



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS, CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

CAETANA PAES ZAMPARETTE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

FLORIANÓPOLIS

2019

Caetana Paes Zamparetti

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS
MULTIRRESISTENTES**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria Luiza Bazzo

Coorientadora: Prof. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero

Florianópolis

2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zamparette, Caetana
Caracterização Molecular de Enterobactérias
Multirresistentes / Caetana Zamparette ; orientador, Maria
Luiza Bazzo, coorientador, Thaís Cristine Marques Sincero,
2019.
181 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Plasmídeos. 3. Enterobactérias. 4.
Multirresistência. 5. Carbapenemases. I. Bazzo, Maria
Luiza . II. Marques Sincero, Thaís Cristine. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Farmácia. IV. Título.

Caetana Paes Zamparette

Caracterização Molecular de Enterobactérias Multirresistentes

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Jussara Kasuko Palmeiro, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Fabíola Branco Filippin Monteiro, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Nilton Erbet Lincopan Huenuman, Dr.
Universidade de São Paulo

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof. Dra. Elenara Maria Teixeira Lemos Senna
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dra. Maria Luiza Bazzo
Orientador(a)

Florianópolis, 2 de agosto de 2019.

Dedico este trabalho ao meu amado pai, Albertino de Souza Zamparete, que sempre foi meu grande incentivador e esteve ao meu lado me apoiando em todas as decisões que tomei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu pai, Albertino de Souza Zamparette, por todo apoio, suporte, incentivo. Obrigada pelo amor incondicional, pelo exemplo de pessoa, pai e profissional que você é. Eu não seria nada sem você.

À minha irmã, Helena Paes Zamparette, que é quem me aguenta todos os dias, a pessoa que mais me conhece e que eu sempre posso contar. Obrigada por tudo, por ser essa irmã maravilhosa, minha parceira, minha amiga.

À minha mãe, Teresinha Medeiros Paes, por todo o apoio, por ser a pessoa que sempre posso contar.

À minha orientadora, Maria Luiza Bazzo, que mesmo sem me conhecer direito, sem nunca ter trabalhado comigo, acreditou em mim, no meu projeto e aceitou me orientar. Obrigada por todo o ensinamento, paciência, orientação e amizade.

À minha co-orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, são sete anos trabalhando juntas, muito obrigada pela parceria, pela paciência, pelos ensinamentos de ciência e de vida. Serei eternamente grata.

Às minhas queridas amigas Daniela, Giuliana e Clarice, agradeço por tudo. Obrigada pela amizade, pelos happy hours, pelas risadas, por sempre me apoiarem, sempre estarem ao meu lado nos dias bons e ruins. São pessoas especiais que a pós-graduação colocou no meu caminho, a amizade delas tornou meus dias mais alegres e leves.

Aos Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia, que me acolheu de braços abertos, me deu todo o suporte para que eu pudesse fazer boa parte dos meus experimentos.

Às pessoas que conheci e amizade que fiz no LBMMS, pessoas que o doutorado colocou no meu caminho. Muito obrigada Lisléia, Taiane, Hanalídia, Mirela, Manuela, Jéssica, Felipe, Fernando, Renata por tudo, pelas risadas, pelos almoços, cafés, troca de experiências, pelas conversas sobre gatos e cachorros, pela amizade. Foi um prazer conhecê-los, são pessoas que levarei para sempre comigo com carinho.

Ao Marcos Schörner pela amizade, pela parceria, paciência e ensinamentos. O pouco que sei e aprendí sobre bioinformática e análise de dados de sequenciamento eu devo a ele.

Ao Laboratório de Microbiologia do HU, especialmente à bioquímica Mara Cristina Scheffer, que me ajudou muito neste projeto, guardou e cedeu parte das minhas amostras. Muito obrigada pela solicitude, pela paciência e ensinamentos ao longo desses quatro anos.

À empresa Neopropecta que permitiu que eu fizesse parte do projeto HAIMP, junto ao qual pude desenvolver meu projeto, coletar algumas amostras que fizeram parte deste trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade, desde a graduação em Farmácia ao título de doutora. Sou muito grata pela formação que recebi e pelas oportunidades que surgiram para mim nesta universidade.

Ao programa de Pós-graduação em Farmácia pela oportunidade e por fazer parte do começo da minha carreira acadêmica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela oportunidade e pelo apoio financeiro desde o meu mestrado até meu doutorado. Este projeto não seria possível se não tivesse havido este apoio.

Sou grata a tudo que aprendi, a tudo o que vivi, a pessoa que me tornei ao longo desses quatro anos. Sou grata a todos que de alguma forma fizeram parte da minha vida nesses anos e me ajudaram de alguma maneira nesta caminhada.

“But I would like to sound one note of warning. The time may come when penicillin can be bought by anyone in the shops. Then there is the danger that the ignorant man may easily underdose himself and by exposing his microbes to non-lethal quantities of the drug make them resistant”.
(Alexander Fleming, 1945)

RESUMO

A resistência antimicrobiana tornou-se um problema de saúde pública mundial. Plasmídeos são os principais vetores para a disseminação de determinantes de resistência, possuem capacidade de replicação em diferentes hospedeiros, são capazes de incorporar em seu genoma diversos determinantes de resistência interessantes para a sobrevivência do seu hospedeiro e possuem grande capacidade de recombinação genética. Com base nessa problemática, este estudo teve como principal objetivo a caracterização molecular de plasmídeos de enterobactérias multirresistentes isoladas em um hospital universitário. Foram selecionados 140 isolados de Enterobacterales, sendo 33 *E. coli*, 58 *K. pneumoniae*, 34 *E. cloacae* e 15 outras espécies. A identificação e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi feita pela metodologia semi-automatizada Vitek 2. Doze genes β -lactamases foram pesquisados por qPCR e a identificação dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos foi feita por PBRT. A determinação da similaridade genética foi feita por PFGE. Após essa triagem, foram selecionados 12 isolados para sequenciamento do genoma completo pela metodologia de *shotgun* pela plataforma Illumina, dois isolados de *E. coli* carregando o gene *mcr-1*, um isolado de *E. coli* e um de *K. pneumoniae* carregando o gene *bla_{NDM-1}*, dois isolados de *K. pneumoniae* carregando o gene *bla_{VIM-1}* e sete isolados carregando o gene *bla_{KPC-2}*, dentre eles um *E. coli*, um *E. cloacae* e cinco *K. pneumoniae*. Os plasmídeos que carregavam *mcr-1* eram provenientes de isolados comunitários e pertenciam ao grupo IncX4, muito similar aos plasmídeos carregadores de *mcr-1* descritos no Brasil. Os isolados que continham o gene *bla_{NDM-1}* eram de espécies diferentes, porém foram recuperados em coletas distintas, do mesmo paciente. Não foi possível determinar em qual plasmídeo o gene *bla_{NDM-1}* estava localizado, no entanto o mesmo se encontrava flanqueado pela sequência de inserção ISAb125 e pelo gene *ble_{MBL}*. Os isolados que carregavam o gene *bla_{KPC-2}* eram de diferentes espécies e recuperados de diferentes sítios, e apesar de não ter ocorrido a montagem completa do plasmídeo pesquisado em todos os isolados, todos os plasmídeos pertenciam ao mesmo grupo IncN, onde o gene *bla_{KPC-2}* estava localizado dentro do transposon Tn4401, o qual continha duas sequências de inserção ISKpn6 e ISKpn7, três transposases *tnpA-1*, *tnpA-2*, *istA* e uma resolvase *tnpR*. O plasmídeo IncN contendo *bla_{KPC-2}*, assim como todo o contexto genético em que o gene de resistência estava inserido apresentou alta identidade com outros plasmídeos descritos no país. Com esse estudo pode-se observar uma possível transferência plasmidial *in vivo* ocorrida com o gene *bla_{NDM-1}*. Ainda, parece haver no Brasil dois

plasmídeos endêmicos responsáveis pela disseminação de determinantes de resistência, um IncN responsável pela disseminação de *bla*_{KPC-2} e um IncX4 responsável pela disseminação de *mcr-1*.

Palavras-chave: Plasmídeos. Enterobactérias. Multirresistência.

ABSTRACT

Antimicrobial resistance has become a global public health problem. Plasmids are the main vectors for the resistance determinants dissemination, since they have replication capacity in a wide variety of hosts, they are able to incorporate several resistance genes in their genomes that are interesting for bacteria survival and have great capacity of genetic recombination. Therefore, this study had as main purpose characterize molecularly multiresistant Enterobacteriaceae plasmids isolated in an University Hospital. Fourteen hundred Enterobacterales isolates were selected, being 33 *E. coli*, 58 *K. pneumoniae*, 34 *E. cloacae* and 15 from other species. The identification and antimicrobial susceptibility test were performed using semi-automated methodology Vitek 2. Twelve β -lactamases genes were investigated by qPCR and incompatibility groups of the plasmids identification was performed by PBRT. The genetic similarity determination was performed by PFGE. After this screening, twelve isolates were selected to be submitted to complete genome sequencing by the Illumina shotgun methodology, two *E. coli* isolates carrying *mcr-1* gene, one *E. coli* and one *K. pneumoniae* carrying *bla_{NDM-1}*, two *K. pneumoniae* isolates carrying *bla_{VIM-1}* gene and seven isolates carrying *bla_{KPC-2}*, among them one *E. coli*, one *E. cloacae* and five *K. pneumoniae*. Plasmids bearing *mcr-1* were recovered from community isolates and belonged to IncX4 group, and they were very similar to IncX4 plasmids carrying *mcr-1* described in other states in Brazil. The isolates carrying *bla_{NDM-1}* were from different species, recovered from different samples from the same patient. It was not possible to determine in which plasmid *bla_{NDM-1}* was localized, however *bla_{NDM-1}* gene was flanked by ISAb125 insert sequence and *ble_{MBL}* resistance gene. Isolates bearing *bla_{KPC-2}* were from different species and retrieved from different sites, but although complete plasmid assembly for in all isolates did not occur, all plasmids belonged to the same IncN group, in which *bla_{KPC-2}* was located within transposon Tn4401b, which contained two insertion sequences ISKpn6 and ISKpn7, three transposases *tnpA-1*, *tnpA-2*, *istA* and a resolvase *tnpR*. The IncN carrying *bla_{KPC-2}* plasmid and the entire genetic environment in which the resistance gene was inserted showed high identity with other plasmids described in the country. With this study we can observe a possible in vivo plasmid transfer occurring with isolates carried *bla_{NDM-1}*. It is possible there are two endemic plasmids in Brazil responsible for resistance determinants dissemination, an IncN responsible for *bla_{KPC-2}* dissemination and an IncX4 responsible for the acquired resistance polymyxin gene dissemination, *mcr-1*.

Keywords: Plasmids. Enterobacteriaceae. Multidrug-resistant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos desenhos das placas para a determinação da CIM para os antimicrobianos imipenem, meropenem e polimixina B.	47
Figura 2. Interpretação visual da determinação da CIM.	48
Figura 3 Fluxograma da coleta e seleção dos isolados.	62
Figura 4. Representação gráfica dos perfis de resistência apresentados pelos 140 isolados MDR, com ênfase nas espécies mais frequentes.	65
Figura 5. Identificação de β -lactamases e do gene <i>mcr-1</i> em números absolutos.	68
Figura 6. Detecção dos grupos de incompatibilidade de plasmídeos entre os isolados.	69
Figura 7. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência e grupos de incompatibilidade identificados nos isolados de <i>E. coli</i>	71
Figura 8. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência e grupos de incompatibilidade dos isolados de <i>E. cloacae</i>	73
Figura 9. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência aos β -lactâmicos e grupos de incompatibilidade encontrados em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	76
Figura 10. Representação gráfica do plasmídeo IncX4 carreador de <i>mcr-1</i> em <i>E. coli</i> EC11.	86
Figura 11. Representação gráfica do plasmídeo IncX4 carreador de <i>mcr-1</i> em <i>E. coli</i> EC91.	87
Figura 12. Comparação do alinhamento dos plasmídeos IncX4 carreadores de <i>mcr-1</i> dos isolados EC11 e EC91 com pICBEC71.	88
Figura 13. Representação gráfica do contexto genético em que <i>bla</i> _{NDM-1} está inserido em EC134.	92
Figura 14. Representação gráfica do contexto genético em que <i>bla</i> _{NDM-1} está inserido em KP135.	93
Figura 15. Alinhamento das sequências de EC134 e KP135 que continha o gene <i>bla</i> _{NDM}	94
Figura 16 Alinhamento entre os plasmídeos IncN carreadores de <i>bla</i> _{KPC-2} identificados neste estudo em comparação com o plasmídeo referência pFCF3SP.	100
Figura 17. Representação gráfica do plasmídeo IncN do isolado EC13.	101
Figura 18. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP23.	102

Figura 19. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP96.....	103
Figura 20. Representação gráfica do plasmídeo IncN de ECL120.....	104
Figura 21. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP136.....	105
Figura 22. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP141.....	106
Figura 23. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP142.....	107
Figura 24. Alinhamento das sequências do plasmídeo IncN2 presentes em KP96 e KP142.	110

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Esquema de classificação das β -lactamases.	31
Quadro 2. Pontos de corte para determinação de CIM para Enterobacterales.	46
Quadro 3. Iniciadores para a detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos e à polimixina e os subtipos amplificados para cada par de iniciador.....	51
Quadro 4 Controles positivos dos genes de β -lactamases testados.	52
Quadro 5. Sequência dos iniciadores para a detecção dos grupos de incompatibilidade de plasmídeos separados por esquemas de reações de PCR	53
Quadro 6. Distribuição dos isolados multirresistentes por sítio de coleta.....	64
Quadro 7. Avaliação da qualidade da montagem dos genomas dos isolados que foram sequenciados pela plataforma MiSeq.	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação de isolados multirresistentes selecionados para o estudo.	63
Tabela 2. Determinação da concentração inibitória mínima dos isolados selecionados para o sequenciamento completo do genoma.	67
Tabela 3. Características dos isolados selecionados para o sequenciamento do genoma completo.	80
Tabela 4. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados EC11 e EC91 carreadores do gene <i>mcr-1</i> em IncX4.	84
Tabela 5. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados EC134 e KP135 carreadores do gene <i>bla</i> _{NDM-1}	90
Tabela 6 Características fenotípicas e genotípicas dos isolados carreadores do gene <i>bla</i> _{KPC-2}	96
Tabela 7. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados KP96 e KP142 carreadores de <i>bla</i> _{VIM-1}	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevantion</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BrCAST	<i>Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
CARD	<i>The Comprehensive Antibiotic Resistance Database</i>
CC	Centro Cirúrgico
CCS-UFSC	Centro de Ciências da Saúde da UFSC
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP-UFSC	Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFSC
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	Clínica Médica I
Cq	<i>Quantification cycle</i>
CRI	Clínica Cirúrgica I
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EGM	Elementos Genéticos Móveis
EMG	Emergência
ENS	Engenharia Sanitária e Ambiental
ESBL	β -lactamases de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
HAIMP	<i>Healthcare Associated Infections Microbiome Project</i>
HGT	Transferência horizontal de genes
HU-UFSC	Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina

Inc	Incompatibilidade
IrAS	Infecções relacionadas à Assistência à Saúde
LABEFLU	Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos
LAC-UFSC	Laboratório de Análises Clínica do HU
LBMMS	Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
MDR	Multidrug resistant
MIMA	Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
MIP-CCB-UFSC	Departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MOB	Sistema de mobilidade dos plasmídeos
MPF	Sistema de acoplamento dos plasmídeos
NCBI	The National Center for Biotechnology Information
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBP	Proteína ligadora de penicilina
PBRT	<i>PCR-based replicon typing</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PDR	<i>Pandrug resistant</i>
PFGE	<i>Pulsed-field gel electrophoresis</i>
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase quantitativa
ST	<i>Sequence Type</i>
SUS	<i>Sistema Único de Saúde</i>
T4CP	Proteína de acoplamento do tipo IV
T4SS	Sistema de secreção do tipo IV

TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TSA	Teste de sensibilidade aos antimicrobianos
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i>
XDR	<i>Extensive drug resistant</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS.....	25
1.1.1	Objetivo Geral	25
1.1.2	Objetivos Específicos.....	25
2	REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA: VISÃO GERAL	26
2.2	ENTEROBACTÉRIAS	28
2.3	β -LACTAMASES: CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA	29
2.4	RESISTÊNCIA ADQUIRIDA ÀS POLIMIXINAS.....	35
2.5	PLASMÍDEOS.....	37
3	METODOLOGIA	43
3.1	COLABORAÇÕES E ASPECTOS ÉTICOS	43
3.2	AMOSTRAGEM.....	43
3.3	IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS	45
3.4	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	45
3.5	DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA.....	46
3.6	ANÁLISE GENOTÍPICA DOS ISOLADOS	48
3.6.1	Extração de DNA.....	48
3.6.2	Amplificação gênica de β-lactamases.....	49
3.6.3	Detecção dos Grupos de Incompatibilidade de Plasmídeos	52
3.6.4	Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	55
3.6.4.1	Preparação dos blocos com DNA.....	55
3.6.4.2	Clivagem do DNA.....	56
3.6.4.3	Eletroforese em Gel de Agarose.....	56
3.6.4.4	Análise dos Padrões Moleculares.....	57
3.6.5	Sequenciamento do genoma completo.....	58

3.6.5.1	Sequenciamento.....	58
3.6.5.2	Análises computacionais	58
4	RESULTADOS.....	61
4.1	RESULTADOS GERAIS	61
4.1.1	Características dos isolados.....	62
4.1.2	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos	64
4.1.3	Identificação dos genes de resistência.....	67
4.1.4	Determinação do Grupos de Incompatibilidade de plasmídeos.....	68
4.1.5	Avaliação da similaridade genética dos isolados por PFGE.....	69
4.1.6	Sequenciamento do genoma completo.....	78
4.1.6.1	Seleção dos isolados.....	78
4.1.6.2	Montagem das sequências	80
4.1.6.3	Resistência adquirida à polimixina – <i>mcr-1</i> : isolados EC11 e EC91.....	83
4.1.6.4	Carbapenemase <i>bla</i> _{NDM-1} : isolados EC134 e KP135.....	89
4.1.6.5	Carbapenemase <i>bla</i> _{KPC-2} : isolados EC13, KP23, KP46, ECL120, KP136, KP141 e KP142	94
4.1.6.6	Carbapenemase <i>bla</i> _{VIM-1} : isolados KP96 e KP142.....	107
5	DISCUSSÃO.....	111
5.1	DISCUSSÃO DOS DADOS GERAIS.....	111
5.2	RESISTÊNCIA ADQUIRIDA À POLIMIXINA: <i>mcr-1</i>	116
5.3	PLASMÍDEOS CARREADORES DE CARBAPENEMASES.....	119
5.3.1	<i>bla</i> _{NDM-1}	119
5.3.2	<i>bla</i> _{KPC-2}	121
5.3.3	<i>bla</i> _{VIM-1}	124
6	CONCLUSÃO	127
7	PERSPECTIVAS.....	129
	REFERÊNCIAS	130

APÊNDICE A – Comparação da qualidade das sequências dos dados brutos e das sequências trimadas do pela ferramenta FASTQC..... 152

APÊNDICE B – Artigo desenvolvido no doutorado com os dados obtidos sobre os plasmídeos carreadores de *mcr-1* 164

1 INTRODUÇÃO

As bactérias habitam a Terra por aproximadamente 3,5 bilhões de anos (CAVALIER-SMITH, 2006; SUMMONS et al., 2006). Quando se compara este dado à era pós antimicrobiana, que possui um pouco mais que 70 anos, a discussão sobre resistência aos antimicrobianos torna-se natural e inevitável (WAGLECHNER; WRIGHT, 2017).

O desenvolvimento dos antimicrobianos revolucionou a área da saúde, tornou-se um dos maiores avanços médicos do século XX (O'NEILL, 2014). No entanto, desde a descoberta do primeiro antimicrobiano no final da década de 1930, a incorporação massiva desses medicamentos tanto na área médica quanto na área agrícola resultou no aumento da exposição dos microrganismos aos antimicrobianos, que por sua vez levou ao aumento da resistência bacteriana (WAGLECHNER; WRIGHT, 2017). Estima-se que o consumo global de antimicrobianos utilizados somente na agricultura varie entre 63 mil a 240 mil toneladas por ano (GRACE, 2015; VAN BOECKEL et al., 2017). Curiosamente, mais de 70% dos antimicrobianos utilizados no tratamento de infecções em seres humanos são utilizados na indústria de animais de corte (O'NEILL, 2015).

Atualmente, a resistência bacteriana é considerada um problema de saúde pública mundial. O surgimento de novos mecanismos de resistência e a sua rápida disseminação estão limitando a capacidade de tratamento de doenças infecciosas comuns, resultando no prolongamento da enfermidade e, conseqüentemente, na incapacidade do paciente e morte (WHO, 2018).

No ano de 2014, o economista Jim O'Neill estimou que aproximadamente 700 mil pessoas no mundo morreriam anualmente em decorrência de infecções causadas por microrganismos multirresistentes. Sob este cenário, em 2050, infecções causadas por microrganismos resistentes seriam a causa da morte prematura de cerca de 10 milhões de pessoas (O'NEILL, 2014). Isso significa que, se nenhuma medida for tomada, entre a situação atual e 2050, o custo econômico global ficará entre 60 e 100 trilhões de dólares (O'NEILL, 2014; TAYLOR et al., 2014).

Entre os principais microrganismos resistentes que ameaçam à saúde humana, a família Enterobacteriaceae, especialmente *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, recebe notoriedade. Nos últimos anos, observou-se a rápida evolução desses microrganismos na

aquisição e disseminação de genes de resistência, principalmente aos β -lactâmicos (cefalosporinas e carbapenêmicos) (WOERTHER et al., 2013).

Em 2013, *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) publicou um documento categorizando 18 microrganismos mais desafiadores para a saúde pública em relação à sua resistência. Nesse relato, as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram categorizadas no nível máximo de periculosidade para a saúde humana (CDC, 2013). Equitativamente, a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou em 2017 uma lista de prioridade de bactérias resistentes para guiar pesquisadores na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos e, novamente, as enterobactérias resistentes às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos, juntamente com *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* lideraram a lista como prioridade crítica (WHO, 2017).

Os genes de resistência estão, em sua maioria, inseridos em elementos acessórios ao genoma bacteriano, como os plasmídeos, em que a flexibilidade genética é mais tolerada pelo microrganismo (KLEMM; WONG; DOUGAN, 2018). Os plasmídeos exerceram um papel fundamental para a evolução da resistência antimicrobiana por meio da transferência horizontal de genes (HGT) (SAN MILLAN, 2018). A capacidade dos plasmídeos de se replicar em diferentes hospedeiros, assim como a incorporação de genes de resistência e a capacidade de recombinação genética são motivos pelos quais eles são considerados os principais vetores de disseminação de genes de resistência. Sendo assim, a identificação de características dos plasmídeos, assim como o seu comportamento em diferentes hospedeiros contribuem para a compreensão do fenômeno de transferência horizontal de genes de resistência. A identificação molecular do plasmídeo e a caracterização genotípica do seu hospedeiro é capaz de distinguir se a disseminação dos genes de resistência ocorreu impulsionada por plasmídeos epidêmicos em diferentes microrganismos ou se ocorreu a disseminação entre microrganismos clonais (ROZWANDOWICZ et al., 2018).

Há muito se estuda sobre elementos genéticos móveis (EGM), especialmente plasmídeos, porém o interesse em compreender o papel que exercem na disseminação dos genes de resistência é mais recente. No Brasil há poucos trabalhos abordando o assunto e em Santa Catarina, até o momento, este é o primeiro estudo sobre o assunto. Isso posto, este estudo tem como objetivo aprofundar o conhecimento sobre plasmídeos de enterobactérias multirresistentes isoladas no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago/UFSC, conhecer os tipos de plasmídeos circulantes, o contexto genético em que estão situados os genes de resistência e determinar se existe relação filogenética entre os isolados.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar plasmídeos de enterobactérias multirresistentes isolados de pacientes colonizados e infectados, bem como de superfícies inertes de ambiente hospitalar.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Identificar as β -lactamases presentes nos isolados multirresistentes;
- Identificar os grupos e subgrupos de incompatibilidade plasmidial presentes nos isolados;
- Determinar a similaridade genética dos isolados;
- Obter a sequência completa de diferentes plasmídeos identificados e determinar o contexto genético envolvido na expressão de genes de resistência, com ênfase nas β -lactamases;

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA: VISÃO GERAL

Antimicrobianos e resistência bacteriana estão vinculados e fazem parte de características muito antigas do metabolismo de procariotos, profundamente incorporados nos genomas desses microrganismos (WAGLECHNER; WRIGHT, 2017). Calcula-se que a origem de antibióticos na natureza varie de 40 milhões a dois bilhões de anos atrás e a presença de resistência a esses antibióticos seja similarmente antiga (HALL; BARLOW, 2004). Estudos de metagenômica revelaram uma diversidade de genes de resistência homólogos aos conhecidos atualmente, amplamente distribuídos no meio ambiente. D'Costa e colaboradores reconstruíram genes de resistência à vancomicina, a partir de DNA metagenômico datado de 30.000 anos de idade e ficou demonstrado que as estruturas recuperadas possuíam função idêntica aos mecanismos de resistência à vancomicina que circulam nos hospitais atualmente (D'COSTA et al., 2011). De encontro a este mesmo raciocínio, análises filogenéticas sustentam que o surgimento de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina ocorreu há mais de uma década antes da meticilina ser sintetizada e introduzida na clínica (HARKINS et al., 2017). A partir desses achados, a hipótese do desenvolvimento da resistência bacteriana torna-se inconsistente, devido à ancestralidade histórica desses genes (D'COSTA et al., 2011).

Normalmente, microrganismos ambientais possuem uma gama de determinantes de resistência localizadas nos cromossomos, reflexo da sua longa história de interação com outros microrganismos, dentre eles os produtores de antibióticos. Entretanto, com bactérias patogênicas a situação não se repete, pois, o nicho em que se encontram é muito restritivo. Muitos deles são habitantes da microbiota de humanos e animais ou são hospedeiros de uma área específica. Em virtude desse ambiente restrito, ciclos de crescimento mais curtos, nichos ecológicos especializados, a presença de genes de resistência intrínseca é menor, porém com o surgimento dos antimicrobianos e a pressão seletiva exercida por eles o cenário mudou e essas bactérias passaram a adquirir determinantes de resistência através de elementos genéticos móveis (WAGLECHNER; WRIGHT, 2017).

Os determinantes de resistência podem ser classificados dependendo da natureza do alvo antimicrobiano e do mecanismo bioquímico de resistência (MORAR; WRIGHT, 2010), entre os principais estão: i) aquisição de uma ou mais mutações no gene da proteína alvo do

antimicrobiano impedindo que ocorra a ligação (WRIGHT, 2010) (por exemplo, modificação de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) que confere resistência à penicilina e mutações nos genes da DNA girase e topoisomerase IV que conferem resistência às fluoroquinolonas) (MUNITA; ARIAS, 2016); ii) produção de enzimas que degrade o antimicrobiano (β -lactamases) (BONOMO, 2017; RAMIREZ; TOLMASKY, 2010); iii) aumento do efluxo do antimicrobiano através das bombas de efluxo; iv) alteração no transporte de compostos para dentro da célula através da diminuição na expressão dos canais de porinas; v) aquisição de vias metabólicas alternativas daquelas que foram inibidas pelo medicamento (RAMIREZ; TOLMASKY, 2010; VAN HOEK et al., 2011; WRIGHT, 2010).

A resistência bacteriana pode ser classificada em três principais categorias: a) Resistência intrínseca, que compreende todos os mecanismos inerentes de um determinado microrganismo que restringe a ação dos antimicrobianos, que podem incluir a presença de estruturas celulares como a membrana externa relativamente impermeável das bactérias Gram negativas, estados fisiologicamente inativos como biofilme e esporos, assim como a presença de genes e proteínas (geralmente espécie específico) que resultam na baixa sensibilidade a determinado antimicrobiano (WRIGHT, 2010); b) Resistência adquirida, que se refere à incorporação de material genético por meio de plasmídeos, transposons (sequências de DNA capazes de se movimentar de uma região para a outra no genoma de uma célula), e integrons (elementos genéticos que podem capturar e expressar genes de outras fontes) e mutações; c) Resistência adaptativa, que é definida como habilidade temporária que a bactéria tem de sobreviver à pressão exercida por um antimicrobiano, promovendo alterações gênicas ou na expressão de proteínas devido à exposição a um gatilho ambiental. Este último mecanismo é dependente da presença de antimicrobiano. (BLAIR et al., 2015; FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012; PARTRIDGE, 2015; SANDOVAL-MOTTA; ALDANA, 2016).

A resistência adquirida ocorre por meio da transferência horizontal de genes e é considerada a principal responsável pela evolução bacteriana e pela disseminação de genes de resistência (MUNITA; ARIAS, 2016). A aquisição de material genético pela bactéria é possível por meio de três mecanismos: 1) Transformação, quando o microrganismo incorpora material genético de um organismo que sofreu lise celular; 2) Transdução, quando a aquisição de material genético se dá por meio de bacteriófagos e 3) Conjugação, troca de material genético entre os microrganismos através dos plasmídeos (ANDERSSON; HUGHES, 2010;

MUNITA; ARIAS, 2016). A conjugação contribui significativamente para a transferência horizontal de genes e para a plasticidade do genoma bacteriano (ILANGOVAN; CONNERY; WAKSMAN, 2015).

2.2 ENTEROBACTÉRIAS

A ordem Enterobacterales, na qual a família Enterobacteriaceae pertence, foi reorganizada, em 2016, com base na análise filogenética e na identificação de características moleculares conservadas, nas quais os membros da ordem puderam ser totalmente distinguidos. Assim, na nova classificação, a ordem Enterobacterales foi dividida em 7 famílias distintas: Enterobacteriaceae, Erwiniaceae, Pectobacteriaceae, Yersiniaceae, Hafniaceae, Morganellaceae e Budviciaceae. A nova família Enterobacteriaceae abrange um agrupamento monofilético distinto em árvores filogenéticas baseadas no genoma e em múltiplos genes e pode ser distinguida das demais famílias da ordem por 21 proteínas conservadas. Todos os gêneros pertencentes a esse grupo são catalase-positivos e oxidase-negativos. Abrangem essa família os principais gêneros de importância clínica: *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, entre outros (ADEOLU et al., 2016).

Enterobacteriaceae são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos que fermentam glicose e outros açúcares, reduzem nitrato a nitrito, são, em sua maioria, móveis pela produção de flagelos peritríqueos. São chamados de “entéricas”, porque seu principal habitat é o trato gastrintestinal inferior dos seres humanos e animais, porém são amplamente distribuídas e encontradas no ambiente, água e solo (DONNENBERG, 2015). É muito comum esses microrganismos colonizarem rapidamente a orofaringe de pacientes hospitalizados (DE LASTOURS et al., 2015; JOHANSON; PIERCE; SANFORD, 1969). Os diferentes nicho em que esses microrganismos se encontram são determinantes na ocorrência de infecções oportunistas extraintestinais (DONNENBERG, 2015).

As enterobactérias são importantes patógenos tanto causando infecções comunitárias quanto hospitalares, sendo as mais comuns: infecção do trato urinário, infecção de corrente sanguínea, infecção do trato respiratório e da cavidade peritoneal (DONNENBERG, 2015). Infecções causadas por enterobactérias costumam ser particularmente graves, devido a facilidade com que esses microrganismos adquirem genes de resistência (PELEG; HOOPER,

2010). Mutações em genes cromossomais contribuem para a resistência antimicrobiana, porém Enterobacteriaceae são versáteis em compartilhar material genético por meio de elementos móveis, mecanismo muito mais eficiente no que diz respeito a disseminação da resistência (PARTRIDGE, 2015).

O principal mecanismo de resistência entre as enterobactérias clinicamente importantes é a hidrólise dos antimicrobianos β -lactâmicos pela ação de β -lactamases. Essa classe de antimicrobianos é o principal tratamento para doenças infecciosas causadas por esses microrganismos e a expressão dessas enzimas é um impediante crítico na seleção da terapia medicamentosa (BUSH; JACOBY, 2010).

Nesse contexto, enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos são consideradas um dos problemas de saúde pública mais urgentes atualmente (CDC, 2013; WHO, 2017). Infecções causadas por microrganismos resistentes a esses antimicrobianos podem elevar a taxa de mortalidade em até 50%. Isso porque os carbapenêmicos são uma das últimas alternativas para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos resistentes (VAN DUIN et al., 2013). Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, especialmente *E. coli* e *K. pneumoniae* eram incomuns até o ano 2000, porém a prevalência dobrou na última década em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) (GUPTA et al., 2011; KELLY; MATHEMA; LARSON, 2017).

Para alarmar ainda mais a situação, em 2016 foi identificado o gene de resistência à colistina presente em plasmídeos de enterobactérias. A colistina era considerada o último recurso de tratamento para infecções causadas por microrganismos resistentes aos carbapenêmicos. A disseminação desse gene ocorreu de maneira silenciosa e rapidamente foi descrito em diversos países (SUN et al., 2018).

2.3 β -LACTAMASES: CLASSIFICAÇÃO E EPIDEMIOLOGIA

Antimicrobianos β -lactâmicos são agentes bactericidas que interrompem a formação da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela ligação covalente às proteínas ligadoras de penicilina, enzimas envolvidas nas etapas finais da reticulação do peptidoglicano dessas bactérias (BUSH; BRADFORD, 2016). A integridade da parede

celular bacteriana é essencial para a manutenção celular em um ambiente hipertônico e hostil como soro, urina, muco pulmonar ou trato gastrointestinal (BONOMO, 2017).

Há quatro mecanismos pelos quais um microrganismo pode tornar-se resistente aos β -lactâmicos: mudanças na proteína alvo do antimicrobiano, perda ou redução na produção de proteínas de membrana; superexpressão de bombas de efluxo e por fim, a produção de β -lactamases que é o mecanismo mais comum e importante em bactérias Gram negativas (BONOMO, 2017).

Atualmente, há 1.557 β -lactamases descritas na literatura (NCBI, 2019). A classificação dessas enzimas foi feita segundo o seu grupo funcional (Quadro 1) (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

As enzimas do grupo 1 são chamadas de cefalosporinases, codificadas no cromossomo de muitas espécies de enterobactérias, conhecidas como AmpC. São mais ativas contra cefalosporinas e geralmente não são inibidas pelo ácido clavulânico. O grupo 2 corresponde ao maior grupo de enzimas, chamadas de serino- β -lactamases. Neste grupo estão incluídas as: i) β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) - que conferem resistência às oximino-cefalosporinas, ii) carbapenemases do tipo KPC - que conferem resistência às oximino-cefalosporinas e carbapenêmicos e iii) as oxacilinas, que conferem resistência às oxacilinas, cefalosporinas e, alguns tipos, aos carbapenêmicos. A maioria das enzimas desse grupo é inibida pelo ácido clavulânico. E, finalmente, as enzimas que englobam o grupo 3 são representadas pelas metalo- β -lactamases. Diferem-se estruturalmente das outras β -lactamases pela presença de dois íons de zinco no sítio ativo. São distinguidas principalmente por hidrolisarem carbapenêmicos e não serem inibidas pelo ácido clavulânico, mas pelo EDTA (BUSH; JACOBY, 2010)

As β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de terceira e quarta geração e sua atividade é inibida na presença de um inibidor de β -lactamase, como por exemplo, ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. São encontradas principalmente em enterobactérias e já foram descritas em todas as partes do mundo (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017). Estima-se que mais de 1,5 bilhão de pessoas no mundo sejam colonizadas por microrganismos produtores de ESBLs (WOERTHER et al., 2013).

Quadro 1. Esquema de classificação das β -lactamases.

Funcional	Molecular	Substrato	Inibidores		Características	Representantes
			AC/TZB*	EDTA		
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrolisa melhor Cefalosporinas do que Benzilpenicilinas. Hidrolisa Cefamicinas.	ACT-1, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise de Cefotaxima aumentado	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrolisa melhor Benzilpenicilinas do que Cefalosporinas.	PC1
2b	A	Penicilinas e primeiras Cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similar para Penicilinas e Cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a geração e Monobactâmicos	Sim	Não	Hidrólise aumentada para oximino- β -lactâmicos	TEM-3, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência ao Ácido Clavulânico, Tazobactam, Sulbactam	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de 3 ^a e 4 ^a geração e Monobactâmicos	Não	Não	Hidrólise aumentada para oximino- β -lactâmicos combinada com resistência aos inibidores	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada para Carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina e Cefepime	Sim	Não	Hidrólise aumentada para Carbenicilina, Cefepime, Cefpiroma	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	V**	Não	Hidrolisa Cloxacilina ou Oxacilina	OXA-1, OXA-10

Continuação						
Funcional	Molecular	Substrato	Inibidores		Características	Representantes
			AC/TZB	EDTA		
2de	D	Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração	V**	Não	Hidrolisa Cloxacilina ou Oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	V**	Não	Hidrolisa Cloxacilina ou Oxacilina e Carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de 3ª e 4ª geração	Sim	Não	Hidrolisa Cefalosporinas, é inibida pelo Ác. Clavulânico. Não hidrolisa Aztreonam	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	V**	Não	Hidrólise aumentada para Carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos e Cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Amplo espectro de hidrólise para Carbapenêmicos, mas não Aztreonam	IMP-1, VIM-1, NDM-1
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrolisa Carbapenêmicos preferencialmente	L1, CAU-1, GOB-1

*Ácido clavulânico/ Tazobactam. ** Variável. Fonte: adaptado de Bush e Jacoby (2010).

As primeiras β -lactamases descritas foram as não-ESBLs do tipo SHV e TEM, encontradas em *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente, conferem resistência à ampicilina, mas não hidrolisam as oximino-cefalosporinas (PATERSON; BONOMO, 2005). Em meados de 1980, algumas substituições específicas de aminoácidos dessas enzimas mudaram seu substrato e passaram a hidrolisar cefalosporinas (KLIEBE et al., 1985).

O grupo CTX-M é uma família de β -lactamase, distinta das enzimas do tipo TEM e SHV, composta exclusivamente de ESBLs. Foi descrita pela primeira vez em 1989 na Alemanha (BAUERNFEIND; GRIMM; SCHWEIGHART, 1990) e nos anos 2000 já havia superado as enzimas TEM e SHV na frequência de ESBLs em que eram encontradas (DOI; IOVLEVA; BONOMO, 2017). Essas enzimas são divididas em seis grupos distintos: CTX-

M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25, KLUC. Cada grupo se diferencia em mais de 10% na identidade da sequência dos aminoácidos e dentro de cada grupo estão inseridas numerosas variantes (D'ANDREA et al., 2013). Acredita-se que a enzima CTX-M foi capturada do cromossomo de *Kluyvera* por elementos genéticos móveis, como as sequências de inserção ISEcp1 ou ISCR1 e inseridas em plasmídeos de *E. coli* (POIREL et al., 2005). O grupo CTX-M é a ESBL mais disseminada globalmente, podendo ser encontradas em vários grupos de plasmídeos. São encontradas principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, porém não se restringe a apenas essas duas espécies. A ESBL CTX-M-15 é mais comumente encontrada em humanos e pertencente ao grupo CTX-M-1, seguida de CTX-M-14 que pertence ao grupo CTX-M-9 (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; D'ANDREA et al., 2013).

No Brasil não há estudo de vigilância nacional capaz de mensurar a epidemiologia das β -lactamases em todas as regiões; há, no entanto, estudos pontuais sobre o assunto. Em 2016, foi publicada uma revisão sistemática sobre a predominância de bla_{CTX-M} no Brasil, em que a ESBL do tipo CTX-M-2 era predominante, seguida de CTX-M-15 do grupo 1. Todavia, diversas variantes foram identificadas, como CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-59 (CTX-M do grupo 2), as quais foram reportadas principalmente nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro que são os estados que mais publicaram estudos sobre o assunto (Rocha et al., 2016). Em 2014, um estudo realizado em Santa Catarina, no Hospital Universitário Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC) encontrou β -lactamases do tipo TEM como mais prevalente, seguida de CTX-M-grupo 1 (ZAMPARETTE, 2014).

A produção de carbapenemases é considerada um problema de saúde global, pois essas enzimas possuem capacidade de hidrolisar todos ou quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos. São codificadas por genes que estão localizados principalmente em plasmídeos e podem ser transferidas horizontalmente para outros microrganismos através dos elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons), e normalmente estão associadas a outros genes que conferem resistência a outros antimicrobianos (MELETIS; CHATZIDIMITRIOU; MALISIOVAS, 2015).

O fenótipo de resistência aos carbapenêmicos pode se dar principalmente pela aquisição de carbapenemases ou pela produção de cefalosporinases combinadas com a diminuição da permeabilidade da membrana celular bacteriana. O fenótipo dessa resistência

pode variar dependendo da taxa de hidrólise da carbapenemase, os níveis de expressão da enzima e o estado da permeabilidade do microrganismo (QUEENAN; BUSH, 2007).

As carbapenemases podem ser classificadas em dois grandes grupos: as serino-carbapenemases, que possuem o mecanismo hidrolítico baseado no resíduo de serina (KPC, GES/IBC, IMI/NMC-A, SFC-1, SME, OXA-48) e as metalo-carbapenemases, que possuem um ou dois íons de zinco na sua atividade catalítica (IMP, VIM, NDM, GIM, SIM, AIM, FIM) (NORDMANN; POIREL, 2002; QUEENAN; BUSH, 2007).

A carbapenemase do tipo KPC foi relatada pela primeira vez em 1996, na Carolina do Norte, nos Estados Unidos da América (EUA) (YIGIT et al., 2001) e ressurgiu nos anos 2000 em Nova Iorque causando extensivos surtos em Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) (CHEN et al., 2014). É disseminada globalmente e é considerada a carbapenemase predominante nos EUA, Colômbia, Argentina, Brasil, Itália, Grécia, Israel e China (GUH et al., 2015; LUTGRING, 2019; SILVIA MUNOZ-PRICE et al., 2013).

As metalo-carbapenemases normalmente são encontradas em enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (BONOMO, 2017). Em 2008, foi relatada uma nova metalo-carbapenemase na Suécia, nomeada NDM-1, em *K. pneumoniae* e *E. coli* de um paciente que havia retornado da Índia para um tratamento médico (YONG et al., 2009). Essa enzima é considerada endêmica no sul asiático (HAWKEY, 2015).

A metalo-carbapenemase VIM foi descrita pela primeira vez em um isolado de *P. aeruginosa* de um paciente do Hospital Universitário de Verona em 1999 (LAURETTI et al., 1999). Desde então foi descrita em vários países, tanto em *P. aeruginosa* quanto em enterobactérias, porém são mais comumente reportadas na Grécia, Itália e Rússia (BONOMO et al., 2018; LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

A metalo-carbapenemase IMP foi inicialmente descrita em *P. aeruginosa* de um isolado do Japão em 1991 (WATANABE et al., 1991) e em 1999 foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* em Singapura (KOH et al., 1999). Esta carbapenemase está disseminada pelo mundo, mas é considerada endêmica no Japão e em Taiwan (BONOMO et al., 2018; LOGAN; WEINSTEIN, 2017).

A carbapenemase do tipo OXA-48 é a oxecilina que tem sido reportada em enterobactérias. Esta enzima possui um baixo poder hidrolítico contra carbapenêmicos e uma maior atividade contra oximino-cefalosporinas, como ceftazidima e ceftriaxona (POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012). Foram reportados principalmente em Enterobacteriaceae na

Turquia, em alguns países da Europa, como Bélgica e França e no norte da África (POTRON et al., 2016).

No Brasil, os primeiros relatos de resistência a carbapenêmicos surgiram no final dos anos 80, em um estudo de vigilância feito em São Paulo, Rio de Janeiro e Salvador, quando foi encontrada uma taxa de 1% de resistência ao imipenem entre os isolados de *E. coli* e 6% entre os isolados de *Enterobacter* spp. (DE GODOY et al., 1989). Mas foi só em 2006 que foi publicado o primeiro relato de carbapenemase no país, IMP-1 em *K. pneumoniae*, isolado em 2003, pertencente ao ST442 (LINCOPAN et al., 2006). A carbapenemase KPC foi descrita pela primeira vez no país em 2009, treze anos após o surgimento da KPC nos EUA (MONTEIRO et al., 2009). Atualmente, KPC-2 é a carbapenemase mais disseminada no país, sendo mais frequentemente encontrada em *K. pneumoniae* (SAMPAIO; GALES, 2016). A metalo-carbapenemase NDM foi reportada pela primeira vez em 2013, em um isolado de *P. rettgeri*, no sul do País (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

2.4 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA ÀS POLIMIXINAS

Polimixinas B e E (Colistina), pertencem a uma classe de antimicrobianos de peptídeos cíclicos, não ribossomais, catiônicos, com uma cauda hidrofóbica que tem ação contra bactérias Gram-negativas pela ruptura da membrana por meio de interações polares hidrofóbicas. As regiões catiônicas interagem com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) na membrana celular externa, onde desloca íons de magnésio e cálcio (CANIAUX et al., 2017; SUN et al., 2018). Devido a sua nefrotoxicidade e neurotoxicidade, esse fármaco deixou de ser utilizado na clínica, porém devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos, foi reintroduzido como última opção terapêutica (BROWN; DORMAN; ROY, 1970; CANIAUX et al., 2017; KOH et al., 1999; SPAPEN et al., 2011).

Polimixinas vinham sendo amplamente utilizadas na criação de animais de corte para fins profiláticos e terapêuticos (SUN et al., 2018). No Brasil era utilizada como promotor de crescimento principalmente na criação de aves e suínos (FERNANDES et al., 2016a). Entretanto, visando remediar o problema de resistência às polimixinas na saúde humana e animal, a importação e a fabricação do sulfato de colistina, com a finalidade de aditivo

zootécnico melhorador de desempenho na alimentação animal, foi proibida no Brasil no final de 2016 (BRASIL, 2016).

A resistência às polimixinas pode se dar por diversos mecanismos: alteração do lipídeo A; formação de cápsula, como mecanismo de virulência, mostrou interferir na sensibilidade à polimixina em *K. pneumoniae*. Em *A. baumannii* a resistência pode estar associada a mutações no sistema de dois componentes PmrAB ou pela perda progressiva do LPS devido a mutações nos genes *lpxA*, *lpxC* e *lpxD*. Além disso, os sistemas de efluxo podem ser responsáveis pela resistência à polimixina em *P. aeruginosa* (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

Em 2016, foi descoberto o gene *mcr-1*, um novo mecanismo de resistência à polimixina, presente em plasmídeos encontrados em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* provenientes de porcos e humanos na China (LIU et al., 2016). Este gene codifica uma proteína transmembrana citoplasmática encontrada em bactérias Gram-negativas. Essa proteína é uma pEtN transferase, que anexa uma porção pEtN ao lipídeo A, ocultando os grupos fosfato carregados negativamente na superfície bacteriana, consequentemente diminuindo a atração eletrostática da colistina (SON et al., 2019). Atualmente foram descritos doze variações do gene *mcr-1* e cinco grupos distintos (SUN et al., 2018)

Logo após a descoberta do gene *mcr-1* em 2016, ele já foi descrito em mais de 40 países, abrangendo cinco dos sete continentes e, desde então, vem sendo encontrado em isolados produtores de β -lactamases (SUN et al., 2018). Acredita-se que o uso indiscriminado de polimixina na agricultura tenha sido a força motriz para o surgimento e disseminação deste gene em plasmídeos (WANG et al., 2017).

Este gene foi descrito a primeira vez no Brasil em 2016, em isolados de *E. coli* provenientes de frangos (LENTZ et al., 2016). Desde então, já foi descrito em isolados de animais, ambiente e amostras clínicas (FERNANDES et al., 2016b; LORENZONI et al., 2018; PILLONETTO et al., 2019; SACRAMENTO et al., 2018). O gene *mcr-1* foi reportado em isolados produtores de ESBL e carbapenemases e em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Salmonella* (AIRES et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; PALMEIRA et al., 2018; RAU et al., 2018; SACRAMENTO et al., 2018; TONINI et al., 2018).

2.5 PLASMÍDEOS

A transferência horizontal de genes possui importantes implicações evolutivas, pois permite a recombinação homóloga entre espécies intimamente relacionadas ou não e promove a integração de novas informações genéticas, que permitem a rápida adaptação a ambientes e condições de estresse (SMILLIE et al., 2010). A HGT, como foi mencionado anteriormente, pode ocorrer por três mecanismos: transformação, transdução e conjugação. Apesar da HGT ser um processo de adaptação bacteriana, apenas a transformação pode ser controlada pelo microrganismo. Tanto a transdução como a conjugação são mediadas por vetores semi-autônomos – fagos e elementos conjugativos, dos quais os plasmídeos são os mais significantes (THOMAS; NIELSEN, 2005).

Plasmídeos são importantes vetores para a transferência de outros elementos genéticos móveis e genes de resistência e virulência adquiridos. Podem variar de tamanho desde menos de um kilobase até várias megabases (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015). Sua permanência extracromossômica deriva da sua capacidade de se replicar e, portanto, ser transmitida a uma população de células hospedeiras. Isso requer sistemas genéticos complexos dedicados à sua transferência vertical. Sistemas de conjugação e mobilização também podem estar presentes, permitindo que os plasmídeos sejam capazes de se transferirem horizontalmente (PARTRIDGE et al., 2018).

A estrutura dos plasmídeos é modular, consequência da recombinação genética, formando um mosaico de genes. Essa estrutura pode ser dividida em genes com funções de manutenção do plasmídeo, chamada de “espinha dorsal” e genes acessórios que codificam características benéficas para o seu hospedeiro. Os genes de manutenção possuem funções de replicação, segregação e conjugação, sendo que esta última não está presente em todos os plasmídeos (HARRISON; BROCKHURST, 2012).

A replicação plasmidial se inicia em uma região chamada de origem (*ori*), desencadeada por um transcrito de RNA ou, mais comumente, pela ligação de uma proteína de iniciação (*Rep*), codificada pelo gene *rep*, para as sequências repetidas de DNA proximais chamadas de iterons. O *ori* e o *rep* formam a conformação básica de todos os plasmídeos, o *replicon* mínimo. Deste modo, os plasmídeos codificam a sua iniciação de replicação, mas usualmente recrutam a maquinaria de replicação do hospedeiro (helicase, primase,

polimerase) para a própria síntese de DNA. As interações de dependência de proteínas de replicação do hospedeiro são um dos fatores que limitam a faixa de hospedeiros possíveis de um plasmídeo (PARTRIDGE et al., 2018).

O número de cópias de um plasmídeo também desempenha um papel importante na manutenção e segregação do plasmídeo na célula, sendo assim, quanto maior o número de cópias de um plasmídeo, maior é a probabilidade de duas células receberem pelo menos uma cópia do mesmo. Quando se trata de um plasmídeo com elevado número de cópias, a sua segregação pode ocorrer de maneira aleatória, porém plasmídeos de baixo número de cópias requerem mecanismos específicos de segregação como sistemas de partição. Esses sistemas vão garantir que cópias do plasmídeo migrem para os polos opostos da célula antes da divisão celular. Além disso, os sistemas de partição também determinam a incompatibilidade dos plasmídeos, ou seja, plasmídeo com o mesmo sistema de partição não são mantidos na mesma célula (GAMA; ZILHÃO; DIONISIO, 2018)

Outra característica que pode determinar a gama de hospedeiros que o plasmídeo irá atingir é sua capacidade de conjugação, ou seja, se é capaz de se auto transferir para outra célula. A conjugação pode ser um processo extremamente promíscuo, sendo chamado de troca genética transgênica (LACROIX; CITOVSKY, 2016). A transferência de genes de resistência de plasmídeos não conjugativos pode acontecer pela mobilidade de outros elementos genéticos móveis (*integrans*, *transposons*, sequências de inserção) que são transferidos para outros *replicons* funcionais (cromossomo ou outros plasmídeos). Portanto, mesmo que o plasmídeo possua uma faixa estreita de hospedeiros, ele pode atuar como “vetor suicida” para a disseminação horizontal de genes de resistência (PARTRIDGE et al., 2018).

Plasmídeos conjugativos normalmente carregam conjuntos completos de genes necessários para a transferência: origem da transferência (*oriT*), proteína relaxase, proteína de acoplamento do tipo IV (T4CP) e o sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015). A relaxase é a proteína essencial para a conjugação, uma vez que reconhece a origem da transferência (*oriT*), uma pequena sequência de DNA na qual é a única requerida em *cis* para um plasmídeo ser transferido por conjugação. A relaxase catalisa a fase inicial da conjugação, ou seja, a clivagem inicial de *oriT* no doador, para produzir a cadeia de DNA que será transferida, e a ligação final do DNA transportado para a célula receptora (SMILLIE et al., 2010). O T4CP está envolvido na conexão entre o relaxossoma e o canal de transporte, responsável também por dar energia ao processo de transporte do DNA. A proteína de acoplamento (T4CP) recruta o complexo relaxase-DNA para um T4SS,

responsável pela translocação do DNA do doador para a célula receptora (DRAPER et al., 2005; FRONZES et al., 2009; GARCILLÁN-BARCIA et al., 2007).

As proteínas constituintes do T4SS podem ser divididas em três classes de acordo com as suas funções: as proteínas do canal de translocação, as proteínas do pilus e as ATPases que fornecem a energia necessária para o sistema funcionar. O canal de translocação é a maior estrutura do sistema e compreende as proteínas VirB3, VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 e VirB10. Pili são estruturas tubulares extracelulares envolvidas na transferência do DNA para a célula receptora. Morfologicamente, há dois tipos de pilus observados dentro do sistema T4SS: pilus do tipo F que é longo e flexível e pilus do tipo P, curto e rígido. A formação do pilus compreende duas proteínas VirB, VirB2 e VirB5, componentes principais e secundários respectivamente. Por fim, o sistema T4SS possui três ATPases que geram energia ao sistema: VirB4, VirB11 e VirD4 (ILANGO VAN; CONNERY; WAKSMAN, 2015)

Atualmente, existe três tipos de classificação dos plasmídeos. Há um esquema de classificação dos plasmídeos baseado na sua estabilidade durante a conjugação, um fenômeno chamado de incompatibilidade plasmidial, proposto em 1971. A incompatibilidade (Inc) é definida como a inabilidade de plasmídeos que compartilham sistemas de replicação e partição semelhantes sejam propagados estavelmente em uma mesma célula (DATTA; HEDGES, 1971). A classificação por grupo de incompatibilidade é sempre baseada na sequência de aminoácidos da proteína de iniciação da replicação (Rep), porém há algumas dificuldades nesta metodologia: os plasmídeos frequentemente carregam múltiplos *replicons*, sendo difícil a classificação dos mesmos em um único grupo. Além disso, informações detalhadas sobre os grupos de incompatibilidade ou por tipos de *replicon* são limitadas em algumas taxonomias bacterianas (SHINTANI; SANCHEZ; KIMBARA, 2015).

Mais recentemente, em 2009 e 2010, foi criada uma nova classificação para os plasmídeos conjugativos (ou mobilizáveis) em seis tipos de mobilidade de acordo com a sequência de aminoácidos das proteínas relaxases dos sistemas (MOB_C, MOB_F, MOB_H, MOB_P, MOB_Q e MOB_V) (GARCILLÁN-BARCIA; ALVARADO; DE LA CRUZ, 2011; PILAR GARCILLÁN-BARCIA et al., 2009; SMILLIE et al., 2010). Adicionalmente, foi criada uma classificação utilizando o sistema de secreção T4SS envolvido na formação do acoplamento (MPF) durante a conjugação. Foram propostas quatro classes de MPF de acordo com a sequência de aminoácidos de T4SS (MPF_F, MPF_G, MPF_I e MPF_T) (SMILLIE et al.,

2010). A classificação baseada no sistema de mobilidade é capaz de cobrir todos os plasmídeos já que raramente os plasmídeos possuem mais de um gene de relaxase, porém não é possível classificar plasmídeos não conjugativos (GARCILLÁN-BARCIA; ALVARADO; DE LA CRUZ, 2011; PILAR GARCILÍ AN-BARCIA et al., 2009; SMILLIE et al., 2010).

Baseado na classificação de incompatibilidade plasmidial, em 2005, foi padronizada uma metodologia para a identificação de plasmídeos por PCR convencional, tendo como alvo os *replicons* das grandes famílias de plasmídeos que ocorrem nas enterobactérias, chamada de tipagem do *replicon* baseado em PCR (PBRT) (CARATTOLI et al., 2005). Esse método foi desenvolvido para classificar os *replicons* dos plasmídeos de 18 grandes grupos de incompatibilidade em Enterobacteriaceae. Entretanto, com a identificação de novos plasmídeos e *replicons* por meio de sequenciamento em larga escala de genomas e de plasmídeos, ocorreu a extensão da metodologia para a identificação de 28 *replicons* diferentes. O agrupamento dos plasmídeos em grupos de incompatibilidade sustenta hoje tanto a técnica de PBRT quanto a plataforma digital *PlasmidFinder* (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) para classificação *in silico* dos *replicons* de Enterobacteriaceae (CARATTOLI et al., 2014). Por ser uma metodologia baseada em PCR multiplex convencional, é laboriosa e nem sempre é capaz de detectar as variantes do *replicon*, principalmente se essas variantes estão localizadas nos sítios de ligação dos iniciadores, além disso, frequentemente encontram-se plasmídeos com múltiplos *replicons*, mosaïcismo em *replicons* (PILAR GARCILÍ AN-BARCIA et al., 2009). No entanto, somando-se outras características bacterianas específicas, como a presença de genes de resistência, características de clonalidade, a tipagem de plasmídeos por PBRT (*PCR-based replicon typing*) é uma ferramenta importante na análise comparativa de linhagens relacionadas ou não relacionadas durante investigações epidemiológicas (CARATTOLI et al., 2014).

O sequenciamento de nova geração em larga escala tornou-se uma importante ferramenta para a identificação de genes de resistência aos antimicrobianos, de novos plasmídeos, e ainda no auxílio para estabelecer a relação clonal entre microrganismos (CABOCHE; AUDEBERT; HOT, 2014; CARATTOLI et al., 2014). A análise comparativa da sequência do plasmídeo tem fornecido informações sobre a evolução e relação entre os plasmídeos quanto a sua estrutura molecular e à existência de regiões denominadas “*hotspots*” para a inserção de genes acessórios (SMALLA; JECHALKE; TOP, 2015). Porém, a dificuldade na análise de bioinformática e na montagem dos plasmídeos, devido à grande quantidade de

dados geradas por esse tipo de sequenciamento é um obstáculo a ser transposto (CARATTOLI et al., 2014; ORLEK et al., 2017; ROOSAARE et al., 2018; ZANKARI et al., 2012).

Nem todas as famílias de plasmídeos ocorrem com a mesma frequência em enterobactérias clinicamente relevantes (CARATTOLI et al., 2014). No entanto, a promiscuidade com que ocorre a transferência de genes de resistência em Gram-negativos é tão grande que é impossível relacionar o gene de resistência a apenas um grupo de plasmídeo (CARATTOLI, 2013).

Plasmídeos do grupo IncF têm sido associados com a ESBL CTX-M-15, a resistência mais disseminada no mundo (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017; CARATTOLI, 2013). Além disso, plasmídeos IncF estão relacionados com a disseminação de outros determinantes de resistência, como a carbapenemase KPC, β -lactamases AmpC plasmidiais (*bla_{CMY}* e *bla_{DHA}*), genes de resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos (*aac(6')*-324 Ib- cr, *qnr*, *qepA*, *armA* e *rmt*) (CARATTOLI, 2009).

Outras famílias de plasmídeos possuem papel importante na disseminação de genes de resistência, como o grupo IncL/M, responsável por espalhar o gene *bla_{CTX-M-3}* na Europa (GOLEBIEWSKI et al., 2007). O gene *bla_{CTX-M-9}* foi disseminado na Europa por plasmídeos da família IncHI2 (NOVAIS et al., 2007), associados também por transmitir o gene *bla_{CTX-M-2}* em reservatórios animais (FERNANDEZ et al., 2007).

Na última década, plasmídeos pertencentes ao grupo IncA/C vêm sendo relacionados à dispersão de *bla_{CMY-2}* (LINDSEY et al., 2009). Adicionalmente, o gene da metalo-carbapenemase NDM-1 foi encontrado no mesmo grupo de incompatibilidade, compartilhando o mesmo plasmídeo com o gene *bla_{CMY-2}* e outros determinantes de resistência aos aminoglicosídeos (JOHNSON et al., 2012). O gene *bla_{NDM-1}* já foi localizado em diferentes tipos de plasmídeos, incluindo IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 e IncN. Entretanto, dois grupos de plasmídeos, IncA/C e IncHI1 são mais frequentemente associadas com este gene (CARATTOLI, 2013).

O grupo de plasmídeos IncL/M foi identificado em associação com genes de resistência que codificam ESBLs (*bla_{CTX-M-3}* e *bla_{SHV-5}*), carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*), β -lactamase do tipo AmpC (*bla_{FOX-7}*), bem como genes que conferem resistência a todos os aminoglicosídeos. Em particular, um único plasmídeo epidêmico

IncL/M foi envolvido na disseminação de *bla*_{OXA-48} (CARATTOLI et al., 2015; DI PILATO et al., 2014; PARTRIDGE et al., 2012; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012; SMET et al., 2010).

A disseminação do gene *mcr-1* ocorreu predominantemente pelos grupos: IncI2, IncX4 e IncHI2 (SUN et al., 2018), no entanto este gene foi descrito em outras famílias de plasmídeos como: IncP, IncHI1, IncFII, IncFIB, IncY e IncK (DONÀ et al., 2017; MCGANN et al., 2016; NORDMANN et al., 2016; XAVIER et al., 2016; ZENG et al., 2016; ZHANG et al., 2017; ZHAO et al., 2017; ZURFLUH et al., 2016). Esses plasmídeos foram descritos em diferentes espécies bacterianas de diferentes localizações geográficas (SUN et al., 2018). No Brasil, o plasmídeo IncX4 parece estar envolvido na disseminação do gene *mcr-1* (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2017; FERNANDES et al., 2016b; MONTEIRO et al., 2009; MORENO et al., 2019; SACRAMENTO et al., 2018; SELLERA et al., 2016).

No Brasil, há poucos trabalhos envolvendo a caracterização dos plasmídeos mediadores de resistência. Em 2012, um estudo que avaliou *E. coli* demonstrou a presença do grupo IncA/C em isolados carreando CTX-M-2, CTX-M-9 e CTX-M-59 (QUEIROZ et al., 2012). Em 2015, foi publicado um estudo descrevendo os grupos de plasmídeos IncA/C, IncI1, IncF, IncHI1, IncFIB carreando as ESBLs CTX-M-2 e CTX-M-59 (DROPA et al., 2015). Andrade e colaboradores, em 2018, relataram a ligação entre os genes *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{KPC-2} aos grupos IncN, IncR, IncFIik e IncL/M entre isolados de *K. pneumoniae* (ANDRADE et al., 2018). Também em 2018, foi descrito a presença do grupo IncU carreando o gene *bla*_{CTX-M-8} em *Shigella sonnei* (SERIBELLI et al., 2018). A descoberta do gene *mcr-1* pareceu impulsionar estudos caracterizando plasmídeos no país, conforme foi citado acima.

Plasmídeos são os principais responsáveis pela rápida adaptação bacteriana frente às mudanças ambientais. A disseminação de genes de resistência a antimicrobianos entre microrganismos de mesma espécie e de espécies diferentes é, com certeza, o exemplo mais expressivo da plasticidade bacteriana (SMALLA; JECHALKE; TOP, 2015). Além disso, os genes de resistência presentes em grandes plasmídeos conjugativos podem persistir por meses, mesmo na ausência da pressão seletiva causada pelo antimicrobiano. Portanto, conhecer o ambiente molecular em que os genes de resistência se encontram dentro dos plasmídeos é importante para definição de estratégias epidemiológicas de contenção da disseminação (KAMRUZZAMAN et al., 2017).

3 METODOLOGIA

3.1 COLABORAÇÕES E ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo fez parte de um projeto de microbioma hospitalar denominado “*Healthcare Associated Infections Microbiome Project*” (HAIMP), que visou o rastreamento, a identificação e a caracterização de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar. O projeto possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC) sob o número 32930514.0.0000.0121. Foram coletadas amostras de pacientes, do ambiente hospitalar, e de profissionais da área da saúde, que participaram do estudo de forma voluntária, assinando um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Para que este projeto fosse realizado diversas instituições foram envolvidas: Neoprospecta Microbiome Technologies S/A, start-up de biotecnologia, localizada em Florianópolis; o Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU-UFSC), local em que foram coletadas as amostras; Laboratório de Microbiologia do HU-UFSC, onde foram feitas as identificações e testes de sensibilidade aos antimicrobianos; Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), do departamento de Análises Clínicas do Centro de Ciências da Saúde da UFSC (CCS-UFSC), coordenado pela Prof.^a Dr.^a Thaís Cristine Marques Sincero; Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS), coordenado pela Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Bazzo, onde foram feitas as reações de qPCR; Laboratório de Protozoologia, localizado no departamento de Microbiologia e Parasitologia do Centro de Ciências Biológicas da UFSC (MIP-CCB- UFSC), coordenado pelo Prof. Edmundo Carlos Grisard; Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e o Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciência Biomédicas da Universidade de São Paulo, coordenado pelo professor Nilton Lincopan, onde foram feitos o sequenciamento completo de quatro dos isolados.

3.2 AMOSTRAGEM

As amostras dos pacientes foram coletadas do reto, narinas e mãos. Dos profissionais foram coletadas amostras das mãos, vestimenta e celular. Por fim, do ambiente hospitalar

foram escolhidas superfícies de alto contato como: leito do paciente (grades e botões das macas) sala de lanche (bancada de refeições, cafeteira, micro-ondas); recepção das unidades (computadores, telefone e bancada); sala de repouso dos médicos e da equipe de enfermagem (camas e armários); vestiários (armários dos funcionários); banheiros dos pacientes (pia e descarga), consultórios médicos (mesa e maca) e equipamentos de uso comum como carrinho de banho e poltrona de fisioterapia.

Durante a fase de coleta de amostras do HAIMP, foram coletadas 180 amostras durante os meses de abril a setembro de 2015 e 95 a partir de outubro de 2015 a março de 2016. Essa alteração foi feita levando-se em consideração os custos gerados por coleta e análise preliminar dos resultados obtidos nos seis primeiros meses de coleta. Retiraram-se os locais que não foram considerados relevantes, permanecendo apenas os críticos. As coletas foram feitas nas unidades: Unidade de Terapia Intensiva (UTI), Clínica Médica I (CMI), Clínica Cirúrgica I (CRI), Centro Cirúrgico (CC) e Emergência adulta (EMG). Todas as amostras foram coletadas com *swab* de rayon (Copan Diagnostics, Inc.).

Os isolados do projeto HAIMP selecionados para este projeto faziam parte das coletas realizadas entre abril e outubro de 2015, pelo fato dessas amostras terem sido identificadas e por terem sido feitos os testes de sensibilidade aos antimicrobianos. A fase de coleta durante esses meses gerou um total de 1.175 amostras. Adicionalmente, para avaliar um maior número de plasmídeos circulantes em isolados clínicos, foram incluídos mais 53 isolados de enterobactérias MDR identificados pelo Setor de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do HU (LAC/HU), selecionados entre janeiro de 2016 a março de 2018.

O critério de escolha dos isolados para este projeto foi se tratar de microrganismos multirresistentes. Para isso, levou-se em consideração o resultado do teste de sensibilidade aos antimicrobianos de todos os isolados e os critérios de classificação de multirresistência publicado por Magiorakos e colaboradores (2012). Esses critérios foram sugeridos pelos centros de controle e prevenção de doenças americano e europeu (CDC – *Centers for Disease Control and Prevention* e ECDC – *European Centre for Disease Prevention and Control*), em que é considerado MDR (*Multidrug resistant*) o microrganismo que não é sensível a um ou mais agentes pertencentes a três ou mais categorias de antimicrobianos. O microrganismo é classificado como XDR (*Extensive drug resistant*) quando não é sensível a um ou mais agentes pertencentes a todas as categorias de antimicrobianos, com exceção de uma ou duas classes. Por último, o microrganismo é considerado PDR (*Pandrug resistant*) se for resistente a um ou mais agentes de todas as categorias de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012).

3.3 IDENTIFICAÇÃO FENOTÍPICA DOS ISOLADOS

A identificação dos isolados foi feita no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC pela metodologia automatizada Vitek2® (bioMérieux) de acordo com as recomendações do fabricante. O cartão utilizado para a identificação dos bacilos Gram-negativos foi o GN *Test Kit*, com 47 testes bioquímicos, dentre os quais é possível detectar a utilização de fontes de carboidratos, atividades enzimáticas e de resistência, além de controle negativo. O sistema de transmitância ótica permite a interpretação dos testes utilizando-se diferentes comprimentos de onda no espectro visível. Durante a incubação, uma leitura foi feita a cada quinze minutos para medir a turbidez ou a coloração dos produtos do metabolismo bacteriano (BIOMÉRIEUX, 2006; PINCUS, 2005).

As suspensões bacterianas foram feitas a partir das colônias puras e isoladas em placas de MacConkey. Com o auxílio de uma alça bacteriológica estéril, uma quantidade suficiente de colônias foi adicionada à 3 mL de salina estéril (0.45% NaCl) até a obtenção de uma suspensão entre 0.5 – 0.63 na escala de McFarland ($\sim 10^8$ UFC/mL). A turbidez da suspensão foi ajustada de acordo com a escala desejada com o auxílio do aparelho DensiChek™. Os tubos contendo as suspensões de cada bactéria foram colocados nas raques do equipamento, adicionando-se os cartões de identificação e introduzindo-os no equipamento para o início da análise. O cartão foi automaticamente preenchido com a suspensão bacteriana através de um sistema a vácuo e selado. Cada cartão foi submetido a leituras cinéticas de fluorescência a cada 15 minutos e o resultado foi liberado em aproximadamente dez horas. Os resultados foram comparados com o banco de dados do próprio equipamento Vitek2®.

3.4 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) também foi realizado no equipamento automatizado Vitek2® (bioMérieux). A partir da suspensão bacteriana que foi feita para a identificação (0,5 – 0,63 na escala de McFarland), adicionou-se 45 µL em um novo tubo contendo 3 mL de salina. Esta nova suspensão foi inserida com o cartão AST N239 no equipamento.

O sistema avalia o padrão de crescimento do microrganismo na presença do antimicrobiano e compara o crescimento com o crescimento do controle, com isso, é possível fazer uma estimativa matemática da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada antimicrobiano. Os resultados são liberados com base nos consensos dos comitês internacionais, como o CLSI (BIOMÉRIEUX, 2006).

3.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada para os doze isolados selecionados para o sequenciamento completo do genoma (Seção 3.6.5). Assim, para os isolados resistentes aos carbapenêmicos, a CIM foi determinada para os antimicrobianos imipenem (Sigma-Aldrich, EUA) e meropenem (Sigma-Aldrich, EUA) e para os isolados resistentes à colistina, a CIM foi determinada para polimixina B (Sigma-Aldrich, EUA). A metodologia adotada para a determinação da CIM foi microdiluição em caldo segundo as normas estabelecidas pela CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2018). Os critérios interpretativos seguiram as recomendações do CLSI para os antimicrobianos imipenem e meropenem e segundo BrCAST (Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) para a polimixina B (BRCAST, 2019) (Quadro 2). O controle de qualidade dos testes foi feito adicionando em todos os ensaios uma cepa controle sensível (*E. coli* ATCC 25922) e um isolado resistente (*bla*_{KPC} positivo ou *mcr-1* positivo).

Quadro 2. Pontos de corte para determinação de CIM para Enterobacterales.

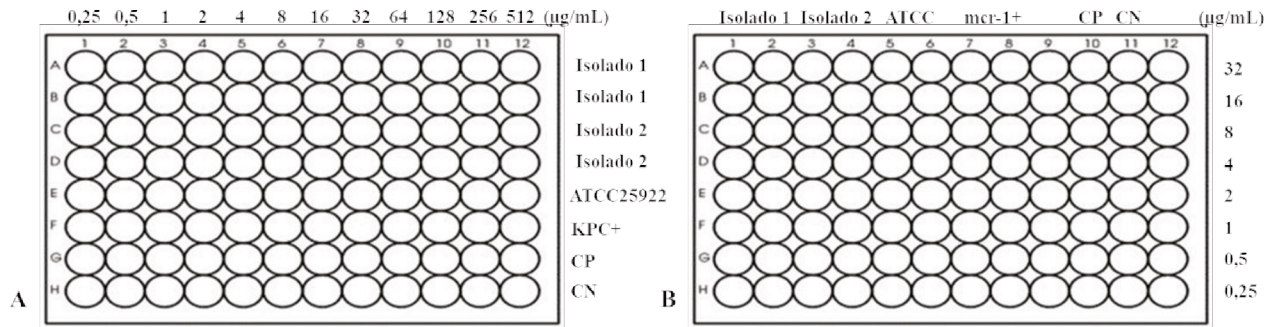
Antimicrobiano	Pontos de corte		
	S	I	R
Imipenem*	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem*	≤ 1	2	≥ 4
Polimixina B**	2	-	> 2

*: Pontos de corte segundo CLSI, 2018. **: Ponto de corte segundo BrCAST. Fonte:(BRCAST, 2019; CLSI, 2018)

Utilizou-se placas de poliestireno de 96 poços com fundo em U estéreis para a cultura celular. O meio utilizado foi o caldo Mueller Hinton Cátion ajustado com pH de 7,4 +/- 0,2 (Sigma-Aldrich, EUA). Foram adicionados 100 µL do meio de cultura concentrado 2X

na placa de 96 poços. Posteriormente, adicionou-se 100 μL do antimicrobiano diluído a uma concentração, em que uma vez adicionado ao meio de cultura, ficasse em concentrações superiores e inferiores aos pontos de corte estabelecidos pelo CLSI e BrCAST (Figura 1).

Figura 1. Representação esquemática dos desenhos das placas para a determinação da CIM para os antimicrobianos imipenem, meropenem e polimixina B.



A: Desenho esquemático das placas com imipenem e meropenem; B: Desenho esquemático das placas com polimixina B. CP: controle positivo (sem antimicrobiano); CN: controle negativo (sem bactérias). Fonte: elaborado pela autora.

A preparação do inóculo foi feita a partir das amostras isoladas em ágar triptona de soja (SigmaAldrich, EUA) incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ *overnight*. Preparou-se uma suspensão em solução salina estéril a 0,5 da escala McFarland a partir de colônias isoladas, determinada pelo equipamento DensiCHEK™ Plus (Biomérieux). Essa suspensão foi diluída 1:10 para que se obtivesse uma concentração de células de aproximadamente 10^7 UFC/mL e então, 5 μL foram adicionados em duplicata às placas contendo o meio com antimicrobianos previamente preparadas. A concentração final de células foi de aproximadamente 5×10^4 UFC/poço. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas. A interpretação do resultado foi feita visualmente pela formação de sedimento bacteriano ou turbidez do meio de cultura (Figura 2).

Figura 2. Interpretação visual da determinação da CIM.



Isolado 1: última concentração de crescimento foi na concentração de 128 µg/mL de imipenem, logo a CIM é 256 µg/mL. A CIM do isolado 2 é 64 µg/mL, da ATCC 25922 é $\leq 0,25$ µg/mL e do isolado KPC+ é 4 µg/mL

Fonte: elaborado pela autora.

3.6 ANÁLISE GENOTÍPICA DOS ISOLADOS

3.6.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi feita com a metodologia baseada em NaCl de Abraão e colaboradores com modificações (ABRÃO et al., 2005).

Os isolados bacterianos foram semeados em ágar MacConkey (Kasvi®) e incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após esse período, com o auxílio de uma alça bacteriológica, adicionou-se aproximadamente 5 colônias isoladas de cada bactéria em 400 µL de tampão de extração TES (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA 0,5 M pH 8,0, SDS 20%). A suspensão bacteriana foi colocada em banho-maria a 100°C por 10 minutos. Em seguida foi adicionado, em cada amostra, 1 µL de Proteinase K (50mg/mL) (Promega Corporation, USA) e os tubos foram transferidos para banho-maria 42°C por uma hora. Após este período foram adicionados 84 µL de uma solução de NaCl 6M em cada microtubo que foi homogeneizado por inversão e centrifugado a $1.100 \times g$ por 5 minutos. Retirou-se o sobrenadante (aproximadamente 350 µL) e transferiu-se para outro microtubo. A precipitação do DNA foi feita com 700 µL de etanol absoluto gelado e centrifugado $1.100 \times g$ por 5

minutos. O álcool foi descartado vertendo-se os microtubos e o DNA sedimentado foi lavado duas vezes com 1.000 μ L etanol 70% gelado. Após cada lavagem ocorreu uma etapa de centrifugação a 1.100 x g por 2 e 5 minutos, respectivamente. O sobrenadante foi descartado invertendo-se o microtubo com cuidado para não desprender o sedimento de DNA. Os microtubos com o DNA foram mantidos na estufa a 60°C até a secagem completa. O sedimento formado foi suspenso em 150 μ L de água ultrapura livre de DNase. O DNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm, no equipamento NanoVue Plus (GE- General Electric) e sua pureza foi observada pela relação 260/280nm e 260/230nm.

Os DNAs extraídos foram utilizados nos ensaios de detecção de genes de resistência por qPCR e para a determinação dos grupos de Incompatibilidade dos plasmídeos.

3.6.2 Amplificação gênica de β -lactamases

O genótipo de resistência aos antimicrobianos foi determinado pela pesquisa de genes de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos pela metodologia de PCR quantitativo (qPCR). Para o projeto HAIMP a empresa Neopropecta desenvolveu um ensaio para a detecção de onze grupos de genes de resistência aos β -lactâmicos para Enterobacteriaceae, incluindo β -lactamases (SHV-1), β -lactamases de espectro estendido (SHV-ESBL, CTX-M dos grupos 1, 2, 8, 9 e 25) e carbapenemases (KPC, IMP, VIM, NDM, OXA-48). Os ensaios foram feitos por qPCR multiplex em equipamento ABI 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). De acordo com o ponto de corte pré-estabelecido, foram consideradas positivas as amostras com $Cq^1 \leq 33$. As sequências dos iniciadores e as condições das reações são propriedade da empresa Neopropecta Microbiome Technologies.

Para os isolados que não faziam parte do projeto HAIMP, foi desenvolvido um ensaio para detecção dos genes de β -lactamases por qPCR, utilizando o Bryt™ Green (Promega Corporation, USA) como intercalante de DNA. Ao todo foram detectados 12 grupos de β -lactamases (bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} – grupos 1, 2, 8 e 9, bla_{KPC} , bla_{NDM} , bla_{IMP} , bla_{VIM} , bla_{GES} , bla_{OXA-48}) e *mcr-1* (Quadro 3). Os iniciadores foram desenhados utilizando-se

¹ *Quantification Cycle*: É o ciclo em que ocorre a amplificação do produto de PCR e que se encontra com o ponto de corte (*Threshold*).

o programa *Primer Select* versão 3.0.25 (Lasergene, DNA Star) para que o produto final amplificado ficasse entre 100 – 250 pares de bases. Em seguida, a especificidade de cada iniciador foi avaliada na ferramenta *PrimerBlast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), disponível no site GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Os iniciadores foram desenhados para amplificar as regiões mais conservadas dos genes e, somado ao fato de que existem vários subtipos de cada enzima, obteve-se a amplificação de diversos subtipos de β -lactamases que estão agrupados em cada gene (Quadro 3).

As reações de qPCR foram feitas com o *kit* GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, USA) que utiliza o intercalante de DNA BRYT Green® Dye. As reações foram realizadas em placas de 96 poços (MicroAmp Optical, Applied Biosystems®) para um volume final de 10 μ L por reação. Todas as reações foram feitas em triplicatas técnicas, incluindo controle negativo e controle positivo para todos os genes (Quadro 4). O mix foi preparado com 5 μ L do Master Mix GoTaq® qPCR (2X), 1 μ L de cada iniciador (0,1 μ M), 2,0 μ L de água livre de nucleasse e 1 μ L de DNA na concentração de 5 ng/ μ L.

As reações ocorreram sob as seguintes condições: 95°C por 5 minutos, 40 ciclos de 95°C por 30 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 63°C por 40 segundos para pareamento dos iniciadores. Após o fim dos 40 ciclos, foi realizada a curva de dissociação por meio da elevação gradual da temperatura (1°C) de 60°C a 95°C, mantendo-se por 15 segundos em cada temperatura. O termociclador utilizado nas reações foi o Mastercycler® ep realplex (Eppendorf), do Laboratório de Biologia Molecular, Microbiologia e Sorologia (LBMMS).

As amostras foram avaliadas conforme o *Cq* (*Quantification cycle*) utilizando um *Threshold*² que foi fixado manualmente para cada gene pesquisado. Foram consideradas positivas as amostras com o *Cq* menor que 30. Para amostras com *Cq* entre 27 e 30 a reação foi repetida e foi realizada uma eletroforese em gel de agarose a 1% para a confirmação visual do tamanho do produto.

² Threshold: Linha traçada arbitrariamente na fase exponencial da curva de amplificação para determinar o valor de *Cq*.

Quadro 3. Iniciadores para a detecção de genes de resistência aos β -lactâmicos e à polimixina e os subtipos amplificados para cada par de iniciador.

β -lactamase	Sequência dos iniciadores		Produto (pb)	Genes amplificados
TEM	F	GTTGGGAACCGAGCTGAATGAA	231	<i>bla</i> _{TEM} : 1, 2, 12, 17, 26, 30, 32, 33, 34, 35, 40, 45, 53, 54, 55, 57, 60, 63, 67, 70, 76, 77, 79, 80, 81, 83, 84, 87, 90, 95, 96, 97, 98, 99, 104, 105, 106, 110, 116, 122, 124, 126, 127, 128, 129, 133, 135, 141, 143, 145, 146, 148, 150, 153, 154, 156, 157, 158, 159, 160, 162, 163, 164, 166, 168, 171, 176, 183, 184, 186, 194, 195, 198, 201, 206, 208, 209, 210, 214, 215, 216, 217, 219, 220
	R	CACGCTCACCGCTCCAGATT		
SHV	F	GGCCGCGTAGGCATGATAGAAA	202	<i>bla</i> _{SHV} : 2, 3, 5, 8, 9, 11, 12, 13, 15, 16, 24, 25, 26, 27, 31, 32, 33, 35, 36, 37, 38, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 48, 49, 50, 51, 52, 55, 56, 57, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 85, 86, 89, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 101, 102, 103, 104, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 119, 120, 121, 128, 129, 132, 133, 134, 135, 137, 142, 143, 144, 145, 146, 156, 157, 160, 164, 168, 172, 173, 178, 179, 183, 185, 186, 187, 188, 190, 191, 194
	R	TGACCGCGGAGTAGTCCACCAG		
CTX-M-1	F	GCAAACCTCTGCGGAATCTGACG	182	<i>bla</i> _{CTX-M1} : 1, 3, 12, 15, 22, 23, 28, 29, 33, 42, 52, 54, 55, 60, 62, 66, 69, 72, 79, 80, 82, 96, 101, 103, 114, 116, 117, 132, 136, 139, 142, 144, 150, 155, 156, 157, 162, 163, 164, 167, 170, 172, 173, 176, 179, 180, 181, 182, 183, 184
	R	CCGCGATATCGTTGGTGGTG		
CTX-M-2	F	GATGGCGACGCTACCCCTGC	204	<i>bla</i> _{CTX-M2} : 2, 4, 5, 6, 7, 20, 31, 35, 43, 44, 56, 59, 76, 77, 92, 95, 97, 115, 124, 131, 141, 165, 171
	R	GCGGCCGCCATCACCTTACT		
CTX-M-8	F	GGGGCGGTTGGGAGTGG	237	<i>bla</i> _{CTX-M8} : 8, 40, 63
	R	CCGCCAGCGTCATCGTGC		
CTX-M-9	F	AATCCGATTGCCGAAAAACACG	135	<i>bla</i> _{CTX-M9} : 9, 13, 14, 16, 17, 19, 21, 24, 27, 38, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 65, 73, 81, 83, 84, 85, 87, 90, 93, 98, 99, 102, 104, 105, 112, 113, 122, 125, 126, 129, 130, 132, 134, 137, 147, 148, 159, 168, 174
	R	AGCCGTCACGCCCTCCCG		
KPC	F	GCCGCTGGCTGGCTTTTCTG	120	<i>bla</i> _{KPC} : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 22, 24, 25
	R	GCGCCTGAGCCGGTATCCAT		
NDM	F	GGTTTCGGGGCAGTCGCTTC	184	<i>bla</i> _{NDM1} : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16
	R	CCATACCGCCCATCTTGTCTG		
IMP	F	ACGGGTGGGGCGTTTTTCC	183	<i>bla</i> _{IMP} : 1, 3, 6, 10, 25, 30, 34, 40, 52, 55
	R	CTATTCCGCCCGTGTGTCG		
VIM	F	CAGATTGCCGATGGTGTGGTTC	157	<i>bla</i> _{VIM} : 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 14, 15, 18, 17, 19, 20, 23, 24, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 50, 51
	R	CAATCTCCGCGAGAAGTGCCG		
OXA-48	F	GCGGTGCAGCTTAGCGACAATG	224	<i>bla</i> _{OXA-48} : 48, 162, 163, 199, 244, 245, 247, 252, 370, 405, 438, 439, 505
	R	GTCAGTGCGCCGCATAGAGG		
GES	F	GCGAGCACGTATGAGCAAGATG	107	<i>bla</i> _{GES} : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31
	R	GGCCGAAATTGGAATACCAACCG		
mcr-1	F	GCTCTTTGGCGGATGCTACTG	181	mcr-1
	R	GGTCTCGGCTTGGTGGTCTG		

Fonte: elaborado pela autora.

Quadro 4 Controles positivos dos genes de β -lactamases testados.

β -lactamase	Espécie	Fonte
CTX-M-1	<i>E. coli</i>	Laboratório ALERTA/SP
CTX-M-2	<i>K. pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
CTX-M-8	<i>K. pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
CTX-M-9	<i>K. pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
TEM	<i>E. coli</i>	LAC/HU-UFSC
SHV	<i>K. pneumoniae</i>	LAC/HU-UFSC
GES	<i>P. aeruginosa</i>	Laboratório ALERTA/SP
KPC	<i>K. pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
NDM	<i>K. pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
IMP	<i>P. aeruginosa</i>	Laboratório ALERTA/SP
VIM	<i>P. aeruginosa</i>	Hospital das Clínicas/SP
OXA-48	<i>K. pneumoniae</i>	Laboratório ALERTA/SP
mcr-1	<i>E. coli</i>	LACEN/PR

Fonte: elaborado pela autora.

3.6.3 Detecção dos Grupos de Incompatibilidade de Plasmídeos

A detecção dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos dos isolados desse projeto foi feita pela metodologia de tipagem do *replicon* baseada em PCR (PBRT). Este ensaio possui como alvo os *replicons* das grandes famílias de plasmídeos que ocorrem em Enterobacteriaceae e detecta 28 grupos de plasmídeos (CARATTOLI et al., 2014; CARLONI et al., 2017).

Os iniciadores foram retirados da literatura (Quadro 5) e o ensaio foi feito tentando reproduzir igualmente as reações de PCR multiplex e simplex contidas no PBRT *kit* (Diatheva, Fano, Italy). Os iniciadores foram separados em oito reações de PCR multiplex e quatro reações de PCR simplex, quando não foi possível a padronização das reações em multiplex. Foi possível identificar 29 grupos de incompatibilidade, um grupo de incompatibilidade a mais que o *kit* de PBRT (X4).

Quadro 5. Sequência dos iniciadores para a detecção dos grupos de incompatibilidade de plasmídeos separados por esquemas de reações de PCR

Reação de PCR	Nome do alvo	Sequência dos iniciadores (5' - 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
M1	FIA	F - CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG R - GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462	(CARATTOLI et al., 2005)
	FIB	F - GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG R - CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	702	
	W	F - CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG R - GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242	
M2	P	F - CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA R - TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534	(CARATTOLI et al., 2005)
	X3	F - GTTTTCTCCACGCCCTTGTTCA R - CTTTGTGCTTGGCTATCATAA	351	(JOHNSON et al., 2012)
M3	T	F - TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT R - CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750	(CARATTOLI et al., 2005)
	A/C	F - GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA R - ACGACAAACCTGAATTGCCCTCCTT	465	(CARATTOLI et al., 2005)
	FIIs	F - CTAAAGAATTTTGATGGCTGGC R - CAGTCACTTCTGCCTGCAC	259-260	(VILLA et al., 2010)
M4	U	F - TCACGACACAAGCGCAAGGG R - TCATGGTACATCTGGGCGC	843	(GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009)
	X1	F - GCTTAGACTTTGTTTTATCGTT R - TAATGATCCTCAGCATGTGAT	461	(JOHNSON et al., 2012)
	R	F - TCGCTTCATTCCTGCTTCAGC R - GTGTGCTGTGGTTATGCCTCA	251	(GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2009)
	FIIk	F - TCTTCTTCAATCTTGCCGGA R - GCTTATGTTGCACRGAAGGA	142-148	(VILLA et al., 2010)
M5	Y	F - AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG R - GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765	(CARATTOLI et al., 2005)
	X2	F - GCGAAGAAATCAAAGAAGCTA	678	(JOHNSON et al.,

		R - TGTTGAATGCCGTTCTTGTCCAG FIC F - GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG R - TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262	2012) (VILLA et al., 2010)
	K/B	F - GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R - TCTTTCACGAGCCCCGCCAAA	160	(CARATTOLI et al., 2005)
M6	HIB-M	F - CAAAACAGAGTATTCAACCC R - CTGATTCTTTTCGAGACAGGG	570	(VILLA et al., 2012)
	FIB-M	F - GTTACGATGGATGTGTCCC GC R - TATCAAGAGCCTTAAGGCGAA	440	
	FII	F - CTGATCGTTTAAGGAATTTT R - CACACCATCCTGCACTTA	258-262	(VILLA et al., 2010)
M7	HI 1	F - GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC R - TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471	(CARATTOLI et al., 2005)
	HI 2	F - GGCTCACTACCGTTGTCATCCT R - TTTCTCCTGAGTCACCTGTAAACAC	644	
	I 1	F - CGAAAGCCGGACGGCAGAA R - TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139	
M8	L/M	F - GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG R - CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785	(CARATTOLI et al., 2005)
	N	F - GTCTAACGAGCTTACCGAAG R - GTTTCAACTCTGCCAAGTTC	559	
	B/O	F - GCGGTCCGGAAAGCCAGAAAAC R - TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159	
S1	X4	F - AGCAAACAGGGAAAGGAGAAGACT R - TACCCCAAATCGTAACCTG	569	(JOHNSON et al., 2012)
S2	FIIy	F - TGGYAGGGAAGTGGTTCTG R - GTRAGTCACACCTTCCC GC	227	(VILLA et al., 2010)
S3	FIBs	F - TGCTTTTATTCTTAAACTATCCAC R - CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT	683	(VILLA et al., 2010)
S4	Fd	F - CTGATCGTTTAAGGAATTTT R - GGAATGTAGCACCCGAT	700	(VILLA et al., 2010)

Fonte: elaborado pela autora.

As concentrações dos reagentes para as reações de PCR não são disponibilizadas nas publicações e nem na bula do PBRT *kit*, portanto, utilizaram-se as condições das PCR padrões do Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada. O volume final das reações foi padronizado para 15 µL para suprir os volumes necessários nas reações de PCR multiplex. Adicionou-se 1,5 µL de Tampão 10X (100 mM Tris-HCl (pH 8,8 a 25°C), 500 mM KCl,

0,8% (v/v) Nonidet P40) (ThermoFisher Scientific), 0,9 μL de MgCl_2 (concentração final de 1,5 mM), 1,0 μL de cada iniciador (concentração final de 0,67 μM), 1,5 μL de dNTPs (cada desoxirribonucleotídeo trifosfato na concentração final de 0,2 mM) (InvitrogenTM – Life Technologies), 0,1 μL de Taq DNA Polimerase recombinante (concentração final de 0,033 U/ μL) (ThermoFisher Scientific), água ultrapura livre de DNase q.s.p, dependendo do esquema de reação e 1 μL de DNA a 50 ng/ μL .

As reações ocorreram sob as seguintes condições: 95°C por 10 minutos, 30 ciclos de 95°C por 60 segundos para a desnaturação da fita de DNA, 60°C por 30 segundos para ligação dos iniciadores e 72°C por 60 segundos para a extensão da fita e mais um ciclo de extensão final a 72°C por 5 minutos (CARATTOLI et al., 2005; CARLONI et al., 2017). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, a 80 V por uma hora em tampão TBE 1X (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA). Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$), visualizados em transiluminador de luz UV (LBT-HE/ Loccus) e fotografados. O padrão de tamanho molecular utilizado foi de 100 bp (Ludwig Biotecnologia).

3.6.4 Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)

A análise da similaridade genética entre os isolados foi avaliada pela técnica de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE). Os isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, por serem as espécies mais prevalentes neste estudo, foram submetidos a este ensaio.

3.6.4.1 Preparação dos blocos com DNA

Os isolados foram semeados em meio não seletivo TSA (*Tryptic Soy Agar*) e incubados em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Após este período, cerca de três colônias isoladas foram suspendidas em 5 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) (Sigma-Aldrich®) e mantidas novamente a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 a 24 horas. Posteriormente, as culturas foram centrifugadas a $1.110 \times g$ por 20 minutos e os sobrenadantes desprezados. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de TE-1 (100mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, pH 8,0) e transferido para um microtubo de 1,5 mL previamente pesado. Os microtubos foram

centrifugados a $1.235 \times g$ por 5 minutos. Após isso, todo o sobrenadante foi removido e o microtubo pesado novamente. Para que a concentração final da suspensão fosse de $1\text{mg}/\mu\text{L}$ para cada amostra, um volume de TE-1 foi adicionado ao sedimento de cada isolado. Dessa suspensão, $10 \mu\text{L}$ foram transferidos para outro microtubo contendo $200 \mu\text{L}$ de TE-2 (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0) acrescidos de $20 \mu\text{L}$ de Proteinase K ($50\text{mg}/\text{mL}$) (Sigma-Aldrich®). A essa mistura, foram adicionados $200 \mu\text{L}$ de agarose de baixo ponto de fusão (UltraPure™ Low Melting Point Agarose/Invitrogen™) a $1,5 \%$ (m/v), homogeneizada com a pipeta e posteriormente aplicou-se aos moldes de acrílico, com cuidado para não haver formação de bolhas. O molde foi acondicionado em refrigerador a 4°C por 30 minutos, até completa solidificação dos blocos. Então, os blocos foram removidos dos moldes e adicionados em tubos contendo 5mL de Tampão de lise (50mM 706 Tris, 50mM EDTA, 1% sarcosil) acrescidos de $10 \mu\text{L}$ de Proteinase K ($50 \text{mg}/\text{mL}$) e mantidos em banho-maria a 56°C por 2 horas. Após a incubação, o tampão de lise foi removido e os blocos sofreram cinco lavagens, duas com água ultrapura estéril e três com TE-2. Os intervalos entre as lavagens foram de 15 minutos a temperatura ambiente. Após as lavagens, os blocos foram armazenados em TE-2 a 4°C por até seis meses.

3.6.4.2 Clivagem do DNA

Para a clivagem do DNA com a enzima de restrição, os blocos foram cortados em pedaços de aproximadamente três milímetros e colocados em microtubos de $0,2 \text{mL}$ contendo $44 \mu\text{L}$ de água ultrapura estéril, $5 \mu\text{L}$ de Tampão Thermo Scientific Tango e $1 \mu\text{L}$ da enzima de restrição XbaI (10 unidades por amostra) (ThermoFisher Scientific®), que reconhece e cliva o DNA cromossômico no sítio de restrição T[^]CTAGA. A incubação ocorreu a 37°C por 4 horas.

3.6.4.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Utilizando-se o molde para 45 amostras, foi preparado um gel de agarose a $1,2\%$ (UltraPure Agarose – Invitrogen™). Após a completa solidificação da agarose, foram adicionados os blocos contendo o DNA clivado dos isolados e o padrão de tamanho molecular Lambda PFG Ladder (New England Biolabs Inc.). Procurou-se adicionar padrão no início do gel, meio e final. Os poços foram selados com agarose de baixo ponto de fusão.

O equipamento utilizado para a eletroforese foi o CHEF-DR® III (Bio-Rad®). Antes de programar a corrida, foram adicionados à cuba de eletroforese 2,5 litros de tampão TBE 0,5X e o módulo de resfriamento foi programado para 14°C. Após o tampão atingir a temperatura desejada o gel foi inserido no equipamento utilizando-se o molde e os fixadores.

A corrida foi programada para as seguintes condições: pulso inicial de 5 segundos, pulso final 35 segundos, voltagem 6 V/cm, ângulo de 120°, tempo de corrida 24 horas. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídeo na concentração de 1 µg/mL por 35 minutos, e logo após, submetido ao transiluminador UV (LTB-HE/ Loccus) para a visualização dos fragmentos de DNA e fotografado.

3.6.4.4 Análise dos Padrões Moleculares

A análise do padrão de bandas gerado foi feita com o programa Gel Compar II (Bionumerics Applied-Maths), no Laboratório de Efluentes Líquidos e Gasosos (LABEFLU), vinculado ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da UFSC, coordenado pela Prof^a. Dr^a. Rejane Helena Ribeiro da Costa. Um dendrograma foi gerado para cada espécie bacteriana analisada, em que o grau de similaridade entre as amostras foi determinado pelo coeficiente de Dice e a correlação para agrupamento foi calculado por UPGMA (do inglês, *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), com otimização de 1,5% e tolerância de 1,5%. A otimização limita o movimento para cada perfil de eletroforese como um todo e a tolerância limita o movimento de cada banda.

A interpretação dos perfis de bandas gerados por PFGE foi feita segundo os critérios propostos por Tenover e colaboradores (1995). Segundo os autores, os isolados são considerados indistinguíveis se seus padrões de restrição tiverem o mesmo número de bandas e as bandas correspondentes forem do mesmo tamanho. Isolados intimamente relacionados são identificados quando os seus padrões de bandas diferem por apenas um único evento genético, resultando em diferença de duas a três bandas. Um isolado é considerado como possivelmente relacionado quando ocorrerem dois eventos genéticos independentes, gerando diferença de quatro a seis bandas no seu perfil. Os isolados são considerados não relacionados quando o perfil de restrição difere em sete ou mais bandas (TENOVER et al., 1995).

3.6.5 Sequenciamento do genoma completo

Após a triagem dos isolados selecionados para esse projeto, 12 amostras foram escolhidas para serem submetidas ao sequenciamento do genoma completo. O critério de escolha foi a importância epidemiológica que o isolado possuía, com base nos determinantes de resistência, o local em que foi coletado e se os isolados geneticamente distintos foram obtidos de um mesmo paciente.

Quatro desses isolados foram sequenciados em parceria com o professor Nilton Lincopan, do Departamento de Microbiologia, do Instituto de Ciências Biomédicas de Universidade de São Paulo e as demais amostras foram sequenciadas pela empresa Neopropecta Microbiome Technologies. A metodologia empregada para o sequenciamento de todos os isolados foi a mesma, plataforma MiSeq™ (Illumina Inc.).

3.6.5.1 Sequenciamento

A extração do DNA dos isolados que foram sequenciados em São Paulo foi feita utilizando o *kit* PureLink™ Quick Gel Extraction (LifeTechnologies, Carlsbad, CA) e as bibliotecas foram preparadas usando o Nextera DNA Flex Library Prep *Kit* (Illumina Inc., San Diego, CA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os isolados sequenciados pela Neopropecta tiveram o DNA purificado utilizando a metodologia de pérolas magnéticas (*beads*) por protocolo proprietário (Neopropecta Microbiome Technologies, Brasil). As bibliotecas dos DNAs foram preparadas com o *kit* Nextera XT DNA Library Preparation (Illumina, Inc., EUA) de acordo com as recomendações do fabricante.

Os genomas dos 12 isolados foram sequenciados por meio do equipamento MiSeq Sequencing System (Illumina, Inc., EUA), com o *kit* V2, 500 ciclos e sequenciamento paired-end (reads 2 x 250pb).

3.6.5.2 Análises computacionais

Foi verificada a qualidade dos dados brutos das leituras do sequenciamento por meio da ferramenta FastQC versão 0.11.7 (disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>). A montagem das seqüências foi

feita utilizando-se o *pipeline* A5-miseq (COIL; JOSPIN; DARLING, 2015), em que foi feita a leitura *de novo* (remoção dos adaptadores, filtragem da qualidade e correção dos erros na geração dos *contigs*³ e *scaffolds*⁴). O programa CAP3 foi utilizado para melhorar as montagens dos *scaffolds*, revisando regiões de baixa qualidade e corrigindo possíveis erros na montagem dos *contigs* (HUANG; MADAN, 1999). As sequências pré-montadas foram anotadas utilizando o programa Prokka (SEEMANN, 2014).

Foram testadas algumas ferramentas de montagem diferentes para averiguar se haveria melhoramento na construção dos *contigs* e *scaffolds*. Para a trimagem das sequências (remoção de sequências de baixa qualidade nas extremidades, assim como adaptadores das leituras sequenciadas) foram utilizados o programa Trimmomatic v.0.36 (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) e o algoritmo Fastx-toolkit (disponível em: http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html). Posteriormente, a montagem *de novo* das sequências foi feita utilizando o *pipeline* SPAdes (BANKEVICH et al., 2012). Para as sequências trimadas pelo algoritmo Fastx-toolkit, a montagem *de novo* foi feita também pelo *pipeline* o A5-miseq (COIL; JOSPIN; DARLING, 2015). Foram considerados como parâmetros de qualidade da montagem: tamanho da sequência, número de *contigs* formados, tamanho do maior *contig*, a métrica N50 (que é calculada através da soma dos tamanhos dos *contigs*, em ordem decrescente, até que essa soma ultrapasse 50% do tamanho total da montagem (BRADNAM et al., 2013)), a métrica L50 (consiste no total de *contigs* necessários para atingir o N50), a métrica N90 (soma dos tamanhos dos *contigs*, em ordem decrescente, até que a soma ultrapasse 90% do tamanho total da montagem) e a métrica L90 (total de *contigs* necessários para atingir o N90).

A montagem dos plasmídeos foi feita utilizando o *pipeline* Plasmidspades (ANTIPOV et al., 2016). Para auxiliar a montagem dos plasmídeos foi utilizada a ferramenta de alinhamento online BLASTn⁵ para pesquisar sequências de plasmídeos similares às

³ *Contigs*: é a montagem contíguo de uma sequência na qual a ordem das bases é conhecida por um alto nível de confiança.

⁴ *Scaffold*: é a montagem de sequências de DNA maiores a partir da sobreposição de contigs separados por intervalos de comprimento conhecido. *Scaffolds* são compostos de *contigs* e *gaps*.

⁵ BLAST: encontra regiões de similaridade entre sequências biológicas. O programa compara sequências de nucleotídeos ou proteínas nos bancos de dados do NCBI e calcula a significância estatística. NCBI (National Center for Biotechnology Information) faz parte da Biblioteca Nacional de Medicina dos Estados Unidos (NLM), um ramo dos Institutos Nacionais de Saúde (NIH). Disponibiliza na sua plataforma online milhões de dados que englobam artigos científicos, sequência de nucleotídeos, informações de taxonomia.

encontradas neste projeto e posteriormente compará-las (disponível em: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). A cobertura das sequências dos plasmídeos depositados no GenBank foi verificada pelo alinhamento dessas sequências contra as leituras brutas obtidas no sequenciamento, utilizando-se o programa Bowtie2 (LANGMEAD; SALZBERG, 2012). A anotação dos plasmídeos também foi feita utilizando o programa Prokka (SEEMANN, 2014) e a visualização das sequências anotadas foi feita no programa Artemis (CARVER et al., 2012). A pesquisa de sequências de inserção, transposases foi feita utilizando a ferramenta *ISfinder* e inseridas nas anotações manualmente (SIGUIER et al., 2006).

Adicionalmente, genes de resistência foram pesquisados utilizando os bancos de dados *ResFinder* v.3.1 (ZANKARI et al., 2012) e *CARD* (*The Comprehensive Antibiotic Resistance Database*) (JIA et al., 2017), os *Sequence Types* (STs) dos isolados foram determinados utilizando-se o banco de dados MLST v.2.0 (LARSEN et al., 2012) e os plasmídeos foram pesquisados em *PlasmidFinder* v.2.0 (CARATTOLI et al., 2014) e o Sequence Type dos plasmídeos foram determinando pelo pMLST (CARATTOLI et al., 2014). Com exceção da base de dados *CARD*, todos os outros bancos de dados citados estão disponíveis no *Center for Genomic Epidemiology* (<http://www.genomicepidemiology.org/>). *CARD* também é uma plataforma *online* (disponível em: <https://card.mcmaster.ca/>). As figuras dos plasmídeos foram feitas utilizando os programas *SnapGene software* (GSL Biotech; disponível em: <https://www.snapgene.com>) e *BRIG* (*BLAST Ring Image Generator*) (ALIKHAN et al., 2011).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS GERAIS

O Hospital Universitário Professor Ernani Polydoro de São Thiago (HU-UFSC) foi fundado em 1980 e atende exclusivamente usuários do Sistema Único de Saúde (SUS). É o único hospital federal do estado. Atua nos três níveis de assistência: básica, média e alta complexidade. Tornou-se referência em diversas especialidades, especialmente na oncologia e cirurgias de grande porte, como transplante hepático (NECKEL; KUCHLER, 2010). O HU-UFSC é classificado como Hospital Geral, devido ao seu perfil institucional, atende à saúde na modalidade de internação nas quatro clínicas básicas: clínica médica, pediatria, ginecologia e obstetrícia e cirurgia geral; dispõe de serviços de apoio assistencial e de diagnóstico complementar, trabalha com serviços de urgência e emergência adulto, ginecológica e obstétrica e pediátrica e possui duas unidades de terapia intensiva (adulto e neonatal) (DE SALLES; SCHMIDT, 2018).

O hospital conta com aproximadamente 300 leitos nas unidades de internação (NECKEL; KUCHLER, 2010). Segundo o boletim estatístico do movimento hospitalar, em 2016 o HU-UFSC realizou 117.868 atendimentos emergenciais, 121.379 consultas ambulatoriais, 9.519 internações, 2.226 partos, 3.328 cirurgias e 13.361 cirurgias ambulatoriais (HU-BEMH, 2016).

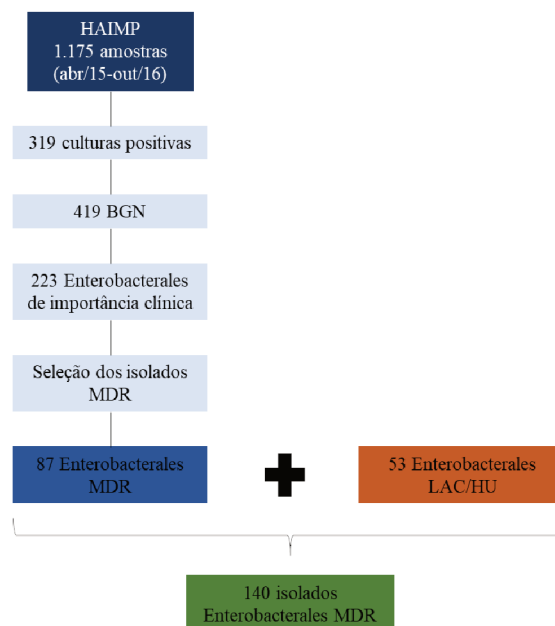
Segundo dados cedidos pelo Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HU-UFSC, no ano de 2015 a taxa global de infecção hospitalar foi de 6,14%, em 2016 de 5,41%, e em 2017 e 2018 essas taxas diminuíram para 4,97% e 3,94%, respectivamente, o que demonstra que parece haver uma tendência de diminuição da taxa de infecção hospitalar no HU-UFSC. Os bacilos Gram-negativos representam 62,2% dos microrganismos causadores de infecção hospitalar no HU-UFSC, sendo as espécies *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* sozinhas são responsáveis por 43,7% dessas infecções. Isolados de *K. pneumoniae* portadores do gene *bla_{KPC}* foram responsáveis por 11,5% das infecções hospitalares reportadas no hospital no ano de 2018.

4.1.1 Características dos isolados

Entre os meses de abril a outubro de 2015, o projeto HAIMP coletou 1.175 amostras provenientes do ambiente hospitalar, de profissionais da saúde e pacientes do HU-UFSC. Dessas amostras, 319 culturas foram positivas (27,1%), obtendo-se 453 isolados de bacilos Gram-negativos, isto porque, dependendo do sítio de coleta, mais de um isolado era identificado. Das 453 culturas positivas, 319 pertenciam a ordem Enterobacterales e 223 pertenciam às espécies de maior importância clínica: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae* complex, *Enterobacter aerogenes*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens* (Figura 3).

A seleção dos isolados multirresistentes para o presente estudo resultou em 87 amostras de bactérias pertencentes a ordem Enterobacterales provenientes do projeto HAIMP, sendo que 22 eram *E. coli*, 31 *K. pneumoniae*, quatro *K. oxytoca*, 24 *E. cloacae* complex, duas *S. marcescens*, uma *P. mirabilis*, uma *C. freundii*, uma *S. odorífera* e uma *S. rubidae*. Somados a essas amostras, mais 53 isolados de enterobactérias provenientes de amostras clínicas foram incluídas neste projeto, sendo 11 *E. coli*, 27 *K. pneumoniae*, 10 *E. cloacae* complex, duas *K. oxytoca*, duas *C. freundii*, uma *E. aerogenes*. No total, 140 isolados de Enterobacterales foram analisados (Tabela 1 e Figura 3).

Figura 3 Fluxograma da coleta e seleção dos isolados.



HAIMP: Healthcare Associated Infections Microbiome Project; BGN: Bacilo Gram negativo; MDR: Multidroga resistente; LAC/HU: Laboratório de Análises Clínicas do HU. Fonte: elaborado pela autora.

Tabela 1. Relação de isolados multirresistentes selecionados para o estudo.

Isolados	HAIMP	LAC-HU	Total
<i>E. coli</i>	22	11	33
<i>K. pneumoniae</i>	31	27	58
<i>E. cloacae</i>	24	10	34
<i>K. oxytoca</i>	4	2	6
<i>E. aerogenes</i>	0	1	1
<i>C. freundii</i>	1	2	3
<i>S. marcescens</i>	2	0	2
<i>P. mirabilis</i>	1	0	1
<i>S. odorifera</i>	1	0	1
<i>S. rubidaea</i>	1	0	1
Total	87	53	140

Fonte: elaborado pela autora.

A maior parte dos isolados MDR selecionados do HAIMP eram provenientes de pacientes, 65,5% (57/87): 50,6% (n=44) foram isolados de *swab* retal, sendo que 43% (n=19) foram isolados de *E. coli*, 34% de *K. pneumoniae* e 18% de *E. cloacae*. Mãos dos pacientes e leito foram os outros sítios em que mais se identificaram isolados MDR, com 10,3% (n=9) cada um (Quadro 6).

Entre os isolados clínicos, o sítio em que mais se identificou isolados MDR foi urina, representando 45% (n=24) desses isolados, seguidos por *swabs* de vigilância com 34% (n=18) das amostras (Quadro 6).

Quadro 6. Distribuição dos isolados multirresistentes por sítio de coleta.

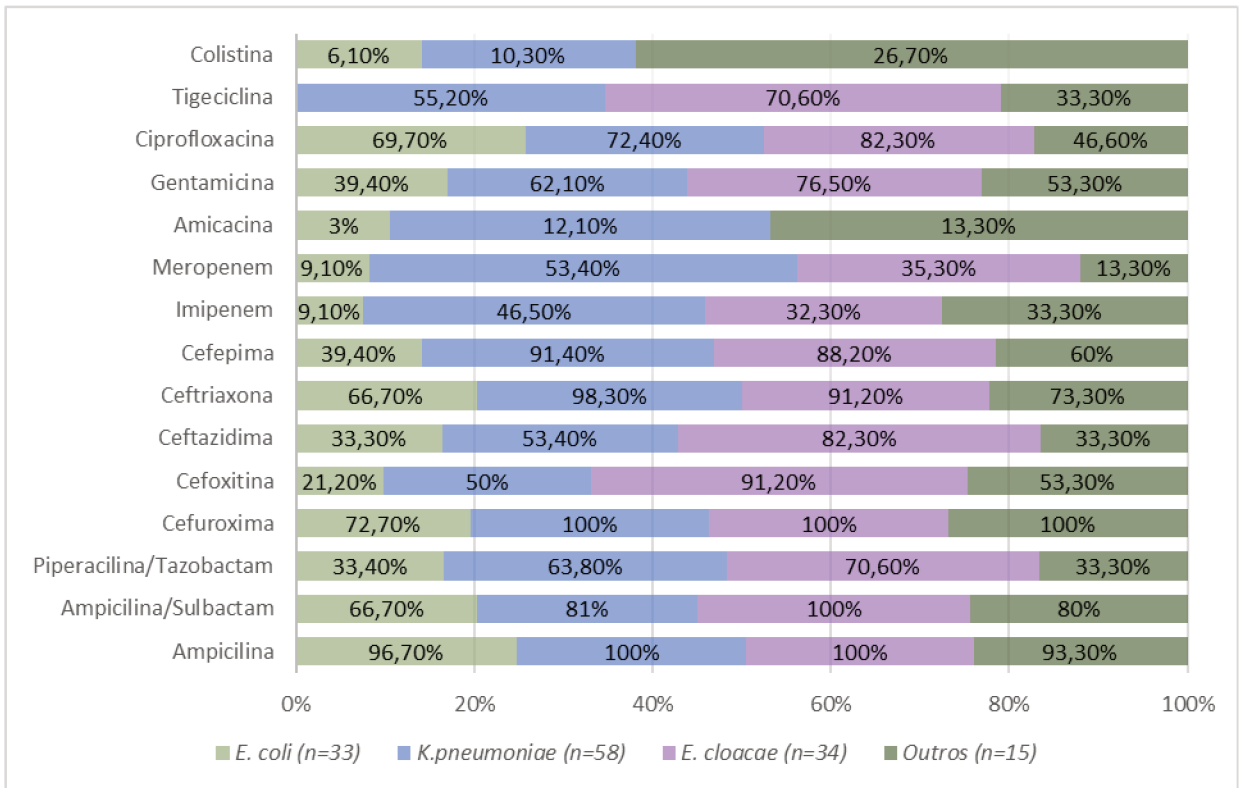
HAIMP		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	Outras espécies*	Total
Paciente	Retal	19	15	8	2	44
	Mãos	1	3	4	1	9
	Nasal		2	2		4
Profissionais	Mãos	1		1		2
	Vestimenta			2		2
Ambiente	Sala de lanche		3	1	2	6
	Posto enfermagem			1		1
	Leito	1	4	4		9
	Consultório				2	2
	Poltrona fisioterapia		2			2
	Carrinho de banho		1			1
	Banheiro		1	1	3	5
Total		22	31	24		87
Isolados Clínicos		<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>	Outras espécies**	Total
Sítio de coleta	Urina	7	10	5	2	24
	Sangue		4		1	5
	Cateter		1			1
	Lesão	1				1
	Líquidos		3	1		4
<i>Swab</i> retal de vigilância		3	9	4	2	18
Total		9	22	10		53

* *K. oxytoca*, *S. marcescens*, *S. odorifera*, *S. rubidae*, *P. mirabilis*, *C. freundii*. ** *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *C. freundii*. Fonte: elaborado pela autora.

4.1.2 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos

O teste de sensibilidade foi realizado pela metodologia automatizada Vitek2® para os 140 isolados selecionados. A análise do perfil de sensibilidade dos isolados foi o primeiro passo para o estudo dos determinantes genéticos de resistência (Figura 4).

Figura 4. Representação gráfica dos perfis de resistência apresentados pelos 140 isolados MDR, com ênfase nas espécies mais frequentes.



Outros: *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *S. odorifera*, *S. rubidea*. Fonte: elaborado pela autora.

Por se tratar apenas de isolados multirresistentes, as altas taxas encontradas de resistência aos antimicrobianos já eram esperadas, com destaque para a ampla resistência aos β -lactâmicos. A resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração, que são os principais substratos das ESBLs, foram de 53,6%, 86,4% e 75% para ceftazidima, ceftriaxona e cefepime, respectivamente. Entre os isolados de *E. coli*, a porcentagem de isolados resistentes às cefalosporinas foi 66,6% e 39,4% para ceftriaxona e cefepime, respectivamente, enquanto para *K. pneumoniae* e *E. cloacae* as taxas de resistência para ceftriaxona foram de 98,3% e 91,2%, respectivamente e para cefepime foram 91,4% e 88,2%. A taxa de resistência aos carbapenêmicos foi de 32,8% para o imipenem e de 34,3% para o meropenem; *K. pneumoniae* apresentou o maior número de isolados resistentes a esses antimicrobianos, 46,5% e 53,4% para imipenem e meropenem, respectivamente.

As taxas de resistência entre os dois aminoglicosídeos testados foi discrepante. A resistência encontrada à amicacina foi de 7,1%, enquanto para gentamicina foi de 59,3%, o que pode significar uma preferência de substrato para o mecanismo de resistência envolvido.

A taxa de resistência à única fluoroquinolona testada, ciprofloxacino, foi de 71,4% e a taxa entre os isolados de *E. coli* foi 69,7%, 72,4% para *K. pneumoniae* e 82,3% para *E. cloacae*.

A CIM foi determinada para os isolados que foram selecionados para o sequenciamento do genoma completo. Foram selecionadas 12 amostras, dessas, 10 eram resistentes aos carbapenêmicos e duas à polimixina. Para os isolados resistentes aos carbapenêmicos foram determinadas a CIM para os antimicrobianos imipenem e meropenem e para os isolados resistentes à colistina, a CIM foi determinada somente para polimixina B (Tabela 2).

Tabela 2. Determinação da concentração inibitória mínima dos isolados selecionados para o sequenciamento completo do genoma.

Isolados	Imipenem (mg/L)	Meropenem (mg/L)	Polimixina B (mg/L)
EC13	4	0,5	-
KP23	256	256	-
KP46	16	128	-
KP96	32	64	-
ECL120	64	64	-
EC134	16	2	-
KP135	32	4	-
KP136	16	256	-
KP141	16	256	-
KP142	32	64	-
EC91	-	-	8
EC11	-	-	8

EC: *Escherichia coli*, KP: *Klebsiella pneumoniae*, ECL: *Enterobacter cloacae*. Fonte: elaborado pela autora.

A CIM de ambos os isolados, EC11 e EC91, determinadas para polimixina, mostram o valor de 8 mg/L. Para os demais isolados, em tiveram as CIMs determinadas para os carbapenêmicos, os valores encontrados variaram de 0,5 a 256 mg/L para o antimicrobiano imipenem e 2 a 256 mg/L para meropenem.

4.1.3 Identificação dos genes de resistência

Neste estudo foram pesquisados 12 genes de β -lactamases, entre eles: *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{OXA-48} e o gene *mcr-1*. Não foi identificado nenhum isolado carreando os genes *bla*_{GES}, *bla*_{IMP} e *bla*_{OXA-48}.

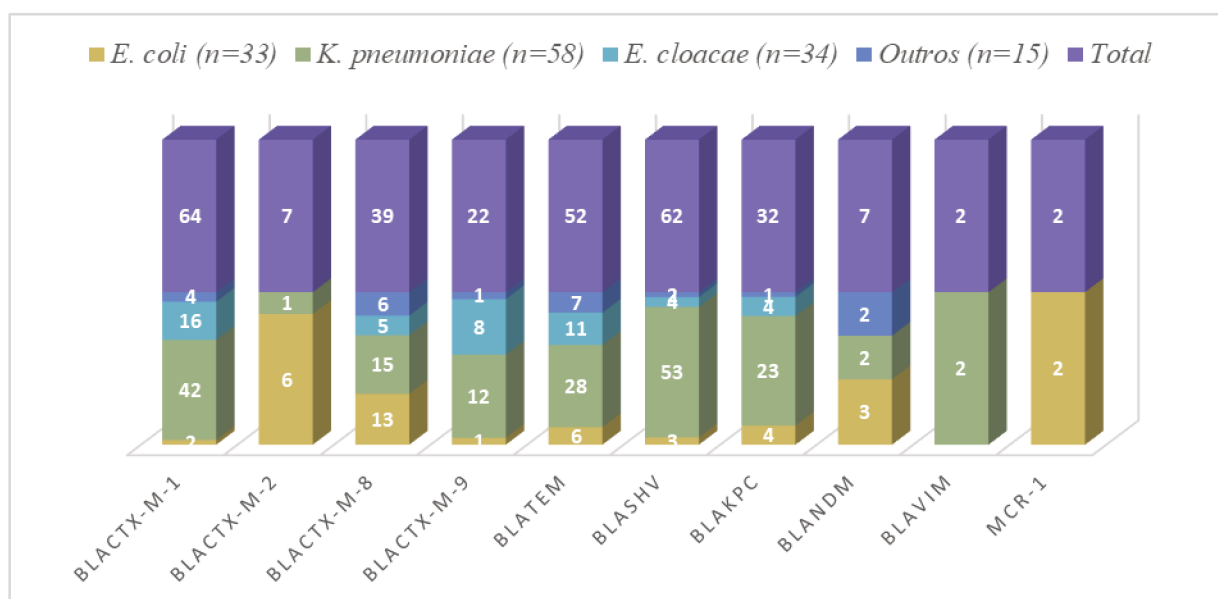
Foram identificados dois isolados de *E. coli* carreando o gene de resistência à polimixina, *mcr-1*. Um desses isolados era proveniente de um *swab* de vigilância de um

paciente da Emergência do HU-UFSC e o outro isolado foi identificado em uma amostra de urina de um paciente ambulatorial. O segundo isolado também carregava a ESBL CTX-M-2.

A β -lactamase mais encontrada foi a ESBL CTX-M-1, presente em 45,7% dos isolados, desses 65,6% eram *K. pneumoniae*. A segunda β -lactamase mais encontrada foi SHV, em 44,3% dos isolados e novamente a maioria deles era *K. pneumoniae*, com 85,5%. A ESBL CTX-M-2 foi a menos identificada, apenas 5% dos isolados carregavam essa enzima (Figura 5).

O gene *bla_{KPC}* foi identificado em 22,8% dos isolados, sendo *K. pneumoniae* o maior representante deste grupo com 71,8%. Foi identificado a metalo-carbapenemase NDM em 7 dos 140 isolados do estudo, sendo três *E. coli*, dois *K. pneumoniae*, um *K. oxytoca* e um *C. freundii*. Outra metalo-carbapenemase encontrada foi *bla_{VIM}* em dois isolados de *K. pneumoniae*. Um desses isolados foi recuperado de urina e o outro foi identificado em um swab de vigilância. O segundo isolado ainda carregava a carbapenemase KPC (Figura 5).

Figura 5. Identificação de β -lactamases e do gene *mcr-1* em números absolutos.



Outros: *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *S. odorifera*, *S. rubidea*. Fonte: elaborado pela autora.

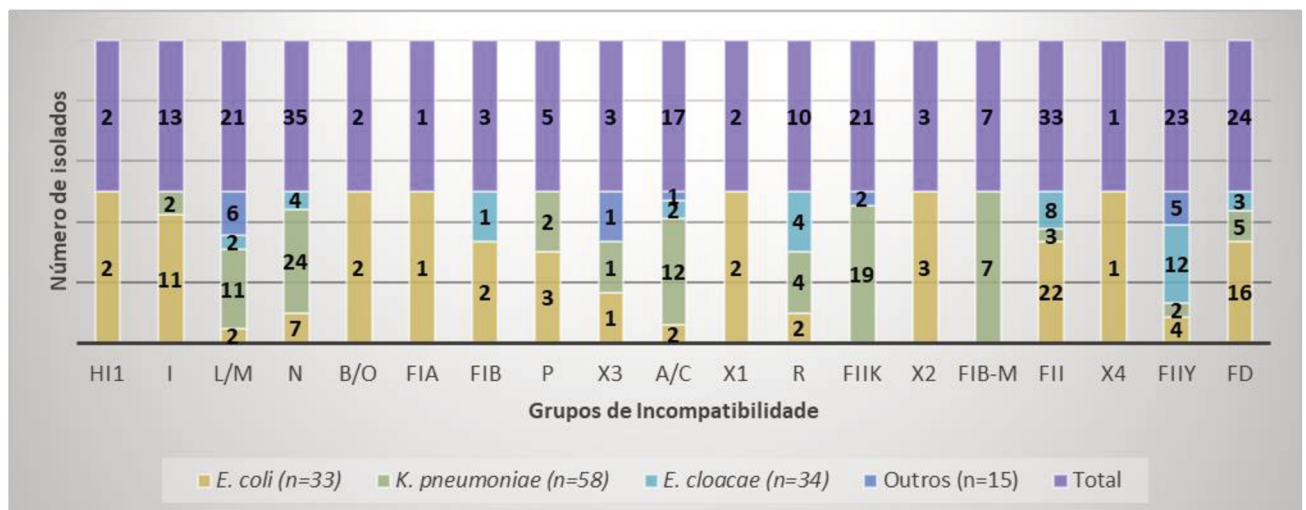
4.1.4 Determinação do Grupos de Incompatibilidade de plasmídeos

Ao avaliar a presença e os tipos de plasmídeos circulantes nos isolados MDR que circulam no HU-UFSC, através da metodologia PBRT foi possível identificar 29 grupos de incompatibilidade diferentes. Desses 29, 10 grupos não foram identificados em nenhuma das

amostras do projeto: IncHI2, IncW, IncT, IncFIIs, IncU, IncY, IncFIC, IncK, IncHIB-M, IncFIBs. Não foi identificado nenhum grupo de incompatibilidade em 40 (28,6%) dos 140 isolados (quatro *E. coli*, 15 *K. pneumoniae*, 15 *E. cloacae*, um *C. freundii*, um *P. mirabilis*, dois *S. marcescens*, um *S. odorifera* e um *S. rubidaea*).

O grupo IncN foi o tipo de plasmídeo mais detectado entre os isolados, presente em 35% das amostras, desses, a maioria era *K. pneumoniae* (68,6%) (Figura 5). O grupo IncFII foi o segundo mais detectado, em 33% dos isolados, em que 66,7% eram *E. coli*. IncFd, IncFIIy, IncFIIk, IncL/M e IncA/C foram detectados em 24%, 23%, 21%, 21% e 17% dos isolados, respectivamente (Figura 6).

Figura 6. Detecção dos grupos de incompatibilidade de plasmídeos entre os isolados.



Outros: *K. oxytoca*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *S. marcescens*, *P. mirabilis*, *S. odorifera*, *S. rubidaea*. Fonte: elaborado pela autora.

4.1.5 Avaliação da similaridade genética dos isolados por PFGE

A tipagem molecular por PFGE é considerada a metodologia padrão ouro para estudos epidemiológicos (SWAMINATHAN et al., 2001). Neste estudo, 123 isolados foram analisados por essa técnica, entre eles 33 *E. coli*, 58 *K. pneumoniae* e 34 *E. cloacae*. A análise de um isolado de *E. coli* e outro de *E. cloacae* falharam, gerando, portanto, a análise por macrorrestrrição de 32 isolados de *E. coli* (Figura 7), 58 *K. pneumoniae* (Figura 8) e 32 de *E. cloacae* (Figura 9).

A análise dos perfis de bandas e a sua separação por grupos relacionados, segundo os critérios de Tenover e colaboradores (1995) são recomendados principalmente em estudos epidemiológicos de surtos hospitalares ou comunitários que abrangem um curto espaço de tempo (um a três meses) (TENOVER et al., 1995). Neste estudo, a coleta das amostras abrangeu um intervalo de tempo maior que três meses, os isolados recolhidos fizeram parte de coleta randomizada e não houve, durante o período da coleta, conhecimento de surto de infecções causado por Enterobacterales. Portanto, uma maior variabilidade genética dos isolados é esperada. A classificação de isolados indistinguíveis foi representada por uma letra (grupo A), a categorização de grupos intimamente relacionados e possivelmente relacionados foi representada pela letra do grupo que aquele isolado estava relacionado e um número (A1, A2). E quando os isolados não tinham relação com nenhum outro eram classificados com letras diferentes (B, C, D).

Os isolados de *E. coli* foram classificados em 28 grupos de similaridade distintos. Quatro grupos possuíam alguma relação de similaridade genética. O grupo A é formado por duas amostras indistinguíveis geneticamente, EC1 e EC2. EC1 era proveniente de um *swab* retal e EC2 foi recuperado de um *swab* nasal, ambos de pacientes internados, porém, o primeiro se encontrava na CRI e o segundo na UTI. No isolado EC1 não foi identificado nenhum dos genes de resistência pesquisados, enquanto EC2 possuía o gene *bla*_{CTX-M-8}. Foram identificados grupos de incompatibilidade iguais (IncFII e IncFd), porém EC2 possuía ainda IncI e IncP (Figura 7).

O grupo J é formado por dois isolados de *E. coli* possivelmente relacionados, provenientes de isolados de *swabs* de vigilância de pacientes distintos, em unidades hospitalares diferentes, em que EC11 carregava o gene *mcr-1* e EC3 carregava o gene *bla*_{CTX-M-8}. EC11 possuía os plasmídeos IncN, IncX3, IncX4, IncFII, IncFIIy, e IncFd, enquanto em EC3 foram identificados os grupos IncI, IncFII e IncP (Figura 7).

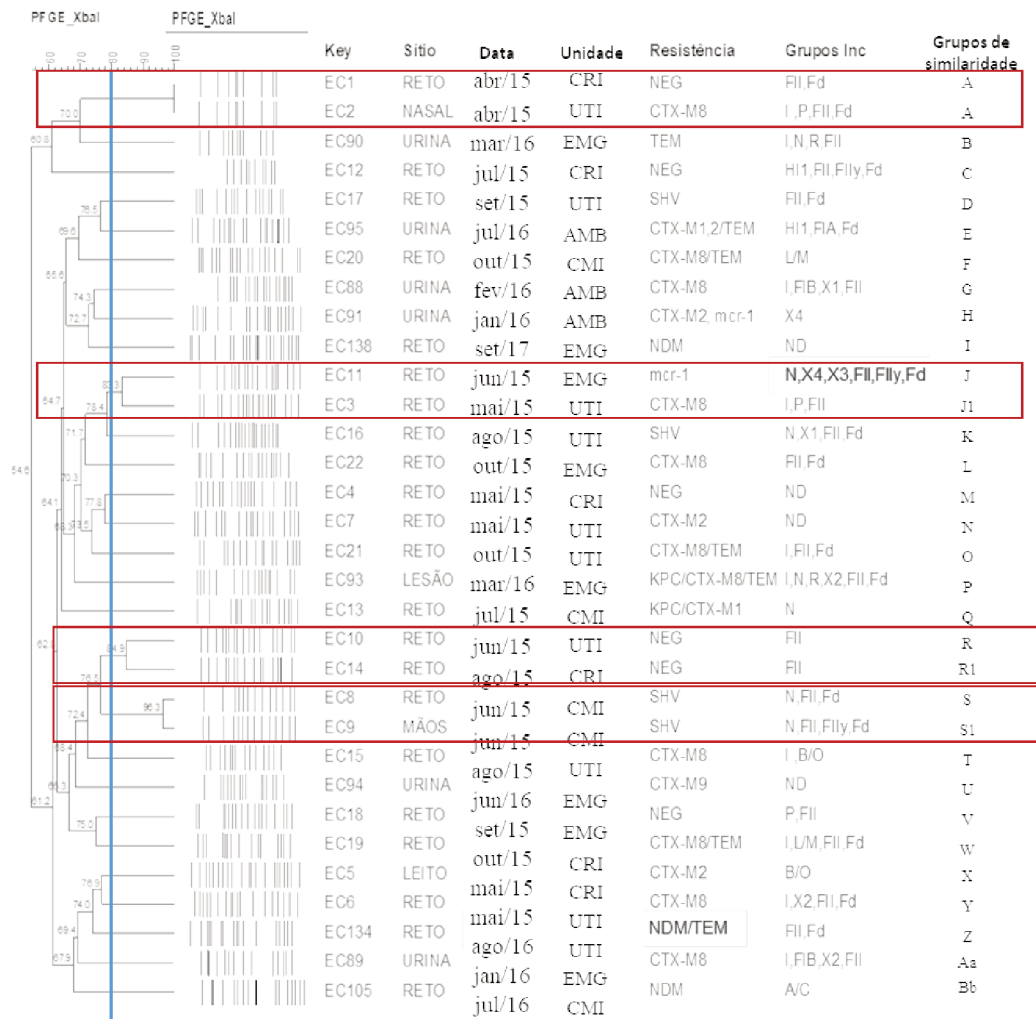
O grupo R é formado por dois isolados de *E. coli* possivelmente relacionados, provenientes de *swabs* retal, em que EC10 foi coletado na UTI em junho de 2015 e EC14 foi coletado na CRI em agosto de 2015. Em ambos os isolados não foram identificados nenhum gene de resistência pesquisado e os dois compartilhavam o mesmo grupo IncFII (Figura 7).

O grupo S é formado por dois isolados de *E. coli* os quais foram classificados como intimamente relacionados. Eram dois isolados do mesmo paciente, internado na CMI, em junho de 2015, E8 e E9, em que ambos carregavam a β -lactamase SHV. Foram identificados

os grupos IncN, IncFII e IncFd em ambos os isolados, porém EC9 possuía ainda IncFIIy (Figura 7).

Não foi possível estabelecer nenhuma relação entre os isolados de *E. coli*, os genes de resistência presentes nas amostras e os grupos de plasmídeos detectados.

Figura 7. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência e grupos de incompatibilidade identificados nos isolados de *E. coli*.



Key: identificação do isolado. ND: não determinado. AMB: Ambulatório, EMG: Emergência, CRI: Clínica Cirúrgica I, CMI: Clínica Médica I, UTI: Unidade de Tratamento Intensivo. Destaque em vermelho para os grupos relacionados geneticamente entre si. Fonte: elaborado pela autora.

Apenas dois isolados de *E. coli* não relacionados carregavam o gene *bla_{KPC}*. EC13 foi um isolado recuperado de um *swab* de vigilância de um paciente internado na CMI, em julho de 2015 e EC93 foi isolado de uma lesão de ferida de uma paciente na EMG, em março de 2016. Além do gene *bla_{KPC}*, EC13 carregava o gene da ESBL CTX-M-1 e o único plasmídeo identificado foi IncN. Enquanto EC93 carregava os genes *bla_{KPC}*, *bla_{CTX-M-8}* e *bla_{TEM}* e os plasmídeos identificados foram IncI, IncN, IncR, IncX2, IncFII, IncFd (Figura 7).

Foi identificado o gene *bla_{NDM}* em três isolados não relacionados de *E. coli*, EC105 (CMI), EC134 (UTI) e EC138 (EMG). EC105 carregava apenas o gene *bla_{NDM}* e o grupo de incompatibilidade detectado foi IncA/C. EC134 também carregava apenas o gene *bla_{NDM}* e *bla_{TEM}* e os grupos IncFII e IncFd foram identificados nesta amostra. E o isolado EC138 carregava apenas o gene *bla_{NDM}*, porém nenhum grupo de incompatibilidade foi detectado (Figura 7).

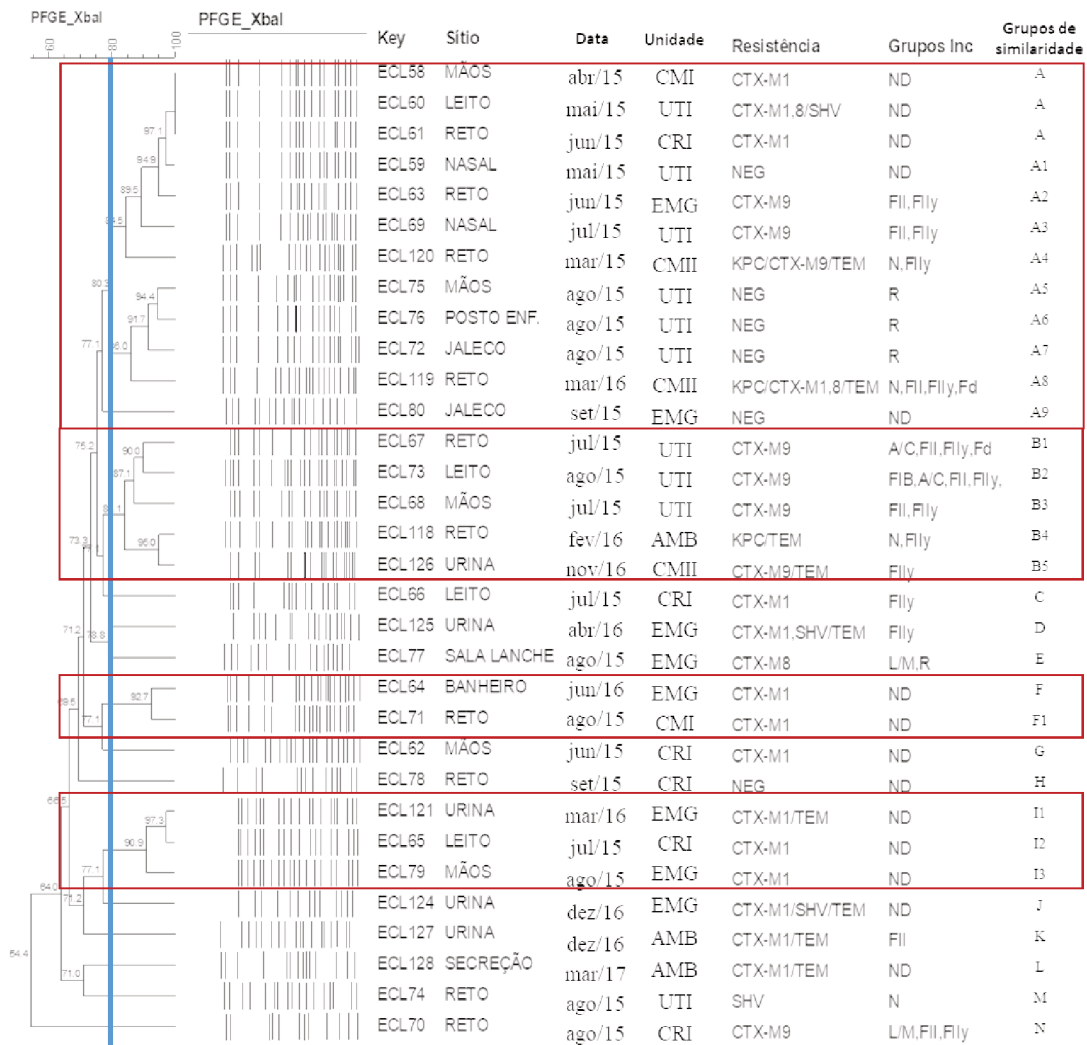
Os 32 isolados de *E. cloacae* formaram 14 grupos de similaridade, porém formou-se 4 grupos de amostras geneticamente relacionadas (Figura 8).

O grupo A é composto de 12 isolados em que 3 eram indistinguíveis e 9 eram relacionados. Os três isolados indistinguíveis, ECL58 (CMI), ECL60 (UTI) e ECL61 (CRI) eram provenientes das mãos de pacientes, leito e *swab* retal, respectivamente. Esses isolados carregavam o gene *bla_{CTX-M-1}*, ECL60 *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-8}* e *bla_{SHV}* e nenhum grupo de incompatibilidade de plasmídeo foi identificado. Os isolados ECL59 (CMI), ECL63 (EMG) e ECL69 (UTI) eram isolados intimamente relacionados com os anteriores. Curiosamente, ECL59 e ECL60 possuíam relação com o mesmo paciente. ECL59 foi recuperado de um *swab* nasal, e ECL60 foi recuperado do leito em que este paciente estava internado. Não foi identificado nenhum gene de resistência e nenhum grupo de incompatibilidade em ECL59. ECL63 e ECL69 foram recuperados de *swab* de vigilância e *swab* nasal, respectivamente, em meses distintos e em unidades de internação diferentes, ambos carregavam o gene *bla_{CTX-M-9}* e os grupos IncFII e IncFIIy foram identificados. O isolado ECL75 foi recuperado das mãos de paciente, ECL76 foi recuperado do posto de enfermagem e ECL72 do jaleco de um profissional da saúde, todos isolados no mesmo mês de coleta e na mesma unidade de internação, UTI. Em nenhum dos isolados foi identificado genes de resistência e foram identificados nos três o grupo IncR.

Apenas três isolados de *E. cloacae* foram identificados o gene *bla_{KPC}*. ECL118, ECL119 e ECL120. Os dois últimos fazem parte do mesmo grupo de similaridade, enquanto ECL118 faz parte de grupo B. ECL119 e ECL120 foram isolados recuperados de culturas,

ambos na unidade de internação CMII, porém ECL119 foi isolado em março de 2016, enquanto ECL120, em março de 2015. ECL118 também foi recuperado de uma cultura de vigilância, porém de uma paciente ambulatorial em fevereiro de 2016 (Figura 8).

Figura 8. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência e grupos de incompatibilidade dos isolados de *E. cloacae*.



Key: identificação do isolado. ND: não determinado. AMB: Ambulatório, EMG: Emergência, CRI: Clínica Cirúrgica I, CMI: Clínica Médica I, CMII: Clínica Médica II, UTI: Unidade de Tratamento Intensivo. Destaque em vermelho para os grupos relacionados geneticamente entre si. Fonte: elaborado pela autora.

O grupo B é formado por 5 isolados intimamente e/ou possivelmente relacionados. ECL67, ECL73, ECL68 e ECL118 foram recuperados de *swab* retal, leito, mãos de paciente e urina, respectivamente. ECL67, ECL68 e ECL73 foram isolados de amostras da UTI, em que ECL67 e ECL68 foram coletados em julho de 2015, porém não pertenciam ao mesmo paciente e ECL73 em agosto do mesmo ano. Todos os quatro isolados carregavam o gene *bla_{CTX-M-9}*, porém ECL118 carregava também o gene *bla_{TEM}*. O isolado ECL118, recuperado de uma cultura de vigilância carregava os genes *bla_{KPC}* e *bla_{TEM}*. Todos os isolados possuíam o grupo IncFIIy, no entanto, ECL67 possuía ainda IncA/C, IncFII e IncFd. ECL73 possuía IncFIB, IncA/C e IncFII. ECL68 possuía IncFII e ECL118 IncN (Figura 8).

O grupo F é composto por dois isolados, ECL64 e ECL71, possivelmente relacionados. ECL64 foi isolado do banheiro do paciente que estava na Emergência do hospital, enquanto ECL71 foi isolado de um *swab* retal, de um paciente internado na CMI. Ambos carregavam o gene *bla_{CTX-M-1}* e nenhum grupo de incompatibilidade foi identificado (Figura 8).

O grupo I é formado por três isolados intimamente relacionados. ECL121 foi recuperado de uma amostra de urina na Emergência, ECL65 foi isolado do leito do paciente internado na CRI e ECL79 foi isolado das mãos do paciente da EMG. Todos carregavam o gene *bla_{CTX-M-1}*, porém o isolado ECL121 carregava também o gene *bla_{TEM}*. Nenhum grupo de incompatibilidade foi detectado nesses isolados (Figura 8).

Quando o gene *bla_{CTX-M-1}* foi identificado em *E. cloacae*, salvo duas exceções, nenhum grupo de incompatibilidade foi detectado. Em contrapartida, a maioria dos isolados em que o gene *bla_{CTX-M-9}* foi identificado o grupo IncFIIy foi detectado, o que pode significar uma relação deste grupo de incompatibilidade com a disseminação desse gene em isolados de *E. cloacae*.

Cinquenta e oito isolados de *K. pneumoniae* foram separados em 36 grupos de similaridade genética, dos quais oito grupos eram compostos por isolados relacionados entre si.

O grupo Y é o maior grupo, formado por 9 isolados de *K. pneumoniae*, em que dois isolados eram indistinguíveis entre si (KP45 e KP46), três isolados foram classificados como intimamente relacionados (KP35, KP39, KP54) e quatro possivelmente relacionados (KP107, KP112, KP26 e KP115). Os isolados KP45 e KP46 foram recuperados de *swab* de vigilância e do leito, respectivamente. Ambos os isolados eram do mesmo paciente, internado na UTI, carregavam os mesmos genes de resistência *bla_{KPC}*, *bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-9}* e *bla_{SHV}* e pertenciam

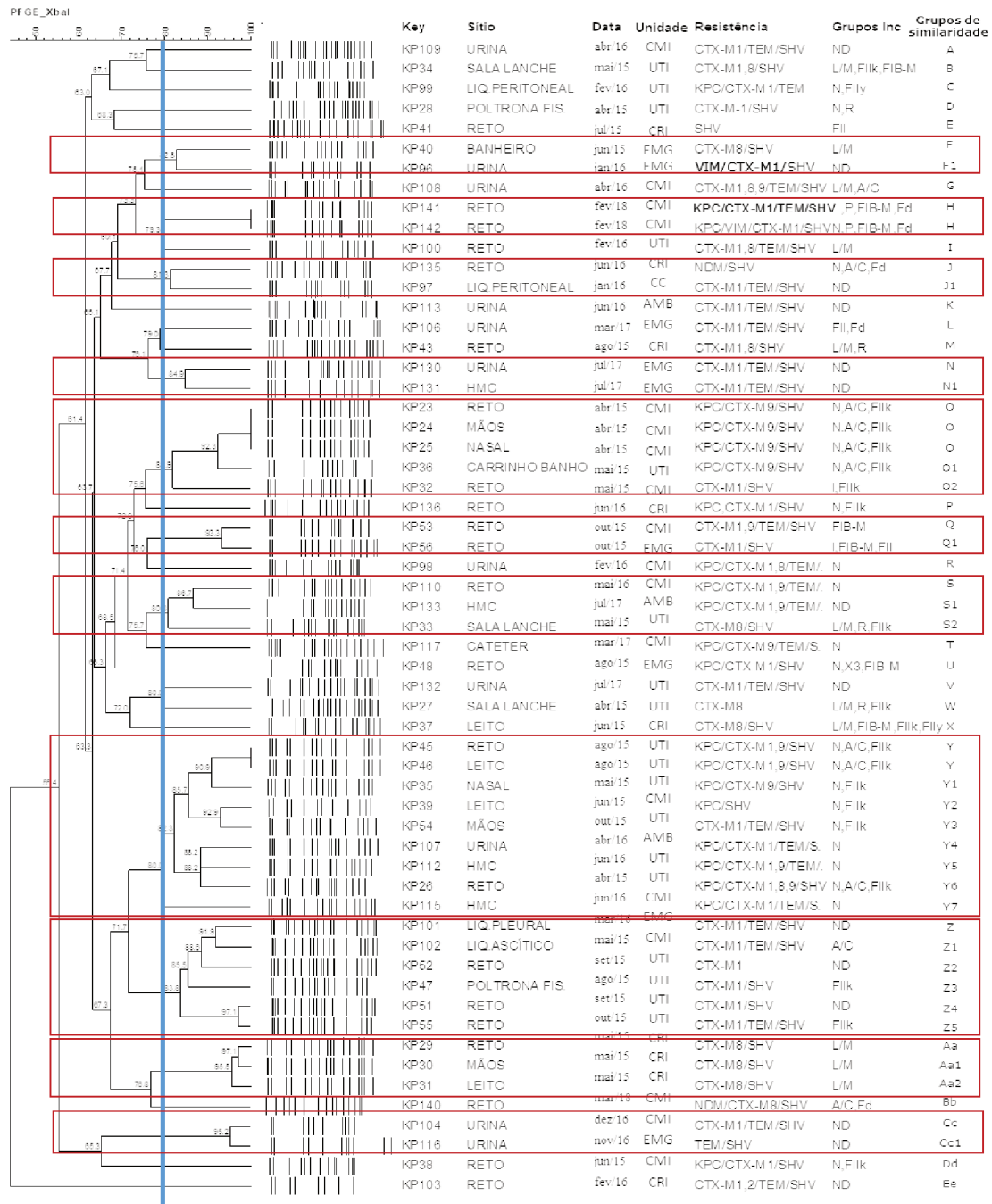
aos mesmos grupos de incompatibilidade IncN, IncA/C e IncFIIk. Os isolados KP35, KP39, KP54 eram provenientes de *swab* nasal, leite e mãos do paciente, respectivamente. Esses três isolados foram recuperados em meses distintos, KP35 e KP54 foram isolados na UTI e KP39 na CMI. KP35, KP54 e KP39 carregavam diferentes genes de resistência. Foram identificados os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{SHV} em KP35, em KP39 foram identificados os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{SHV} e em KP54 foram identificados os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. No entanto, foram detectados os mesmos grupos de plasmídeos IncN e IncFIIk. Os isolados KP107, KP112, KP26 e KP115 foram recuperados de amostra de urina, hemocultura, *swab* de vigilância e hemocultura, respectivamente, em meses e unidades distintas. KP107 e KP117 carregavam os mesmos genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e o mesmo grupo de incompatibilidade IncN. O isolado KP26 carregava os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{SHV} e possuía os grupos IncN, IncA/C e IncFIIk. O isolado KP115 carregava os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e possuía o plasmídeo IncN (Figura 9).

O segundo maior grupo formado por isolados relacionados de *K. pneumoniae* é o grupo Z, formado por 6 isolados intimamente e possivelmente relacionados. Os isolados KP101, KP102 e KP52, que eram intimamente relacionados, foram isolados de líquido pleural, líquido ascítico e *swab* retal, respectivamente, todos provenientes de diferentes unidades hospitalares e coletados em meses distintos. Todos os três isolados carregavam o gene *bla*_{CTX-M-1}, mas os isolados KP101 e KP102 carregavam também os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Os grupos de incompatibilidade não foram detectados em KP101 e KP52, mas KP102 possuía o IncA/C. Os isolados possivelmente relacionados KP47, KP51 e KP55 foram recuperados, o primeiro, da poltrona de fisioterapia e os dois últimos de *swabs* de vigilância (de pacientes distintos). Os três últimos isolados foram recuperados da mesma unidade de internação, porém em meses distintos. Todos também carregavam o gene *bla*_{CTX-M-1}, porém KP47 e KP51 carregavam *bla*_{SHV} e KP55 carregava *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Os grupos de incompatibilidade de KP51 não foram detectados e de KP47 e KP55 foi IncFIIk (Figura 9).

O grupo O é o grupo mais homogêneo formado, composto por 5 isolados de *K. pneumoniae* em que três eram indistinguíveis (KP23, KP24 e KP25), recuperadas de *swab* retal, mãos e *swab* nasal, respectivamente, do mesmo paciente e um isolado intimamente relacionado com os anteriores que foi recuperado de uma amostra do carrinho de banho, da mesma unidade de internação em que os isolados anteriores foram coletados (UTI). Quatro

dos cinco isolados carregavam os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-9} e *bla*_{SHV} e em todos eles foram identificados os mesmos plasmídeos IncN, IncA/C e IncFIIk (Figura 9).

Figura 9. Dendrograma, sítio de isolamento, genes de resistência aos β-lactâmicos e grupos de incompatibilidade encontrados em isolados de *K. pneumoniae*.



Key: identificação do isolado. ND: não determinado. AMB: Ambulatório, EMG: Emergência, CRI: Clínica Cirúrgica I, CMI: Clínica Médica I, CMII: Clínica Médica II, UTI: Unidade de Tratamento Intensivo, CC: Centro Cirúrgico. Destaque em vermelho para os grupos relacionados geneticamente entre si. Fonte: elaborado pela autora.

O grupo Aa é composto de 3 isolados intimamente relacionados; KP29 e KP30 foram isolados do mesmo paciente, amostras recuperadas de *swab* retal e mãos e o isolado KP31 foi isolado do leito desse mesmo paciente. Os três isolados carregavam os genes *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV} e em todos foram identificados o grupo de incompatibilidade IncL/M, que pode estar relacionado com a presença do gene *bla*_{CTX-M-8} (Figura 9).

O grupo S é composto pelos isolados KP33, KP110 e KP133, foram recuperados da sala de lanche da UTI, de um *swab* de vigilância na CMI e de uma amostra de hemocultura de um paciente ambulatorial, respectivamente. KP110 e KP133 carregavam os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, enquanto KP33 carregava os genes *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV} (Figura 9).

Os grupos F, H, J, N, Q e Cc eram compostos por 2 isolados cada um.

O grupo F era formado pelos isolados KP40 e KP96, recuperados do banheiro do paciente e de urina, respectivamente. Ambos coletados na Emergência do hospital, porém em datas distintas. Possuíam genes de resistência diferentes, em que KP96 apresentava os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{SHV}, enquanto em KP40 foram identificados os genes *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{SHV}.

O grupo H é composto de dois isolados (KP141 e KP142) do mesmo paciente, recuperados de um mesmo *swab* de vigilância. Esses isolados foram distinguidos fenotipicamente entre si pelo teste de detecção de carbapenemases feito com inibidores de β -lactamases realizado no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC. Foi identificado que o isolado KP141 carregava os genes de resistência *bla*_{KPC}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, enquanto KP142 carregava *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. KP141 e KP142 possuíam os mesmos grupos de incompatibilidade IncN, IncP, IncFIB-M e IncFd. Pelo fato de os dois isolados serem clonais e apresentarem as mesmas características fenotípicas e genotípicas, com exceção de que KP142 possui o gene *bla*_{VIM}, esses isolados foram selecionados para o sequenciamento completo do genoma (Figura 9).

O grupo J é composto pelo isolado KP135, recuperado de uma cultura de vigilância na CRI e pelo isolado KP97 de uma cultura de líquido peritoneal no CC. KP135 carregava os genes *bla*_{NDM} e *bla*_{SHV}, enquanto KP97 carregava os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} (Figura 9)

O grupo N é formado de dois isolados possivelmente relacionados; KP130 foi recuperado de uma amostra de urina e KP131 de uma amostra de hemocultura de um único

paciente da EMG. Ambos carregavam os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} e nenhum grupo de incompatibilidade foi identificado (Figura 9).

Os isolados KP53 e KP56 pertencem ao grupo Q e foram classificados como possivelmente relacionados. KP53 carregava os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-9}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, enquanto KP56, os genes *bla*_{CTX-M-1}, e *bla*_{SHV}. Esses isolados compartilhavam o mesmo grupo de incompatibilidade IncFIB-M, porém em KP56 foi identificado também IncI e IncFII (Figura 9).

Por fim, o grupo Cc é formado por dois isolados de urina, KP104 e KP116, recuperados em datas distintas, em unidades distintas. Em KP104 foram identificados os genes *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, enquanto em KP116 foram identificados *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Nenhum grupo de incompatibilidade foi identificado nesses isolados (Figura 9).

Apenas dois isolados de *K. pneumoniae* carregando *bla*_{NDM} foram identificados, KP135 e KP140, ambos de *swab* retal, e não relacionados. KP135 foi isolado em junho de 2016 na CRI, enquanto KP140 foi isolado em março de 2018 na CMI. Os grupos de incompatibilidade encontrados nessas amostras foram IncA/C, IncN e IncFd, para KP135 e IncA/C e IncFd em KP140. Nos isolados de *E. coli* NDM positivos, os grupos de incompatibilidade encontrados foram IncA/C em EC105, IncFII e IncFd em EC134 e nenhum grupo de incompatibilidade identificado em EC138. Com poucos isolados carregando este gene de resistência é difícil estabelecer uma relação entre a presença da resistência com o grupo de plasmídeo, porém, é possível que haja uma relação entre o gene *bla*_{NDM} e o plasmídeo IncA/C.

Com exceção do isolado de *K. pneumoniae* KP133, em todos os isolados que carregavam o gene *bla*_{KPC}, tanto em *E. coli* quanto em *E. cloacae* e *K. pneumoniae*, foi identificado o grupo de incompatibilidade IncN, sugerindo que pode haver uma relação deste plasmídeo com a disseminação do gene *bla*_{KPC} nestes isolados.

4.1.6 Sequenciamento do genoma completo

4.1.6.1 Seleção dos isolados

Foram escolhidos 12 isolados para serem sequenciados por sequenciamento *shotgun* na plataforma MiSeq (Illumina, Inc). Os critérios de inclusão dos isolados consideraram a importância epidemiológica, os locais onde foram recuperados e se eram isolados diferentes,

porém de um mesmo paciente. Portanto, foram escolhidos 4 isolados que carregavam o gene *bla_{KPC}*, de espécies diferentes e/ou foram isolados de sítios diferentes e em todos os 4 isolados foram identificados o plasmídeo IncN, que, neste estudo, parece estar envolvido com esta carbapenemase (Tabela 3).

Três isolados de cultura de vigilância identificados como EC134, KP135 e KP136 foram selecionados, pois se tratava de isolados do mesmo paciente. As cepas KP135 e KP136, que carregam os genes *bla_{NDM}* e *bla_{KPC}*, respectivamente, foram isolados na primeira internação do paciente no HU-UFSC, e o isolado EC134 com o gene *bla_{NDM}* foi obtido em uma segunda internação. As três amostras foram escolhidas para estudar o contexto genético do gene *bla_{NDM}* e avaliar a probabilidade de ter ocorrido transferência plasmidial entre os isolados (Tabela 3).

Os isolados KP141 e KP142 foram selecionados também por terem sido isolados do mesmo paciente. Foram recuperados da mesma cultura de vigilância, porém foi no teste fenotípico para detecção de carbapenemases com inibidores enzimáticos que eles foram reisolados. Na metodologia de PFGE apresentaram perfis indistinguíveis e com os mesmos grupos plasmidiais, porém a amostra KP141 apresentava a carbapenemase KPC, enquanto a amostra KP142 apresentava as carbapenemases KPC e VIM. Além disso, os perfis da CIM dessas duas amostras foram diferentes (Tabela 3).

O isolado KP96 foi selecionado por carrear a metalo-carbapenemase VIM, assim como o isolado KP142, então, objetivou-se averiguar o contexto genético dos plasmídeos carreadores desse gene para essas amostras. O isolado KP96 foi isolado de urina de um paciente da Emergência do HU-UFSC, portanto de provável origem comunitária (Tabela 3).

Os isolados EC11 e EC91 foram selecionados por carregarem o gene plasmidial de resistência à polimixina, *mcr-1*. EC11 foi recuperado de um *swab* de vigilância de um paciente da Emergência do hospital e EC91 foi recuperado de uma cultura de urina de um paciente ambulatorial (Tabela 3).

Tabela 3. Características dos isolados selecionados para o sequenciamento do genoma completo.

ID original	Espécie	Sítio	Data*	Unidade**	Genes de resistência	Grupo de Incompatibilidade
EC13	<i>E. coli</i>	Reto	jul/15	CMI	<i>bla_{KPC}</i> e <i>bla_{CTX-M-1}</i>	N
KP23	<i>K. pneumoniae</i>	Reto	abr/15	CMI	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{CTX-M-9}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	N, A/C, FIIk
KP46	<i>K. pneumoniae</i>	Leito	ago/15	UTI	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{CTX-M-1}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	N, A/C, FIIk
ECL120	<i>E. cloacae</i>	Reto	mar/16	CMII	<i>bla_{KPC}</i>	N, FIIk
EC134	<i>E. coli</i>	Reto	ago/16	UTI	<i>bla_{NDM}</i>	FII, Fd
KP135	<i>K. pneumoniae</i>	Reto	jun/16	CRI	<i>bla_{NDM}</i>	N, A/C, Fd
KP136	<i>K. pneumoniae</i>	Reto	jun/16	CRI	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{CTX-M-1}</i>	N, FIIk
KP96	<i>K. pneumoniae</i>	Urina	jan/16	EMG	<i>bla_{VIM}</i>	Não identificado
KP141	<i>K. pneumoniae</i>	Reto	fev/18	CMI	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{CTX-M-1 e 8}</i>	N, P, FIB-M, Fd
KP142	<i>K. pneumoniae</i>	Reto	fev/18	CMI	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{VIM}</i> , <i>bla_{CTX-M-1}</i>	N, P, FIB-M, Fd
EC91	<i>E. coli</i>	Urina	jan/16	AMB	<i>bla_{CTX-M-2}</i> , <i>mcr-1</i>	X4
EC11	<i>E. coli</i>	Reto	jun/15	EMG	<i>bla_{TEM}</i> , <i>mcr-1</i>	N, X3, X4, FII, FIIy, Fd

ID: Identificação do isolado; *Data da coleta; **Unidade de Internação; CMI: Clínica Médica I, CMII: Clínica Médica II, CRI: Clínica Cirúrgica I, UTI: Unidade de Terapia Intensiva, EMG: Emergência, AMB: Ambulatório. As linhas destacadas em alaranjado e verde são correspondentes a isolados do mesmo paciente. Fonte: elaborado pela autora.

4.1.6.2 Montagem das sequências

A fim de verificar a melhor montagem do genoma, os drafts do genoma foram avaliados por dois *pipelines* de montagem: A5-miseq e SPAdes, com as sequências brutas e as sequências trimadas (Quadro 7).

Comparando os parâmetros de montagem, o *pipeline* SPAdes foi o que entregou resultados mais satisfatórios em termos de tamanho das amostras, *contigs* de tamanhos maiores, conseqüentemente a presença da maior parte da sequência em um menor número de *contigs*. Já com pipeline A5-miseq ocorreu a geração de menor número de *contigs* (Quadro 7).

Quadro 7. Avaliação da qualidade da montagem dos genomas dos isolados que foram sequenciados pela plataforma MiSeq.

Programa	Parâmetros	EC11	EC13	KP23	KP46	EC91	KP96	ECL120	EC134	KP135	KP136	KP141	KP142
A5	Tamanho	4914941	5405055	5863503	5661586	5326986	5699366	5629715	4986331	5782523	5586255	5802315	5850422
	Nº de contigs	96	421	108	90	169	115	98	74	101	77	93	97
	Maior contig	287575	349073	786506	803415	345645	478441	529949	553144	885262	453023	599804	803237
	N50	133871	138483	219552	329344	181326	204027	189635	317967	369499	269886	212791	259724
	L50	14	14	9	6	11	10	10	6	5	8	9	7
	N90	33906	15843	35065	46782	26265	41017	45697	47101	43894	50290	40450	37479
	L90	41	52	34	22	35	32	34	25	27	26	32	31
A5 + Fastx	Tamanho	4920222	5403967	6E+06	5661590	5353067	5699063	5629952	4985180	5782556	5586589	5802934	5850463
	Nº de contigs	91	420	109	90	124	114	98	72	101	78	94	97
	Maior contig	523594	349073	786506	803415	346103	478441	529949	553144	885262	453023	599804	803237
	N50	189167	138483	219312	329344	192997	204027	189635	317967	369499	269886	212791	259724
	L50	8	14	9	6	11	10	10	6	5	8	9	7
	N90	41464	16400	35065	46782	30562	41017	45697	47101	43894	50290	40450	37479
	L90	29	51	34	22	33	32	34	25	27	26	32	31
Spades	Tamanho	4927341	5615605	5850702	5660920	5360741	5692353	5648531	4992257	5783556	5599787	5808526	Erro na montagem da sequência
	Nº de contigs	226	958	161	203	202	200	243	124	172	129	204	
	Maior contig	505840	333102	523474	551750	345860	478255	662897	1228019	975996	452782	806235	
	N50	188816	149672	203938	208254	192758	209758	188032	410177	369259	294713	187324	
	L50	8	14	10	9	11	10	10	4	5	8	9	
	N90	40747	3779	44655	47937	29919	40603	42832	80082	59573	62365	35001	
	L90	32	80	32	27	32	32	34	12	21	24	35	

Continuação

Programa	Parâmetros	EC11	EC13	KP23	KP46	EC91	KP96	ECL120	EC134	KP135	KP136	KP141	KP142
Spades + Fastx	Tamanho	4924918	5608394	5849493	5662965	5359377	5691822	5641753	4989276	5783909	5594594	5804496	Erro na montagem da sequência
	Nº de contigs	217	949	165	208	199	198	224	120	168	128	187	
	Maior contig	505727	333220	693432	737863	345860	478240	662897	1228019	975996	853907	806235	
	N50	188816	149654	203492	208254	192758	209758	210384	410177	369259	349199	203939	
	L50	8	14	10	9	11	10	9	4	5	6	8	
	N90	40747	3990	44655	41592	29919	40603	42832	80082	59558	67661	35001	
	L90	32	76	33	29	32	32	30	17	21	20	32	
Spades + Trimmomatic	Tamanho	4912437	5466658	5842924	5654250	5355443	5683905	5617691	4987780	5779138	5593009	5790199	5842073
	Nº de contigs	176	686	139	185	200	186	171	109	167	127	167	174
	Maior contig	505884	333155	786396	737863	345860	478186	662987	1228131	975996	853907	803716	803716
	N50	188816	149530	219072	282053	193347	209940	210257	410177	369259	349199	220409	331412
	L50	8	14	9	7	11	10	9	4	5	6	8	7
	N90	33398	10776	48270	44622	31703	41516	43284	77630	59558	67409	40425	35001
	L90	33	58	31	23	31	30	30	17	21	20	31	30

FastX e Trimmomatic: Primeiro as sequências passaram pelo pré-processamento de trimagem (remoção de sequências de baixa qualidade nas extremidades) e posteriormente pelo processo de montagem pelos dois *pipelines*. Os parâmetros destacados em negritos foram considerados os melhores valores. Fonte: elaborado pela autora.

Mesmo testando várias abordagens de montagens, não houve diferença na análise posterior que foi a montagem dos plasmídeos. O sucesso na montagem dos plasmídeos está mais relacionado com a qualidade e cobertura do sequenciamento do que propriamente com a montagem das sequências em si.

4.1.6.3 Resistência adquirida à polimixina – *mcr-1*: isolados EC11 e EC91

Os isolados EC11 e EC91 foram recuperados de pacientes não internados no HU-UFSC. EC11 foi isolado de um *swab* de vigilância na Emergência do hospital, em junho de 2015 e EC91 foi isolado de uma amostra de urina de um paciente ambulatorial em janeiro de 2016. O perfil de resistência dos dois isolados foi diferente, porém ambos foram classificados como MDR. EC11 é resistente à ampicilina, ampicilina/sulbactam e polimixina, enquanto EC91 é resistente à ampicilina, cefalotina, cefuroxima, ceftriaxona, norfloxacino, ciprofloxacino, ácido nalidíxico, gentamicina e sulfametoxazol/trimetoprim. Na ocasião do isolamento a polimixina não foi testada para EC91 no TSA por se tratar de uma amostra de urina. A concentração inibitória mínima para polimixina B dos dois isolados foi 8 mg/L (Tabela 4).

Os genes de resistência identificados por qPCR em *E. coli* EC11 foram o gene *mcr-1* e a β -lactamase *bla*_{TEM}, enquanto para *E. coli* EC91 foi *mcr-1* e a ESBL *bla*_{CTX-M-2}. Os grupos de incompatibilidade plasmidial detectados por PBRT em EC11 foram IncN, IncX3, IncX4, IncFII, IncFIIy, IncFd, enquanto em EC91 foi detectado apenas o grupo IncX4 (Tabela 4). Na análise de similaridade genética por PFGE essas amostras foram classificadas como não relacionadas. Os isolados EC11 e EC91 são do *sequence type* ST206 e ST354, respectivamente.

A análise *in silico* do resistoma de EC11 demonstrou a presença de genes de resistência adquirida a aminoglicosídeos (*aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aadA1*, *aadA2*), fluoroquinolonas (*qnrB19*), fencóis (*floR*, *cmlA1*), sulfonamidas (*sul2*, *sul3*), tetraciclina (*tet(A)*), trimetoprim (*dfpA8*), além dos genes *bla*_{TEM} e *mcr-1* também confirmados por qPCR. Os grupos de incompatibilidade de plasmídeos detectados pelo *PlasmidFinder* foram IncX4, IncN, IncX3, IncFIB (Tabela 4).

A análise do resistoma de EC91 mostrou a presença de outros genes de resistência adquirida a aminoglicosídeos (*aadA1*, *aac(3)-IId*, *ant(2'')-Ia*), fenicóis (*catA1*), sulfonamidas (*sul1*), tetraciclina (*tet(B)*), trimetoprim (*dfrA17*), macrolídeos (*mdf(A)*), além dos genes *blACTX-M-2* e *mcr-1* confirmados por qPCR. A detecção de plasmídeos *in silico* demonstrou a presença de outros plasmídeos não detectados por PBRT: IncX4f, Col(MG828), Col440I, p0111, IncFIA, IncFIB (Tabela 4).

Tabela 4. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados EC11 e EC91 carreadores do gene *mcr-1* em IncX4.

Características		EC11	EC91
Sítio		reto	urina
Perfil de resistência^a		AMP, SAM, PMX	NAL, AMP, CFA, CRO, CXM, CIP, NXM, GMN, SXT
CIM polimixina B^b		8	8
Tamanho do genoma		4.927.341	5.360.741
MLST (ST)^c		206	354
Resistoma^d			
ATBs	polimixina	<i>mcr-1</i> *	<i>mcr-1</i> *
	β-lactâmicos	<i>bla_{TEM-1a}</i> *	<i>blACTX-M-2</i> *
	aminoglicosídeos	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i>	<i>aadA1</i> , <i>aac(3)-IId</i> , <i>ant(2'')-Ia</i> ,
	fluoroquinolonas	<i>qnrB19</i> , <i>gyrA (S83L)</i> , <i>qnrB10</i> ,	<i>gadW</i> , <i>marR (Y137H</i> , <i>G103S)</i> , <i>parC (S801</i> , <i>E84G)</i> , <i>gyrA (D87N</i> , <i>S83L)</i>
	fenicol	<i>floR</i> , <i>marA</i>	<i>catA1</i> , <i>marA</i>
	sulfonamidas	<i>sul2</i> , <i>sul3</i>	<i>sul1</i>
	trimetoprim	<i>dfrA8</i>	<i>dfrA17</i>
	macrolídeos		<i>mdf(A)</i>
	macrofantina	<i>nfsA</i>	<i>nfsA</i>
	peptídeo	<i>pmrF</i> , <i>yojI</i>	<i>yojI</i> , <i>PmrF</i>
	fosfomicina	<i>glpT (E448K)</i> ,	<i>cyaA (S352T)</i> , <i>glpT</i> <i>(E448K)</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>
Grupos de Incompatibilidade^e		IncX4, IncN, IncX3, IncFIB	IncX4 , Col(MG828), Col440I, p0111, IncFIA, IncFIB
Grupos de Incompatibilidade^f		IncN, IncX3, IncX4, IncFII, IncFIIy, IncFd	IncX4

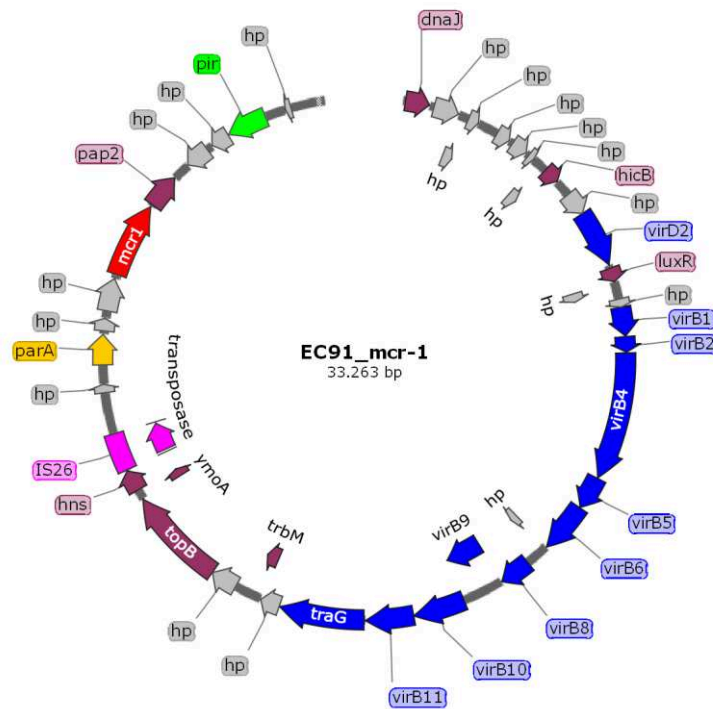
Continuação		
Características	EC11	EC91
Nº de acesso Genbank dos plasmídeos	MK940857	MK940858
Nº de acesso Genbank do genoma	VDLS00000000; BioSample SAMN11954205	VDLT00000000; BioSample SAMN11954204

^a: teste de sensibilidade aos antimicrobianos determinado pelo Vitek 2; ^b: CIM determinada por microdiluição em caldo; ^c: ST, sequence type. MLST loci (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*) (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>); ^d: genes de resistência adquiridos detectados pelo banco de dados *ResFinder* e pelo CARD; ^e: grupos de incompatibilidade encontrados pelo banco de dados *PlasmidFinder*; ^f: grupos de incompatibilidade detectados por PBRT; AMP: Ampicilina, SAM: Ampicilina/Sulbactam, NAL: Ác. Nalidíxico, CFA: Cefalotina, CRO: Ceftriaxona, CXM: Cefuroxima, CIP: Ciprofloxacina, NXN: Norfloxacina, GMN: Gentamicina, SXT: Sulfametoxazol/Trimetoprim, PMX: Polimixina; em negrito os grupos de incompatibilidade encontrados nas duas metodologias; *: genes confirmados por qPCR; ATBs: antimicrobianos.

Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo que carregava o gene *mcr-1* no isolado EC11 foi possível mapear 33.304pb e no isolado EC91 33.263pb (Figuras 10 e 11). Os plasmídeos de EC11 e EC91 são plasmídeos IncX4 conjugativos (*traG*), apresentam todo o sistema de secreção do tipo IV, com relaxase (*virD2*), proteínas responsáveis pelos canais de translocação (*virB3*, *virB6*, *virB7*, *virB8*, *virB9* e *virB10*), genes responsáveis pela formação do pili (*virB2* e *virB5*) e ATPases (*virB4* e *virB11*). À montante do gene *mcr-1* está localizado o único elemento móvel dos plasmídeos, a transposase IS26. Ainda, o plasmídeo possui um sistema de partição (*parA*), envolvido na sua manutenção na célula e à jusante do gene *mcr-1* encontrou-se o replicon do plasmídeo (*pir*) (Figuras 10 e 11).

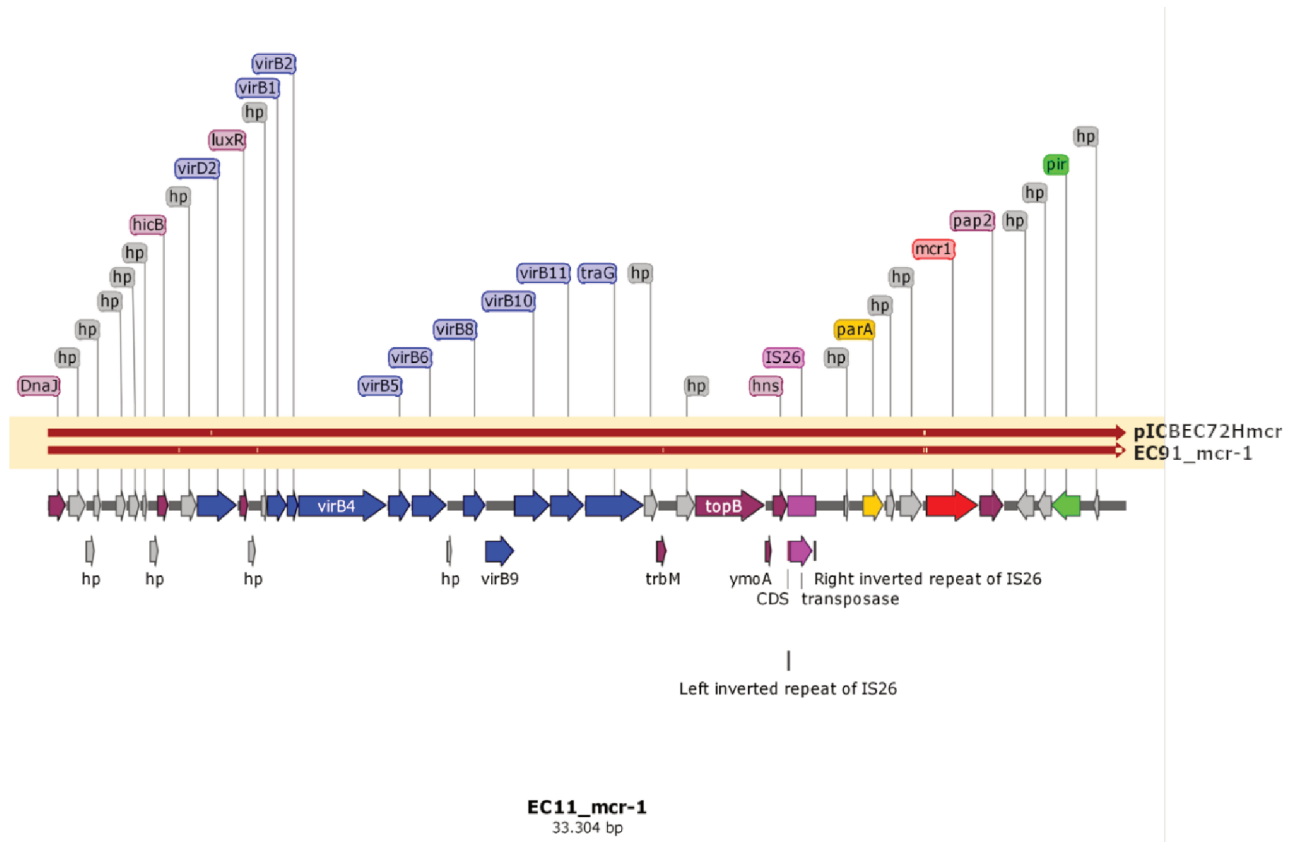
Figura 11. Representação gráfica do plasmídeo IncX4 carreador de *mcr-1* em *E. coli* EC91.



Gene de resistência *mcr-1* representado pela cor vermelha; *replicon* do plasmídeo IncX4 representado pela cor verde; gene de partição (*parA*) representado pela cor amarela, genes envolvidos na conjugação do plasmídeo representados pela cor azul, transposase representada pela cor rosa, outros genes representados pela cor roxa e proteínas hipotéticas representado pela cor cinza. Hp: proteína hipotética. Fonte: elaborado pela autora.

Os dois plasmídeos apresentam 100% de identidade entre si e são do grupo IncX4. Além disso, pMIMAEC11 e pMIMAEC91, como foram nomeados (números de acesso no Genbank: MK940857 e MK940858, respectivamente), compartilham 100% e 99,6% de identidade, respectivamente, com o pICBEC71 (nº de acesso do Genbank: CP015977) (Figura 12). Os resultados desses isolados geraram o primeiro artigo referente ao assunto desta tese (Apêndice B).

Figura 12. Comparação do alinhamento dos plasmídeos IncX4 carreadores de *mcr-I* dos isolados EC11 e EC91 com pICBEC71.



Alinhamento entre o plasmídeo IncX4 carreador do gene *mcr-I* do isolado EC11 contra os plasmídeos IncX4 de EC91 e pICBEC72. Os pequenos traços brancos verticais nas sequências de EC91 e pICBEC71 representam as diferenças nas sequências entre eles e o plasmídeo de EC11. O plasmídeo IncX4 de EC91 apresentou 105 *mismatches*⁶ e um *gap*⁷ e pICBEC71 apresentou três *mismatches* em relação ao IncX4 de EC11. Gene de resistência *mcr-I* foi representado pela cor vermelha; o *replicon* do plasmídeo IncX4 foi representado pela cor verde; gene de partição (*parA*) foi representado pela cor amarela, genes envolvidos na conjugação do plasmídeo foram representados pela cor azul, transposase foi representada pela cor rosa, outros genes foram representados pela cor roxa e proteínas hipotéticas foram representadas pela cor cinza. Hp: proteína hipotética. Fonte: elaborado pela autora.

⁶ *Mismatch*: representam regiões do alinhamento entre as sequências em que os nucleotídeos não são idênticos.

⁷ *Gap*: representam inserções e deleções entre as sequências.

4.1.6.4 Carbapenemase *bla*_{NDM-1}: isolados EC134 e KP135

Os isolados EC134, KP135 e KP136 foram recuperados do mesmo paciente em duas internações diferentes. Os isolados de *K. pneumoniae*, KP135 e KP136, foram isolados no dia 1º de junho de 2016 de um *swab* de vigilância de um paciente internado na Unidade Cirúrgica (CRI) do HU-UFSC. A amostra KP135 apresentou resistência à ampicilina, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, imipenem e meropenem. A presença de metalo-carbapenemase foi detectada pelo método fenotípico de bloqueio enzimático com EDTA. A confirmação da presença do gene *bla*_{NDM} foi feita por PCR no Laboratório de Análises Clínicas do HU-UFSC (LAC-HU) e, posteriormente, neste projeto por qPCR. Pelo fato do isolado KP136 apresentar outra carbapenemase que será abortada posteriormente neste estudo, os dados dessa amostra serão expostos na seção posterior.

O terceiro isolado foi recuperado de uma cultura de vigilância do dia 1º de agosto de 2016, quando o paciente foi internado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Se tratava de um isolado de *E. coli* (EC134) resistente à ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina/tazobactam, cefuroxima, cefoxitina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, imipenem e meropenem. Foi confirmada a presença de metalo-carbapenemase pelo teste de bloqueio enzimático com EDTA e a confirmação do gene *bla*_{NDM} por PCR no LAC-HU e, posteriormente, por qPCR neste projeto.

A CIM dos isolados KP135 e EC134 foi determinada para meropenem e imipenem, sendo que KP135 apresentou CIM de 4 mg/L e 32 mg/L, e EC134 apresentou CIM de 2 mg/L e 16 mg/L, respectivamente (Tabela 5).

Os genes de resistência identificados por qPCR em EC134 foram *bla*_{NDM} e *bla*_{TEM}, em KP135 foram identificados os genes *bla*_{NDM}, *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Os grupos de incompatibilidade detectados por PRBT em EC134 foram IncFII e IncFd, em KP135 foram IncN, IncA/C e IncFd (Tabela 5).

O tamanho do genoma de EC134 (ST155), montado pelo SPAdes foi de 4.992.257pb e de KP135 (ST1229) foi de 5.783.909pb (Tabela 5).

Tabela 5. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados EC134 e KP135 carreadores do gene *bla_{NDM-1}*.

Características		EC134	KP135
Sítio		reto	reto
Perfil de resistência^a		AMP, SAM, PTZ, CXM, FOX, CZD, CRO, FEP, IPM, MEM	AMP, PTZ, CXM, FOX, CZD, CRO, FEP, IPM, MEM
CIM meropenem^b		2	4
CIM imipenem^b		16	32
Tamanho do genoma		4.987.780	5.779.138
MLST (ST)^c		155	1229
Resistoma^d			
ATBs	β -lactâmicos	<i>bla_{NDM-1}</i> *, <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{TEM-1C}</i> *, <i>PBP3</i> (D350N, S357N), <i>ampH</i> , <i>ampC</i>	<i>bla_{NDM-1}</i> *, <i>bla_{OXA-1}</i> , <i>bla_{TEM-1C}</i> *, <i>bla_{SHV-172}</i> *, <i>PBP3</i> (D350N, S357N)
	aminoglicosídeos	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3')-VI</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i>	<i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aph(3')-VI</i>
	fluoroquinolonas	<i>qnrB2</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrB20</i> , <i>marR</i> (Y137H, G103S)	<i>oqxB</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>marR</i>
	fenicol	<i>catB3</i>	<i>catB3</i>
	sulfonamidas	<i>sul2</i> , <i>sul1</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>
	fosfomicina	<i>glpT</i> (E448K)	<i>fosA6</i> , <i>uhpT</i> (E350Q)
	peptídico	<i>ugd</i> , <i>pmrF</i>	
	macrodantina	<i>nfsA</i>	
	rifampicina	<i>arr-3</i>	<i>arr-3</i>
Grupos de Incompatibilidade^e		IncFII , IncFd	IncN , IncA/C, IncFd
Grupos de Incompatibilidade^f		IncA/C2, IncFII	IncN , IncA/C2, IncFII, IncFIB(k)

^a: teste de sensibilidade aos antimicrobianos determinado por Vitek 2; ^b: CIM determinada por microdiluição em caldo; ^c: ST, sequence type. MLST loci (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, and *recA*) para *E. coli* e (*gapA*; *infB*; *mdh*; *pgi*; *phoE*; *rpoB*; *tonB*) para *K. pneumoniae*; ^d: genes de resistência adquiridos detectados pelo banco de dados *ResFinder* e *CARD*; ^e: grupos de incompatibilidade encontrados pelo banco de dados *PlasmidFinder*; ^f: grupos de incompatibilidade detectados por PBRT; AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam, PTZ: piperacilina/tazobactam, CXM: cefuroxima, FOX: cefoxitina, CZD: ceftazidima, CRO: ceftriaxona, FEP: cefepime, IPM: imipenem, MEM: meropenem, em negrito os grupos de incompatibilidade encontrados nas duas metodologias; *: genes confirmados por qPCR. Fonte: elaborado pela autora.

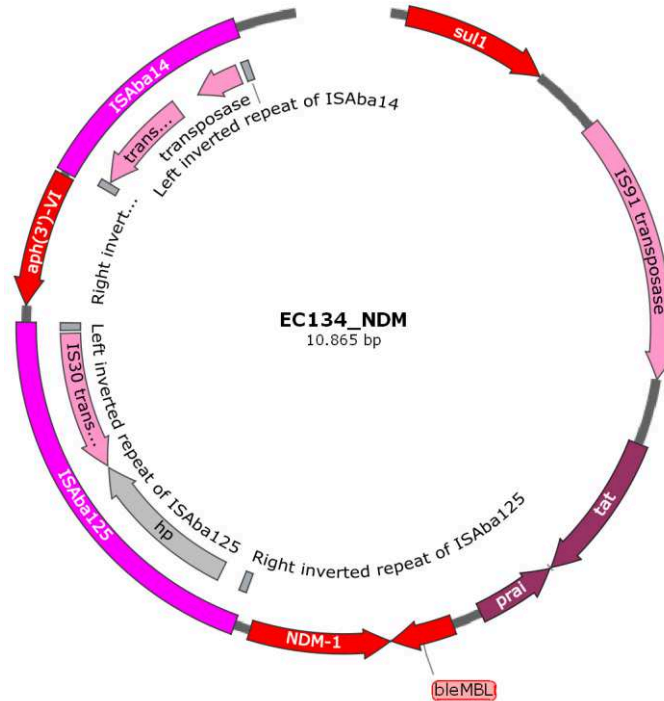
Além das β -lactamases detectadas por qPCR, a pesquisa *in silico* por genes de resistência adquiridos nas bases *ResFinder* e *CARD*, para os isolados EC134 e KP135,

resultou na presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fencóis, macrolídeos, tetraciclina, sulfonamidas, fosfomicina e rifampicina. A β -lactamase *bla_{OXA-1}* não foi pesquisada por qPCR, porém foi identificada nos dois isolados. No isolado EC134 foram identificados genes de resistência à macrolídeos e antimicrobianos peptídicos, enquanto em KP135 foi detectada a mutação da porina *ompK37* (Tabela 5).

Os grupos de incompatibilidade detectados na análise *in silico* para EC134 foram *IncA/C2* e *IncFII* e para KP135 foram *IncN*, *IncA/C2*, *IncFII*, *IncFIB(k)*. Por análise *in silico* de pMLST os plasmídeos *IncA/C2* detectados nos dois isolados apresentavam o mesmo ST3. Os resultados dos plasmídeos identificados por PBRT discordaram daqueles encontrados na análise do sequenciamento (Tabela 5).

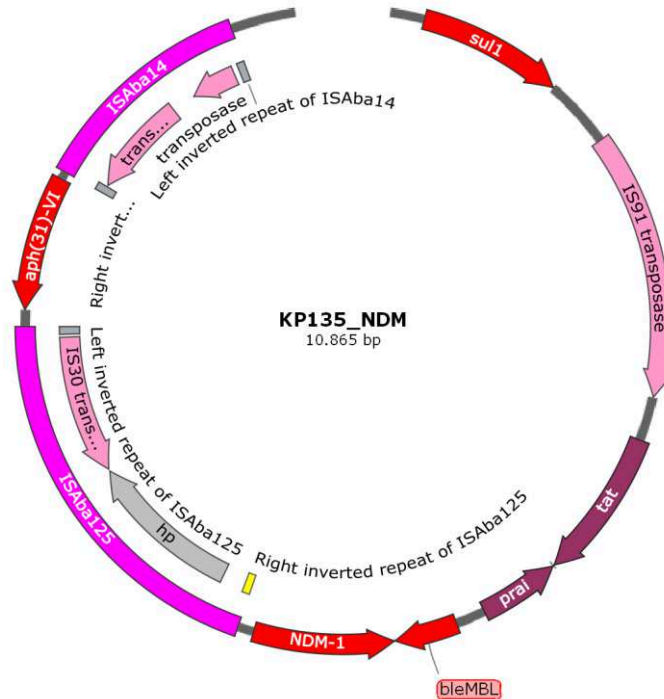
Diferentemente do que ocorreu com os isolados *mcr-1* positivos, não foi possível a formação do plasmídeo completo carregando o gene *bla_{NDM-1}*. Tanto para o isolado EC134 quanto para o isolado KP135 houve a formação de parte do plasmídeo carreador da metalo-carbapenemase, uma sequência de 10.865pb contendo o gene *bla_{NDM-1}*, porém nesta sequência não estava incluído o *replicon* do plasmídeo correspondente, portanto, não foi possível associar o gene de resistência a qualquer grupo de incompatibilidade (Figuras 13 e 14).

Figura 13. Representação gráfica do contexto genético em que *bla*_{NDM-1} está inserido em EC134.



Genes de resistência destacado pela cor vermelha, transposases representadas pela cor rosa-claro, sequências de inserção representadas pela cor rosa escuro, outras proteínas representadas pela cor roxa e proteínas hipotéticas representadas pela cor cinza. Hp: proteína hipotética. Fonte: elaborado pela autora.

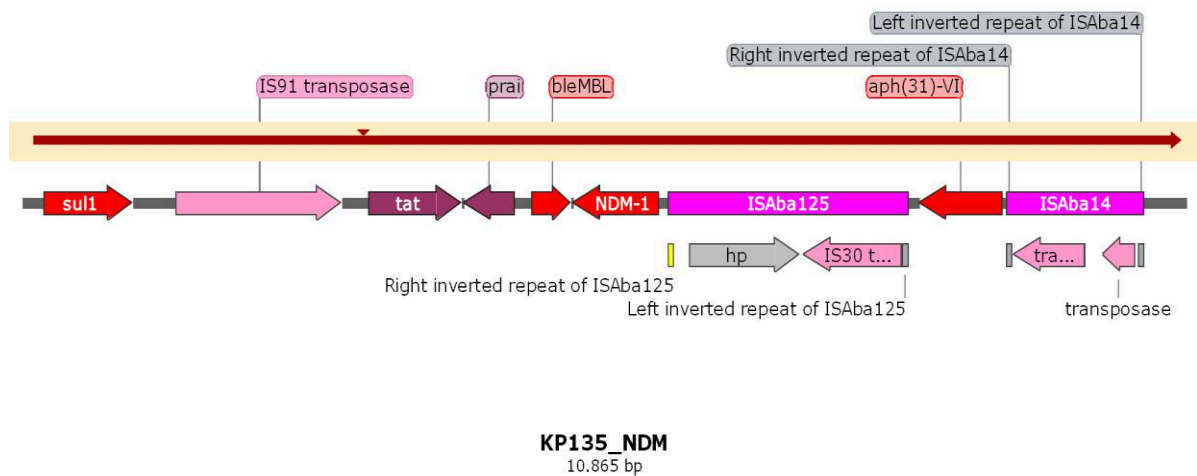
Figura 14. Representação gráfica do contexto genético em que *bla*_{NDM-1} está inserido em KP135.



Genes de resistência destacado pela cor vermelha, transposases representadas pela cor rosa-claro, sequências de inserção representadas pela cor rosa escuro, outras proteínas representadas pela cor roxa e proteínas hipotéticas representadas pela cor cinza. Hp: proteína hipotética. Fonte: elaborado pela autora.

A sequência contendo o gene *bla*_{NDM-1} dos isolados EC134 e KP135 continham 10.865pb e eram idênticas (Figura 15). Nessas sequências haviam quatro genes de resistência: *bla*_{NDM-1}, *ble*_{MBL}, que confere resistência à bleomicina, *sul1*, que confere resistência às sulfonamida e *aph(3')-IV*, que confere resistência aos aminoglicosídeos. À jusante do gene *bla*_{NDM-1} havia uma transposase da família IS91 e à montante do gene de resistência havia a presença da sequência de inserção ISAbal25. À montante do gene *aph(3')-IV* foi identificada a sequência de inserção ISAbal4, conhecida por estar associada à resistência aos aminoglicosídeos.

Figura 15. Alinhamento das sequências de EC134 e KP135 que continha o gene *bla_{NDM}*.



Alinhamento das sequências contendo o gene *bla_{NDM-1}* com 100% de identidade entre as sequências. Genes de resistência destacado pela cor vermelha, transposases representadas pela cor rosa-claro, sequências de inserção representadas pela cor rosa escuro, outras proteínas representadas pela cor roxa e proteínas hipotéticas representadas pela cor cinza. Hp: proteína hipotética. Fonte: elaborado pela autora.

Os isolados EC134 e KP135 apresentam os grupos IncA/C e IncFII em comum. A análise de pMLST *in silico* desses plasmídeos revelou que o ST dos plasmídeos IncFII dos dois isolados eram diferentes, FII-2 para EC134 e FII-K4 para KP135. Entretanto, além do ST dos plasmídeos IncA/C ser o mesmo nos dois isolados (ST3), as sequências dos *contigs* dos plasmídeos de ambos os isolados também eram idênticos.

4.1.6.5 Carbapenemase *bla_{KPC-2}*: isolados EC13, KP23, KP46, ECL120, KP136, KP141 e KP142

Durante análise de similaridade genética por PFGE observou-se que o gene *bla_{KPC}* foi identificado em isolados nos quais o plasmídeo do grupo IncN estava presente. A partir desses resultados, foram selecionados sete isolados, sendo um de *E. coli*, cinco de *K. pneumoniae* e um de *E. cloacae* recuperados de diferentes sítios, a fim de conhecer o contexto genético em que este gene de resistência está inserido. O isolado de *E. coli* (EC13) foi recuperado de um *swab* de vigilância, em julho de 2015, na Clínica Médica I. O isolado de *E. cloacae* (ECL120) também foi recuperado de um *swab* de vigilância de um paciente internado na Clínica Médica II, em março de 2016. O isolado KP23 de *K. pneumoniae* foi recuperado de um *swab* de vigilância, em abril de 2015, na Clínica Médica I, KP46 foi isolado de um *swab*

coletado do leito da UTI, em agosto de 2015. O isolado KP136 foi recuperado de um *swab* de vigilância na primeira internação de um paciente na Unidade Cirúrgica I. Este isolado foi recuperado junto com outra *K. pneumoniae* (KP135) que carregava o gene *bla_{NDM-1}*. Os isolados KP141 e KP142 foram recuperados juntos de uma amostra de *swab* de vigilância de um paciente internado na Clínica Médica I, em fevereiro de 2018.

As concentrações inibitórias mínimas entre os isolados para os antimicrobianos imipenem variaram de 4 a 256 mg/L e para meropenem de 0,5 a 256 mg/L, o que sugere diferenças na expressão gênica ou a presença de outros mecanismos de resistência aos carbapenêmicos além do mecanismo de resistência enzimático via *bla_{KPC}* (Tabela 6).

A análise *in silico* de MSLT determinou que o isolado de *E. coli* (EC13) pertence ao ST131, o isolado de *E. cloacae* (ECL120) ao ST184, o isolado de *K. pneumoniae* KP23 ao ST258, KP46 ao ST437 e os isolados KP141 e KP142 ao ST340, sendo que todos os isolados de *K. pneumoniae* pertenciam ao complexo clonal 258 de *K. pneumoniae* (Tabela 6).

Todos os isolados apresentaram diversos genes de resistência aos β -lactâmicos (além daqueles confirmados por qPCR), aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fenicóis e fosfomicina. Com exceção de EC13, todos os outros isolados apresentaram gene de resistência ao trimetoprim. EC13 foi o único isolado que apresentou gene de resistência à macrodantina e junto com ECL120 foram os únicos isolados que apresentaram genes que conferiam resistência aos antimicrobianos peptídicos. KP141 e KP142 não apresentaram genes de resistência aos macrolídeos e KP141 e EC13 foram os únicos que não apresentaram genes de resistência às sulfonamidas (Tabela 6).

Assim como nos outros isolados que foram sequenciados houve discrepância entre os grupos de incompatibilidade encontrados por PBRT e os identificados pelo *PlasmidFinder*. Em todos os isolados foi identificado o grupo IncN e este achado foi confirmado na análise *in silico* para todos os isolados. A análise *in silico* de pMLST detectou que os plasmídeos IncN de todos os isolados portadores do gene *bla_{KPC-2}* pertenciam ao ST15 (Tabela 6).

Tabela 6 Características fenotípicas e genotípicas dos isolados carreadores do gene *bla*_{KPC-2}.

Características	EC13	KP23	KP46	ECL120	KP136	KP141	KP142	
Sítio	reto	reto	leito	reto	reto	reto	reto	
Perfil de resistência^a	AMP, SAM, FEP, CRO, CXM, PTZ, CIP, ETP, GMN	AMP, SAM, FEP, CRO, CXM, CZD, PTZ, CIP, ETP, IPM, MEM, TGC, PXN	AMP, SAM, FEP, CRO, CXM, CZD, PTZ, CIP, ETP, IPM, MEM, TGC, GMN	AMP, SAM, CXM, CZD, CRO, FEP, ETP, IPM, MEM, GMN, CIP, TGC	AMP, PIP, CFU, CRO, CZD, CTX, FEP, IPM, MEM, GMN, CIP	AMP, SAM, FEP, CRO, FOX, CXM, CZD, PTZ, CIP, ETP, IPM, MEM, TGC, GMN, AKN, PXN	AMP, SAM, FEP, CRO, FOX, CZD, CXM, PTZ, CIP, ETP, IPM, MEM, TGC, GMN, AKN, PXN	
CIM meropenem^b (mg/L)	0,5	256	128	64	256	256	64	
CIM imipenem^b (mg/L)	4	256	16	64	16	16	32	
Tamanho do genoma	5.466.658	5.842.924	5.654.250	5.617.691	5.593.009	5.790.199	5.842.073	
MLST (ST)^c	131	258	437	184	340	340	340	
Resistoma^d								
ATBs	β-lactâmicos	<i>bla</i> _{OXA-1} / <i>bla</i> _{CTX-M-15} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{TEM-1B} */ <i>ampH</i>	<i>bla</i> _{CTX-M-14} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{SHV-182} */ <i>bla</i> _{TEM-1B} *	<i>bla</i> _{CTX-M-14} */ <i>bla</i> _{CTX-M-15} */ <i>bla</i> _{TEM-1B} */ <i>bla</i> _{SHV-182} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{OXA-1} *	<i>bla</i> _{OXA-10} / <i>bla</i> _{TEM-1A} */ <i>bla</i> _{OXA-9} / <i>bla</i> _{ACT-7} / <i>bla</i> _{CTX-M-14} */ <i>bla</i> _{KPC-2} *	<i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{CTX-M-15} */ <i>bla</i> _{TEM-1B} */ <i>bla</i> _{SHV-182} *	<i>bla</i> _{CTX-M-15} */ <i>bla</i> _{OXA-9} / <i>bla</i> _{TEM-1A} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{SHV-182} *	<i>bla</i> _{TEM-1A} */ <i>bla</i> _{SHV-182} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{VIM-1} */ <i>bla</i> _{OXA-9} / <i>bla</i> _{CTX-M-15} *

Continuação							
Características	EC13	KP23	KP46	ECL120	KP136	KP141	KP142
aminoglicosídeos	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-Iid</i> , <i>baeS</i> , <i>acrD</i> , <i>cpxA</i>	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA2</i> , <i>kdpE</i>	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-Iid</i> , <i>aph(6)-Id</i>	<i>ant(2'')-Ia</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aadA1</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(6)-Id</i> , <i>SAT-2</i>	<i>aph(3')-Ia</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aadA2</i> , <i>aph(6)-</i> <i>Id</i> , <i>aac(3)-Iid</i>	<i>aadA1</i> , <i>aac(6')-Ib</i> , <i>aac(3)-Iid</i>	<i>aadA1</i> , <i>aph(3')-XV</i> , <i>aac(6')-Ib3</i> , <i>aac(3)-Iid</i>
fluoroquinolonas	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>aac(3)-Iid</i> , <i>parC (S80I)</i> , <i>gyrA (D87N</i> , <i>S83L)</i>	<i>oqxA</i> , <i>oqxB</i> , <i>parC (S80I)</i> , <i>gyrA (S83I)</i> , <i>gyrB (E466D)</i>	<i>qnrB1</i> , <i>aac(6')-</i> <i>Ib-cr</i> , <i>qnrB17</i> , <i>parC (S80I)</i> , <i>gyrA (S83I)</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>gyrA (S83F</i> , <i>D87N)</i>	<i>qnrB19</i> , <i>qnrB10</i> , <i>parC</i> <i>(S80I)</i> , <i>gyrA</i> <i>(S83I)</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrS1</i> , <i>gyrA</i> <i>(S80I)</i> , <i>parC</i> <i>(S83I)</i>	<i>aac(6')-Ib-cr</i> , <i>qnrS1</i> , <i>parC</i> <i>(S80I)</i> , <i>gyrA</i> <i>(S83I)</i>
fenicol		<i>catA1</i>	<i>catB3</i>	<i>catB8</i> , <i>catA1</i>			
sulfonamidas		<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul1</i> , <i>sul2</i>	<i>sul1</i>		<i>sul1</i>
trimetoprim		<i>dfrA12</i>	<i>dfrA30</i>	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA14</i>
macrolídeos	<i>acrR</i> , <i>mdfA</i>	<i>erm(42)</i> , <i>mph(A)</i>	<i>mph(A)</i>	<i>erm(42)</i> , <i>mph(A)</i>	<i>mphA</i>		
fosfomicina	<i>ptsI (V25I)</i> , <i>uhpT (E350Q)</i> , <i>glpT (E448K)</i>	<i>fosA</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>	<i>fosA6</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>	<i>fosA2</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>	<i>fosA6</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>	<i>fosA6</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>	<i>fosA6</i> , <i>uhpT</i> <i>(E350Q)</i>
macrofantina	<i>nfsA</i>						
peptídicos	<i>pmrF</i> , <i>eptA</i> , <i>ugd</i>						

Continuação

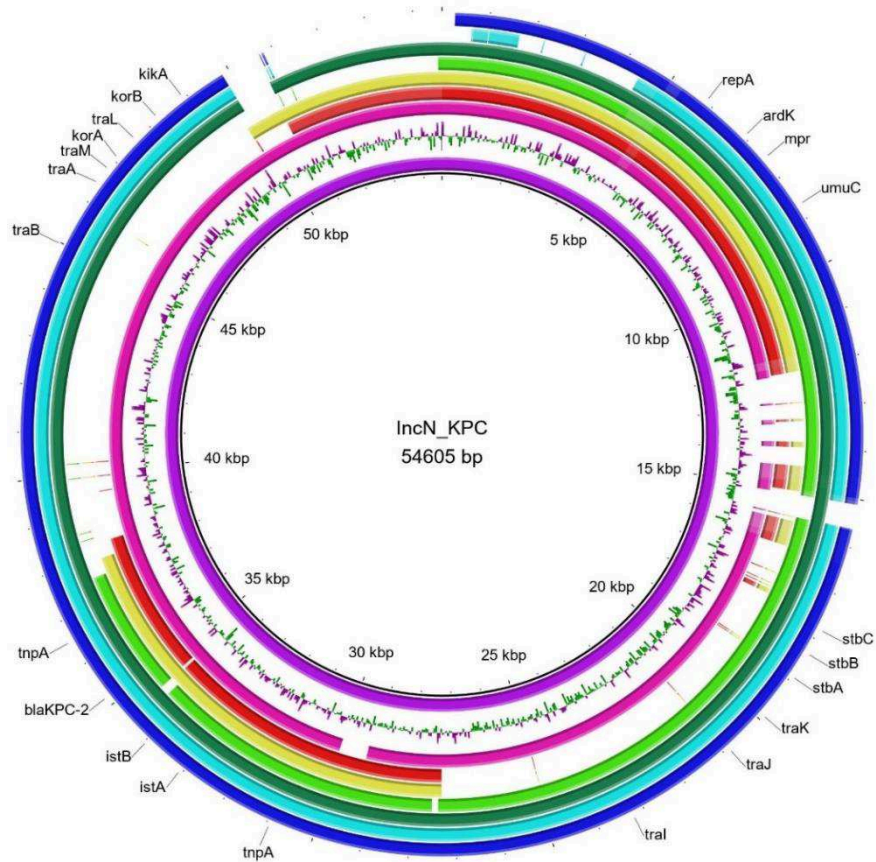
Características	EC13	KP23	KP46	ECL120	KP136	KP141	KP142
Grupos de Incompatibilidade^e	IncN	IncN, IncA/C, IncFIIk	IncN, IncA/C, IncFIIk	IncN, IncFIIy	IncN, IncA/C	IncN, IncP, IncA/C, IncFIB-M, IncFd	IncN, IncP, IncA/C, IncFIB-M, IncFd
Grupos de Incompatibilidade^f	Col(MG828), Col156, IncFIA, IncFIB, IncN	IncA/C2, IncFIB, IncFII, IncN	IncA/C2, IncFIB, IncFII, IncN	IncA/C2, IncHI2, IncHI2A, IncN	IncN, IncR, IncFIB(k), IncFII(k), IncFII(pCRY)	ColRNAI, IncFIB, IncN, IncX3	IncN2, IncN, ColRNAI, IncFIB, IncX3

a: teste de sensibilidade aos antimicrobianos determinado por Vitek 2; b: CIM determinada por microdiluição em caldo; c: ST, sequence type. MLST loci (adk, fumC, gyrB, icd, mdh, pura e recA) para *E. coli*, (gapA, infB, mdh, pgi, phoE, rpoB e tonB) para *K. pneumoniae* (dnaA, fusA, gyrB, leuS, pyrG, rplB e rpoB) e para *E. cloacae*; d: genes de resistência adquiridos detectados pelo banco de dados *ResFinder* e *CARD*; e: grupos de incompatibilidade encontrados pelo banco de dados *PlasmidFinder*; f: grupos de incompatibilidade detectados por PBRT; em negrito os grupos de incompatibilidade encontrados nas duas metodologias; *: genes confirmados por qPCR. ATBs: antimicrobianos, AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam, FEP: cefepime, CRO: ceftriaxona, CXM: cefuroxima, FOX: ceftazidima, PTZ: piperacilina/tazobactam, CIP: ciprofloxacina, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, TGC: tigeciclina, GMN: gentamicina, AKN: amicacina: PXN: polimixina. Fonte: elaborado pela autora

Na montagem dos plasmídeos portadores do gene *bla*_{KPC-2}, apenas em três isolados o grupo IncN e o gene *bla*_{KPC-2} se apresentavam no mesmo *scaffold*, sendo eles EC13, KP141 e KP142. No entanto, o alinhamento entre os isolados observou-se que havia identidade > 99% entre eles, portando se tratava de um mesmo plasmídeo. Para fazer a montagem dos plasmídeos dos isolados em que IncN e *bla*_{KPC-2} não estavam no mesmo *scaffold* utilizou-se como referência o plasmídeo pFCF3SP (nº de acesso do Genbank: CP004367) de um isolado de *K. pneumoniae* recuperada de hemocultura em São Paulo (PÉREZ-CHAPARRO et al., 2014).

Nenhum plasmídeo IncN carreador do gene *bla*_{KPC-2} foi recuperado por completo nos isolados deste estudo se comparado com o plasmídeo pFCF3SP, no entanto todos possuíam identidade maior que 99% com o plasmídeo de São Paulo (Figura 16). O plasmídeo IncN de todos os isolados tinham como característica apresentar apenas o gene *bla*_{KPC-2} como determinante de resistência, que estava flanqueado por duas sequências de inserção ISKpn6 e ISKpn7. Além disso, com exceção dos isolados EC13 e KP23 para os quais não foi viável a montagem de toda a região em que a carbapenemase estava inserida, para os outros isolados o gene *bla*_{KPC-2} estava inserido em um transposon Tn4401b (Figura 16). Ainda, à montante do gene *bla*_{KPC-2} foi identificado em EC13 e KP46 a transposase IS903B. O plasmídeo IncN era conjugativo, pois possuía todo um sistema de conjugação identificado pela presença dos genes *tra* (Figura 16).

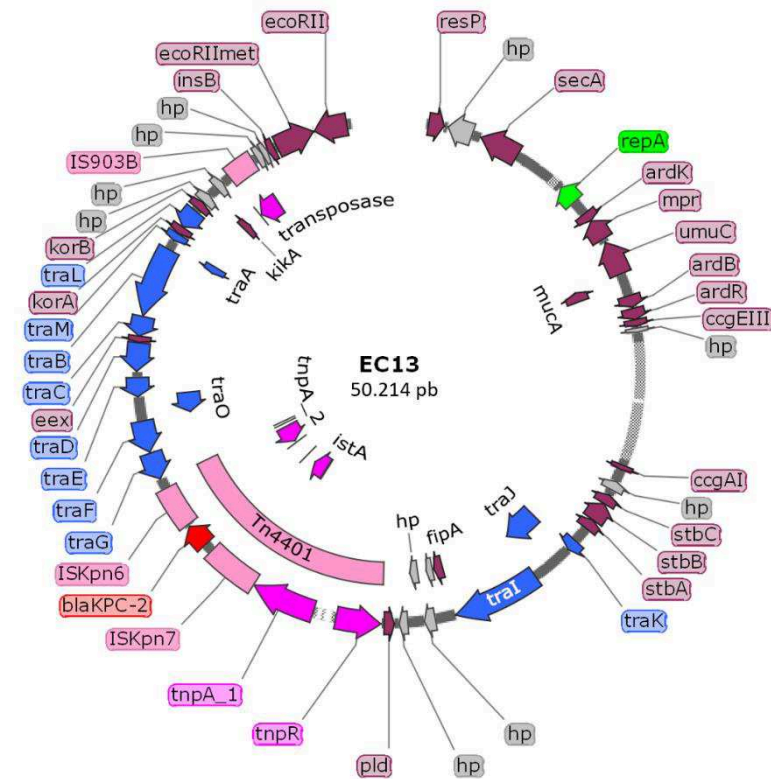
Figura 16 Alinhamento entre os plasmídeos IncN carreadores de *bla*_{KPC-2} identificados neste estudo em comparação com o plasmídeo referência pFCF3SP.



O alinhamento das sequências foi realizado de dentro para fora; a sequência representada em roxo é o plasmídeo pFCF3SP utilizado como referência para a montagem dos plasmídeos IncN deste estudo. Em fúcsia está representado o plasmídeo IncN de EC13, em vermelho o plasmídeo de KP23, em amarelo KP46, em verde claro ECL120, em verde escuro KP136, em azul claro KP141 e em azul escuro o plasmídeo IncN de KP142. Os espaços em branco são os *gaps* encontrados nos plasmídeos. Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo IncN carreador de *bla*_{KPC-2} do isolado EC13 foi possível mapear 50.214pb, todo o sistema de conjugação plasmidial e o transposon Tn4401 completo, de isoforma “b” em que a carbapenemase KPC estava inserida. Houve a formação de *gaps* em duas regiões da sequência, à montante do *replicon repA* e à montante do início do sistema de conjugação *tra* (Figura 17).

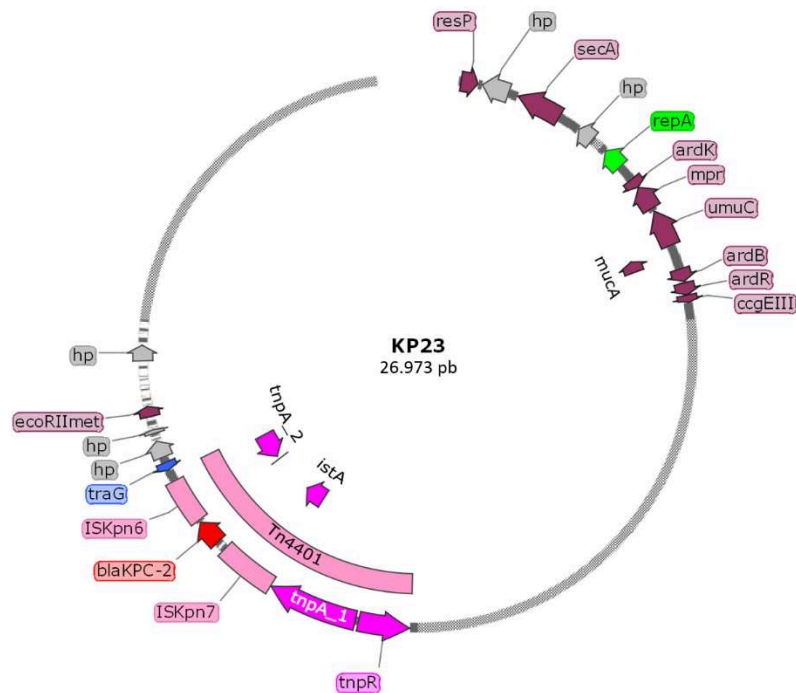
Figura 17. Representação gráfica do plasmídeo IncN do isolado EC13.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla_{KPC-2}*, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7, IS903B), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo IncN de KP23 foi possível mapear 26.793 pb. Houve *gaps* na sequência à jusante do *replicon repA* e do transposon Tn4401. Além disso, ocorreu a formação de *gap* no meio da sequência do transposon Tn4401, na região da transposase ISKpn7, portanto parte da sequência do transposon foi perdida, não podendo ser confirmada a sua isoforma. Não foi possível fazer a montagem do plasmídeo nas regiões em que o sistema de conjugação estava presente (Figura 18).

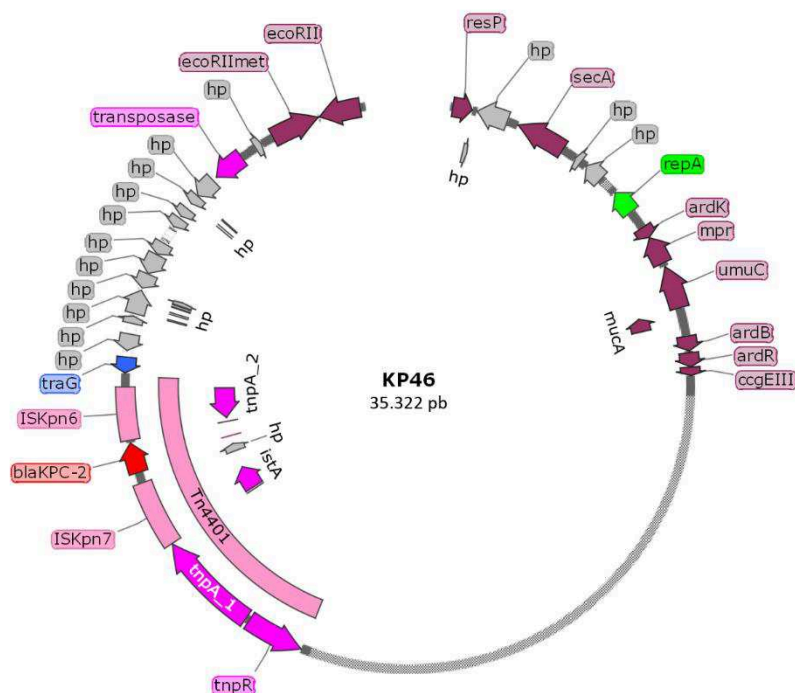
Figura 18. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP23.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla_{KPC-2}*, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo IncN de KP46 foi possível mapear 35.322 pb. A montagem do plasmídeo deste isolado foi prejudicada na região do sistema de conjugação, com a formação de *gaps* e sequências inespecíficas. Porém foi possível fazer a confirmação da presença de *bla_{KPC-2}* no transposon Tn4401b (Figura 19).

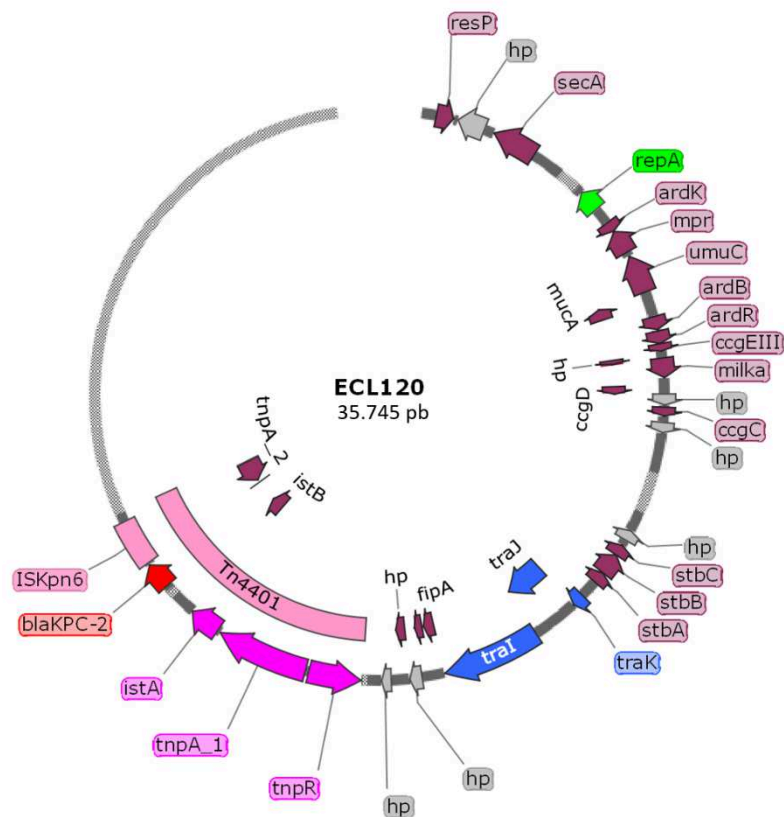
Figura 19. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP96.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla_{KPC-2}*, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

De maneira similar ao isolado anterior (KP46), foi possível mapear 35.745 pb do plasmídeo IncN de ECL120. Não ocorreu a montagem do plasmídeo na região em que a maior parte dos genes do sistema de conjugação estavam presentes, e ainda houve a montagem parcial da transposase ISKpn7, prejudicando a montagem completa do transposon Tn4401 e não sendo possível a confirmação da sua isoforma (Figura 20).

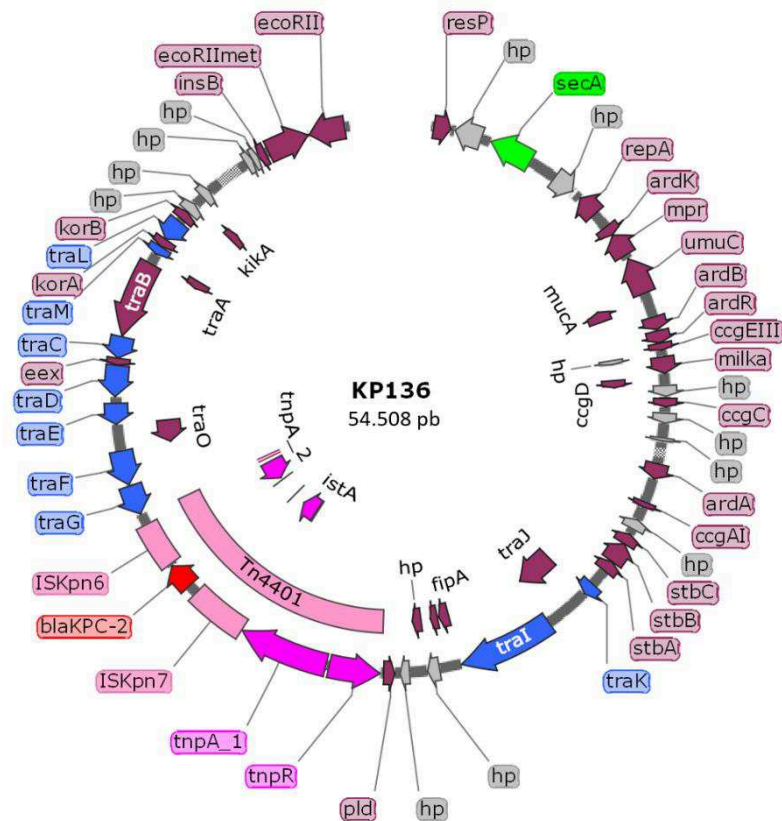
Figura 20. Representação gráfica do plasmídeo IncN de ECL120.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla_{KPC-2}*, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

A montagem do plasmídeo IncN do isolado KP136 permitiu o melhor mapeamento dos plasmídeos IncN (54.508 pb) e, conseqüentemente a maior cobertura em relação ao plasmídeo referência. Houve a formação de dois pequenos *gaps*, um a jusante do *replicon* *repA* e outro a jusante do gene *traL*. A sequência do transposon Tn4401b estava completa, confirmando sua isoforma e a presença do gene *bla_{KPC-2}* flanqueado pelas duas transposases ISKpn6 e ISKpn7 (Figura 21).

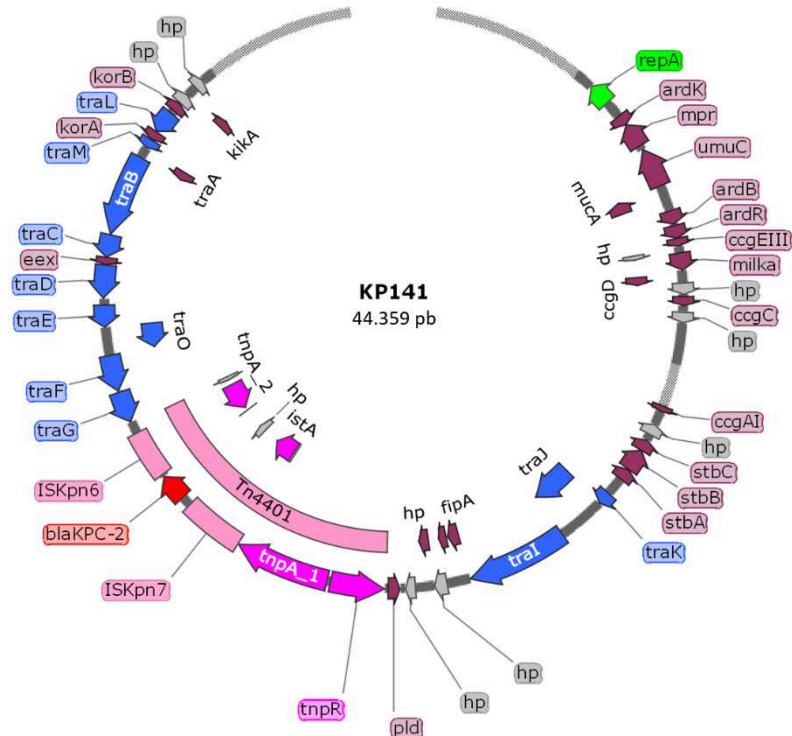
Figura 21. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP136.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla*_{KPC-2}, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo IncN de KP141 foi possível mapear 44.359 pb, com 3 *gaps*, sendo um deles a montante do *replicon* *repA*, outro à montante do gene *traK* e o último no final da sequência à jusante de *traL*. A sequência do transposon Tn4401b estava completa, confirmando a presença do gene *bla*_{KPC-2} e a isoforma do elemento móvel. Um dos *gaps* atingia o local da sequência em que estaria inserida a transposase IS903B (Figura 22).

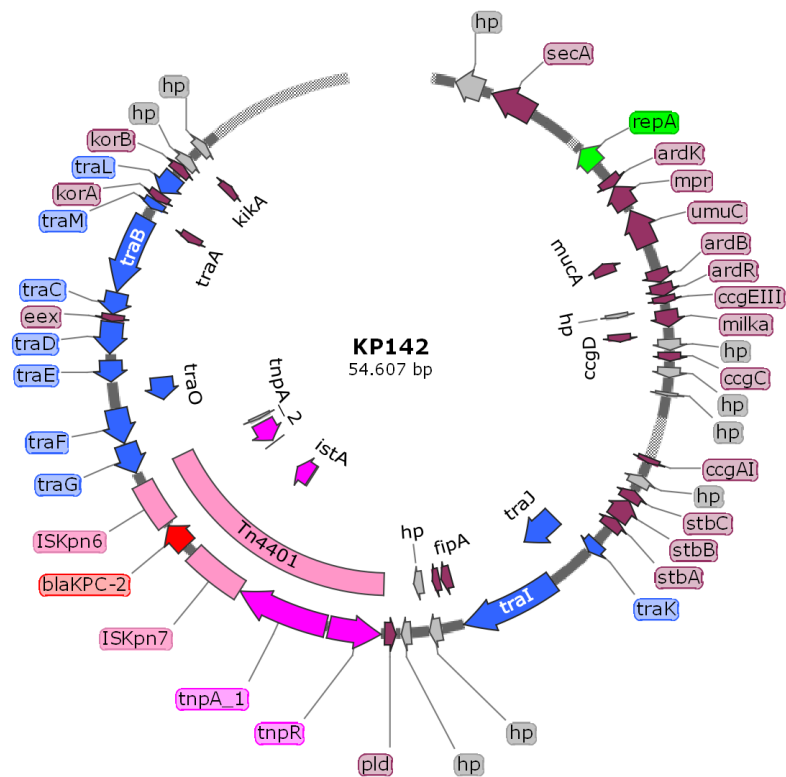
Figura 22. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP141.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla*_{KPC-2}, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

Para o plasmídeo IncN de KP142 foi possível mapear 48.853 pb, foram encontrados quatro *gaps* em toda a sequência, sendo dois deles à montante do *replicon* do plasmídeo, outro à jusante de *repA* e o último no final da sequência à jusante do gene *traL*. A presença da sequência completa de Tn4401b confirmou a sua isoforma e a presença do gene *bla*_{KPC-2} flaqueado pelas transposases ISKpn6 e ISKpn7 (Figura 23).

Figura 23. Representação gráfica do plasmídeo IncN de KP142.



Destacado em vermelho está o gene de resistência *bla_{KPC-2}*, em rosa claro estão representados os elementos genéticos móveis (transposon Tn4401, ISKpn6, ISKpn7), em rosa escuro estão representadas as transposases encontradas nos plasmídeos, em verde está representado o *replicon* do plasmídeo IncN, em azul todos os genes envolvidos no mecanismo de conjugação, em roxo os demais genes do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

4.1.6.6 Carbapenemase *bla_{VIM-1}*: isolados KP96 e KP142.

A metalo-carbapenemase *bla_{VIM}* foi detectada em dois isolados MDR de *K. pneumoniae* não relacionados. O primeiro, KP96, foi recuperado de uma amostra de urina de um paciente da Emergência do HU-UFSC, em janeiro de 2016. O segundo, KP142, foi recuperado de um *swab* de vigilância, em fevereiro de 2018, na Clínica Médica I. Este último isolado foi recuperado juntamente com o seu clone KP141 (análise por PFGE), porém KP141 não carregava o gene *bla_{VIM-1}*.

Os dois isolados possuíam perfis de sensibilidade aos antimicrobianos diferentes, no entanto, a CIM para imipenem e meropenem dos dois isolados eram as mesmas, 64 mg/L e 32 mg/L, respectivamente (Tabela 7).

Ambos os isolados carregavam as β -lactamases *bla*_{VIM-1}, *bla*_{SHV-182}, *bla*_{CTX-M-15}, porém KP96 carregava o gene *bla*_{OXA-1} e KP142 carregava os genes *bla*_{TEM-1a}, *bla*_{OXA-9} e outra carbapenemase *bla*_{KPC-2} (Tabela 7). Além dos genes de resistência aos β -lactâmicos, foram identificados, por análise *in silico*, genes de resistência aos aminoglicosídeos, fluoroquinolonas, fenicolis, sulfonamidas, trimetoprim e fosfomicina. Apenas KP96 carregava genes de resistência para tetraciclinas e macrolídeos (Tabela 7).

Nenhum grupo de incompatibilidade de plasmídeo foi detectado por PBRT em KP96, porém em análise ao *PlasmidFinder*, foram identificados os plasmídeos Col440I, IncA/C2, IncFIB, IncFII, IncN2. No isolado KP142 foram identificados por PCR os plasmídeos IncN, IncP, IncA/C, IncFIB-M, IncFd e na análise *in silico* os plasmídeos identificados foram IncN2, IncN, ColRNAI, IncFIB, IncX3 (Tabela 7).

Tabela 7. Características fenotípicas e genotípicas dos isolados KP96 e KP142 carregadores de *bla*_{VIM-1}.

Características		KP96	KP142
Sítio		urina	reto
Perfil de resistência^a		AMP, SAM, AMC, CEF, FEP, CRO, CXM, PTZ, CIP, NOR, NFE, SXT, MEM	AMP, SAM, FEP, CRO, FOX, CZD, CXM, PTZ, CIP, ETP, IPM, MEM, TGC, GMN, AKN PXN
CIM meropenem^b (mg/L)		64	64
CIM imipenem^b (mg/L)		32	32
Tamanho do genoma		5.683.905	5.842.073
MLST (ST)^c		11	340
Resistoma^d			
ATBs	β -lactâmicos	<i>bla</i> _{SHV-182} */ <i>bla</i> _{VIM-1} */ <i>bla</i> _{OXA-1} / <i>bla</i> _{CTX-M-15} *	<i>bla</i> _{TEM-1A} */ <i>bla</i> _{SHV-182} */ <i>bla</i> _{KPC-2} */ <i>bla</i> _{VIM-1} */ <i>bla</i> _{OXA-9} / <i>bla</i> _{CTX-M-15} *
	aminoglicosídeos	<i>aph</i> (3')-XV, <i>aadA2</i> , <i>aadA1</i> , <i>aac</i> (6')-Ib-cr, <i>aph</i> (3')-Ia, <i>aph</i> (6)-Id	<i>aadA1</i> , <i>aph</i> (3')-XV, <i>aac</i> (6')-Ib3, <i>aac</i> (3)-Iid

Continuação

Características	KP96	KP142
fluoroquinolonas	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrB19, gyrA (S83I), parC (S80I), qnrB10</i>	<i>aac(6')-Ib-cr, qnrS1, parC (S80I), gyrA (S83I)</i>
fenicol	<i>catB3, floR</i>	
sulfonamidas	<i>sul1, sul2</i>	<i>sul1</i>
trimetoprim	<i>dfrA12</i>	<i>dfrA14</i>
macrolídeos	<i>mph(A)</i>	
fosfomicina	<i>fosA6, uhpT (E350Q)</i>	<i>fosA6, uhpT (E350Q)</i>
Grupos de Incompatibilidade^e	NI	IncN , IncP, IncA/C, IncFIB-M, IncFd
Grupos de Incompatibilidade^f	Col440I, IncA/C2, IncFIB, IncFII, IncN2	IncN2, IncN , ColRNAI, IncFIB, IncX3

a: teste de sensibilidade aos antimicrobianos determinado pelo Vitek 2; b: CIM determinada por microdiluição em caldo; c: ST, sequence type. MLST loci (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, pura e recA*) para *E. coli*, (*gapA, infB, mdh, pgi, phoE, rpoB e tonB*) para *K. pneumoniae* e (*dnaA, fusA, gyrB, leuS, pyrG, rplB e rpoB*) para *E. cloacae*; d: genes de resistência adquiridos detectados pelo banco de dados *ResFinder* e *CARD*; e: grupos de incompatibilidade encontrados pelo banco de dados *PlasmidFinder*; f: grupos de incompatibilidade detectados por PBRT; em negrito os grupos de incompatibilidade encontrados nas duas metodologias; *: genes confirmados por qPCR. ATBs: antimicrobianos; AMP: ampicilina, SAM: ampicilina/sulbactam, FEP: cefepime, CRO: ceftriaxona, CXM: cefuroxima, FOX: cefoxitina, CZD: ceftazidima, PTZ: piperacilina/tazobactam, CIP: ciprofloxacina, ETP: ertapenem, IPM: imipenem, MEM: meropenem, TGC: tigeciclina, GMN: gentamicina, AKN: amicacina: PXN: polimixina. Fonte: elaborado pela autora

Assim como aconteceu com os isolados que carregavam o gene *bla_{NDM-1}*, não foi possível montar e associar o gene *bla_{VIM-1}* a nenhum plasmídeo dos isolados. O *contig* formado em que o gene *bla_{VIM-1}* estava presente, nos dois isolados, possuía apenas 1.164 pb, o que é praticamente apenas o tamanho do gene *bla_{VIM-1}* que possui 954 pb.

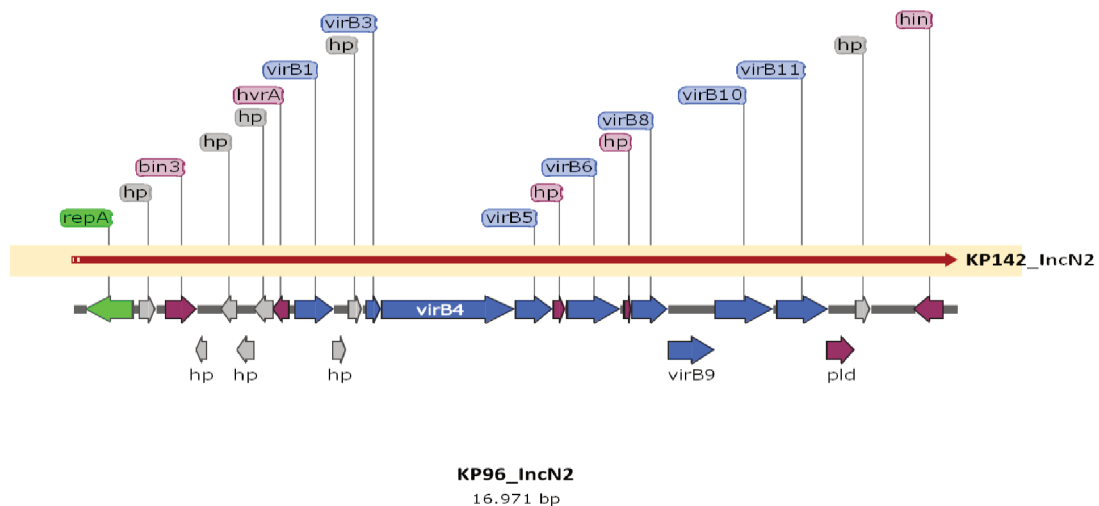
No entanto existe a hipótese de que o gene *bla_{VIM-1}* esteja localizado no plasmídeo IncN2 encontrado nos dois isolados. Os isolados KP141 e KP142 que foram recuperados juntos de uma mesma amostra de *swab* de vigilância, pela análise de PFGE foram considerados clonais e eram o mesmo clone ST340, compartilhavam o mesmo perfil de resistência, porém não compartilharam a mesma CIM para os carbapenêmicos testados.

Possuíam os mesmos genes de resistência, exceto que KP142 carregava também *bla*_{VIM-1} e possuíam os mesmos grupos de incompatibilidade plasmidiais, com exceção de que KP142 possuía um plasmídeo a mais, que pertencia ao grupo IncN2. Interessantemente este plasmídeo foi encontrado também no isolado KP96.

O *contig* em que o plasmídeo IncN2 estava inserido em KP96 possuía tamanho de 16.971 pb e em KP142, 17.012 pb. O alinhamento dessas duas sequências resultou na identidade maior que 99% (Figura 23). A sequência recuperada desses plasmídeos não possuía nenhum gene de resistência ou elemento genético móvel. Havia o *replicon* do plasmídeo e um conjunto de genes responsáveis pelo sistema de secreção do tipo IV, proteínas responsáveis pelos canais de translocação (*virB1*, *virB3*, *virB5*, *virB8* e *virB10*) e genes responsáveis pela formação do pili (*virB11*) (Figura 24).

Não foi possível afirmar se IncN2 se tratava de um plasmídeo pequeno, com tamanho um pouco maior que 17.000 pb, nem se havia relação entre a presença desses plasmídeos nos isolados KP96 e KP142 e o gene *bla*_{VIM-1}. Novas abordagens de sequenciamento serão necessárias para esclarecer a limitação técnica que ocorreu nesses isolados.

Figura 24. Alinhamento das sequências do plasmídeo IncN2 presentes em KP96 e KP142.



Alinhamento da sequência de IncN2 de KP96 comparado com a sequência encontrada em KP142. A linha em vermelho escuro representa a sequência de KP142 que possuía >99% de identidade com a sequência de KP96, porém apresentou um mismatch e um gap representado como linhas brancas no início da sequência de KP142. Em verde está representado o *replicon* do plasmídeo, em azul está representado o sistema de secreção do tipo IV, em roxo estão os outros genes de manutenção do plasmídeo e em cinza as proteínas hipotéticas. Hp: proteínas hipotéticas. Fonte: elaborado pela autora.

5 DISCUSSÃO

5.1 DISCUSSÃO DOS DADOS GERAIS

Enterobacterales são microrganismos comuns da microbiota intestinal dos seres humanos e de animais, no entanto, são importantes patógenos oportunistas tanto em infecções comunitárias quanto em infecções hospitalares (DONNENBERG, 2015). Infecções causadas por enterobactérias costumam ser particularmente graves, devido a facilidade com que esses microrganismos adquirem genes de resistência (PELEG; HOOPER, 2010).

Neste estudo, foram selecionados apenas microrganismos multirresistentes de diferentes sítios: pacientes, profissionais da saúde e ambiente hospitalar. Interessantemente, cerca de 47% dos isolados selecionados eram microrganismos colonizadores do paciente. Sabe-se que esses microrganismos podem permanecer na microbiota por meses ou até mais de um ano. Durante este período, podem ocorrer trocas de material genético entre os microrganismos patogênicos e da microbiota e, conseqüentemente, a transferência horizontal de genes de resistência para bactérias anteriormente sensíveis (patogênicas ou colonizantes) (CANIÇA et al., 2016; DING et al., 2015). Além disso, a colonização de bactérias multirresistentes gera despesa ao hospital, que incluem: despesas com a detecção desses patógenos, medidas de controle de infecção e limitação de leitos devido ao isolamento do paciente, dependendo do tipo de bactéria (HÜBNER; RIED; FLESSA, 2018). Para o paciente que está colonizado por microrganismo MDR, a sua admissão ao hospital pode ser associada ao prolongamento da internação, aumento dos custos médicos e risco aumentado de infecções nosocomiais (ENGLER-HÜSCH et al., 2018).

Infecções do trato urinário (ITU) são o tipo mais frequente de infecção que levam as pessoas a utilizarem antimicrobianos no mundo (KHAWCHAROENPORN; VASOO; SINGH, 2013; KLEVENS et al., 2007). Neste estudo, isolados recuperados de culturas de urina representaram 68% do total de isolados provenientes de infecção que foram selecionados. Os bacilos Gram-negativos, mais especificamente, Enterobacterales, são os principais microrganismos causadores de ITUs e não é incomum o tratamento empírico para esse tipo de infecção (LINSENMEYER; STRYMISH; GUPTA, 2015). Com o aumento da resistência aos antimicrobianos pelas enterobactérias, o tratamento empírico tornou-se mais

desafiador, pois limitou as opções terapêuticas (SANCHEZ et al., 2012). A escolha inadequada do antimicrobiano para o tratamento da ITU pode, além de ser ineficaz e significar uma recidiva para o paciente, acarretar na seleção de microrganismos ainda mais resistentes.

A resistência das enterobactérias é uma realidade e as taxas de Enterobacterales produtores de ESBL está crescendo (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). O perfil de sensibilidade dos isolados MDR deste estudo foram congruentes com os resultados obtidos na identificação dos genes de resistência pesquisados. Altas taxas de resistência às cefaloporinas foram encontradas, chegando a mais de 90% entre os isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae*, refletindo as taxas da principal ESBL encontrada neste estudo, *bla*_{CTX-M-1} (45,7%) (Figura 5), que por sua vez, está em consonância com a epidemiologia mundial na qual CTX-M-15, que faz parte do grupo 1, é a ESBL mais dominante em várias parte do mundo (BEVAN; JONES; HAWKEY, 2017). Se contrapondo aos dados epidemiológicos do país, que considera *bla*_{CTX-M-2} a ESBL mais frequente do Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016), esta enzima foi identificada em apenas 5% dos isolados deste estudo. Curiosamente, esses resultados vêm sendo observados pelo nosso grupo de pesquisa desde 2014 em Santa Catarina (ZAMPARETTE, 2014).

Um dos maiores desafios da saúde pública mundial é a resistência aos carbapenêmicos, especialmente em Enterobacteriaceae (BONOMO et al., 2018). A carbapenemase KPC, que foi descrita em 1996, em *K. pneumoniae*, nos EUA (YIGIT et al., 2001) e atualmente é considerada endêmica naquele país e em alguns países da Europa, como Grécia e Itália (SILVIA MUNOZ-PRICE et al., 2013). No Brasil, esta enzima é considerada a principal carbapenemase do país (SAMPAIO; GALES, 2016). Neste estudo *bla*_{KPC} foi a principal carbapenemase identificada entre todos os isolados (23%), do quais 71,8% deles eram representados por *K. pneumoniae*.

Em 2008, a metalo-carbapenemase *bla*_{NDM} foi descrita na Suécia, em um isolado de *K. pneumoniae* e um de *E. coli* (YONG et al., 2009), porém, um estudo retrospectivo de culturas estocadas revelou que o gene *bla*_{NDM} já estava circulando em amostras de Enterobacteriaceae desde 2006 (CASTANHEIRA et al., 2011). No Brasil, *bla*_{NDM} foi identificado pela primeira vez no cromossomo de um isolado de *Providencia rettgeri*, no Rio Grande do Sul, em 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). No entanto, um estudo retrospectivo feito no mesmo hospital em que primeiro isolado foi reportado revelou que esta enzima estava no país desde 2012 (CARVALHO-ASSEF et al., 2014). Desde então, houve

relatos esporádicos desse gene em diversos estados do país: Rio de Janeiro (CAMPOS et al., 2015; PEREIRA et al., 2015; QUILES et al., 2015), Paraná (PILLONETTO et al., 2014), Santa Catarina (CHAGAS et al., 2015), Rio Grande do Sul (PAGANO et al., 2015; ROZALES et al., 2014, 2017), Bahia (BARBERINO et al., 2018), Distrito Federal (FARIA-JUNIOR, 2016) e São Paulo (DO CARMO JUNIOR et al., 2015; FERREIRA et al., 2016), isolado em diversas espécies de bacilos Gram-negativos: *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *P. rettgeri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *C. freundii*, *P. mirabilis*, *A. baumannii*, *A. bereziniae* e *A. pittii* (DA SILVA et al., 2019; SAMPAIO; GALES, 2016). Por sua rápida disseminação pelo mundo e por sua habilidade em ser expressa em várias espécies de Gram-negativos, alguns pesquisadores sugerem que *bla_{NDM}* se tornará a carbapenemase mais distribuída mundialmente (BONOMO, 2017). Seguindo este raciocínio, neste estudo foram identificados sete isolados carreando este gene de resistência, dos quais três eram *E. coli*, dois isolados eram *K. pneumoniae*, um *K. oxytoca* e um *C. freundii*, recuperados entre janeiro de 2016 e março de 2018. Adicionalmente, durante as coletas do projeto HAIMP, o gene *bla_{NDM}* não foi identificado em nenhum isolado, entretanto, nos resultados de metagenômica, este gene foi identificado em uma amostra ambiental do CRI e do CC, em que *Acinetobacter johnsonii* era a espécie mais abundante (SEREIA, 2018). Portanto, tudo leva a crer que *bla_{NDM}*, mesmo que em baixa frequência, está circulando no hospital, pelo menos desde 2015.

Um dos maiores desafios atualmente é o entendimento dos mecanismos de disseminação dos genes de resistência que ocorrem através dos plasmídeos. Plasmídeos conjugativos possuem um papel fundamental na disseminação desses genes de resistência, normalmente pertencem às famílias que são amplamente espalhadas em diferentes espécies bacterianas e, geralmente carregam múltiplos determinantes de resistência, conferindo resistência a diferentes classes de antimicrobianos (CARATTOLI, 2013). Nem todas as famílias de plasmídeos ocorrem com a mesma frequência em espécies de Enterobacteriaceae, porém algumas famílias são mais prevalentes e difusas: IncA/C, IncF, IncHI2, IncI1, IncI2, IncM, IncN e IncX (CARATTOLI et al., 2005; DOLEJSKA; PAPAGIANNITSIS, 2018). Corroborando com os dados da literatura, os grupos de incompatibilidade que mais se destacaram neste estudo foram IncN, IncF, IncL/M e IncA/C (Figura 6).

Plasmídeos dos grupos IncN integram uma das principais famílias relacionadas com a disseminação de determinantes de resistência em Enterobacteriaceae (CARATTOLI, 2009;

GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2011) e, neste estudo foi o grupo de incompatibilidade mais encontrado entre os isolados (35%), principalmente em *K. pneumoniae*. Caracteristicamente são plasmídeos conjugativos de alta frequência, que abrangem uma diversidade de hospedeiros e são estáveis dentro do hospedeiro por possuírem sistemas de partição e anti-restrição (BELOGUROV; DELVER; RODZEVICH, 1992; MORÉ; POHLMAN; WINANS, 1996). Foram associados à disseminação de muitos determinantes de resistência, como ESBLs, AmpCs plasmidiais, carbapenemases, genes adquiridos de resistência a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (GARCÍA-FERNÁNDEZ et al., 2011). Dentre as carbapenemases, IncN foram relacionados com a disseminação de *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}* (CARATTOLI, 2009, 2013). Interessantemente, neste estudo, com exceção de um isolado de *K. pneumoniae* que carregava *bla_{KPC}*, todos os isolados de *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* que carregavam esta carbapenemase, foi identificada a presença do grupo IncN, o que é um forte indício da relação deste grupo de incompatibilidade ao gene de resistência. Para reforçar ainda mais esta suspeita, no Brasil, a disseminação de *bla_{KPC-2}* foi associada ao transposon Tn4401, presente no grupo de incompatibilidade IncN (PEREIRA et al., 2013).

Neste estudo, o grupo de incompatibilidade IncFII foi o segundo grupo mais frequente entre os isolados, principalmente em isolados de *E. coli*, porém outros grupos da família IncF foram identificados nas outras espécies estudadas, IncFIIk esteve mais presente em isolados de *K. pneumoniae* e IncFIIy em isolados de *E. cloacae*. Plasmídeos do grupo IncF fazem parte de uma variedade de plasmídeos de relação e nomenclatura complexa, se limitam em residir em Enterobacteriaceae por dependerem de fatores do hospedeiro para a sua replicação. (TOUKDARIAN, 2004). Em *E. coli*, em que IncFII foi mais encontrado, por exemplo, IncF costuma apresentar determinantes específicos de virulência como bacteriocinas, citotoxinas, sideróforos, fatores de adesão (VILLA et al., 2010). Neste estudo, não foi possível estabelecer uma relação entre os genes de resistência e os plasmídeos do grupo IncF encontrados, pois em nenhum isolado este foi o único grupo de plasmídeo encontrado. Entretanto, parece haver uma relação entre os plasmídeos do grupo IncFII e IncFIIy e *bla_{CTX-M-9}* nos isolados de *E. cloacae*. Em todos os isolados em que este gene estava presente, esses plasmídeos foram identificados. Interessantemente, *bla_{CTX-M-1}* foi a ESBL mais encontrada entre os isolados, e de acordo com a literatura, este gene parece estar diretamente relacionado com os plasmídeos da família IncF (CARATTOLI, 2009; NOVAIS et al., 2007), entretanto, na maioria dos isolados em que *bla_{CTX-M-1}* foi detectado, nenhum grupo de incompatibilidade foi identificado, o que pode ser justificado pela limitação da técnica de

PCR, por não se tratar de nenhum dos 29 grupos de incompatibilidade pesquisado ou ainda por se tratar de um novo grupo de incompatibilidade.

O grupo IncL/M é considerado uma das seis principais famílias de plasmídeos identificadas em Enterobacteriaceae. Apesar deste grupo plasmidial estar associado à disseminação de ESBLs (*bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{SHV-5}), carbapenemases (*bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}) e genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos (BONNIN et al., 2013; GOLEBIEWSKI et al., 2007; HO et al., 2011; PARTRIDGE et al., 2012; SMET et al., 2010; VILLA et al., 2000), quando este plasmídeo foi identificado nos isolados deste estudo, verificou-se que a maioria deles apresentavam *bla*_{CTX-M-8}, ESBL não associada a este plasmídeo até o momento, entretanto, a presença desse plasmídeo nesses isolados, sugerem que pode haver uma associação entre o grupo IncL/M e *bla*_{CTX-M-8} em isolados do HU-UFSC. Nenhum desses isolados foram selecionados para o sequenciamento completo, não sendo possível a confirmação dessa relação. Outro gene de resistência em que IncL/M está a *bla*_{NDM} (CARATTOLI et al., 2015), porém dos isolados que apresentavam este gene de resistência, nenhum apresentou este grupo de incompatibilidade.

A metodologia de classificação dos plasmídeos baseadas na tipagem do *replicon* é uma importante ferramenta para fornecer algumas informações sobre a epidemiologia da resistência aos antimicrobianos mediadas por plasmídeos, como por exemplo, rastrear os tipos de plasmídeos que estão envolvidos em um surto de resistência e esse surto é dirigido por diversos plasmídeos ou um plasmídeo dominante (VALVERDE et al., 2009). Além disso, as hipóteses sobre a transmissão de genes de resistência durante surtos podem ser pesquisadas de acordo com os plasmídeos presentes nos isolados clínicos (PECORA et al., 2015). Entretanto, os resultados encontrados na determinação dos grupos de incompatibilidade por PBRT, foram divergentes dos resultados encontrados na análise *in silico*, para todos os isolados que foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo. A exemplo disso, no isolado EC91, portador de *mcr-1*, foi identificado apenas o grupo IncX4 por PBRT, enquanto na análise *in silico* foram identificados além de IncX4 mais cinco plasmídeos diferentes, dos quais dois (IncFIA e IncFIB) faziam parte do conjunto de grupos identificados pela metodologia (Tabela 4). Uma das justificativas das discrepâncias dos resultados seria devido à tendência dos plasmídeos em ganhar, perder e rearranjar conteúdo genético (ORLEK et al., 2017). Isso significa que o mesmo grupo de incompatibilidade pode compartilhar poucos genes

filogeneticamente concordantes, impedindo, por exemplo, a subtipagem e análise filogenética (FONDI et al., 2016; MAIDEN, 2006; TAZZYMAN; BONHOEFFER, 2014). Outro motivo seria que os genes da “espinha dorsal” dos plasmídeos podem não ser tão conservados em todos os plasmídeos do mesmo grupo, devido ao mosaicismo plasmidial (LANZA et al., 2014; SEN et al., 2013) e se essas diferenças nas sequências estiverem localizadas nas regiões de hibridização dos iniciadores, ocorre falha na detecção desses plasmídeos.

O sequenciamento de leituras curtas com a combinação da análise *in silico* da tipagem plasmidial e dos genes de resistência (*PlasmidFinder* e *ResFinder*) podem gerar a estrutura completa do plasmídeo de interesse. Entretanto, não raro, isso não é possível (ARREDONDO-ALONSO et al., 2017). Acontece principalmente por haver múltiplas cópias de regiões repetidas, que são estruturas comumente encontradas em plasmídeos, flanqueando os genes de resistência, gerando uma ambiguidade na montagem, podendo fragmentá-la (PEVZNER; TANG; WATERMAN, 2001; TREANGEN; SALZBERG, 2012), não sendo possível a sua junção, mesmo utilizando várias ferramentas de bioinformática. Os sistemas de sequenciamento *paired-end* podem ajudar a resolver este problema, mas apenas se as leituras pareadas abrangerem as regiões repetidas. Se os *contigs* formados contiverem informações suficientes, é possível separar sequências cromossômicas e plasmidiais pesquisando no banco de dados BLAST (ORLEK et al., 2017; SENI et al., 2016). Neste projeto, pode-se presenciar os dois vieses do sequenciamento de leituras curtas. Foi possível montar o plasmídeo completo dos isolados que carregavam o gene *mcr-1* (EC11 e EC91), entretanto, nos isolados que carregavam o gene *bla_{NDM}* a montagem do plasmídeo completo não foi possível, mesmo utilizando-se várias ferramentas de bioinformática. Ainda, não foi possível a montagem completa dos plasmídeos IncN carregadores de *bla_{KPC-2}*, nem estabelecer uma relação de *bla_{VIM-1}* com um grupo de incompatibilidade, uma vez que a sequência em que o gene *bla_{VIM-1}* estava presente era muito pequena.

5.2 RESISTÊNCIA ADQUIRIDA À POLIMIXINA: *mcr-1*

A polimixina é um antimicrobiano amplamente utilizado na criação animal para fins profiláticos e terapêuticos (SUN et al., 2018). A demanda anual deste fármaco na agropecuária é de cerca de 12 toneladas (LIU et al., 2016). Com o aumento da resistência bacteriana e com o surgimento de novos mecanismos de resistência, a polimixina, que foi um antimicrobiano obsoleto na medicina humana, por ser altamente nefro e neurotóxico, passou a

ser utilizado para tratar infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos (BROWN; DORMAN; ROY, 1970; CANIAUX et al., 2017; KOH et al., 1999; SPAPEN et al., 2011).

Até 2016, acreditava-se que a resistência à polimixina se dava apenas por mutações cromossômicas (BARON et al., 2016; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014), porém, com a descoberta de *mcr-1*, localizado primeiramente no plasmídeo de isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* gerou um alerta às agências de saúde pública mundiais.

O gene *mcr-1* foi descoberto por acaso, quando se observou o aumento da resistência à polimixina em isolados de *E. coli*, nos quais a resistência a esse antimicrobiano por mutação não é comum. A descoberta desse gene ocorreu em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* obtidos de animais e de paciente internados, na China (LIU et al., 2016). Rapidamente foi relatada a presença desse gene em diversas partes do mundo e atualmente ele já foi descrito em mais de 40 países (SUN et al., 2018). O gene *mcr-1* já foi descrito em 13 grupos de incompatibilidade diferentes, porém os grupos IncI2, IncHI2 e IncX4 são considerados responsáveis pela disseminação deste gene no mundo. Parece haver uma relação geográfica entre o tipo de plasmídeo com a disseminação de *mcr-1*, em que IncHI2 está mais localizado na Europa, IncI2 na Ásia e IncX4 está na Europa, Ásia e América Latina (MATAMOROS et al., 2017).

No Brasil, o primeiro relato deste gene ocorreu em 2016, com isolados de origem animal datados de 2012 (FERNANDES et al., 2016a). E o primeiro relato de *mcr-1* em isolado clínico também ocorreu em 2016, de um isolado de *E. coli* ST101 proveniente de um paciente com pé diabético, em que o gene *mcr-1* estava localizado em um plasmídeo IncX4 (FERNANDES et al., 2016b). Interessantemente, os isolados em que foram identificados *mcr-1* deste estudo foram recuperados de culturas de vigilância de 2015 (EC11) e 2016 (EC91) de pacientes não internados, o que faz com que EC11 seja o primeiro isolado clínico de *E. coli* carreador de *mcr-1* do país.

EC11 e EC91, pertenciam ao ST206 e ST354, respectivamente. *E. coli* ST206 carreando *mcr-1* nunca havida sido relatado no Brasil, porém a aquisição *mcr-1* por *E. coli* ST206 foi relatada na China, em isolados clínicos, em colonizações de animais de corte e ambientes aquáticos (SHEN et al., 2018; ZHENG et al., 2017, 2018; ZHOU et al., 2017). *E. coli* ST354 carreando *mcr-1* foi descrita na China em humanos, galinhas e animais de

companhia (WU et al., 2018; ZHANG et al., 2016), no Camboja em isolados clínicos (STOESSER et al., 2016) e no Pasquitão em aves migratórias (MOHSIN et al., 2016), sendo considerado o novo genótipo pandêmico de MSLT com potencial zoonótico.

Plasmídeos do grupo IncX foram um dos primeiros plasmídeos isolados em Enterobacteriaceae, são conjugativos e com gama de hospedeiros estreita. São conhecidos por codificar o sistema de secreção do tipo IV para promover sua própria transferência, carregam genes de resistência e genes de formação de biofilme (JOHNSON et al., 2012). Como relatado anteriormente, o plasmídeo IncX4 é um dos principais responsáveis pela disseminação de *mcr-1* no mundo. No Brasil, até o momento, todos os plasmídeos identificados que carregavam *mcr-1* pertenciam ao grupo IncX4 e foram identificados em diferentes espécies de Enterobacteriaceae: *E. coli* (DALMOLIN et al., 2017; FERNANDES et al., 2016b; MONTE et al., 2017; PALMEIRA et al., 2018; SACRAMENTO et al., 2018; SELLERA et al., 2016), *K. pneumoniae* (AIRES et al., 2017) e *Salmonella* (MORENO et al., 2019).

Interessantemente, os plasmídeos pMIMAEC11mcr e pMIMAEC91mcr (Figura 12) eram idênticos ao plasmídeo IncX4 pICBEC71, descrito por Fernandes e colaboradores (FERNANDES et al., 2016b), que por sua vez possuíam 99,9% de identidade com plasmídeos IncX4 encontrados na China (Nº de acesso do Genbank: KU761327.1) e Estônia (Nº de acesso do Genbank: KU743383.1) (DU et al., 2016). Há um consenso de que o plasmídeo IncX4 poderia ser a chave para a disseminação de *mcr-1* intercontinentalmente (FERNANDES et al., 2016b; WU et al., 2018)

A principal hipótese é de que *mcr-1* foi transmitido dos reservatórios animais para os seres humanos e que a resistência plasmidial à colistina foi devida à grande quantidade de colistina utilizada na criação animal e que provavelmente este gene está circulando no ambiente há muito mais tempo do que se tem conhecimento (MATAMOROS et al., 2017). Isso faz com que seja necessário reavaliar o uso de antimicrobianos na agropecuária, pelo menos limitar a antimicrobianos que não sejam também usados para seres humanos, a fim de evitar que novas resistências desse tipo surjam. Nesse sentido, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento proibiu desde dezembro de 2016 a utilização de colistina como aditivo em rações para criação animal no Brasil.

A disseminação de *mcr-1* é uma realidade na restrição da terapia antimicrobiana para tratar infecções causadas por bactérias multirresistentes. Neste estudo, os dois isolados de *E. coli* em questão eram MDR, sendo um deles resistente apenas à ampicilina, ampicilina/sulbactam e colistina e mesmo assim, carregava vários outros genes de resistência

(Tabela 4). O outro isolado era resistente a diversos antimicrobianos, carregava *bla*_{CTX-M-2} e vários outros genes de resistência identificados *in silico*, no entanto, esses genes não estavam presentes no mesmo plasmídeo que *mcr-1*. O gene *mcr-1* ainda não foi isolado no mesmo plasmídeo que β -lactamases, por exemplo, mas já foi encontrado nos mais diferentes reservatórios e em diversas espécies de enterobactérias, possui, portanto, um poder disseminação muito grande. No Brasil, este gene já foi isolado em diversas espécies, em bactérias que carregavam os genes *bla*_{KPC} (DALMOLIN et al., 2017), *bla*_{CTX-M-2} (PALMEIRA et al., 2018) (como aconteceu no caso de EC91) e *bla*_{CTX-M-8} (SACRAMENTO et al., 2018), o que pode levar a uma restrição terapêutica tão significativa a ponto de comprometer o sucesso terapêutico no tratamento de infecções causadas por essas bactérias.

Diferentemente do que aconteceu com a maioria dos genes de resistência, *mcr-1* não foi descoberto nem disseminado dentro do hospital, a disseminação deste gene ocorreu de maneira silenciosa, provavelmente transmitida dos animais para os seres humanos. Os dois isolados deste estudo eram provenientes de pacientes não internados, que provavelmente nunca entraram em contato com a polimixina, pelo menos não diretamente, e mesmo assim carregavam *mcr-1*. Como o principal reservatório deste gene são animais de corte, inclusive foi descrito em amostras ambientais e em carnes embaladas contaminadas (CHIBA et al., 2019; MONTE et al., 2017; SACRAMENTO et al., 2018), qualquer pessoa poderia estar colonizada sem saber com bactérias que carreguem este gene.

5.3 PLASMÍDEOS CARREADORES DE CARBAPENEMASES

5.3.1 *bla*_{NDM-1}

As metalo-carbapenemases possuem como característica hidrolisar quase todos os β -lactâmicos (MOJICA; BONOMO; FAST, 2016). Neste estudo, foram sequenciados dois isolados que carregavam *bla*_{NDM}, um de *K. pneumoniae* e outro de *E. coli*, em que KP135 pertence ao ST1229 e EC134 pertence ao ST155, ambos foram recuperados do mesmo paciente, porém de culturas de vigilância diferentes, em internações distintas.

O gene *bla*_{NDM} foi reportado em plasmídeos que variavam de 50kb a 350kb de tamanho e de diferentes grupos de incompatibilidade (KHAN; MARYAM; ZARRILLI,

2017), incluindo IncL/M, IncA/C, IncF, IncHI1 e IncN; porém, IncA/C e IncHI1 são os mais frequentemente associados com este gene (CARATTOLI, 2013). No Brasil, foi reportado em plasmídeos IncFIik, IncX3, IncHI2, IncP, IncW e IncN (CAMPOS et al., 2015; QUILES et al., 2015).

Neste estudo, os plasmídeos do grupo IncA/C foram encontrados em 17% dos isolados e entre os sete isolados em que o gene *bla_{NDM}* foi identificado, em quatro o plasmídeo IncA/C estava presente, sendo KP135 e EC134 dois desses isolados. Plasmídeos IncA/C possuem como características serem plasmídeos grandes, de baixo número de cópias e ampla gama de hospedeiros em enterobactérias; são conjugativos e foram os primeiros plasmídeos associados a resistência em Gram-negativos (HARMER; HALL, 2015). Ganham notoriedade ao serem associados à disseminação de AmpC plasmidial *bla_{CMY}* e, mais recentemente, *bla_{NDM}* (CARATTOLI et al., 2012; HANCOCK et al., 2017; POIREL et al., 2011; WALSH et al., 2011).

Devido às limitações na metodologia de sequenciamento utilizada, não foi possível fazer a montagem dos plasmídeos IncA/C de EC134 e KP135, entretanto, ambos pertenciam ao ST3 e possuíam sequências idênticas. Além disso, não foi possível realizar a montagem completa dos plasmídeos carreadores de *bla_{NDM-1}* para ambos os isolados portadores desta enzima e, conseqüentemente não se pode afirmar, com certeza se há ou não associação entre *bla_{NDM-1}* e o grupo IncA/C2 presentes nessas células. Como foi mencionado anteriormente, um dos grandes problemas na montagem do sequenciamento de leituras curtas são justamente as regiões repetidas (PEVZNER; TANG; WATERMAN, 2001; TREANGEN; SALZBERG, 2012). Possivelmente, este tenha sido o problema, por se tratar de um grande plasmídeo com muitos genes de resistência e vários elementos genético móveis que são flanqueados por regiões repetidas. Outra hipótese na falha da montagem é a baixa cobertura no sequenciamento.

Normalmente os plasmídeos que carregam *bla_{NDM}* possuem outros determinantes de resistência que podem ser transferidos para outros microrganismos tornando-os multirresistentes ou com fenótipo de resistência estendida (MOJICA; BONOMO; FAST, 2016). Os isolados EC134 e KP135 eram multirresistentes e compartilhavam os mesmos genes de resistência para várias classes de antimicrobianos (Tabela 5). Em Enterobacteriaceae, *bla_{NDM}* é encontrado principalmente em plasmídeos e em contraste com o ambiente genético mais conservado deste gene em *Acinetobacter* spp., em enterobactérias ocorre diversidade no contexto genético desses plasmídeos. Entretanto, a maioria das

sequências dos plasmídeos de *bla_{NDM}* disponíveis no *Genbank* contém uma sequência de inserção IS_{Aba125} completa ou truncada à montante de *bla_{NDM}*, e à jusante da carbapenemase o gene *ble_{MBL}* está presente (CARATTOLI et al., 2012; PARTRIDGE; IREDELL, 2012; PFEIFER et al., 2011; VILLA et al., 2012). Essa região parece ser conservada nos plasmídeos contendo a enzima NDM. Muitos elementos móveis diferentes foram descritos flanqueando esses genes e possuindo um potencial para mobilizá-los, como Tn125 descrito primeiramente em *Acinetobacter*, mas já encontrado em Enterobacteriaceae; a transposase da família IS5 e a sequência de inserção IS3000 (da família IS30) (CHEN et al., 2015; SUN et al., 2015; YANG et al., 2015). No Brasil, foi caracterizado o Tn3000 como elemento genético móvel flanqueando *bla_{NDM-1}*, com duas cópias de IS3000 dispostas na porção 5' de IS_{Aba125} e a jusante de *ble_{MBL}* (CAMPOS et al., 2015). Nos isolados deste estudo, foi recuperada uma parte da região conservada dos plasmídeos carreadores de *bla_{NDM-1}*, tanto em EC134 quanto em KP135 essa região possuía o mesmo tamanho (10.865pb) e eram idênticas entre si. Foi identificada a sequência de inserção IS_{Aba125} à montante de *bla_{NDM-1}*, à montante de IS_{Aba125} estava o gene *aph(3')-VI*, que confere resistência aos aminoglicosídeos, e ao lado deste gene localizava-se outra sequência de inserção IS_{Aba14}, associada à resistência aos aminoglicosídeos. À jusante do gene *bla_{NDM-1}* estava o gene de resistência à bleomicina, outra transposase IS91 e o gene de resistência à sulfonamida *sulI* (Figura 15).

Os plasmídeos desses isolados serão novamente sequenciados, no entanto, tudo leva a crer que os plasmídeos carreadores de *bla_{NDM-1}* em EC134 e KP135 são iguais, possivelmente do grupo IncA/C e que provavelmente ocorreu a transferência *in vivo* desse plasmídeo enquanto o paciente estava sendo colonizado por KP135.

5.3.2 *bla_{KPC-2}*

Microrganismos produtores de carbapenemase KPC são o principal desafio do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do HU-UFSC. Em 2018, enterobactérias portadoras de *bla_{KPC-2}* foram responsáveis por aproximadamente 12% das infecções nosocomiais reportadas. Por isso houve a necessidade de aprofundar o conhecimento do contexto genético em que esse gene de resistência está inserido no hospital, assim como conhecer os plasmídeos circulantes responsáveis pela disseminação.

Diferentemente do que aconteceu com a carbapenemase *bla*_{OXA-48} em que o fator crucial para a disseminação foi a transmissão de elementos genéticos móveis (ADLER et al., 2011; CARRÈR et al., 2010), a disseminação de *bla*_{KPC} está relacionada ao complexo clonal 258 de *K. pneumoniae* (ADLER et al., 2012). Este complexo foi responsável pela disseminação do gene *bla*_{KPC} nos EUA, Europa e América Latina, incluindo o Brasil (ADLER et al., 2012; ANDRADE et al., 2011; BARANIAK et al., 2011; CUZON et al., 2010; KITCHEL et al., 2009; NICOLETTI; FEHLBERG; PICÃO, 2012). Em consonância com os dados da literatura, todos os isolados de *K. pneumoniae* carreadores de *bla*_{KPC-2} que foram selecionados para o sequenciamento do genoma pertenciam ao CC258, no entanto, embora todos esses isolados pertencerem ao mesmo complexo, apenas um deles (KP23) pertencia ao ST258 que é o clone amplamente disseminado no mundo, os demais isolados pertenciam aos STs 437 e 340. ST437, juntamente com ST11, são descritos na literatura como os clones dominantes no Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016). Recentemente, *K. pneumoniae* ST340 foi associada à co-produção de *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15} e ao gene *qnrB* em um hospital terciário de São Paulo (TOLENTINO et al., 2019). Interessantemente, três isolados de *K. pneumoniae* deste estudo que pertencem a este ST e carregam *bla*_{KPC-2}, carregam também os genes *bla*_{CTX-M-15} e *qnr* (Tabela 6).

A origem de *bla*_{KPC} permanece desconhecida, porém provavelmente esta resistência foi adquirida de um ancestral presente no cromossomo de um microrganismo ambiental, uma vez que β -lactamases existem muito antes da era dos antibióticos (BUSH, 2013).

O gene *bla*_{KPC} é tipicamente encontrado em plasmídeos e foi descrito em vários grupos de incompatibilidade, incluindo IncFII, IncFIA, IncI2, IncA/C, IncN, IncX, IncR, IncP, IncU, IncW, IncL/M e ColE (CHEN et al., 2014). No Brasil, o gene *bla*_{KPC} foi encontrado e reportado em plasmídeos do grupo IncFII, IncN e IncL/M (ANDRADE et al., 2011). No entanto, o plasmídeo que carregava *bla*_{KPC-2} do isolado mais antigo encontrado no Brasil (*K. pneumoniae*, em 2005) pertencia ao grupo IncN (pFCF1305) (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Curiosamente, em estudo publicado por Pérez-Chaparro e colaboradores comparando as sequências dos plasmídeos pFCF1305 e pFCF3SP, este último, utilizado como referência na montagem dos plasmídeos deste estudo, revelou alta similaridade entre eles e entre outros plasmídeos IncN carreadores do gene *bla*_{KPC-2} encontrados em outros países, como Grécia (PAPAGIANNITSIS et al., 2013) e EUA (GOOTZ et al., 2009). Mesmo se tratando de plasmídeos IncN de tamanhos diferentes, a espinha dorsal desses plasmídeos e o contexto genético em que *bla*_{KPC-2} estava inserido permaneceram conservados (PÉREZ-

CHAPARRO et al., 2014). Adicionalmente, foi identificado no Paraná um plasmídeo IncN carreador de *bla*_{KPC-2} em isolados de *K. pneumoniae* que também apresentavam alta identidade com os plasmídeos IncN caracterizados no país (PALMEIRO et al., 2019).

Apesar da limitação metodológica do sequenciamento e da análise de bioinformática que foram desafiadoras neste projeto, os plasmídeos IncN que foram montados ou parcialmente montados apresentaram alta identidade com o plasmídeo pFCF3SP, o que sugere que possa haver um plasmídeo IncN endêmico no Brasil, conservado, responsável pela disseminação do gene de resistência *bla*_{KPC-2}. Ainda, esses resultados suportam a hipótese levantada neste projeto de que a disseminação de *bla*_{KPC-2} no HU-UFSC ocorreu através do plasmídeo IncN, que estava presente em espécies de *E. coli*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae*, em isolados datados de 2015 a 2018, o que pode significar que este plasmídeo circula no hospital muito antes da coleta das amostras deste projeto.

O sucesso na disseminação de *bla*_{KPC-2} é multifatorial, *bla*_{KPC} está localizado em um transposon promíscuo, Tn4401, que é capaz de se transportar para vários plasmídeos que comumente são conjugativos. Esses plasmídeos têm se espalhado para diversas espécies de Enterobacterales, porém são altamente compatíveis com isolados de *K. pneumoniae* CC258 (CUZON et al., 2010). Tn4401 é um transposon de aproximadamente 10 kb, delimitado por duas sequências de repetição invertidas de 39 pb que ancora o gene *bla*_{KPC}, uma transposase Tn3 (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção, ISKpn6 e ISKpn7 (NAAS et al., 2008). Foram identificadas oito isoformas de Tn4401 (Tn4401a ao Tn4401h), porém as isoformas “a” e “b” são as mais difundidas mundialmente (BARANIAK et al., 2016; BRYANT et al., 2013; CHEN et al., 2012; CHERUVANKY et al., 2017; PECORA et al., 2015; SILVIA MUNOZ-PRICE et al., 2013). Assim como nos plasmídeos pFCF1305 e pFCF3SP descritos em São Paulo, como no plasmídeo caracterizado no Paraná, a isoforma do transposon Tn4401 encontrada nos isolados deste estudo foi a “b”, com 100% de identidade com o Tn4401b descrito em pFCF3SP. A confirmação da presença desta isoforma não foi feita apenas em EC13 e KP23 devido a formação de *gaps* no meio da sequência do transposon. Esses resultados reforçam a hipótese da existência de um plasmídeo IncN conservado e endêmico no país associado à disseminação do gene *bla*_{KPC-2}.

5.3.3 *bla*_{VIM-1}

A metalo-carbapenemase *bla*_{VIM-1} foi descrita em 1997, em Verona, na Itália (LAURETTI et al., 1999) e logo em seguida *bla*_{VIM-2} foi descrita na França, em uma amostra coletada em 1996 (POIREL et al., 2000), nas duas situações, em isolados de *P. aeruginosa*. Inicialmente, acreditava-se se tratar de uma carbapenemase exclusivamente de bacilos Gram-negativos não fermentadores, porém cada vez mais esta enzima vem sendo detectada em Enterobacterales (MOJICA; BONOMO; FAST, 2016). Essa enzima é a metalo-carbapenemase predominante da Europa, especialmente no Mediterrâneo, como na Itália e Grécia (CORNAGLIA; GIAMARELLOU; ROSSOLINI, 2011; YORDANOV; STRATEVA, 2009).

Atualmente, *bla*_{VIM-2} é considerada a variante mais disseminada no mundo desta enzima, porém *bla*_{VIM-1} é mais frequentemente encontrada em Enterobacteriaceae. A Grécia é considerada o epicentro de infecções causadas por *K. pneumoniae* e *E. coli* carreadoras de *bla*_{VIM-1} (WALSH et al., 2005). Na América Latina, VIM-2 foi detectada pela primeira vez, em 2002, no Chile e na Venezuela em isolados de *P. fluorescens* e *P. aeruginosa*, respectivamente (SADER et al., 2005a). No Brasil, *bla*_{VIM-2} circula desde 2005, predominantemente em isolados de *P. aeruginosa* (BRADFORD et al., 2015; FRANCO et al., 2010; PAEZ et al., 2011; PICÃO et al., 2008; RIZEK et al., 2014; SADER et al., 2005b). Nenhum relato da presença de *bla*_{VIM} em isolados de Enterobacterales foi encontrado, entretanto, um estudo detectou *bla*_{VIM-1} em espécies de *Paenibacillus* spp. e *Bacillus* spp, que são microrganismos ambientais (PITONDO-SILVA et al., 2016). Com base nos dados epidemiológicos do país, este pode ser o primeiro relato de *bla*_{VIM-1} em isolados de *K. pneumoniae*, um deles (KP96) recuperado de uma amostra de urina de paciente atendido na Emergência, ou seja, não se tratava de um paciente internado e o outro isolado co-produzia duas carbapenemases, *bla*_{KPC-2} e *bla*_{VIM-1}.

K. pneumoniae é uma das maiores fontes de resistência aos antimicrobianos e categorizada como risco urgente pelas agências de saúde públicas (WHO, 2017). O aumento da ocorrência de *K. pneumoniae* multirresistente reflete os processos de disseminação multifatoriais que incluem a disseminação de linhagens genéticas multirresistentes (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011), aquisição de plasmídeos carregando múltiplos genes de resistência e a aquisição de genes de resistência localizados em transposons promíscuos (LEE et al., 2016). A habilidade de um mesmo isolado de *K.*

pneumoniae carrear múltiplas β -lactamases é bem conhecido e, possivelmente esta habilidade contribui para o sucesso seletivo deste patógeno. Combinações de todos os tipos de genes *bla* foram reportados nesta espécie (NAVON-VENEZIA; KONDRATYEVA; CARATTOLI, 2017). No momento, chama-se a atenção para o isolado deste estudo, KP142, que carregava duas carbapenemases diferentes, *bla*_{KPC-2} e *bla*_{VIM-1}, em diferentes plasmídeos. Essa combinação de genes em um único microrganismo não é comum, porém tem sido reportada em outros países como Grécia (POURNARAS et al., 2010; PROTONOTARIOU et al., 2018), Espanha (PORRES-OSANTE et al., 2014), EUA (THOMSON et al., 2016) e Venezuela (FALCO et al., 2016).

A vantagem evolucionária para *K. pneumoniae* carrear múltiplas β -lactamases com sobreposição de atividade catalítica ainda é uma área pouco abordada. No entanto, há a hipótese de que a multiplicidade de β -lactamases em um único microrganismo esteja envolvida na resistência extra eficiente. Por exemplo, bactérias que expressam carbapenemases como IMP, VIM e NDM são geralmente sensíveis ao aztreonam, no entanto a aquisição de uma β -lactamase do tipo ESBL ou AmpC contornaria esta lacuna na resistência (MOLTON et al., 2013).

O gene *bla*_{VIM} foi descrito em plasmídeos com ampla gama de hospedeiros, como IncN, IncA/C, IncL/M e plasmídeos de hospedeiro restrito como IncP, IncFII(k), IncX3 (CARATTOLI, 2013; MATSUMURA et al., 2018; ZENG et al., 2019). Conforme exposto anteriormente, não foi possível determinar qual plasmídeo estava associado a *bla*_{VIM-1} nos dois isolados deste estudo, no entanto, há a hipótese de que o gene esteja no plasmídeo IncN2, presente nos dois isolados. O plasmídeo IncN2 foi descrito carregando *bla*_{VIM-5} em um isolado de *C. freundii* na Turquia e carregando o gene *bla*_{VIM-23} em um isolado de *E. cloacae* no México (MATSUMURA et al., 2018).

O sequenciamento completo do genoma permitiu a análise *in silico* dos plasmídeos, a identificação dos grupos de incompatibilidade, assim como a análise dos *loci* de interesse, bem como dos genes de resistência de maneira unificada (ORLEK et al., 2017). No entanto, a montagem dos plasmídeos a partir de sequências curtas foi bastante desafiadora (NAGARAJAN; POP, 2013). Esta foi a maior limitação do sequenciamento deste projeto, não apenas na análise do plasmídeo que carregava o gene *bla*_{VIM-1}, mas também dos plasmídeos

que carregavam *bla*_{NDM-1}. Foi possível a montagem do plasmídeo carreador de *mcr-1* e alguns plasmídeos, ainda que incompletos que carregavam o gene *bla*_{KPC-2}.

Como exemplo, duas alternativas possíveis para solucionar este problema seriam: i) isolar o plasmídeo de interesse por transformação bacteriana e sequenciar a bactéria transformante. Entretanto, como normalmente microrganismos multirresistentes possuem vários plasmídeos e diferentes genes de resistências localizados nos diferentes plasmídeos, essa abordagem se torna laboriosa e ineficiente (MATHERS et al., 2015); ou ii) realizar o sequenciamento dos isolados por tecnologias que gerem sequências longas como as da Pacific BiosciencesTM e Oxford NanoporeTM, que estão cada vez mais acessíveis (JAIN et al., 2016; LEMON et al., 2017). Embora o sequenciamento por nanoporos da OxfordTM esteja em implementação em nosso laboratório, não houve tempo hábil para aplicar nos isolados deste trabalho, o que será feito para as publicações, utilizando-se uma montagem híbrida para fechar as sequências dos plasmídeos (GEORGE et al., 2017).

6 CONCLUSÃO

O acúmulo de genes de resistência pelos microrganismos está gerando uma dificuldade mundial para o tratamento de infecções bacterianas. Apesar da resistência ser um fenômeno natural, o excesso e o mau uso dos antimicrobianos utilizados na agropecuária e na área médica são, em grande parte, os responsáveis por essa crise.

A presença de microrganismos multirresistentes ultrapassou o ambiente hospitalar e cada vez mais são identificados microrganismos multirresistentes responsáveis por infecções comunitárias ou colonizando pacientes que não tiveram internações prévias, como foi visto nos isolados carreadores dos genes *mcr-1* e *bla_{VIM-1}*.

Para controle da disseminação dos genes de resistência é necessário o entendimento sobre os elementos genéticos envolvidos, a dinâmica da transferência horizontal de genes e a ecologia microbiana. Este projeto demonstrou que, com exceção do gene *bla_{VIM-1}*, em que não foi possível assegurar qual plasmídeo estava envolvido na disseminação desse gene, todos os outros genes de resistência que foram sequenciados (*mcr-1*, *bla_{KPC-2}* e *bla_{NDM-1}*) estavam em plasmídeos conjugativos e/ou flanqueados por elementos genéticos móveis, o que faz com que esses genes sejam facilmente disseminados para outros microrganismos.

Este estudo encontrou um grande desafio na análise dos plasmídeos dos isolados sequenciados, no entanto, pode-se observar uma possível transferência *in vivo* do plasmídeo carreador do gene *bla_{NDM-1}* ocorrida entre um isolado de *E. coli* e *K. pneumoniae*. Além disso, foi identificado o isolado clínico mais antigo em que foi detectado o gene plasmidial de resistência à polimixina (*mcr-1*) no Brasil, até o presente momento. Ainda, ao que tudo indica, a disseminação do gene *mcr-1* no Brasil está ocorrendo por um único plasmídeo endêmico do grupo IncX4. Adicionalmente, a disseminação da carbapenemase *bla_{KPC-2}*, no HU-UFSC, é resultado da transferência de um único plasmídeo do grupo IncN, que por sua vez possui grande similaridade com plasmídeos carreadores de *bla_{KPC-2}*, descritos em São Paulo e Paraná, o que pode ser um indicativo que a disseminação deste gene no Brasil ocorreu devido a um único plasmídeo.

Este projeto foi pioneiro na abordagem e pesquisa de plasmídeos presentes em microrganismos multirresistentes no estado de Santa Catarina. Ele foi o passo inicial para que novas pesquisas nessa área sejam feitas, já que este assunto, apesar de pouco abordado no

Brasil, é fundamental para o entendimento da dinâmica da disseminação de genes de resistência, contribuindo com dados epidemiológicos locais e nacionais que poderão ser utilizados no manejo da disseminação de microrganismos multirresistentes.

7 PERSPECTIVAS

- Utilizar nova abordagem de sequenciamento dos isolados selecionados para fechar as sequências de todos os plasmídeos.
- Abranger a pesquisa de caracterização molecular de plasmídeos para outros microrganismos multirresistentes, isolados em outros locais do estado, a fim de obter também dados epidemiológicos dos plasmídeos circulantes em Santa Catarina.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, M. G. et al. Padronização da técnica de extração de DNA de células de mucosa oral com NaCl: aplicação no estudo do gene PROP1. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 49, n. 6, p. 978–982, dez. 2005.
- ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morgane. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5575–5599, 1 dez. 2016.
- ADLER, A. et al. Introduction of OXA-48-producing Enterobacteriaceae to Israeli hospitals by medical tourism. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 2763–2766, 2011.
- ADLER, A. et al. A Swordless Knight: Epidemiology and Molecular Characteristics of the *bla*_{KPC}-Negative Sequence Type 258 *Klebsiella pneumoniae* Clone. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 10, p. 3180–3185, 2012.
- AIRES, A. M. et al. Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 7, p. e00317-17, 2017.
- ALIKHAN, N.-F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 402, p. 2–10, 2011.
- ANDERSSON, D. I.; HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 4, p. 260–271, 8 abr. 2010.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. **ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- ANDRADE, L. N. et al. Virulence genes, capsular and plasmid types of multidrug-resistant CTX-M(-2, -8, -15) and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from four major hospitals in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 91, n. 2, p. 164–168, 1 jun. 2018.
- ANTIPOV, D. et al. plasmidSPAdes: assembling plasmids from whole genome sequencing data. **Bioinformatics**, v. 32, n. 22, p. 3380–3387, 27 jul. 2016.
- ARREDONDO-ALONSO, S. et al. On the (im)possibility of reconstructing plasmids from whole-genome short-read sequencing data. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 10, p. 1–8, 1 out. 2017.
- BANKEVICH, A. et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. **Journal of Computational Biology**, v. 19, n. 5, p. 455–477, 2012.

BARANIAK, A. et al. Molecular characteristics of KPC-producing Enterobacteriaceae at the early stage of their dissemination in Poland, 2008-2009. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5493–9, dez. 2011.

BARANIAK, A. et al. KPC-Like Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae Colonizing Patients in Europe and Israel on behalf of the MOSAR WP2, WP3, and WP5 Study Groups. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 60, n. 3, p. 1912–1917, 2016.

BARBERINO, M. G. et al. Isolation of *bla*_{NDM}-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 47–50, jan. 2018.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 6, p. 583–591, 1 dez. 2016.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v. 18, n. 5, p. 294–8, 1990.

BELOGUROV, A. A.; DELVER, E. P.; RODZEVICH, O. V. IncN plasmid pKM101 and IncI1 plasmid Collb-P9 encode homologous antirestriction proteins in their leading regions. **Journal of Bacteriology**, v. 174, n. 15, p. 5079–5085, ago. 1992.

BEVAN, E. R.; JONES, A. M.; HAWKEY, P. M. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. **J Antimicrob Chemother**, v. 72, p. 2145–2155, 2017.

BIOMÉRIEUX. **Vitek 2 Technology: Online software user manual**, 2006.

BLAIR, J. M. A. et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 42–51, 1 jan. 2015.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Genome analysis Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 15, p. 2114–2120, 2014.

BONNIN, R. A. et al. Comparative Genomics of IncL/M-Type Plasmids: Evolution by Acquisition of Resistance Genes and Insertion Sequences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 674–676, jan. 2013.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 3 jan. 2017.

BONOMO, R. A. et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 66, n. 8, p. 1290–1297, 3 abr. 2018.

BRADFORD, P. A. et al. Multiyear, Multinational Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo- β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 1067–1078, 2015.

BRADNAM, K. R. et al. Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. **GigaScience**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 22 dez. 2013.

BRASIL. **Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016**. Brasil Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, , 2016. Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucao-normativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf>>

BRCAST. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos**. Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing, 2019. Disponível em: <<http://brcast.org.br/>>

BROWN, J. M.; DORMAN, D. C.; ROY, L. P. Acute renal failure due to overdosage of colistin. **The Medical journal of Australia**, v. 2, n. 20, p. 923–4, 14 nov. 1970.

BRYANT, K. A. et al. KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 37–41, 2013.

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

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor perspectives in medicine**, v. 6, n. 8, p. 1–23, 1 ago. 2016.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 1 mar. 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–33, jun. 1995.

CABOCHE, S.; AUDEBERT, C.; HOT, D. High-Throughput Sequencing, a Versatile Weapon to Support Genome-Based Diagnosis in Infectious Diseases: Applications to Clinical Bacteriology. **Pathogens (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 2, p. 258–79, 2 abr. 2014.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of Tn3000, a Transposon Responsible for *bla*_{NDM-1} Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–95, 1 dez. 2015.

CANIAUX, I. et al. MCR: modern colistin resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 36, p. 415–420, 2017.

CANIÇA, M. et al. In vivo Acquisition of Carbapenemase Gene *bla*_{KPC-2} in Multiple Species of Enterobacteriaceae through Horizontal Transfer of Insertion Sequence or Plasmid. **Frontiers in Microbiology** | www.frontiersin.org, v. 7, p. 1651, 2016.

CARATTOLI, A. et al. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, n. 3, p. 219–228, 1 dez. 2005.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–38, jun. 2009.

CARATTOLI, A. et al. Evolution of IncA/C *bla*_{CMY-2}-carrying plasmids by acquisition of the *bla*_{NDM-1} carbapenemase gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 2, p. 783–6, 1 fev. 2012.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 298–304, 1 ago. 2013.

CARATTOLI, A. et al. *In Silico* Detection and Typing of Plasmids using PlasmidFinder and Plasmid Multilocus Sequence Typing. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 7, p. 3895–3903, jul. 2014.

CARATTOLI, A. et al. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–14, 1 maio 2015.

CARLONI, E. et al. Comparative analysis of the standard PCR-Based Replicon Typing (PBRT) with the commercial PBRT-KIT. **Plasmid**, v. 90, p. 10–14, 1 mar. 2017.

CARRÈR, A. et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1369–73, mar. 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 1 dez. 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475–6, 2014.

CARVER, T. et al. Artemis: an integrated platform for visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 4, p. 464–469, 15 fev. 2012.

CASTANHEIRA, M. et al. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1274–8, 1 mar. 2011.

CAVALIER-SMITH, T. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1470, p. 969–1006, 29 jun. 2006.

CDC. **Antibiotic resistance threat in the United States**, 2013. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 7 jun. 2019

- CHAGAS, T. P. G. et al. Detection of an NDM-1-producing *Acinetobacter bereziniae* strain in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 3, n. 2, p. 147–148, 1 jun. 2015.
- CHEN, L. et al. Partial excision of bla KPC from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1635–1638, 2012.
- CHEN, L. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 12, p. 686–696, dez. 2014.
- CHEN, Z. et al. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 294, 14 abr. 2015.
- CHERUVANKY, A. et al. Enhanced *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Expression from a Novel Tn4401 Deletion. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e00025-17, 1 jun. 2017.
- CHIBA, N. et al. Detection of mcr-1-mediated colistin resistance in *E. coli* isolate from imported chicken meat from Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 16, p. 249–250, mar. 2019.
- CLSI. M100 - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing** Wayne Clinical and Laboratory Standards Institute, , 2018.
- COIL, D.; JOSPIN, G.; DARLING, A. E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. **Bioinformatics**, v. 31, n. 4, p. 587–589, 15 fev. 2015.
- CONCEIÇÃO-NETO, O. C. et al. Detection of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, n. 2, p. 282–284, 1 ago. 2017.
- CORNAGLIA, G.; GIAMARELLOU, H.; ROSSOLINI, G. M. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 11, n. 5, p. 381–393, maio 2011.
- CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase blaKPC-2 Gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349–1356, 2010.
- D'ANDREA, M. M. et al. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6–7, p. 305–317, ago. 2013.
- D'COSTA, V. M. et al. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p. 457–461, 2011.
- DA SILVA, I. R. et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 3, p. 394–399, 4 abr. 2019.
- DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of mcr-1 and bla_{KPC-2} in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 8, p. 2404–2406, 1 ago. 2017.
- DATTA, N.; HEDGES, R. W. Compatibility groups among fi - R factors. **Nature**, v. 234, n.

5326, p. 222–3, 26 nov. 1971.

DE GODOY, C. V et al. [In vitro susceptibility to a new antimicrobial agent (imipenem) of pathogens isolated from inpatients at various centers]. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 31, n. 3, p. 169–76, 1989.

DE LASTOURS, V. et al. Prevalence of *Escherichia coli* Carriage in the Oropharynx of Ambulatory Children and Adults with and without Upper Respiratory Symptoms. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. 3, p. 461–463, 18 mar. 2015.

DE SALLES, R. K.; SCHMIDT, H. M. **Carta de Serviços ao Cidadão**. Florianópolis: [s.n.]. Disponível em: <<http://www2.ebserh.gov.br/documents/2016343/2016402/Carta+de+Serviço+ao+Cidadão/6103d00f-4233-4f13-b6b2-cfe19493e19d>>. Acesso em: 14 jun. 2019.

DI PILATO, V. et al. Characterization of pFOX-7a, a conjugative IncL/M plasmid encoding the FOX-7 AmpC-type β -lactamase, involved in a large outbreak in a neonatal intensive care unit. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2620–2624, 1 out. 2014.

DING, B. et al. Four carbapenem-resistant gram-negative species carrying distinct carbapenemases in a single patient. **Journal of clinical microbiology**, v. 53, n. 3, p. 1031–3, mar. 2015.

DO CARMO JUNIOR, N. V. et al. First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of São Paulo. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 675–676, 1 nov. 2015.

DOI, Y.; IOVLEVA, A.; BONOMO, R. A. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. **Journal of travel medicine**, v. 24, n. suppl_1, p. S44–S51, 1 abr. 2017.

DOLEJSKA, M.; PAPAGIANNITSIS, C. C. Plasmid-mediated resistance is going wild. **Plasmid**, v. 99, p. 99–111, set. 2018.

DONÀ, V. et al. Heterogeneous Genetic Location of *mcr-1* in Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Humans and Retail Chicken Meat in Switzerland: Emergence of *mcr-1*-Carrying IncK2 Plasmids. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 11, p. 1–6, 1 nov. 2017.

DONNENBERG, M. S. Enterobacteriaceae. In: **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8. ed. [s.l.] Content Repository Only!, 2015. p. 2503–2517.

DRAPER, O. et al. Site-specific recombinase and integrase activities of a conjugative relaxase in recipient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 45, p. 16385–16390, 8 nov. 2005.

DROPA, M. et al. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical

Enterobacteriaceae from a hospital in Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 08, p. 890–897, 29 ago. 2015.

DU, H. et al. Emergence of the *mcr-1* colistin resistance gene in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 287–288, mar. 2016.

ENGLER-HÜSCH, S. et al. In-hospital costs of community-acquired colonization with multidrug-resistant organisms at a German teaching hospital. **BMC Health Services Research**, v. 18, n. 1, p. 737, 26 dez. 2018.

FALCO, A. et al. A cluster of KPC-2 and VIM-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric service of a Venezuelan Hospital. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 595, p. 1–9, 2016.

FARIA-JUNIOR, C. NDM-Producing Enterobacteriaceae Strains among Hospitals in Brasília, Brazil. **Journal of Microbiology & Experimentation**, v. 3, n. 2, p. 1–5, 29 jan. 2016.

FERNANDES, M. et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 17, p. 1–3, 2016a.

FERNANDES, M. R. et al. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6415–6417, 2016b.

FERNANDEZ, A. G. et al. Comparative Analysis of IncHI2 Plasmids Carrying *bla*_{CTX-M-2} or *bla*_{CTX-M-9} from *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Poultry and Humans. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 4177–4180, 1 nov. 2007.

FERNÁNDEZ, L.; HANCOCK, R. E. W. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 661–81, out. 2012.

FERREIRA, A. M. et al. First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **The Journal of hospital infection**, v. 94, n. 1, p. 73–4, 1 set. 2016.

FONDI, M. et al. “Every Gene Is Everywhere but the Environment Selects”: Global Geolocalization of Gene Sharing in Environmental Samples through Network Analysis. **Genome Biology and Evolution**, v. 8, n. 5, p. 1388–1400, 13 maio 2016.

FRANCO, M. R. G. et al. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. **Clinics (Sao Paulo, Brazil)**, v. 65, n. 9, p. 825–9, 2010.

FRONZES, R. et al. Structure of a Type IV Secretion System Core Complex. **Science**, v. 323, n. 5911, p. 266–268, 9 jan. 2009.

GAMA, J. A.; ZILHÃO, R.; DIONISIO, F. Impact of plasmid interactions with the chromosome and other plasmids on the spread of antibiotic resistance. **Plasmid**, v. 99, p. 82–88, set. 2018.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. et al. Characterization of plasmids harbouring *qnrS1*, *qnrB2* and *qnrB19* genes in *Salmonella*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 274–281, fev. 2009.

GARCÍA-FERNÁNDEZ, A. et al. Multilocus sequence typing of IncN plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1987–1991, 1 set. 2011.

GARCILLÁN-BARCIA, M. P. et al. Conjugative transfer can be inhibited by blocking relaxase activity within recipient cells with intrabodies. **Molecular Microbiology**, v. 63, n. 2, p. 404–416, jan. 2007.

GARCILLÁN-BARCIA, M. P.; ALVARADO, A.; DE LA CRUZ, F. Identification of bacterial plasmids based on mobility and plasmid population biology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 936–956, 1 set. 2011.

GEORGE, S. et al. Resolving plasmid structures in Enterobacteriaceae using the MinION nanopore sequencer: assessment of MinION and MinION/Illumina hybrid data assembly approaches. **Microbial Genomics**, v. 3, n. 8, p. 1–8, 13 jun. 2017.

GOLEBIEWSKI, M. et al. Complete Nucleotide Sequence of the pCTX-M3 Plasmid and Its Involvement in Spread of the Extended-Spectrum β -Lactamase Gene *bla*_{CTX-M-3}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 11, p. 3789–3795, 1 nov. 2007.

GOOTZ, T. D. et al. Genetic organization of transposase regions surrounding bla KPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 5, p. 1998–2004, 2009.

GRACE, D. Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries. **International Livestock Research Institute**, p. 44, 16 jun. 2015.

GUH, A. Y. et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012–2013. **JAMA**, v. 314, n. 14, p. 1479–1487, 13 out. 2015.

GUPTA, N. et al. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 1, p. 60–67, 1 jul. 2011.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. **Drug Resistance Updates**, v. 7, n. 2, p. 111–123, 1 abr. 2004.

HANCOCK, S. J. et al. Identification of IncA/C Plasmid Replication and Maintenance Genes and Development of a Plasmid Multilocus Sequence Typing Scheme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, n. 2, p. 1–11, 2017.

HARKINS, C. P. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* emerged long before the

- introduction of methicillin into clinical practice. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 130, 20 dez. 2017.
- HARMER, C. J.; HALL, R. M. The A to Z of A/C plasmids. **Plasmid**, v. 80, p. 63–82, 1 jul. 2015.
- HARRISON, E.; BROCKHURST, M. A. Plasmid-mediated horizontal gene transfer is a coevolutionary process. **Trends in Microbiology**, v. 20, n. 6, p. 262–267, 2012.
- HAWKEY, P. M. Multidrug-resistant Gram-negative bacteria: a product of globalization. **Journal of Hospital Infection**, v. 89, n. 4, p. 241–247, abr. 2015.
- HO, P. L. et al. Complete Sequencing of pNDM-HK Encoding NDM-1 Carbapenemase from a Multidrug-Resistant *Escherichia coli* Strain Isolated in Hong Kong. **PLoS ONE**, v. 6, n. 3, p. 1–7, 21 mar. 2011.
- HU-BEMH. **Boletim Estatístico do Movimento Hospitalar**. Florianópolis: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.hu.ufsc.br/bemhs/bemhexterna/download/9>>. Acesso em: 14 jun. 2019.
- HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome research**, v. 9, n. 9, p. 868–77, 1 set. 1999.
- HÜBNER, C.; RIED, W.; FLESSA, S. Assessing the opportunity costs of patients with multidrug-resistant organisms in hospitals. **The European Journal of Health Economics**, v. 19, n. 7, p. 1009–1017, 15 set. 2018.
- ILANGOVAN, A.; CONNERY, S.; WAKSMAN, G. Structural biology of the Gram-negative bacterial conjugation systems. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 5, p. 301–310, 1 maio 2015.
- JAIN, M. et al. The Oxford Nanopore MinION: delivery of nanopore sequencing to the genomics community. **Genome Biology**, v. 17, n. 239, p. 1–11, 2016.
- JIA, B. et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. **Nucleic Acids Research**, v. 45, p. 567–573, 2017.
- JOHANSON, W. G.; PIERCE, A. K.; SANFORD, J. P. Changing Pharyngeal Bacterial Flora of Hospitalized Patients. **New England Journal of Medicine**, v. 281, n. 21, p. 1137–1140, 20 nov. 1969.
- JOHNSON, T. J. et al. Expansion of the IncX plasmid family for improved identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae. **Plasmid**, v. 68, n. 1, p. 43–50, jul. 2012.
- KAMRUZZAMAN, M. et al. Plasmid interference for curing antibiotic resistance plasmids in vivo. **PloS one**, v. 12, n. 2, p. 1–20, 2017.
- KELLY, A. M.; MATHEMA, B.; LARSON, E. L. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the community: a scoping review. **International journal of antimicrobial agents**, v. 50, n. 2, p. 127–134, ago. 2017.
- KHAN, A. U.; MARYAM, L.; ZARRILLI, R. Structure, Genetics and Worldwide Spread of

New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM): a threat to public health. **BMC Microbiology**, v. 17, n. 1, p. 101, 27 dez. 2017.

KHAWCHAROENPORN, T.; VASOO, S.; SINGH, K. Urinary Tract Infections due to Multidrug-Resistant Enterobacteriaceae: Prevalence and Risk Factors in a Chicago Emergency Department. **Emergency medicine international**, v. 2013, p. 258517, 31 out. 2013.

KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365–70, ago. 2009.

KLEMM, E. J.; WONG, V. K.; DOUGAN, G. Emergence of dominant multidrug-resistant bacterial clades: Lessons from history and whole-genome sequencing. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 51, p. 12872–12877, 18 dez. 2018.

KLEVENS, R. M. et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public health reports (Washington, D.C. : 1974)**, v. 122, n. 2, p. 160–6, 2007.

KLIEBE, C. et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 28, n. 2, p. 302–7, ago. 1985.

KOH, T. H. et al. Carbapenem-hydrolysing IMP-1 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Singapore. **Lancet (London, England)**, v. 353, p. 2162, 19 jun. 1999.

LACROIX, B.; CITOVSKEY, V. Transfer of DNA from Bacteria to Eukaryotes. **mBio**, v. 7, n. 4, p. 1–9, 12 set. 2016.

LANGMEAD, B.; SALZBERG, S. L. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. **Nature methods**, v. 9, n. 4, p. 357–9, 4 mar. 2012.

LANZA, V. F. et al. Plasmid Flux in *Escherichia coli* ST131 Sublineages, Analyzed by Plasmid Constellation Network (PLACNET), a New Method for Plasmid Reconstruction from Whole Genome Sequences. **PLoS Genetics**, v. 10, n. 12, p. 1–21, 18 dez. 2014.

LARSEN, M. V et al. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1355–61, 1 abr. 2012.

LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584–90, jul. 1999.

LEE, C. R. et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1–30, 2016.

LEMON, J. K. et al. Rapid Nanopore Sequencing of Plasmids and Resistance Gene Detection

in *Clinical Isolates*. v. 55, n. 12, p. 3530–3543, 2017.

LENTZ, S. A. et al. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr*-1 gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 26, p. 30267, 30 jun. 2016.

LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v. 55, n. 11, p. 1611–1613, 1 nov. 2006.

LINDSEY, R. L. et al. Inc A/C Plasmids Are Prevalent in Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* Isolates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 7, p. 1908–1915, 1 abr. 2009.

LINSENMEYER, K.; STRYMISH, J.; GUPTA, K. Two Simple Rules for Improving the Accuracy of Empiric Treatment of Multidrug-Resistant Urinary Tract Infections. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7593–6, 1 dez. 2015.

LIU, Y.-Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, fev. 2016.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: The Impact and Evolution of a Global Menace. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28–S36, 15 fev. 2017.

LORENZONI, V. V. et al. Bloodstream infection by *mcr*-1-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 22, n. 4, p. 356–357, 1 jul. 2018.

LUTGRING, J. D. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: An emerging bacterial threat. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 182–186, 1 maio 2019.

MAGIORAKOS, A.-P. et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 3, p. 268–281, 1 mar. 2012.

MAIDEN, M. C. J. Multilocus Sequence Typing of Bacteria. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 561–588, 11 out. 2006.

MATAMOROS, S. et al. Global phylogenetic analysis of *Escherichia coli* and plasmids carrying the *mcr*-1 gene indicates bacterial diversity but plasmid restriction OPEN. **SCIENTIFIC REPORTS**, v. 7, n. 15364, p. 1–17, 2017.

MATHERS, A. J. et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing *K. pneumoniae* at a Single Institution: Insights into Endemicity from Whole-Genome Sequencing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 3, p. 1656–1663, 2015.

MATSUMURA, Y. et al. Genomic characterization of IMP and VIM carbapenemase-encoding transferable plasmids of Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 3034–3038, 2018.

- MCGANN, P. et al. *Escherichia coli* Harboring *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} on a Novel IncF Plasmid: First Report of *mcr-1* in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 7, p. 4420–4421, 1 jul. 2016.
- MELETIS, G.; CHATZIDIMITRIOU, D.; MALISIOVAS, N. Double- and multi-carbapenemase-producers: the excessively armored bacilli of the current decade. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 34, n. 8, p. 1487–1493, 18 ago. 2015.
- MOHSIN, M. et al. First description of plasmid-mediated colistin-resistant extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in a wild migratory bird from Asia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 4, p. 463–464, 1 out. 2016.
- MOJICA, M. F.; BONOMO, R. A.; FAST, W. B1-Metallo- β -Lactamases: Where Do We Stand? **Current drug targets**, v. 17, n. 9, p. 1029–50, 2016.
- MOLTON, J. S. et al. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 9, p. 1310–1318, maio 2013.
- MONTE, D. F. et al. Chicken Meat as a Reservoir of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1–4, 1 maio 2017.
- MONTEIRO, J. et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 1 jan. 2009.
- MORAR, M.; WRIGHT, G. D. The Genomic Enzymology of Antibiotic Resistance. **Annu Rev Genet**, v. 44, p. 25–51, 2010.
- MORÉ, M. I.; POHLMAN, R. F.; WINANS, S. C. Genes encoding the pKM101 conjugal mating pore are negatively regulated by the plasmid-encoded KorA and KorB proteins. **Journal of Bacteriology**, v. 178, n. 15, p. 4392–4399, ago. 1996.
- MORENO, L. Z. et al. First report of *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 4, p. 376–379, 1 abr. 2019.
- MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr**, v. 4, n. 2, p. 1–46, 2016.
- NAAS, T. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.
- NAGARAJAN, N.; POP, M. Sequence assembly demystified. **Nature Reviews Genetics**, v. 14, n. 1, p. 157–168, 2013.
- NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a

major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 013, p. 252–275, 2017.

NCBI. **Beta-Lactamase Data Resources - Pathogen Detection - NCBI**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources/>>. Acesso em: 9 jun. 2019.

NECKEL, R.; KUCHLER, A. D. C. **UFSC 50 anos: Trajetórias e desafios**. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

NICOLETTI, A. G.; FEHLBERG, L. C. C.; PICÃO, R. C. Clonal Complex 258, the Most Frequently Found Multilocus Sequence Type Complex in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolated in Brazilian Hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 8, p. 4565, 2012.

NORDMANN, P. et al. Plasmid-Mediated Colistin-Resistant *Escherichia coli* in Bacteremia in Switzerland. **Clinical Infectious Diseases**, v. 62, n. 10, p. 1322–1323, 15 maio 2016.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 321–31, jun. 2002.

NOVAIS, A. et al. Emergence and Dissemination of Enterobacteriaceae Isolates Producing CTX-M-1-Like Enzymes in Spain Are Associated with IncFII (CTX-M-15) and Broad-Host-Range (CTX-M-1, -3, and -32) Plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 796–799, 1 fev. 2007.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, v. 1, p. 1–20, 2014.

O'NEILL, J. Antimicrobials in agriculture and environment: Reducing unnecessary use and wast. **Review on Antimicrobial Resistance**, p. 1–44, 2015.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J.-M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. 643, p. 1–18, 26 nov. 2014.

ORLEK, A. et al. Plasmid Classification in an Era of Whole-Genome Sequencing: Application in Studies of Antibiotic Resistance Epidemiology. **Front. Microbiol**, v. 8, p. 182, 9 fev. 2017.

PAEZ, J. et al. Clusters of infection due to metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in stem cell transplant and haematology units. **The Journal of hospital infection**, v. 77, n. 1, p. 76–7, jan. 2011.

PAGANO, M. et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 45, n. 4, p. 444–445, 1 abr. 2015.

PALMEIRA, J. D. et al. Draft genome of a ST443 mcr-1 - and bla CTX-M-2 -carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 269–270, jun. 2018.

- PALMEIRO, J. K. et al. Molecular Epidemiology of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in a Brazilian Tertiary Hospital. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1–15, 23 jul. 2019.
- PAPAGIANNITSIS, C. C. et al. Characterization of pKP1433, a Novel KPC-2-Encoding Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 340. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3427–3429, 2013.
- PARTRIDGE, S. R. et al. pEI1573 Carrying *bla*_{IMP-4}, from Sydney, Australia, Is Closely Related to Other IncL/M Plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6029–6032, nov. 2012.
- PARTRIDGE, S. R. Resistance mechanisms in Enterobacteriaceae. **Pathology**, v. 47, n. 3, p. 276–284, 1 abr. 2015.
- PARTRIDGE, S. R. et al. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 31, n. 4, p. 1–61, 1 out. 2018.
- PARTRIDGE, S. R.; IREDELL, J. R. Genetic Contexts of *bla* NDM-1. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6065–6067, 2012.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–86, out. 2005.
- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early Dissemination of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.
- PECORA, N. D. et al. Genomically Informed Surveillance for Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in a Health Care System. **mBio**, v. 6, n. 4, p. 1–11, 28 jul. 2015.
- PELEG, A. Y.; HOOPER, D. C. Hospital-acquired infections due to gram-negative bacteria. **The New England journal of medicine**, v. 362, n. 19, p. 1804–13, 13 maio 2010.
- PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–316, 1 fev. 2013.
- PEREIRA, P. S. et al. Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 580–2, jun. 2015.
- PÉREZ-CHAPARRO, P. et al. Complete Nucleotide Sequences of Two *bla*_{KPC-2}-Bearing IncN Plasmids Isolated from Sequence Type 442 *Klebsiella pneumoniae* Clinical Strains Four Years Apart. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2958–2960, 2014.
- PEVZNER, P. A.; TANG, H.; WATERMAN, M. S. An Eulerian path approach to DNA fragment assembly. **PNAS**, v. 98, n. 17, p. 9748–9753, 2001.

- PFEIFER, Y. et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 9, p. 1998–2001, 1 set. 2011.
- PICÃO, R. C. et al. Metallo-beta-lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2028–37, jun. 2008.
- PILAR GARCILÍ AN-BARCIA, M. et al. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 3, p. 657–687, 1 maio 2009.
- PILLONETTO, M. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 12, p. 7592–4, dez. 2014.
- PILLONETTO, M. et al. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia coli* from human sources in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 2, p. 140–142, 1 fev. 2019.
- PINCUS, D. H. Microbial identification using the Biomérieus Vitek® 2 system. **Encyclopedia of rapid microbiological methods**, p. 1–32, 2005.
- PITONDO-SILVA, A. et al. High prevalence of *bla*_{VIM-1} gene in bacteria from Brazilian soil. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 62, n. 10, p. 820–826, out. 2016.
- POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 891–7, abr. 2000.
- POIREL, L. et al. ISEcp1B-Mediated Transposition of *bla*_{CTX-M} in *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 447–450, 1 jan. 2005.
- POIREL, L. et al. Genetic features of *bla*_{NDM-1}-positive Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 11, p. 5403–7, 1 nov. 2011.
- POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597–1606, 1 jul. 2012.
- PORRES-OSANTE, N. et al. Emergence of a multiresistant KPC-3 and VIM-1 carbapenemase-producing *Escherichia coli* strain in Spain. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1792–1795, jul. 2014.
- POTRON, A. et al. Characterisation of OXA-244, a chromosomally-encoded OXA-48-like β -lactamase from *Escherichia coli*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n. 1, p. 102–103, jan. 2016.
- POURNARAS, S. et al. Detection of the new metallo-beta-lactamase VIM-19 along with KPC-2, CMY-2 and CTX-M-15 in *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1604–1607, ago. 2010.

- 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, p. 331–337, 2018.
- QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 1 jul. 2007.
- QUEIROZ, M. L. P. et al. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 1, p. 91–94, 1 set. 2012.
- QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas**, v. 48, n. 2, p. 174–7, fev. 2015.
- RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy**, v. 13, n. 6, p. 151–71, dez. 2010.
- RAU, R. B. et al. Emergence of *mcr-1* Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, n. 1, p. 58–59, 1 jan. 2018.
- RIZEK, C. et al. Characterization of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple genes coding for this antibiotic resistance. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 13, n. 43, p. 1–5, 2014.
- ROOSAARE, M. et al. PlasmidSeeker: identification of known plasmids from bacterial whole genome sequencing reads. **PeerJ**, v. 6, p. 1–16, 2018.
- ROZALES, F. P. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, 1 ago. 2014.
- ROZALES, F. P. et al. Characterization of Transformants Obtained From NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 5, p. 634–636, 7 maio 2017.
- ROZWANDOWICZ, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1121–1137, 1 maio 2018.
- SACRAMENTO, A. G. et al. Genomic analysis of MCR-1 and CTX-M-8 co-producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 15, p. 288–289, 1 dez. 2018.

SADER, H. S. et al. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **International journal of antimicrobial agents**, v. 25, n. 1, p. 57–61, jan. 2005a.

SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 11, n. 1, p. 73–6, jan. 2005b.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 31–37, dez. 2016.

SAN MILLAN, A. Evolution of Plasmid-Mediated Antibiotic Resistance in the Clinical Context. **Trends in Microbiology**. dez. 2018, p. 978–985.

SANCHEZ, G. V. et al. *In Vitro* Antimicrobial Resistance of Urinary *Escherichia coli* Isolates among U.S. Outpatients from 2000 to 2010. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2181–2183, abr. 2012.

SANDOVAL-MOTTA, S.; ALDANA, M. Adaptive resistance to antibiotics in bacteria: a systems biology perspective. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine**, v. 8, n. 3, p. 253–267, maio 2016.

SEEMANN, T. Genome analysis Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 2014.

SELLERA, F. P. et al. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated mcr-1 and bla CTX-M genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 72, n. 4, p. 1256, 28 dez. 2016.

SEN, D. et al. Inferring the Evolutionary History of IncP-1 Plasmids Despite Incongruence among Backbone Gene Trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 1, p. 154–166, jan. 2013.

SENI, J. et al. Multiple ESBL-Producing *Escherichia coli* Sequence Types Carrying Quinolone and Aminoglycoside Resistance Genes Circulating in Companion and Domestic Farm Animals in Mwanza, Tanzania, Harbor Commonly Occurring Plasmids. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 142, 11 fev. 2016.

SEREIA, A. F. R. **Microbioma do Ambiente, de Profissionais da Saúde e Pacientes em um Hospital Universitário Público Brasileiro e se Papel nas Infecções relacionadas à Assistência à Saúde**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2018.

SERIBELLI, A. A. et al. IncU plasmid harbouring bla_{CTX-M-8} in multidrug-resistant *Shigella sonnei* in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 14, p. 99–100, set. 2018.

SHEN, Z. et al. Emerging Carriage of NDM-5 and MCR-1 in *Escherichia coli* From Healthy People in Multiple Regions in China: A Cross Sectional Observational Study. **EClinical Medicine**, v. 6, p. 11–20, 2018.

- SHINTANI, M.; SANCHEZ, Z. K.; KIMBARA, K. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 242, p. 1–16, 31 mar. 2015.
- SIGUIER, P. et al. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D32–D36, 1 jan. 2006.
- SILVIA MUNOZ-PRICE, L. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 9, p. 785–796, set. 2013.
- SMALLA, K.; JECHALKE, S.; TOP, E. M. Plasmid Detection, Characterization, and Ecology. **Microbiology spectrum**, v. 3, n. 1, p. 1–21, fev. 2015.
- SMET, A. et al. Complete Nucleotide Sequence of CTX-M-15-Plasmids from Clinical *Escherichia coli* Isolates: Insertional Events of Transposons and Insertion Sequences. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, p. 1–8, 18 jun. 2010.
- SMILLIE, C. et al. Mobility of Plasmids †. **MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS**, v. 74, n. 3, p. 1092–2172, 2010.
- SON, S. J. et al. MCR-1: a promising target for structure-based design of inhibitors to tackle polymyxin resistance. **Drug Discovery Today**, v. 24, n. 1, p. 206–216, jan. 2019.
- SPAPEN, H. et al. Renal and neurological side effects of colistin in critically ill patients. **Annals of intensive care**, v. 1, n. 14, p. 1–7, 25 maio 2011.
- STOESSER, N. et al. Colistin resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 285–286, mar. 2016.
- SUMMONS, R. E. et al. Steroids, triterpenoids and molecular oxygen. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 361, n. 1470, p. 951–68, 29 jun. 2006.
- SUN, F. et al. Production of plasmid-encoding NDM-1 in clinical *Raoultella ornithinolytica* and *Leclercia adecarboxylata* from China. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 458, 21 maio 2015.
- SUN, J. et al. Towards Understanding MCR-like Colistin Resistance. **Trends in Microbiology**, v. 26, n. 9, p. 794–808, 2018.
- SWAMINATHAN, B. et al. PulseNet: The Molecular Subtyping Network for Foodborne Bacterial Disease Surveillance, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 3, p. 382–389, jun. 2001.
- TAYLOR, J. et al. EUROPE Estimating the economic costs of antimicrobial resistance Model and Results. **Rand Europe**, p. 1–87, 2014.

TAZZYMAN, S. J.; BONHOEFFER, S. Why There Are No Essential Genes on Plasmids. **Molecular Biology and Evolution**, v. 32, n. 12, p. 3079–3088, 23 dez. 2014.

TENOVER, F. C. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of clinical microbiology**, v. 33, n. 9, p. 2233–9, set. 1995.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer between Bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 9, p. 711–721, set. 2005.

THOMSON, G. K. et al. Coproduction of KPC-18 and VIM-1 Carbapenemases by *Enterobacter cloacae*: Implications for Newer β -Lactam- β -Lactamase Inhibitor Combinations. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, n. 3, p. 791–794, 2016.

TOLENTINO, F. M. et al. Endemicity of the High-Risk Clone *Klebsiella pneumoniae* ST340 Coproducing QnrB, CTX-M-15, and KPC-2 in a Brazilian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v. 25, n. 4, p. 528–537, 2019.

TONINI, M. A. et al. Carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST3901 carrying *mcr-1* and *bla*_{CTX-M} genes isolated from a diabetic foot infection in Brazil. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 13, p. 209–210, jun. 2018.

TOUKDARIAN, A. Plasmid Strategies for Broad-Host-Range Replication in Gram-Negative Bacteria. In: **Plasmid Biology**. [s.l.] American Society of Microbiology, 2004. p. 259–270.

TREANGEN, T. J.; SALZBERG, S. L. Repetitive DNA and next-generation sequencing: computational challenges and solutions. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 1, p. 36–46, 2012.

VALVERDE, A. et al. Spread of *bla*_{CTX-M-14} Is Driven Mainly by IncK Plasmids Disseminated among *Escherichia coli* Phylogroups A, B1, and D in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5204–5212, 1 dez. 2009.

VAN BOECKEL, T. P. et al. Reducing antimicrobial use in food animals: Consider user fees and regulatory caps on veterinary use. **Science**, v. 357, n. 6358, p. 1350–1352, 2017.

VAN DUIN, D. et al. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 75, n. 2, p. 115–120, fev. 2013.

VAN HOEK, A. H. A. M. et al. Acquired antibiotic resistance genes: an overview. **Frontiers in microbiology**, v. 2, p. 203, 2011.

VILLA, L. et al. Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2911–4, out. 2000.

VILLA, L. et al. Replicon sequence typing of IncF plasmids carrying virulence and resistance determinants. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 12, p. 2518–2529, dez. 2010.

- VILLA, L. et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15} and *qnrB1* genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1645–1650, jul. 2012.
- WAGLECHNER, N.; WRIGHT, G. D. Antibiotic resistance: it's bad, but why isn't it worse? **BMC Biology**, v. 15, p. 1–8, 2017.
- WALSH, T. R. et al. Metallo- β -lactamases: The quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–325, 2005.
- WALSH, T. R. et al. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 355–62, 1 maio 2011.
- WANG, X. et al. The MCR-1 colistin resistance: A new challenge to global public health. **Chinese Science Bulletin**, v. 62, n. 10, p. 1018–1029, 1 abr. 2017.
- WATANABE, M. et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147–51, jan. 1991.
- WHO. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/>>. Acesso em: 26 maio. 2019.
- WHO. **Antimicrobial resistance**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 4 jun. 2019.
- WOERTHER, P.-L. et al. Trends in Human Fecal Carriage of Extended-Spectrum - Lactamases in the Community: Toward the Globalization of CTX-M. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 744–758, 1 out. 2013.
- WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: The role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, p. 736–755, 2011.
- WRIGHT, G. D. The antibiotic resistome. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 8, p. 779–788, 17 ago. 2010.
- WU, C. et al. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in China, 2008–2014. **Emerging Microbes & Infections**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 4 dez. 2018.
- XAVIER, B. B. et al. Complete sequence of an IncFII plasmid harbouring the colistin resistance gene *mcr-1* isolated from Belgian pig farms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2342–2344, 1 ago. 2016.
- YANG, Q. et al. Dissemination of NDM-1-Producing Enterobacteriaceae Mediated by the IncX3-Type Plasmid. **PLOS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–9, 5 jun. 2015.

YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 1 abr. 2001.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-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. 5046–54, dez. 2009.

YORDANOV, D.; STRATEVA, T. *Pseudomonas aeruginosa* – a phenomenon of bacterial resistance. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, n. 9, p. 1133–1148, 1 set. 2009.

ZAMPARETTE, C. P. **Determinação fenotípica e genotípica de Beta-lactamases de Espectro Estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)**. [s.l.] Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

ZANKARI, E. et al. Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2640–2644, 1 nov. 2012.

ZENG, K.-J. et al. Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Colistin-Resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3862–3, 1 jun. 2016.

ZENG, L. et al. Genetic characterization of a *bla* VIM-24 -Carrying IncP-7 β plasmid p1160-VIM and a *bla*_{VIM-4} -harboring integrative and conjugative element Tn6413 from clinical *Pseudomonas aeruginosa*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 213, p. 1–9, 2019.

ZHANG, C. et al. A Phage-Like IncY Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* from a Pig Farm in China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 3, p. 1–4, 1 mar. 2017.

ZHANG, X.-F. et al. Possible Transmission of *mcr-1*-Harboring *Escherichia coli* between Companion Animals and Human. **Emerging infectious diseases**, v. 22, n. 9, p. 1679–81, 2016.

ZHAO, F. et al. IncP Plasmid Carrying Colistin Resistance Gene *mcr-1* in *Klebsiella pneumoniae* from Hospital Sewage. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 2, p. 1–6, 1 fev. 2017.

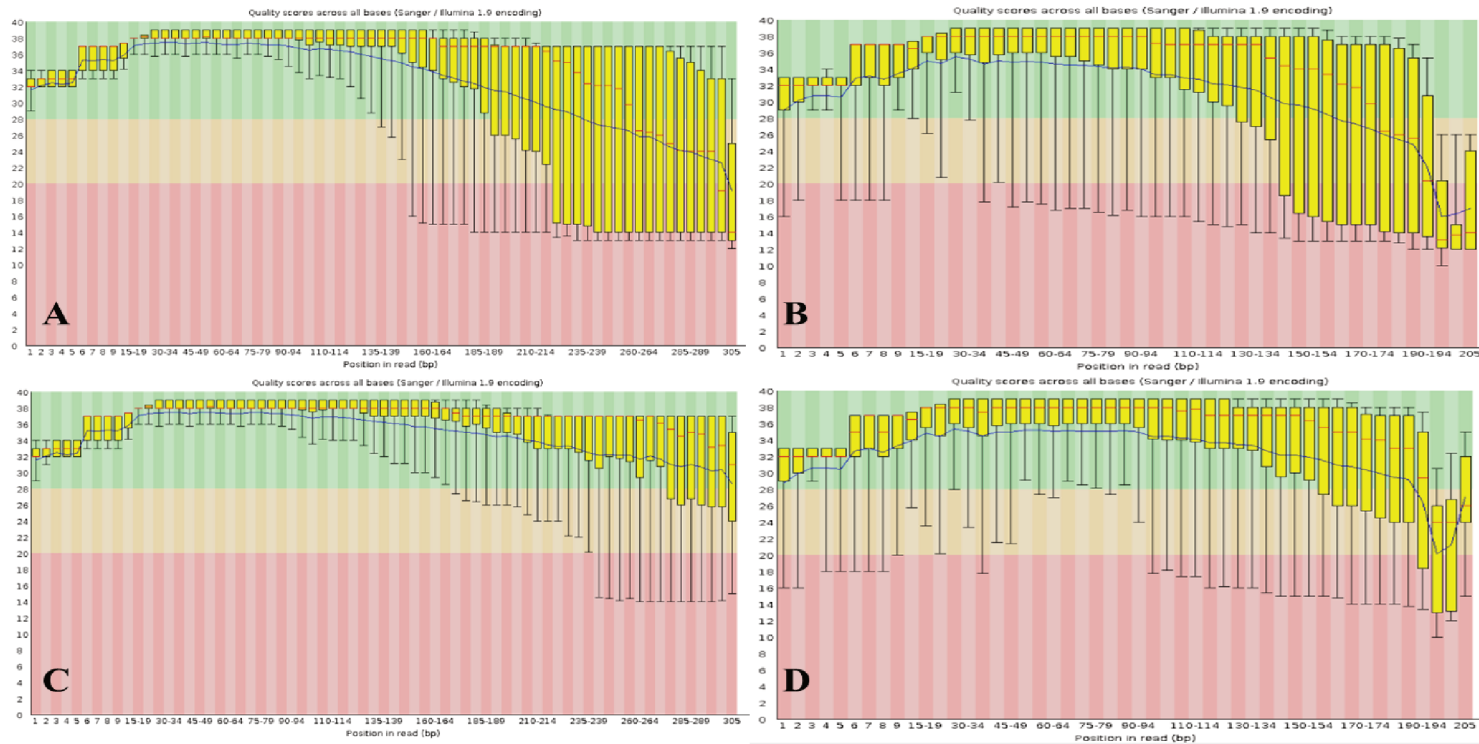
ZHENG, B. et al. Complete genome sequencing and genomic characterization of two *Escherichia coli* strains co-producing MCR-1 and NDM-1 from bloodstream infection. **Scientific Reports**, v. 7, p. 17885, 2017.

ZHENG, B. et al. Discovery and characterisation of an *Escherichia coli* ST206 strain producing NDM-5 and MCR-1 from a patient with acute diarrhoea in China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 51, n. 2, p. 273–275, 1 fev. 2018.

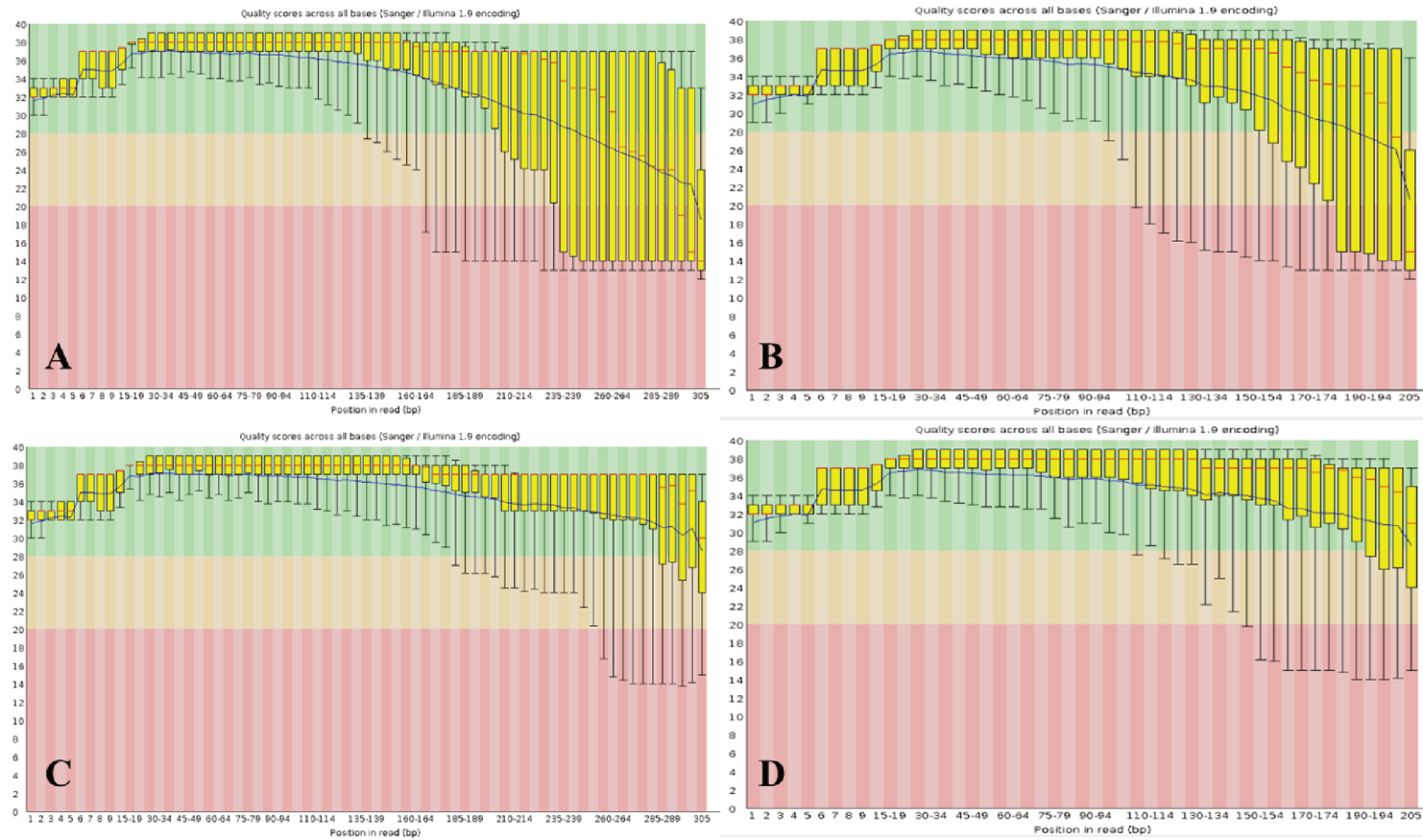
ZHOU, H.-W. et al. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried *mcr-1* in Waterborne Enterobacteriaceae in China. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 61, n. 8, p. 1–9, 1 ago. 2017.

ZURFLUH, K. et al. Full-Length Nucleotide Sequences of *mcr-1*-Harboring Plasmids Isolated from Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Isolates of Different Origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 9, p. 5589–5591, 1 set. 2016.

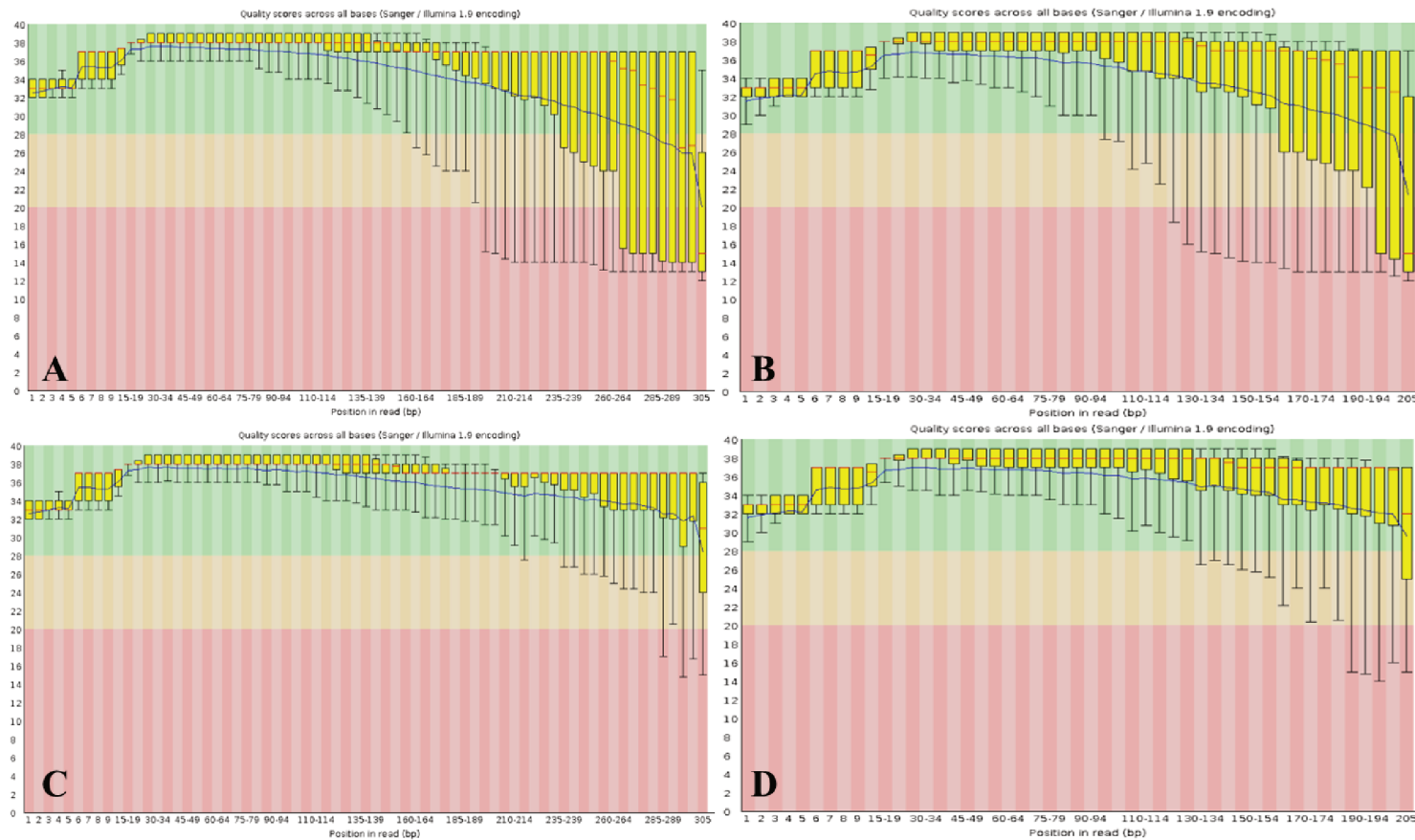
APÊNDICE A – Comparação da qualidade das sequências dos dados brutos e das sequências trimadas do pela ferramenta FASTQC



Isolado EC11. Leituras brutas: 661.877. Leituras trimadas: 493.757. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



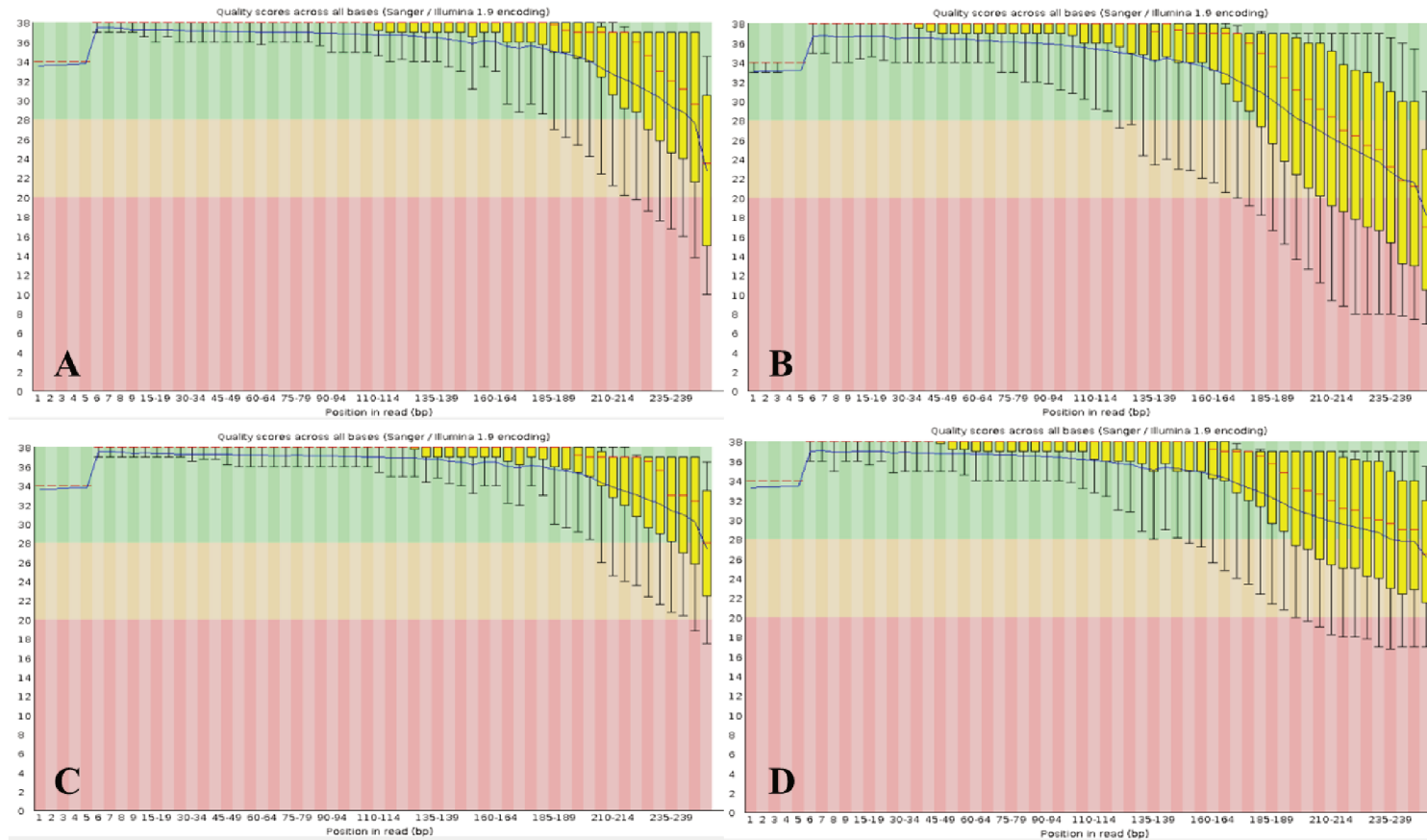
Isolado EC13. Leituras brutas: 938.813. Leituras trimadas: 931.352. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



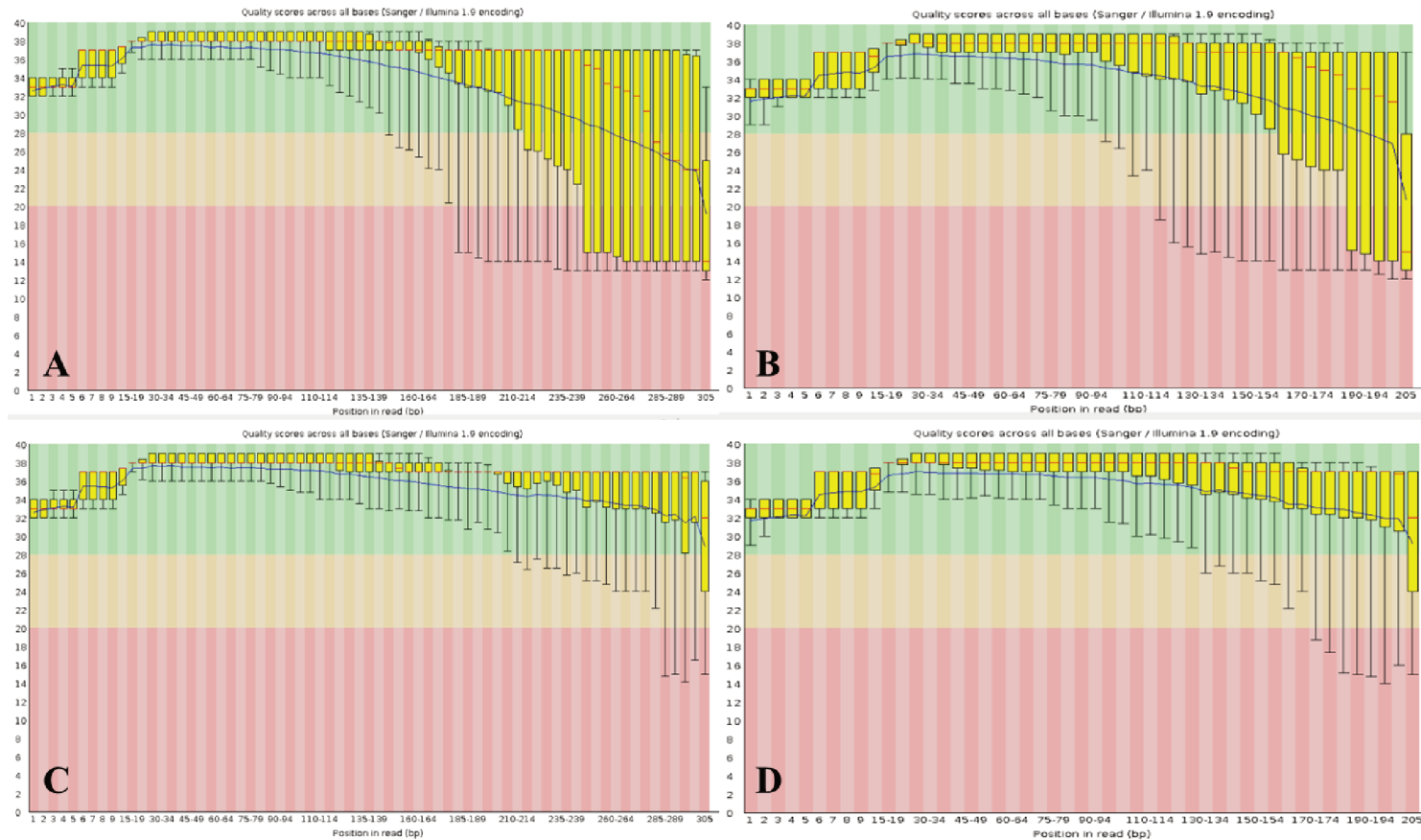
Isolado KP23. Leituras brutas: 1.189.584. Leituras trimadas: 1.175.519. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



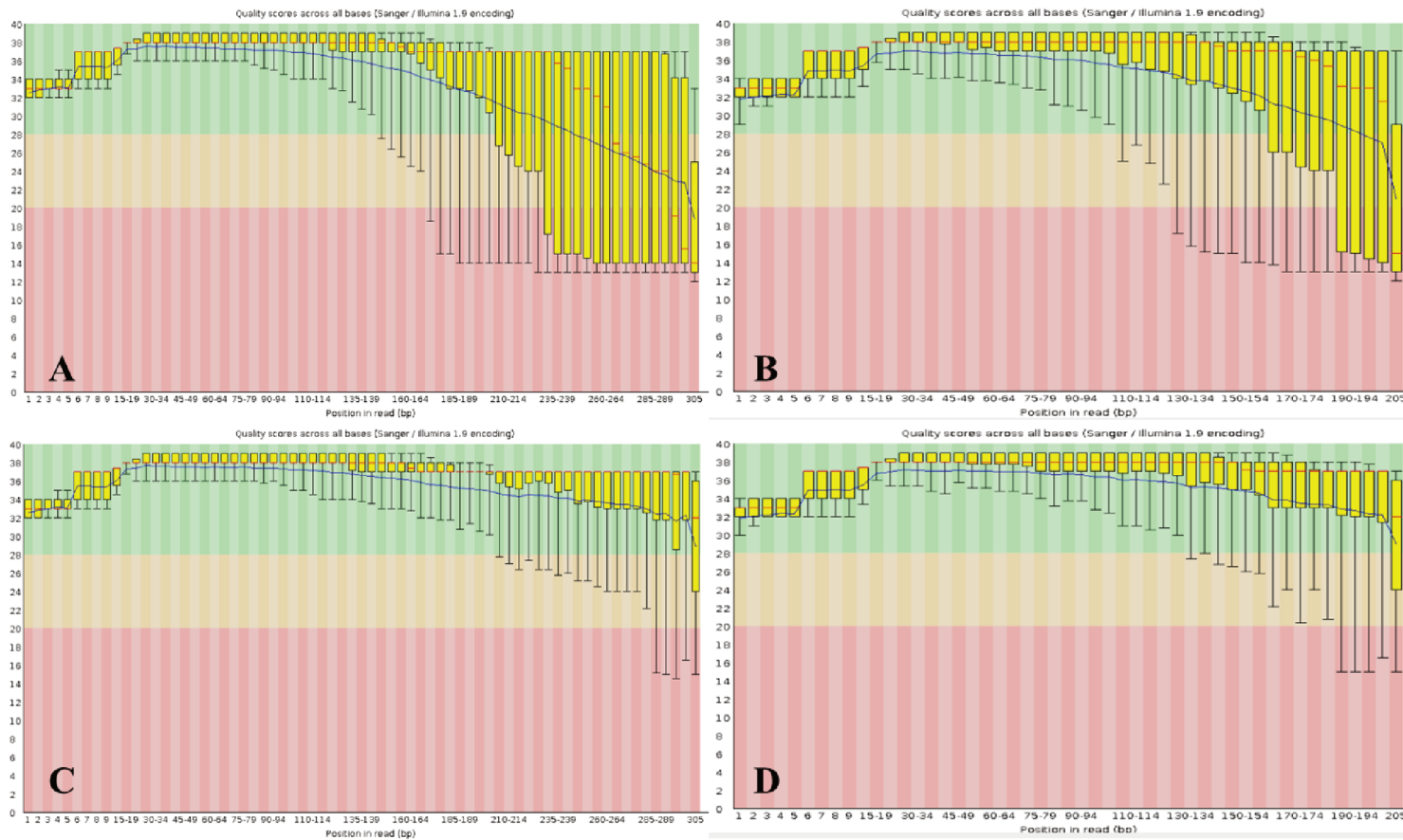
Isolado KP46. Leituras brutas: 1.161.833. Leituras trimadas: 1.151.137. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



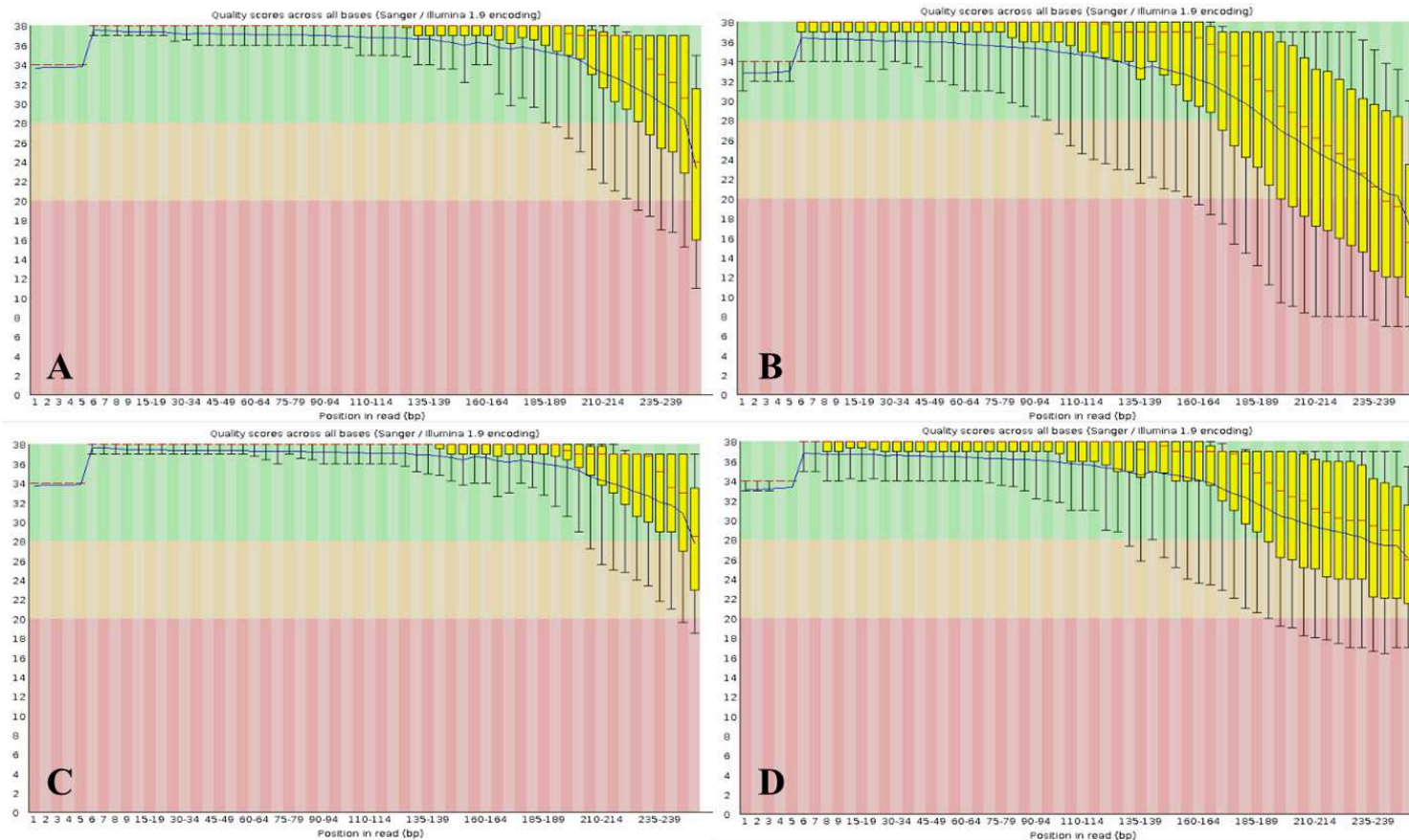
Isolado EC91. Leituras brutas: 1.135.667. Leituras trimadas: 1.087.695. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



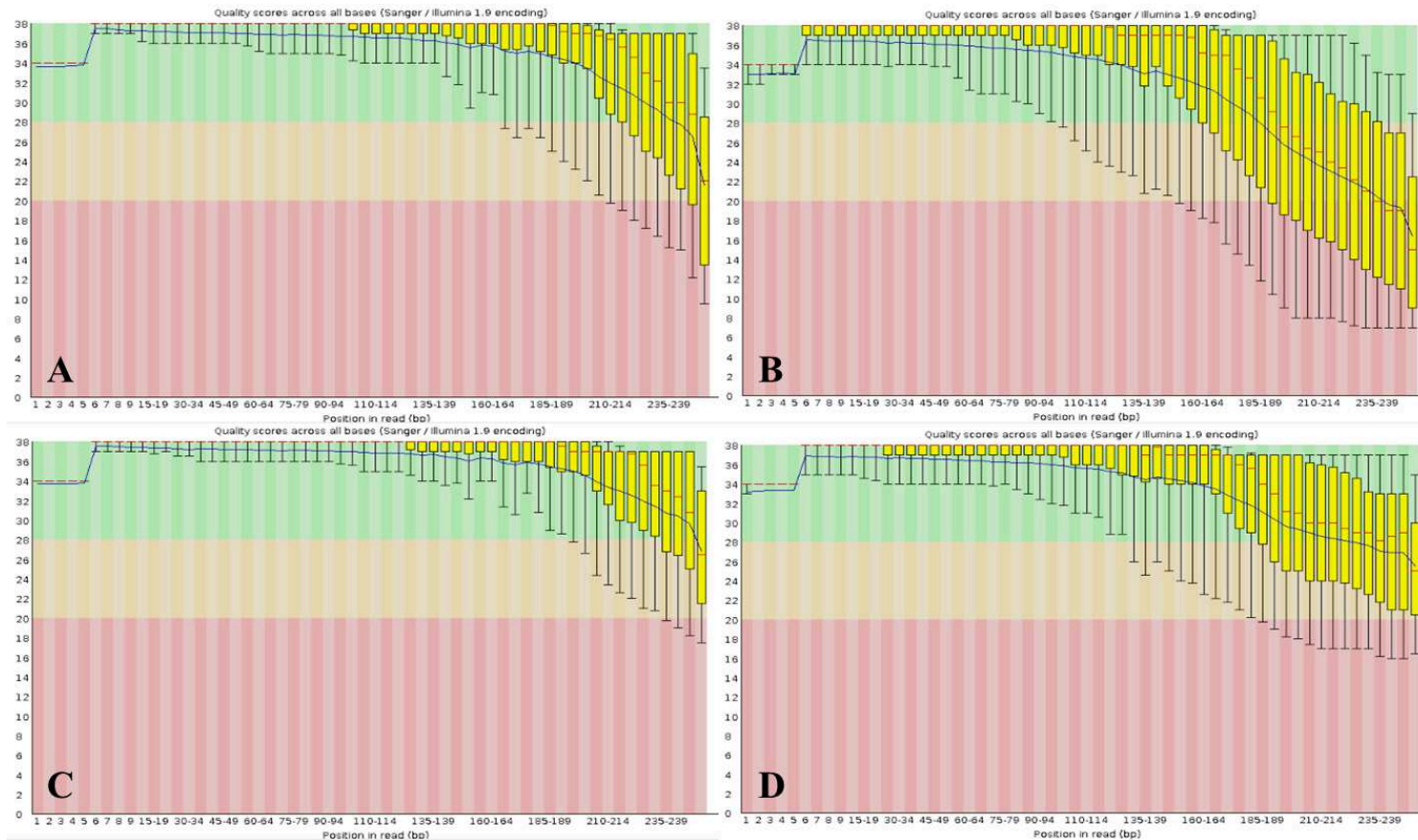
Isolado KP96. Leituras brutas: 1.203.800. Leituras trimadas: 1.188.221. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



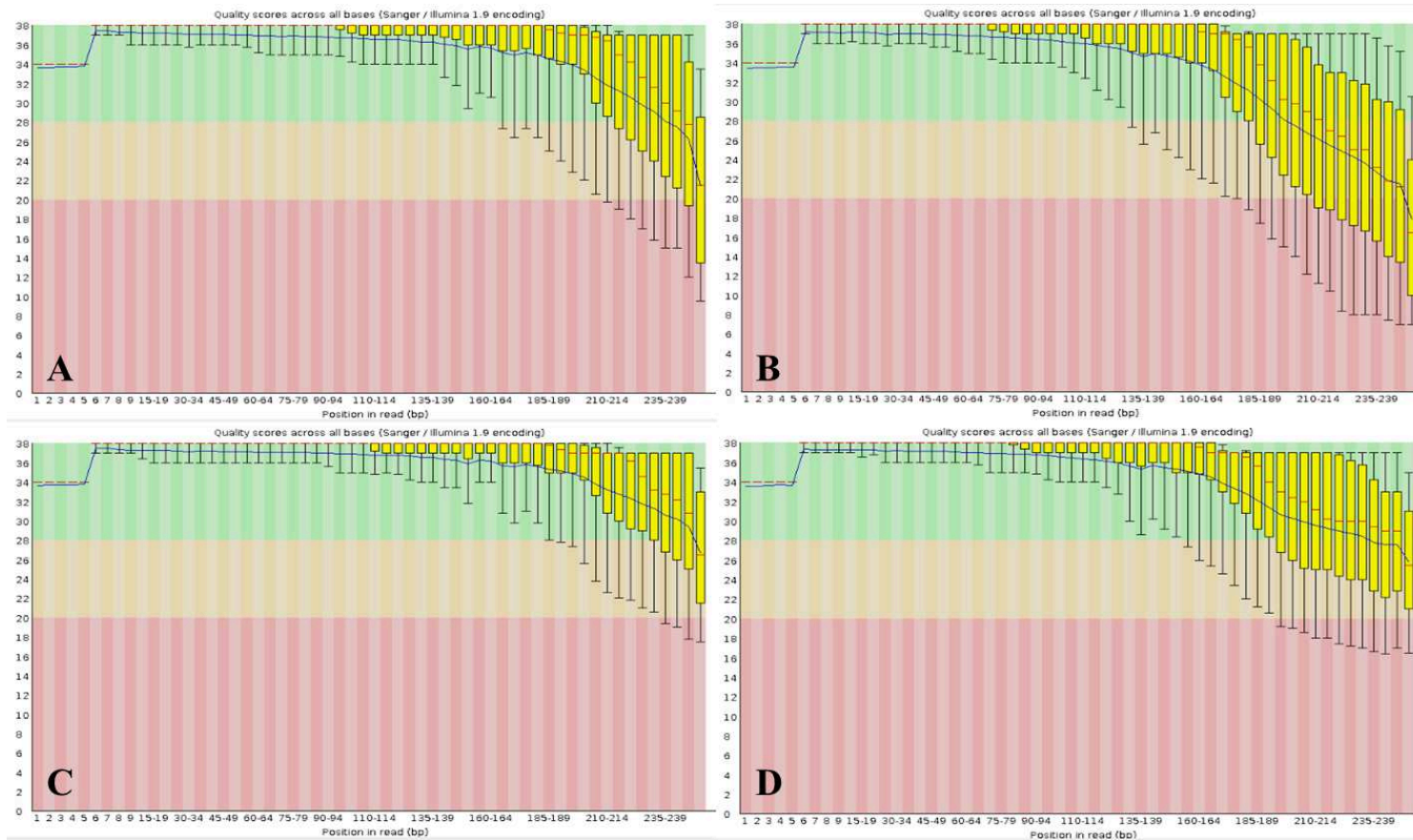
Isolado ECL120. Leituras brutas: 1.263.596. Leituras trimadas: 1.251.055. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



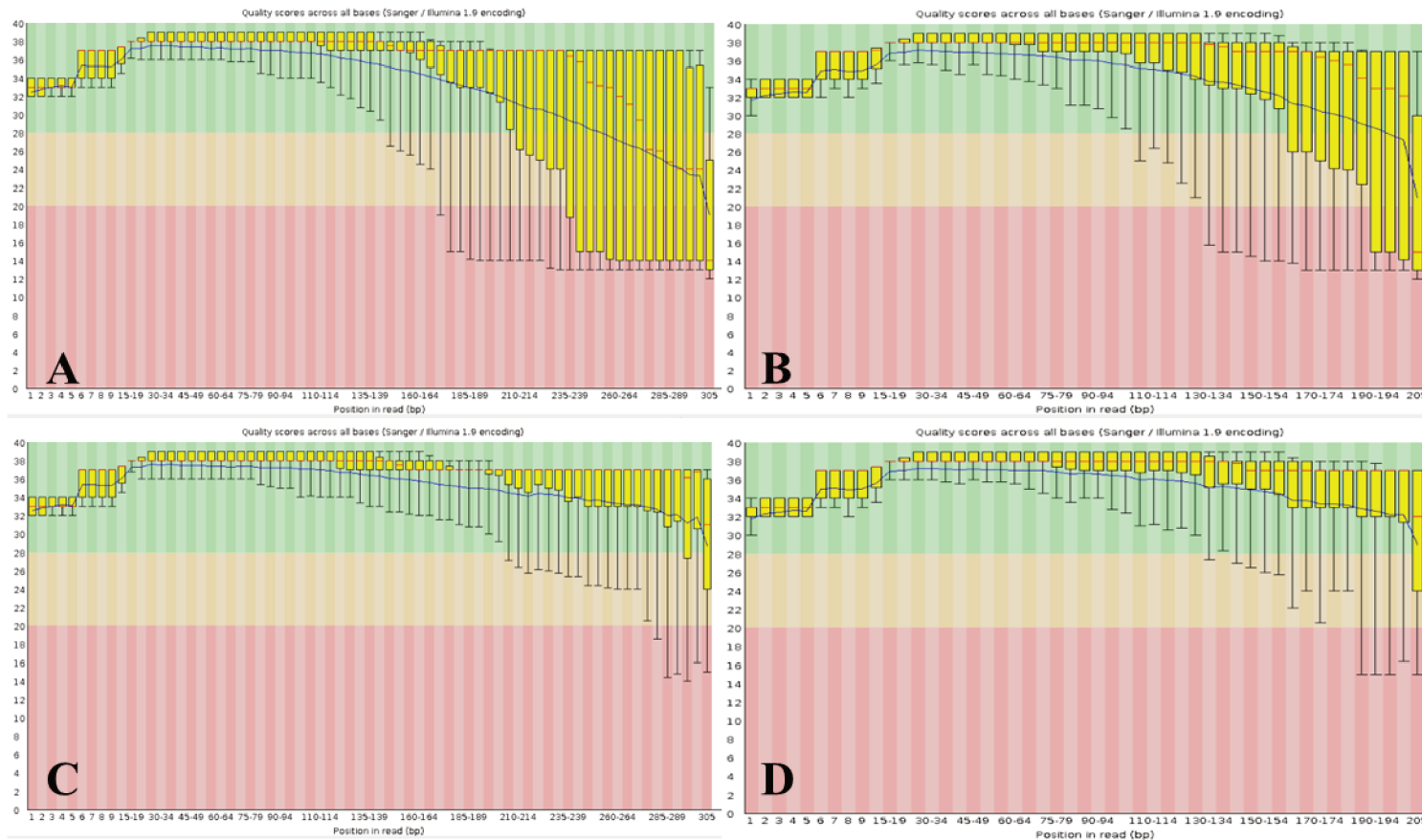
Isolado EC134. Leituras brutas: 1.131.957. Leituras trimadas: 1.088.665. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



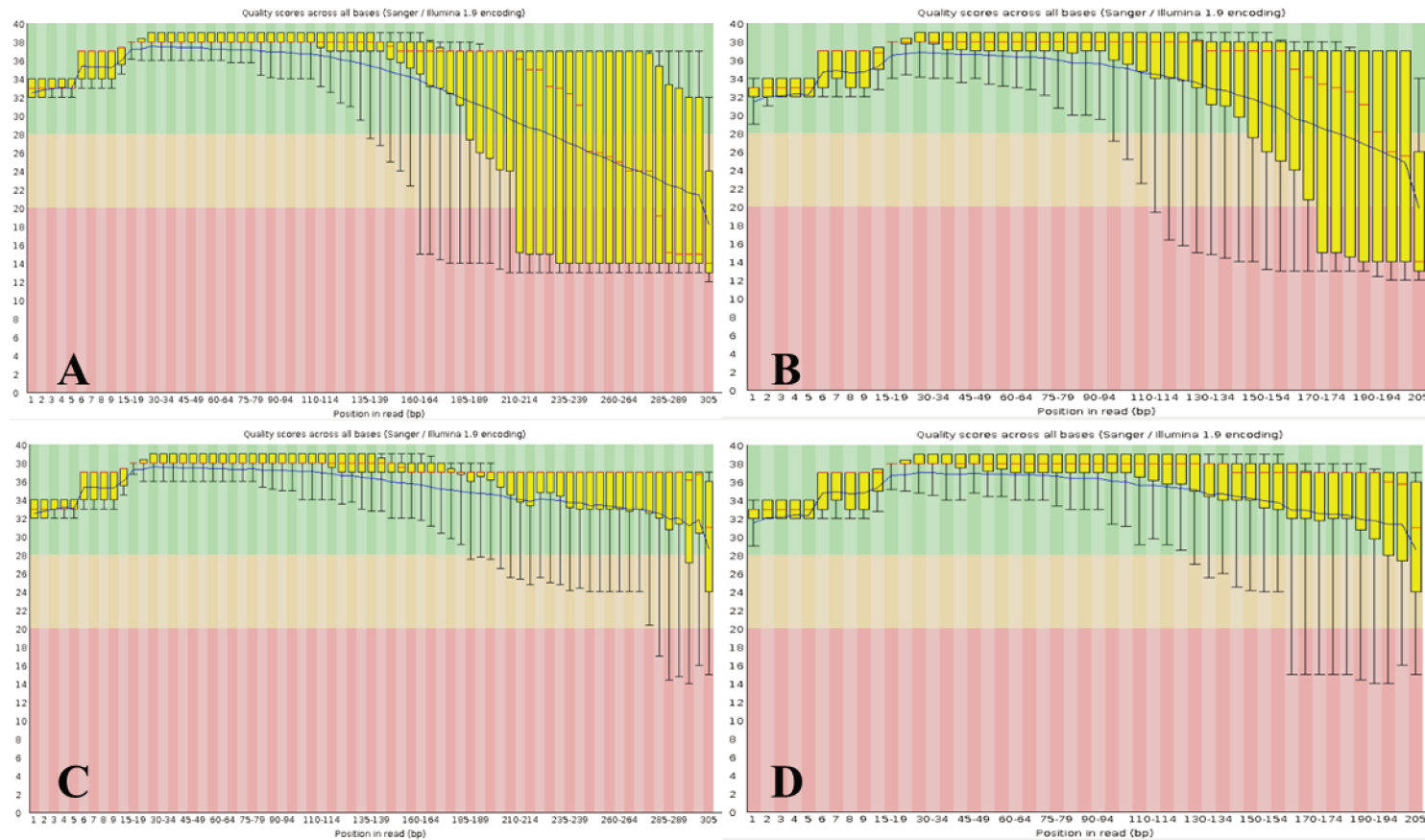
Isolado KP135. Leituras brutas: 1.066.464. Leituras trimadas: 1.010.884. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



Isolado KP136. Leituras brutas: 1.179.570. Leituras trimadas: 1.139.402. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



Isolado KP141. Leituras brutas: 1.243.113. Leituras trimadas: 1.230.535. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.



Isolado KP142. Leituras brutas: 1.554.911. Leituras trimadas: 1.535.886. A: Sequência *forward* dos dados brutos; B: Sequência *reverse* dos dados brutos; C: Sequência *forward* trimada pelo Trimmomatic, D: Sequência *reverse* trimada pelo Trimmomatic. O eixo Y no gráfico mostra o score de qualidade, quanto mais alto o score, melhor é a qualidade. O fundo do gráfico se divide no eixo Y em muito boa qualidade (verde), qualidade razoável (laranja) e má qualidade (vermelho). A linha central em vermelho representa o valor médio, a caixa amarela representa o intervalo interquartil (25 – 75%), a linha azul representa a qualidade média.

1 APÊNDICE B – Artigo desenvolvido no doutorado com os dados obtidos sobre os
2 plasmídeos carreadores de *mcr-1*

3
4 **IncX4 Plasmid-Mediated *mcr-1.1* in Colistin-Resistant**
5 ***Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil**

6 ZAMPARETTE, C.P.,^{1*} SCHORNER, M.^{1*}, CAMPOS, E.¹, MOURA, Q.²;
7 CERDEIRA, L.², TARTARI, D.C.¹, SEREIA, A.F.R.³, CUNHA, P.³, OLIVEIRA, L.F.V.³,
8 GRISARD, E.C.⁴; LINCOPAN, N.², BAZZO, M.L.¹, and SINCERO, T.C.M.^{1**}

9
10 ¹ Department of Clinical Analysis, Health Sciences Center, Federal University of
11 Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

12 ² Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, University of São
13 Paulo, São Paulo, Brazil

14 ³ Neoprospecta Microbiome Technologies, Florianópolis, Brazil

15 ⁴ Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Biological Sciences
16 Center, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil.

17
18 **Running Head:** MCR-1-producing *Escherichia coli* in Outpatients

19
20 **Keywords:** Bacterial pathogens, ESBL, CTX-M, Multidrug-resistant, Polymyxins.

21
22 * These authors contributed equally to this study

23
24 **Address correspondence to:

25 *Thaís Sincero, Ph.D.*

26 *Department of Clinical Analysis, School of Pharmacy*

27 *Universidade Federal de Santa Catarina, Brazil*

28 *E-mail: thais.sincero@ufsc.br*

29 **Abstract**

30 Plasmid-mediated colistin resistance has become a global health concern, not only
31 because its dissemination has occurred drastically, but also because it has begun to be
32 reported in multidrug-resistant pathogens. We hereby report microbiological and genomic
33 characteristics of two *mcr-1.1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* isolates identified
34 for the first time in community patients, in Santa Catarina, Southern Brazil. *E. coli* strains
35 belonging to ST206 and ST354 exhibited a multidrug-resistant profile. In fact, resistome
36 analysis revealed the presence of clinically important genes conferring resistance to
37 polymyxins (*mcr-1.1*), broad-spectrum cephalosporins (*bla_{CTX-M-2}*), quinolones [*qnrB10*,
38 *qnrB19* and *gyrA* (S83L, D87N), *parC* (A56T, S80I, E84G) or *parE* (I355T) mutations],
39 aminoglycosides [*aac(3)-IId*, *aadA1*, *aadA2*, *ant(2'')-Ia*, *aph(3')-Ia*, *aph(3'')-Ib*, *aph(6)-Id*],
40 trimethoprim (*dfrA8*, *dfrA17*), phenicols (*floR*, *cmlA1*, *catA1*), sulphonamides (*sul1*, *sul2*,
41 *sul3*), tetracyclines (*tetA*, *tetB*) and/or Fosfomycin (*GlpT* E448K, *cyaA* S352T). Interestingly,
42 in both colistin-resistant *E. coli* strains, *mcr-1.1* genes were carried by IncX4 plasmids,
43 responsible for the worldwide dissemination of *mcr*-type genes. In this regard, plasmid
44 backbones were identical to the first IncX4 plasmid reported in Brazil and sharing more than
45 99.9% identity to IncX4 plasmids from China. In conclusion, these data confirm the presence
46 of international ST206 and ST354 carrying *mcr-1.1* genes and that IncX4 plasmids has been
47 key vectors contributing to the endemic status of *mcr-1.1*-positive colistin-resistant *E. coli* in
48 Brazil.

49 **Introduction**

50 Polymyxin has been used in veterinary and clinical therapy for decades, but
51 nowadays is playing an important role as a last resort in the treatment of severe multidrug-
52 resistant Gram-negative bacilli infections¹. Besides it has been estimated the use of
53 approximately 12 tons of polymyxin in agriculture every year², acquired resistance is usually
54 described as a consequence of chromosomal mutations leading to modifications of the lipid A
55 moiety of lipopolysaccharide³. However, in 2015 it was described for the first time the
56 plasmid-mediated polymyxin resistance gene, designated *mcr-1*. This fact raised several
57 questioning about resistance genes dissemination between animal and human sources, and has
58 increased concern about multi-resistant Enterobacterales².

59 Since first description, the *mcr-1* gene has been described globally in different
60 Enterobacterales species,⁴ most *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* spp.
61 from animal, environmental and human sources.⁵ In Brazil, the first identification of the *mcr-*
62 *1* gene was published in 2016 in *E. coli* isolates from livestock, evidencing that *mcr-1-*
63 positive *E. coli* has been emerging in South America since at least 2012⁶. Thereafter, this gene
64 has begun to be described in humans⁷⁻¹³, environmental samples¹⁴, and agricultural
65 sources^{15,16}. In this study, we report for the first time the occurrence and genomic features of
66 *mcr-1.1*-positive colistin-resistant *Escherichia coli* isolates from community patients, in Santa
67 Catarina, Southern Brazil.

68

69 **Materials and Methods**

70 Two clinical isolates of *E. coli* (Ec11 and EC91) were recovered from outpatients
71 attended at a University Hospital in Santa Catarina state, Brazil. One strain originated from a
72 surveillance rectal *swab*, collected in 2015 (EC11), of a 48-years-old man, and the other one
73 was recovered from a urine sample obtained in 2016 (EC91), from a 68-years-old woman

74 presenting with urinary tract infection. Identification and the antimicrobial susceptibility tests
75 were performed by the VITEK™ 2 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). The
76 minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the broth microdilution method
77 according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2019)
78 (<http://www.eucast.org/>). Initially, the presence of the *mcr-1* gene was screened by qPCR
79 using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, USA) with *mcr-1-F* primer
80 (5'GCTCTTTGGCGCGATGCTACTG 3') and *mcr-1-R* primer
81 (5'GGTCTCGGCTTGGTCGGTCTG 3'). The whole genome sequencing (WGS) was
82 performed using the MiSeq™ platform (Illumina Inc.). Genomic library was prepared using
83 the Nextera DNA Flex Library Prep *Kit* (Illumina Inc., San Diego, CA) according to the
84 manufacturer's instructions. WGS was executed using paired-end reads (250-bp). The reads
85 were assembled with the A5 software,¹⁷ being processed for adapter trimming, quality
86 filtering and error correction to generate contigs and scaffolds, obtaining a N50 value of
87 133871 bp for EC11, and 181326 bp for EC91. Plasmids assembling from WGS data was
88 performed using PlasmidSPAdes software v.3.13.0¹⁸, and the automatic annotation using
89 Prokka¹⁹. Additionally, resistance and virulence genes, sequence types (ST/MLST) and
90 plasmid incompatibility (Inc) types of the strains were identified using *ResFinder*²⁰ v.3.1,
91 *VirulenceFinder* 1.5, *MLST*²¹ v.2.0 server, and *PlasmidFinder*²² v.2.0 databases available
92 from the Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>).
93 Additionally, resistance gene sequences and mutations were confirmed using the
94 Comprehensive Antibiotic Resistance Database (<https://card.mcmaster.ca/>). Phylogroups were
95 established according to the Clermont *et al.* scheme²³.
96

97 **Results**

98 In this study, colistin-resistant *E. coli* strains (EC11 and EC91) carrying the *mcr-1.1*
 99 gene were identified in outpatients, who were not directly exposed to polymyxin. Both strains
 100 exhibited a multidrug-resistant (MDR) profile²⁴. In this regard, among antibiotic tested, EC11
 101 was resistant to ampicillin, ampicillin/sulbactam, nalidixic acid,
 102 trimethoprim/sulfamethoxazole (TMP/SMX), and colistin (MIC= 8 mg/L). In addition to
 103 colistin resistance (MIC= 8 mg/L) mediated by *mcr-1.1*, EC91 strain was also resistant to
 104 ampicillin, cephalothin, nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin and broad-spectrum
 105 cephalosporins (i.e., ceftriaxone), indeed, ESBL production was confirmed (Table 1).

106 WGS analysis revealed that EC11 and EC91 belonged to ST206 and ST354.
 107 Antibiotic resistome analysis in EC11 identified resistance genes to β -lactams (*bla*_{TEM-1A}),
 108 aminoglycosides (*aph(6)-Id*, *aph(3'')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aadA1*, *aadA2*), quinolones (*qnrB19*,
 109 *gyrA S83L*, *QnrB10*, *parC p.A56T*), phenicols (*floR*, *cmlA1*), sulphonamides (*sul2*, *sul3*),
 110 tetracyclines (*tetA*), trimethoprim (*dfrA8*), fosfomycin (*GlpT E448K*), and polymyxins (*mcr-*
 111 *1*); while in EC91 the presence of resistance genes to β -lactams (*bla*_{CTX-M-2}), aminoglycosides
 112 (*aadA1*, *aac(3)-IId*, *ant(2'')-Ia*), quinolones (*parC S80I*, *E84G*; *gyrA S83L*, *D87N*; *parE*
 113 *p.I355T*), macrolides (*mdf(A)*), phenicols (*ctaA1*), sulphonamides (*sul1*), tetracyclines (*tet(B)*),
 114 trimethoprim (*dfrA17*), fosfomycin (*GlpT E448K*, *cyaA S352T*) and polymyxins (*mcr-1*) was
 115 confirmed.

116 Plasmid incompatibility groups IncN, IncX3, IncX4 and IncFIB were identified in
 117 EC11 by *PlasmidFinder*, whereas Col(MG828), Col440I, p0111, IncFIA, IncFIB and IncX4
 118 groups were identified in EC91 (Table 1).

119 In both colistin-resistant *E. coli* strains, the presence of *mcr-1.1* was associated with
 120 IncX4 plasmids, designated pMIMAEC11mcr and pMIMAEC91mcr, respectively (GenBank
 121 access numbers: MK940857 and MK940858). In this regard, pMIMAEC11mcr and

122 pMIMAEC91mcr shared 100% and 99.6% identity, respectively, with pICBEC71 (Genbank
123 accession no. CP015977) (Figure 1), the first IncX4 plasmid harboring *mcr-1.1* gene
124 identified in Brazil, from a clinical *E. coli* isolate.⁶

125

126 Discussion

127 Plasmid-mediated polymyxin resistance brought a global public health consensus
128 concern because previously polymyxin mechanism of resistance was restricted to
129 chromosomal mutations and intrinsic resistance^{25,26,27} and now is in several groups of highly
130 transferable plasmids⁵.

131 The first report of the *mcr-1* gene in a clinical isolate in Brazil occurred in 2016, an
132 *E. coli* ST101 isolate from a patient with diabetic foot. The *mcr-1* gene from that sample was
133 located on IncX4 plasmid⁶. The EC11 isolate was recovered in 2015, which makes it the
134 oldest clinical isolate identified carrying the *mcr-1* gene in the country. In Brazil, every
135 plasmid harboring *mcr-1* gene described so far belonged to the IncX4 group, with MIC values
136 varying from 2 to 16mg/L^{6,7,10,14,15,28-30}. That plasmid group is one of the principal
137 responsible for the *mcr-1* dissemination^{5,31}. They are conjugative plasmids³² and one of the
138 major groups found in *E. coli* isolates, but it is also described in other Enterobacterales
139 species^{33,34}. Interestingly, the plasmids pMIMAEC11mcr and pMIMAEC91mcr were
140 identical to IncX4 plasmid described by Fernandes and collaborators⁶ (Genbank accession no.
141 CP015977) in Brazil, also from human samples (Figure 1). Additionally, IncX4 plasmids of
142 this study presented more than 99.9% identity to IncX4 plasmid found in China (Genbank
143 accession no. KU761327.1) and in Estonia (Genbank accession No. KU743383.1)³⁵.
144 Altogether, these data and previous published works support the hypothesis of an endemic

145 plasmid circulating in Brazil, responsible for disseminating *mcr-1* resistance gene in different
146 species of Enterobacterales from different niches. Also, there is a consensus that the IncX4
147 plasmid could be the key to the dissemination of the *mcr-1* gene intercontinentally^{6,36}.

148 Although *E. coli* ST206 and ST354 have been worldwide reported from human and
149 non-human sources (<http://enterobase.warwick.ac.uk>), including in Brazil (ST206)³⁷, the
150 acquisition of *mcr-1*-type genes by *E. coli* isolates belonging to the ST206 has been restricted
151 to China, so far being associated with human infections and colonizations of livestock or
152 aquatic environments³⁸⁻⁴¹. Whereas for *E. coli* ST354, the acquisition of *mcr-1* genes has been
153 documented in China (human, chicken and companion animals)^{42,43}, in Cambodia (clinical
154 isolates)⁴⁴ and Paquistan (migratory wild birds)⁴⁵, thus being considered a new pandemic
155 MLST genotype with zoonotic potential. Therefore, in this study, we confirm the presence of
156 international ST206 and ST354 carrying *mcr-1.1* genes in Brazil.

157

158 **Conclusion**

159 We provide the first description of IncX4 conjugative plasmids harboring *mcr-1* gene
160 in clinical isolates of Santa Catarina state, in Southern Brazil. Complementing other studies
161 worldwide, our data help to understand the dissemination routes of the plasmid-mediated
162 colistin resistance. Finally, these data confirm that IncX4 plasmids has been key vectors
163 contributing to the endemic status of *mcr-1.1*-positive colistin-resistant *E. coli* in Brazil.

164

165

166 **Acknowledgments**

167 CNPq, CAPES and FAPESP research grants are gratefully acknowledged. N.L. is
168 research fellow of CNPq (312249/2017-9). C.P.Z. was recipient of a CAPES scholarship. The
169 authors thank the microbiology laboratory from University Hospital Professor Polydoro
170 Ernani of São Thiago for storage multidrug-resistant isolates and to Dr. Mara Scheffer for
171 EC91 isolation.

172

173 **Disclosure Statement**

174 Patrícia Amorim da Cunha, MSc, Aline Fernanda Rodrigues Sereia, PhD, and Luiz
175 Felipe Valter Oliveira, PhD, are employees of Neoprospecta AS. Other authors declare no
176 competing financial interests exist.

177

178 **Statement on funding**

179 This work was funded by research grants from Conselho Nacional de
180 Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq 458293/2014-8, 462042/2014-6,
181 312249/2017-9 and 433128/2018-6), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
182 (FAPESP 2016/08593-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

183

184 **Nucleotide accession number(s)**

185 The nucleotide sequences of pMIMAEC11mcr and pMIMAEC91mcr plasmids were
186 deposited at DDBJ/ENA/GenBank under accession numbers: MK940857 and MK94085.

187

188

189

References

- 190
191
- 192 1. Kempf, I., E. Jouy, and C. Chauvin. 2016. Colistin use and colistin resistance in
193 bacteria from animals. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48:598–606.
- 194 2. Liu, Y.-Y., Y. Wang, T.R. Walsh, L.-X. Yi, R. Zhang, J. Spencer, Y. Doi, G. Tian, B.
195 Dong, X. Huang, L.-F. Yu, D. Gu, H. Ren, X. Chen, L. Lv, D. He, H. Zhou, Z. Liang,
196 J.-H. Liu, and J. Shen. 2016. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance
197 mechanism *MCR-1* in animals and human beings in China: a microbiological and
198 molecular biological study. *Lancet Infect. Dis.* 16:161–168.
- 199 3. Baron, S., L. Hadjadj, J.-M. Rolain, and A.O. Olaitan. 2016. Molecular mechanisms of
200 polymyxin resistance: knowns and unknowns. *Int. J. Antimicrob. Agents* 48:583–591.
- 201 4. Adeolu, M., S. Alnajjar, S. Naushad, and R.S. Gupta. 2016. Genome-based phylogeny
202 and taxonomy of the ‘Enterobacterales’: proposal for Enterobacterales ord. nov.
203 divided into the families Enterobacteriaceae, *Erwiniaceae* fam. nov.,
204 *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov.,
205 *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
206 66:5575–5599.
- 207 5. Sun, J., H. Zhang, Y.H. Liu, and Y. Feng. 2018. Towards Understanding MCR-like
208 Colistin Resistance. *Trends Microbiol.*
- 209 6. Fernandes, M.R., J.A. McCulloch, M.A. Vianello, Q. Moura, P.J. Pérez-Chaparro, F.
210 Esposito, L. Sartori, M. Dropa, M.H. Matté, D.P. A Lira, E.M. Mamizuka, and N.
211 Lincopan. 2016. First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the
212 *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a
213 Human Infection in Brazil.
- 214 7. Augusto Martins Aires, C., O. Carlos da Conceição-Neto, T. Rachel Tavares Oliveira,

- 215 C. Frizzera Dias, L. Feital Montezzi, R. Cristina Picão, R. Mattos Albano, M. Dutra
216 Asensi, A.D. Paula, A. Carvalho-Assef, O. Cruz, and F. Oswaldo Cruz. 2017.
217 Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Clinical *KPC-2*-Producing
218 *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil.
- 219 8. Dionisio, F., I.C. Conceição, A.C.R. Marques, L. Fernandes, and I. Gordo. 2005. The
220 evolution of a conjugative plasmid and its ability to increase bacterial fitness. *Biol. Lett*
221 1:250–252.
- 222 9. Dalmolin, T.V., A.F. Martins, A.P. Zavascki, D. de Lima-Morales, and A.L. Barth.
223 2018. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of *KPC-2*-producing
224 *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 90:132–
225 133.
- 226 10. Dalmolin, T.V., L. Castro, F.Q. Mayer, A.P. Zavascki, A.F. Martins, D. de Lima-
227 Morales, and A.L. Barth. 2017. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical
228 isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* 72:2404–2406.
- 229 11. Rossi, F., R. Girardello, C. Morais, A.P. Cury, L.F. Martins, A. Maria Da Silva, E.
230 Abdala, I. V Joã, C. Setubal, A. José, and S. Duarte. Plasmid-mediated *mcr-1* in
231 carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an
232 unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil?
- 233 12. Lorenzoni, V.V., T.V. Dalmolin, L.N. Franco, A.L. Barth, and R. Hörner. 2018.
234 Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in
235 southern Brazil. *Brazilian J. Infect. Dis.* 22:356–357.
- 236 13. Pillonetto, M., A. Mazzetti, G.N. Becker, C.A. Siebra, L.N.V.. Arend, and A.L. Barth.
237 2019. Low level of polymyxin resistance among nonclonal *mcr-1*-positive *Escherichia*

- 238 *coli* from human sources in Brazil. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93:140–142.
- 239 14. Sacramento, A.G., M.R. Fernandes, F.P. Sellera, M.E. Muñoz, R. Vivas, S.S.
240 Dolabella, and N. Lincopan. 2018. Genomic analysis of *MCR-1* and *CTX-M-8* co-
241 producing *Escherichia coli* ST58 isolated from a polluted mangrove ecosystem in
242 Brazil. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* 15:288–289.
- 243 15. Moreno, L.Z., V.T.M. Gomes, J. Moreira, C.H. de Oliveira, B.P. Peres, A.P.S. Silva, S.
244 Thakur, R.M. La Ragione, and A.M. Moreno. 2019. First report of *mcr-1*-harboring
245 *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil.
246 *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*
- 247 16. Rau, R.B., D. de Lima-Morales, P.L. Wink, A.R. Ribeiro, A.F. Martins, and A.L.
248 Barth. 2018. Emergence of *mcr-1* Producing *Salmonella enterica* serovar
249 Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil. *Foodborne Pathog. Dis.*
250 15:58–59.
- 251 17. Coil, D., G. Jospin, and A.E. Darling. 2015. A5-miseq: an updated pipeline to assemble
252 microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics* 31:587–589.
- 253 18. Antipov, D., N. Hartwick, M. Shen, M. Raiko, A. Lapidus, and P.A. Pevzner.
254 plasmidSPAdes: Assembling Plasmids from Whole Genome Sequencing Data.
- 255 19. Seemann, T. 2014. Genome analysis Prokka: rapid prokaryotic genome annotation.
256 30:2068–2069.
- 257 20. Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F.M.
258 Aarestrup, and M. V. Larsen. 2012. Identification of acquired antimicrobial resistance
259 genes. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:2640–2644.
- 260 21. Larsen, M. V, S. Cosentino, S. Rasmussen, C. Friis, H. Hasman, R.L. Marvig, L.
261 Jelsbak, T. Sicheritz-Pontén, D.W. Ussery, F.M. Aarestrup, and O. Lund. 2012.
262 Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J. Clin. Microbiol.*

- 263 50:1355–1361.
- 264 22. Carattoli, A., E. Zankari, A. García-Fernández, M. Voldby Larsen, O. Lund, L. Villa,
265 F. Møller Aarestrup, and H. Hasman. 2014. *In Silico* Detection and Typing of Plasmids
266 using *PlasmidFinder* and Plasmid Multilocus Sequence Typing. *Antimicrob. Agents*
267 *Chemother.* 58:3895–3903.
- 268 23. Clermont, O., J.K. Christenson, E. Denamur, and D.M. Gordon. 2013. The Clermont
269 *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and
270 detection of new phylo-groups. *Environ. Microbiol. Rep.* 5:58–65.
- 271 24. Magiorakos, A.-P., A. Srinivasan, R.B. Carey, Y. Carmeli, M.E. Falagas, C.G. Giske,
272 S. Harbarth, J.F. Hindler, G. Kahlmeter, B. Olsson-Liljequist, D.L. Paterson, L.B. Rice,
273 J. Stelling, M.J. Struelens, A. Vatopoulos, J.T. Weber, and D.L. Monnet. 2012.
274 Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an
275 international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance.
276 *Clin. Microbiol. Infect.* 18:268–281.
- 277 25. Wanty, C., A. Anandan, S. Piek, J. Walshe, J. Ganguly, R.W. Carlson, K.A. Stubbs,
278 C.M. Kahler, and A. Vrielink. 2013. The Structure of the Neisserial
279 Lipooligosaccharide Phosphoethanolamine Transferase A (LptA) Required for
280 Resistance to Polymyxin. *J. Mol. Biol.* 425:3389–3402.
- 281 26. McPhee, J.B., S. Lewenza, and R.E.W. Hancock. 2003. Cationic antimicrobial peptides
282 activate a two-component regulatory system, PmrA-PmrB, that regulates resistance to
283 polymyxin B and cationic antimicrobial peptides in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol.*
284 *Microbiol.* 50:205–217.
- 285 27. Miller, A.K., M.K. Brannon, L. Stevens, H.K. Johansen, S.E. Selgrade, S.I. Miller, N.

- 286 Høiby, and S.M. Moskowitz. 2011. PhoQ mutations promote lipid A modification and
287 polymyxin resistance of *Pseudomonas aeruginosa* found in colistin-treated cystic
288 fibrosis patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:5761–5769.
- 289 28. Monte, D.F., A. Mem, M.R. Fernandes, L. Cerdeira, F. Esposito, J.A. Galvão,
290 B.D.G.M. Franco, N. Lincopan, and M. Landgraf. 2017. Chicken Meat as a Reservoir
291 of Colistin-Resistant *Escherichia coli* Strains Carrying *mcr-1* Genes in South America.
292 *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e02718-16.
- 293 29. Sellera, F.P., M.R. Fernandes, L. Sartori, M.P.N. Carvalho, F. Esposito, C.L.
294 Nascimento, G.H.P. Dutra, E.M. Mamizuka, P.J. Pérez-Chaparro, J.A. McCulloch, and
295 N. Lincopan. 2016. *Escherichia coli* carrying IncX4 plasmid-mediated *mcr-1* and *bla*
296 *CTX-M* genes in infected migratory Magellanic penguins (*Spheniscus magellanicus*). *J.*
297 *Antimicrob. Chemother.* 72:dkw543.
- 298 30. Palmeira, J.D., H. Ferreira, J.-Y. Madec, and M. Haenni. 2018. Draft genome of a
299 ST443 *mcr-1* - and *bla*_{CTX-M-2} -carrying *Escherichia coli* from cattle in Brazil. *J. Glob.*
300 *Antimicrob. Resist.* 13:269–270.
- 301 31. Sun, J., L.-X. Fang, Z. Wu, H. Deng, R.-S. Yang, X.-P. Li, S.-M. Li, X.-P. Liao, Y.
302 Feng, and Y.-H. Liu. Genetic Analysis of the IncX4 Plasmids: Implications for a
303 Unique Pattern in the *mcr-1* Acquisition OPEN.
- 304 32. Partridge, S.R., S.M. Kwong, N. Firth, and S.O. Jensen. 2018. Mobile Genetic
305 Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 31:e00088-
306 17.
- 307 33. Johnson, T.J., E.M. Bielak, D. Fortini, L.H. Hansen, H. Hasman, C. Debroy, L.K.
308 Nolan, and A. Carattoli. 2012. Expansion of the IncX plasmid family for improved
309 identification and typing of novel plasmids in drug-resistant Enterobacteriaceae.
310 *Plasmid* 68:43–50.

- 311 34. Dobiasova, H., and M. Dolejska. Prevalence and diversity of IncX plasmids carrying
312 fluoroquinolone and β -lactam resistance genes in *Escherichia coli* originating from
313 diverse sources and geographical areas.
- 314 35. Li, R., M. Xie, J. Zhang, Z. Yang, L. Liu, X. Liu, Z. Zheng, E.W.-C. Chan, and S.
315 Chen. 2017. Genetic characterization of *mcr-I* -bearing plasmids to depict molecular
316 mechanisms underlying dissemination of the colistin resistance determinant. *J.*
317 *Antimicrob. Chemother.* 72:393–401.
- 318 36. Moreno, L.Z., V.T.M. Gomes, J. Moreira, C.H. de Oliveira, B.P. Peres, A.P.S. Silva, S.
319 Thakur, R.M. La Ragione, and A.M. Moreno. 2019. First report of *mcr-I*-harboring
320 *Salmonella enterica* serovar Schwarzengrund isolated from poultry meat in Brazil.
321 *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 93:376–379.
- 322 37. Arais, L.R., A. V. Barbosa, J.R.C. Andrade, T.A.T. Gomes, M.D. Asensi, C.A.M.
323 Aires, and A.M.F. Cerqueira. 2018. Zoonotic potential of atypical enteropathogenic
324 *Escherichia coli* (aEPEC) isolated from puppies with diarrhoea in Brazil. *Vet.*
325 *Microbiol.* 227:45–51.
- 326 38. Zhou, H.-W., T. Zhang, J.-H. Ma, Y. Fang, H.-Y. Wang, Z.-X. Huang, Y. Wang, C.
327 Wu, and G.-X. Chen. 2017. Occurrence of Plasmid- and Chromosome-Carried *mcr-I* in
328 Waterborne Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob. Agents Chemother.* 61:e00017-
329 17.
- 330 39. Zheng, B., X. Yu, H. Xu, L. Guo, J. Zhang, C. Huang, P. Shen, X. Jiang, Y. Xiao, and
331 L. Li. 2017. Complete genome sequencing and genomic characterization of two
332 *Escherichia coli* strains co-producing *MCR-I* and *NDM-I* from bloodstream infection
333 OPEN. *Sci. RePoRtS* | 7:17885.

- 334 40. Zheng, B., T. Lv, H. Xu, X. Yu, Y. Chen, J. Li, C. Huang, L. Guo, J. Zhang, X. Jiang,
335 Y. Xiao, and L. Li. 2018. Discovery and characterisation of an *Escherichia coli* ST206
336 strain producing *NDM-5* and *MCR-1* from a patient with acute diarrhoea in China. *Int.*
337 *J. Antimicrob. Agents* 51:273–275.
- 338 41. Shen, Z., Y. Hu, Q. Sun, F. Hu, H. Zhou, L. Shu, T. Ma, Y. Shen, Y. Wang, J. Li, T.R.
339 Walsh, R. Zhang, and S. Wang. 2018. Emerging Carriage of *NDM-5* and *MCR-1* in
340 *Escherichia coli* From Healthy People in Multiple Regions in China: A Cross Sectional
341 Observational Study.
- 342 42. Wu, C., Y. Wang, X. Shi, S. Wang, H. Ren, Z. Shen, Y. Wang, J. Lin, and S. Wang.
343 2018. Rapid rise of the ESBL and *mcr-1* genes in *Escherichia coli* of chicken origin in
344 China, 2008–2014. *Emerg. Microbes Infect.* 7:1–10.
- 345 43. Zhang, X.-F., Y. Doi, X. Huang, H.-Y. Li, L.-L. Zhong, K.-J. Zeng, Y.-F. Zhang, S.
346 Patil, and G.-B. Tian. 2016. Possible Transmission of *mcr-1*-Harboring *Escherichia*
347 *coli* between Companion Animals and Human. *Emerg. Infect. Dis.* 22:1679–1681.
- 348 44. Stoesser, N., A.J. Mathers, C.E. Moore, N.P. Day, and D.W. Crook. 2016. Colistin
349 resistance gene *mcr-1* and pHNSHP45 plasmid in human isolates of *Escherichia coli*
350 and *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet Infect. Dis.* 16:285–286.
- 351 45. Mohsin, M., S. Raza, N. Roschanski, K. Schaufler, and S. Guenther. 2016. First
352 description of plasmid-mediated colistin-resistant extended-spectrum β -lactamase-
353 producing *Escherichia coli* in a wild migratory bird from Asia. *Int. J. Antimicrob.*
354 *Agents* 48:463–464.

355

356

357 Table 1. Microbiological and Genomic Characteristics of *mcr-1.1*-Positive Colistin-
358 Resistant *Escherichia coli* from Outpatients in Santa Catarina, Southern Brazil

Characteristics	<i>E. coli</i> EC11	<i>E. coli</i> EC91
Sample	Rectal <i>swab</i>	Urine
Resistance profile ^a	ampicillin, ampicillin/ sulbactam, nalidixic acid, trimethoprim/sulfamethoxazole	ampicillin, cephalothin, ceftriaxone, cefuroxim, nalidixic acid, norfloxacin, ciprofloxacin
Colistin MIC ^b (mg/L)	8	8
Genome data		
Genome size (bp)	4,923,677	5,326,986
Epidemiological genomic data		
MLST (ST ^c)	206	354
Serotype	H5	O23, H34
Clermont phylogroup ^d	A	F
Resistome ^e		
Antibiotics	Polymy xin	<i>mcr-1</i> *
	β - lactams	<i>bla</i> _{TEM-1a} * <i>bla</i> _{CTX-M-2} *
	aminogl ycosides	<i>aph(6)-Id</i> , <i>aph(3'')-Ib</i> , <i>aph(3')-Ia</i> , <i>aadA1</i> , <i>aadA2</i> <i>IId</i> , <i>ant(2'')-Ia</i>
	fluoroq uinolones	<i>qnrB19</i> , <i>gyrAS83L</i> , <i>qnrB10</i> , <i>parC</i> p.A56T E84G; <i>gyrA</i> S83L, D87N; <i>parE</i> p.I355T
	fosfom ycin	<i>glpT</i> E448K <i>glpT</i> E448K; <i>uhpT</i> E350Q; <i>cyaA</i> S352T
	macroli des	<i>mdf(A)</i>
	phenico ls	<i>catA1</i>

	amides	sulphon	<i>sul2, sul3</i>	<i>sul1</i>
	line	tetracyc	<i>tet(A)</i>	<i>tet(B)</i>
	oprim	trimeth	<i>dfrA8</i>	<i>dfrA17</i>
QACs ^f			<i>qacH</i>	
groups	Plasmid incompatibility	IncFIB	IncX4 ^g IncN, IncX3,	IncX4 ^g , Col(MG828), Col440I, p0111, IncFIA, IncFIB
	GenBank accession		MK940857	MK940858
numbers				

359

360

^a Antimicrobial Susceptibility Test (AST), determined by Vitek^{2™}.

361

^b Minimum Inhibitory Concentration (MIC), determined by broth microdilution

362

method.

363

^c ST, sequence type. MLST loci (*adk, fumC, gyrB, icd, mdh, purA, and recA*) defined by

364

Achtman (<http://mlst.warwick.ac.uk/mlst/dbs/Ecoli>).

365

^d Phylogroups were established according to the Clermont *et al.* scheme²³.

366

^e Acquired resistance genes detected using *ResFinder* v.3.1.

367

^f QACs, quaternary ammonium compounds.

368

^g Plasmid harboring *mcr-1* gene.

369

* Genes confirmed by qPCR.

370

371

372 Figure 1.

373 Backbone of pMIMAEC11mcr IncX4 plasmid (GenBank accession no. MK940857)
374 carrying the *mcr-I* gene in a human *E. coli* strain isolated in Brazil, comparing with
375 pMIMAEC91mcr (GenBank accession no. MK940858) also described in this study, and with
376 pICBEC72Hmcr (Genbank accession no. CP015977), from the first clinical isolate described
377 in Brazil. Comparative analysis was performed using SnapGene version 4.3. The
378 pMIMAEC91mcr IncX4 plasmid presented 99.96% identity, 1 gap and 105 mismatches
379 compared to pMIMAEC11mcr IncX4 plasmid, and the pICBEC72Hmcr presented 100%
380 identity and 3 mismatches. HP: hypothetical protein.