACC	439pb	60°C	20
<i>bla</i> _{IMP}	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC GTGATGCGTCYCCAAYTTCAC	232pb	60°C	18
<i>bla</i> _{VIM}	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG AGGTGGGCCATTGAGCCAGA	523pb	62°C	18
<i>bla</i> _{OXA-48}	TTGGTGGCATCGATTATCGG GAGCACTTCTTTGTGATGGC	743pb	55°C	17
ERIC	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGAAGTGGGGTGAGCG	NA	36°C	12

NA, does not apply. bp, base pairs

Table 2: Sensitivity and specificity test for the Carba NG test

Comparison between the Carba NG rapid test and the PCR molecular test for <i>bla</i> _{KPC} .				
Test PCR KPC				
		Presence	Ausence	Total
Test Carba NG	Positive	11 (TP)	1 (FP)	12
	Negative	1 (FN)	12 (TN)	13
	Total	12	13	25
Sensitivity : 91,66% Specificity : 92,30%				
Comparison between the Carba NG rapid test and the PCR molecular test for <i>bla</i> _{NDM}				
Test PCR NDM				
		Presence	Ausence	Total
Test Carba NG	Positive	12 (TP)	1 (FP)	13
	Negative	1 (FN)	11 (TN)	12
	Total	13	12	25
Sensitivity : 92,30% Specificity : 91,66%				
Comparison between the Carba NG rapid test and the PCR molecular test for <i>bla</i> _{NDM} / <i>bla</i> _{KPC}				
Test PCR KPC/NDM				
		Presence	Ausence	Total
Test Carba NG	Positive	1 (TP)	1 (FP)	2
	Negative	6 (FN)	25(TN)	31
	Total	7	26	33
Sensitivity : 14,29% Specificity : 96,15%				

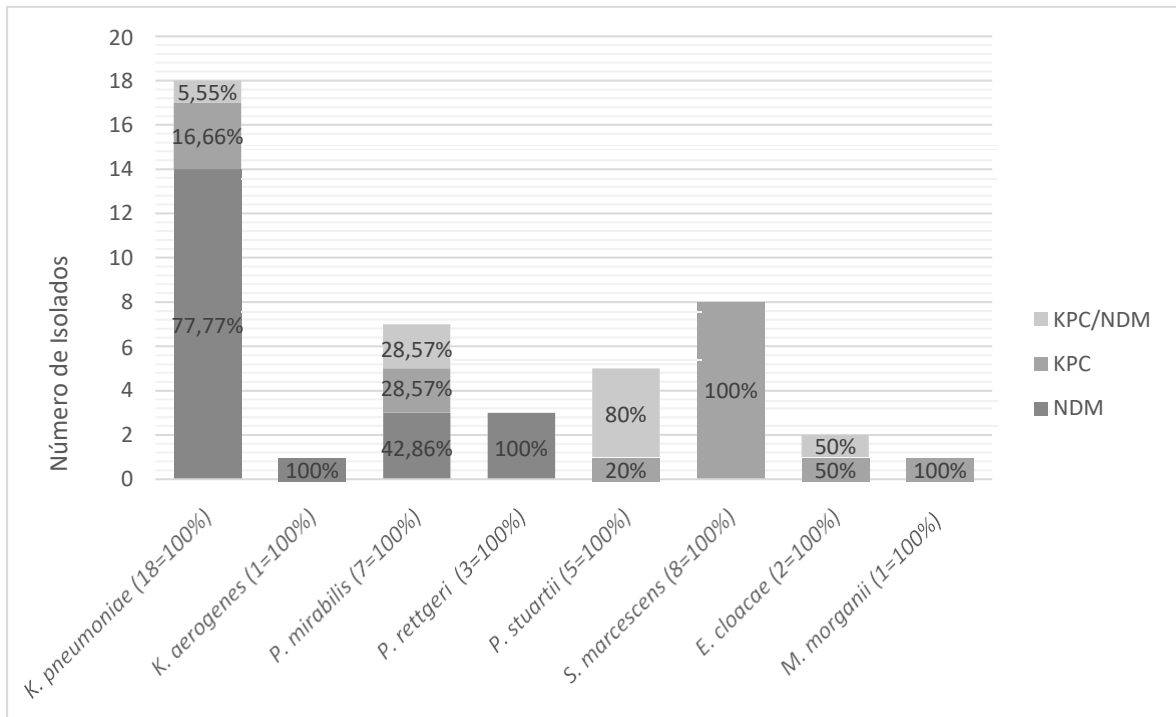
KPC PCR test: Sensitivity values 91.66%; specificity 92.30%; positive predictive value 91.66%; negative predictive value 92.30%; prevalence 48%; accuracy 92.00%. **NDM PCR test:** Sensitivity values 92.00%; specificity 91.66%; positive predictive value 92.30%; negative predictive value 91.66%; prevalence 52%; 92% accuracy. **KPC/NDM PCR test:** Sensitivity values 14.29%; specificity 96.15%; positive predictive value 14.29%; negative predictive value 96.15%, prevalence 21.21%; accuracy 78.79%. TP: True positive. FN: False negative. FP: False positive. TN: True Negative

Table 3: Comparison of the clinical isolates of Enterobacterales about Carba-NG rapid tests, positive phenotypic tests and PCR for *bla_{KPC}* and *bla_{NDM}* genes

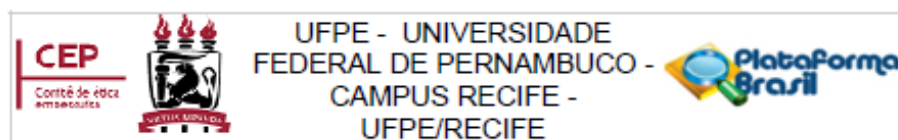
Isolate/ Patiet	Detection by Test Carba-NG	¹ Detection by phenotypic resistance tests	² PCR for <i>bla_{KPC}</i> and <i>bla_{NDM}</i>
K1-A5/P1	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
K3-A5/P3	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K4-A5/P3	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K39-A5/P11	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K41-A5/P13	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K56-A5/P15	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
P1-A4/P19	KPC; NDM	MBL e KPC	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
P3-A4/P21	ND	ND	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
P4-A4/P22	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
P5-A4/P23	KPC	KPC	<i>bla_{NDM}</i>
S2-A2/P26	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S4-A2/P28	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S7-A2/P31	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
PS1-A2/P19	NDM	MBL	<i>bla_{KPC}</i>
PS3-A2/P35	NDM	MBL	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
PR1-A2/P38	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
PR2-A2/P39	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
PR3-A2/P38	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
EC1-A1/P40	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
K25-A5/P8	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K59-A5/P16	NDM	MBL	<i>bla_{NDM}</i>
K61-A5/P18	NDM	MBL e KPC	<i>bla_{NDM}</i>
P6-A4/P24	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
P7-A4/P12	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S1-A2/P25	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S5-A2/P29	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S6-A2/P30	KPC; NDM	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
S8-A2/P32	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
MM1-A1/P33	KPC	KPC	<i>bla_{KPC}</i>
PS2-A2/P12	NDM	MBL E KPC	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
PS4-A2/P36	NDM	MBL	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
PS5-A2/P37	NDM	MBL	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{NDM}</i>
EC2-A1/P41	KPC	KPC	<i>bla_{NDM}</i> , <i>bla_{KPC}</i>

¹Detection by phenotypic resistance tests: The phenylboronic acid (PBA) test and the ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) test were used for the phenotypic identification of the KPC and MBL enzymes, respectively. ² Resistance genes: were detected using the PCR technique.

Graphic 1: Percentage of genes detected by species and classified according to the genes detected.



ANEXO A - REGISTRO NO COMITÊ DE ÉTICA CAAE Nº 58470022.3.0000.5208



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de mecanismos de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos e relação clonal de isolados clínicos de Enterobacterales provenientes de colonização e de infecção em pacientes com e sem covid-19 em um hospital público de Recife-PE.

Pesquisador: LAMARTINE RODRIGUES MARTINS

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 58470022.3.0000.5208

Instituição Proponente: Pós-Graduação em Medicina Tropical

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.498.694

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências Médicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para qualificação do mestrado, pelo aluno Lamartine Rodrigues Martins, sob a Orientação da Profa. Dra. Ana Catarina de Souza Lopes e Coorientação da Dra. Elizabeth Maria Bispo Beltrão.

Objetivo da Pesquisa:

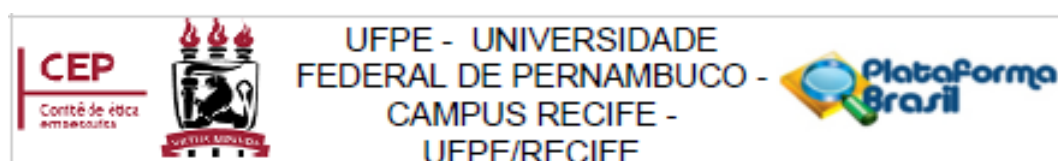
Objetivo Geral:

Investigar a presença dos principais genes e enzimas de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos bem como a relação clonal entre os isolados clínicos da ordem Enterobacterales derivados de colonização e infecção em pacientes com e sem Covid-19 provenientes de um hospital público de Recife entre 2021 e 2022.

Objetivos Específicos

- Investigar a presença dos genes de resistência blaKPC, blaGES, blaOXA-48, blaVIM, blaNDM e blaIMP em isolados de Enterobacterales de colonização e infecção em pacientes com e sem Covid-19;
- Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de Enterobacterales de

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 50.740-600
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **Fax:** (81)2126-3163 **E-mail:** cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.498.894

colonização e infecção em pacientes com e sem Covid-19.

- Comparar a presença dos genes de resistência blaKPC, blaGES, blaOXA-48, blaVIM, blaNDM e blaIMP entre as diferentes espécies de Enterobacterales;
- Comparar a presença dos genes de resistência nos isolados provenientes de colonização e infecção em pacientes com e sem Covid-19;
- Comparar os resultados do teste rápido CarbaNG com a PCR convencional para a identificação dos genes de resistência blaKPC, blaOXA-48, blaVIM, blaNDM e blaIMP nos isolados clínicos provenientes de infecção do estudo;
- Determinar a relação clonal dentre os isolados de cada espécie de Enterobacterales do estudo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: o pesquisador referiu os riscos inerentes a pesquisa e a devida minimização, no que se refere ao transporte das amostras biológicas e dados coletados.

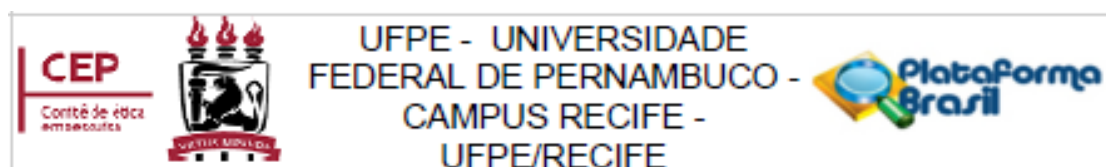
Benefícios: o pesquisador referiu que a pesquisa não trará benefícios diretos, apenas benefícios indiretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O tema é relevante. O pesquisador justifica afirmando que levando em conta esse grande potencial acerca da aquisição e disseminação de genes e mecanismos de resistência no contexto atual de pandemia de Sars-CoV-2 e utilização indiscriminada de antimicrobianos, são necessários estudos que avaliem a epidemiologia molecular dos genes de resistência que possam estar presentes em isolados pertencentes a ordem Enterobacterales, a investigação desses genes de resistência é fundamental para o desenvolvimento de medidas de terapia, acompanhamento e demais cuidados com o paciente no ambiente hospitalar. Afirma ainda que os resultados deste trabalho podem auxiliar as práticas clínicas nos pacientes com coinfeção ou infecções secundárias além de registrar a presença de cepas clonais e com capacidade pandêmica, auxiliando a CCIH através do compartilhamento desses dados com o hospital de estudo. O estudo será descritivo e transversal, constituído de cepas de

Enterobacterales resistentes a um ou mais carbapenêmicos, isoladas de culturas de vigilância, hemoculturas e secreção traqueal ou demais culturas provenientes de um hospital de Recife-PE. Será descrito a presença de clones, bem como serão investigados os genes de resistência para carbapenemase blaKPC, blaOXA, blaNDM, blaVIM e blaIMP. O projeto está orçado em R\$ 3.526,14 e o pesquisador principal será responsável pelo orçamento. Os pesquisadores declaram que os

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.498.604

dados coletados (Culturas bacterianas, e dados primários) nesta pesquisa ficarão armazenados no Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana da UFPE, sob a responsabilidade do pesquisador Lamartine Rodrigues Martins, no

endereço Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, no prédio do Centro de Ciência da Saúde, Laboratório de Biologia Molecular e Genética Bacteriana, localizado no segundo andar, pelo período de mínimo 5 anos.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram anexados: 1 - Folha de rosto; 2 - Carta de anuência do Centro de Estudos do Hospital Agamenon Magalhães (HAM); 3 - Declaração do setor de patologia do HAM que fornecerá os isolados bacterianos para o estudo; 4 - Lattes dos pesquisadores; 5 - Projetos no formato plataforma e detalhado; 6 - Carta justificando a não obrigatoriedade do TCLE; 7 - termo de compromisso.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

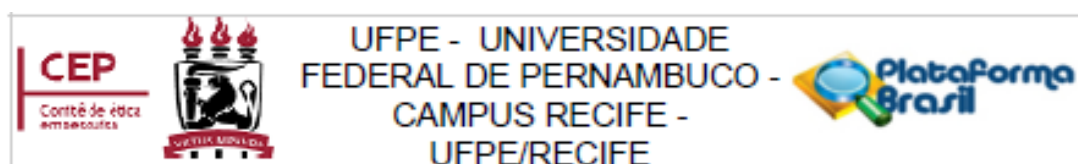
As exigências foram atendidas e o protocolo está APROVADO, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação",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

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 468/12).

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

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades

Endereço: Av. das Engenhas, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.488.804

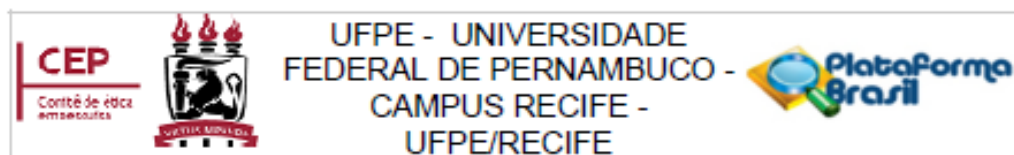
desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1912772.pdf	27/06/2022 15:53:50		Aceito
Outros	Carta_de_Resposta.docx	27/06/2022 15:53:08	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.docx	03/06/2022 12:45:11	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Cronograma	Cronograma_03.docx	03/06/2022 12:44:40	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Para_o_CEP.docx	03/06/2022 12:43:09	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Outros	Termo_Lamartine.pdf	05/05/2022 19:43:07	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Outros	Declaracao_HAM_autorizacao_coleta.pdf	16/04/2022 11:24:27	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_anuencia.pdf	16/04/2022 11:19:53	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_para_Ausencia_do_TCLE.docx	16/04/2022 11:04:29	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Outros	Curriculo_Lamartine.pdf	16/04/2022 11:03:17	LAMARTINE RODRIGUES	Aceito

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br



Continuação do Parecer: 5.498.894

Outros	Curriculo_Lamartine.pdf	16/04/2022 11:03:17	MARTINS	Aceito
Outros	Curriculo_Elizabeth_Maria.pdf	16/04/2022 11:00:12	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Outros	Curriculo_Ana_Catarina.pdf	16/04/2022 10:59:32	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito
Folha de Rosto	LAMARTINE_Folha_de_rosto_copia_as sinado.pdf	16/04/2022 10:27:28	LAMARTINE RODRIGUES MARTINS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 29 de Junho de 2022

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

Endereço: Av. das Engenhasria, s/n, 1º andar, sala 4 - Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 Fax: (81)2126-3163 E-mail: cephumanos.ufpe@ufpe.br

ANEXO B- CONFIRMAÇÃO DE SUBMISSÃO

Submission Confirmation

[Print](#)

Thank you for your submission

Submitted to Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical

Manuscript ID RSBMT-2023-0075

Title Occurrence of bla_{NDM-1}, bla_{NDM-5}, bla_{NDM-7} and bla_{KPC-2} in clinical isolates of Enterobacterales with high genetic variability, from colonization and infection in patients with or without covid-19, from a hospital in Recife-PE, Brazil.

Authors Martins, Lamartine
Pimentel, Maria Izabely
Oliveira, Érica
Jucá, Moacir
Beitrão, Elizabeth Maria Bispo
Lopes, Ana Catarina

Date Submitted 16-Feb-2023

