

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação dos Mecanismos Adquiridos de Resistência a Antimicrobianos em  
Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases por Sequenciamento de Nova  
Geração

CAROLINA SILVA NODARI

PORTO ALEGRE, 2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Avaliação dos Mecanismos Adquiridos de Resistência a Antimicrobianos em  
Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases por Sequenciamento de Nova  
Geração

Dissertação apresentada por **Carolina  
Silva Nodari** para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

PORTO ALEGRE, 2016

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30 de março de 2016, pela Banca Examinadora constituída por:

- Prof. Dr. Cícero Armínio Gomes Dias

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

- Prof. Dr. Diogo André Pilger

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

- Dr. Rodrigo Cayô da Silva

Universidade Federal de São Paulo

#### CIP - Catalogação na Publicação

Nodari, Carolina Silva  
Avaliação dos Mecanismos Adquiridos de Resistência  
a Antimicrobianos em Enterobactérias Produtoras de  
Carbapenemases por Sequenciamento de Nova Geração /  
Carolina Silva Nodari. -- 2016.  
125 f.

Orientador: Afonso Luís Barth.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do  
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa  
de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto  
Alegre, BR-RS, 2016.

1. Microbiologia Clínica. 2. Resistência  
Bacteriana. I. Barth, Afonso Luís, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), com o apoio financeiro do Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do HCPA (FIPE-HCPA) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A aluna recebeu bolsa de estudos da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).



Aos meus pais, por sempre acreditarem no meu potencial, e por me darem todas as oportunidades para desenvolvê-lo.



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido professor e orientador Afonso Luís Barth, por me abrir as portas para a pesquisa e o universo acadêmico. Foram quatro anos de aprendizado todos os dias, que me fizeram crescer profissional e, principalmente, pessoalmente. Agradeço por todo o apoio que me destes e que foram fundamentais para que eu pudesse escolher quais caminhos trilhar de agora em diante.

Aos colegas do LABRESIS, que me acompanham desde que eu era apenas uma aluna de Iniciação Científica. Agradeço especialmente à Daiana, que chegou na reta final do trabalho, mas cujas contribuições foram fundamentais para a análise dos dados obtidos; à Natália, companheira de risadas e extrações de plasmídeo sem fim; e à Lisi, pela companhia dentro e fora do laboratório.

Aos funcionários do CPE do HCPA, especialmente à Marina, pelo apoio na parte experimental do projeto; e ao Everaldo, sempre disposto a ajudar e a oferecer um café quentinho quando eu chegava correndo na secretária do CPE, com um monte de problemas para resolver.

Aos colegas do PPGCF, por lembrarem continuamente as diversas vertentes que as Ciências Farmacêuticas podem oferecer, e, especialmente ao Carlos, pela companhia para cumprir os créditos obrigatórios do Programa.

À CAPES e ao CNPq, pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro disponibilizados para que eu pudesse desenvolver ao máximo esse projeto.

Finalmente, à minha família, especialmente aos meus pais, pelo apoio desde que eu decidi cursar Farmácia e que se estendeu quando eu resolvi que “não iria trabalhar, ia continuar estudando” para seguir os meus sonhos; e ao Eric, por aguentar todos os meus “surtos”, quando eu sentava na frente do computador e não conseguia escrever uma linha durante um dia inteiro.

Sem vocês, eu não seria nada. Muito obrigada!



*Pesquisar é procurar, e só procura quem  
se acha insatisfeito, inquieto, curioso,  
quem se sente desafiado pelo mundo,  
quem não se conforma com as  
explicações que lhe são dadas.*

(Joanir Gomes de Azevedo)



## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os mecanismos adquiridos de resistência de isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemases utilizando a tecnologia de sequenciamento de nova geração. Foram incluídos no estudo quatro isolados – três *Escherichia coli* e uma *Serratia marcescens* – produtores de diferentes carbapenemases – OXA-370, KPC-2, NDM-1 e GES-5, respectivamente, obtidos a partir de um estudo de vigilância para detecção de carbapenemases. O DNA total dos isolados foi extraído utilizando kits comerciais e submetido à fragmentação enzimática para a obtenção de bibliotecas genômicas de aproximadamente 300 pares de bases. Após a preparação das bibliotecas, elas foram carregadas em chips 316 v2 para a plataforma Ion Torrent PGM e submetidas ao sequenciamento, utilizando um programa de 850 flows. Para cada genoma, foram obtidos aproximadamente um milhão de reads, os quais foram submetidos ao processo de montagem para a obtenção de genomas de aproximadamente 5Mb com uma cobertura de, em média, 175 vezes. As sequências obtidas foram submetidas à anotação utilizando o sistema RAST e a ferramenta *online* ResFinder. Sequências de inserção foram pesquisadas utilizando a ferramenta ISFinder. Além das carbapenemases, genes que codificam para outras  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>) foram encontrados em todos os genomas. AMEs (*aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *strA*, *strB*, *aac(6')Ib-cr*, *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ic*), bem como genes que codificam resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim também foram comuns aos isolados avaliados. Os seguintes ambientes genéticos foram observados: *bla*<sub>OXA-370</sub> é flanqueada pela IS5075-like, *bla*<sub>KPC-2</sub> está inserida no transposon Tn4401, e *bla*<sub>NDM-1</sub>, no transposon Tn3000. Cada isolado de *E. coli* pertenceu a um *sequence type* (ST) distinto: 1099F pertence à ST617, 1326F, à ST648, e 2610F, à ST707. Nossos resultados indicaram a diversidade de genes de resistência que podem ser encontrados em um isolado clínico, ressaltaram a variedade de contextos genéticos em que as carbapenemases podem estar inseridas e demonstraram que o sequenciamento de nova geração pode ser utilizado como uma ferramenta para a caracterização de isolados bacterianos multirresistentes, auxiliando, entre outros aspectos, na tipagem e na identificação de determinantes de resistência.

**Palavras-chave:** Carbapenemases, Resistoma, Sequenciamento de Segunda Geração.



## ABSTRACT

### **Analysis of Acquired Resistance Determinants in Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* by Next-Generation Sequencing**

The aim of this study was to characterize the resistome of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* using a next-generation sequencing platform. Four isolates were included in this study – three *Escherichia coli* and one *Serratia marcescens* – producing different carbapenemases – OXA-370, KPC-2, NDM-1 and GES-5, respectively, obtained from a surveillance study for carbapenemase detection. Total DNA was extracted using commercially available kits and submitted to enzymatic fragmentation to obtain libraries of around 300 base pairs of each isolate. After library preparation, they were loaded in 316 v2 chips for Ion Torrent PGM platform, and sequencing was performed using an 850 flows program. For each genome, approximately a million reads were obtained, and they were further assembled. The genome length for each isolate was of around 5Mb, with a mean coverage of 175x. The RAST system and the online tool ResFinder were used for annotation, as well as ISFinder. Besides the carbapenemases, genes encoding for other  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub>, *bla*<sub>OXA-2</sub>) were found in all genomes. AMEs (*aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *strA*, *strB*, *aac(6')Ib-cr*, *aac(6')-Ib* and *aac(6')-Ic*) were also detected in every isolate included in the study, as well as genes encoding for resistance determinants to sulfonamides and trimetoprim. The genetic environment of the carbapenemases was very similar to other isolates described in the literature – *bla*<sub>OXA-370</sub> is flanked by IS5075-like, *bla*<sub>KPC-2</sub> is inserted in transposon Tn4401, and *bla*<sub>NDM-1</sub> was found in transposon Tn3000. Each isolate belonged to a distinct ST – 1099F is part of ST617, 1326F belonged to ST648 and 2610F, to ST707. Our results demonstrated the diversity of resistance determinants that can be found in a clinical isolate, highlighted the variability of genetic environments in which carbapenemases can be present and demonstrated that next-generation sequencing is a valuable tool for the characterization of multidrug-resistant isolates, and can provide information regarding the molecular typing and the identification of resistance determinants.

**Keywords:** Carbapenemases, Resistome, Next-Generation Sequencing.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AAC	<i>Aminoglycosides N-acetyltransferases</i>
AME	Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos ( <i>Aminoglycosides Modifying Enzymes</i> )
ANT	<i>Aminoglycosides O-nucleotidyltransferases</i>
APH	<i>Aminoglycosides O-phosphotranferases</i>
BGN	Bacilo Gram-negativo
bp	Par de bases ( <i>base pair</i> )
CC	Complexo Clonal
CESP	Grupo dos microrganismos <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> , <i>Serratia marcescens</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratorial Standards Institute</i>
ESBL	$\beta$ -lactamase de espectro estendido ( <i>Extended-Spectrum <math>\beta</math>-Lactamase</i> )
GES	Guiana Extended-Spectrum Beta-Lactamase
IMP	Imipenemase
IS	Sequência de inserção ( <i>Insertion Sequence</i> )
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight</i>
MBL	Metallo- $\beta$ -Lactamase
MLST	<i>Multilocus Sequence Typing</i>
NDM	New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase
NGS	Sequenciamento de Nova Geração ( <i>Next-Generation Sequencing</i> )
PA $\beta$ N	<i>Phenyl-Arginine-Beta-Naphthylamide</i>
PBP	Proteína de Ligação das Penicilinas ( <i>Penicillin Binding Protein</i> )
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
QRDR	Região determinante de resistência às quinolonas ( <i>Quinolone-Resistance Determining Region</i> )
RND	<i>Resistance-Nodulation-Division</i>
rRNA	Ácido Ribonucleico Ribossomal
SPM	São Paulo Metallo- $\beta$ -Lactamase
ST	<i>Sequence Type</i>
VIM	<i>Verona Integron-Mediated Metallo-<math>\beta</math>-Lactamase</i>
WGS	Sequenciamento de Genoma Completo ( <i>Whole Genome Sequencing</i> )



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	19
2. OBJETIVOS .....	25
2.1. Objetivo Geral .....	27
2.2. Objetivos Específicos.....	27
3. REVISÃO DA LITERATURA .....	29
3.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i> .....	31
3.2. Resistência a antimicrobianos em Enterobactérias.....	32
3.2.1. Alteração de permeabilidade da membrana externa .....	32
3.2.2. Bombas de efluxo .....	34
3.2.3. Modificação dos sítios de ligação dos antimicrobianos .....	36
3.2.4. Produção de enzimas .....	38
3.3. Carbapenemases.....	43
3.3.1. Carbapenemases de classe A.....	44
3.3.2. Carbapenemases de classe B.....	46
3.3.3. Carbapenemases de classe D.....	47
3.4. Sequenciamento de nova geração .....	48
4. MANUSCRITOS .....	55
4.1. Manuscrito I – “Resistome Comparative Analysis of three Carbapenemase-Producing <i>Escherichia coli</i> isolated in Brazil” .....	59
4.2. Manuscrito II – “Draft Genome Sequence of a GES-5-producing <i>Serratia marcescens</i> Isolated in Southern Brazil” .....	89
5. DISCUSSÃO GERAL .....	97
6. CONCLUSÃO .....	101
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	105
8. ANEXOS.....	121
8.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa .....	123



## 1. INTRODUÇÃO



A família *Enterobacteriaceae* é composta por bacilos Gram negativos anaeróbios facultativos que não formam esporos, capazes de fermentar glicose e reduzir nitrato e são oxidase negativa (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009). Embora a maioria dos microrganismos dessa família possa ser encontrada como microbiota intestinal normal em seres humanos, eles causam uma variedade de patologias em diversos sítios de infecção, incluindo o próprio trato gastrointestinal.

O diagnóstico laboratorial de infecções por enterobactérias é baseado na cultura do material clínico, isolamento e identificação das espécies, a qual, tradicionalmente, é realizada por caracterização bioquímica convencional, e mais atualmente por espectroscopia de massas (avaliação das proteínas ribossomais pela técnica de ionização e dessorção a laser assistida por matriz – tempo de voo - do inglês, *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight* - MALDI-TOF) ou por técnicas de biologia molecular, como sequenciamento do gene 16S. Pode ainda ser realizada a classificação sorológica dos isolados, quando esta apresenta relevância clínica, ou para fins epidemiológicos (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009). Embora diversas classes de antimicrobianos (tetraciclina, aminoglicosídeos e quinolonas, por exemplo) apresentem efetividade clínica em infecções por enterobactérias, os  $\beta$ -lactâmicos (principalmente as cefalosporinas e os carbapenêmicos) encontram-se entre as principais opções terapêuticas para o tratamento destas infecções. A escolha da terapia mais adequada deve ser baseada na avaliação da susceptibilidade *in vitro* das enterobactérias aos antibióticos, através da técnica do antibiograma (Levinson e Jawetz, 2005).

Da mesma maneira que outros bacilos Gram-negativos (BGN), os membros da família *Enterobacteriaceae* podem adquirir resistência a diferentes classes de antimicrobianos por quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana; mutações na proteína-alvo do antimicrobiano; produção de enzimas capazes de degradar estes fármacos; e mecanismos de efluxo (Barth *et al.*, 2013). Não resta dúvida, no entanto, de que o mecanismo mais importante para o desenvolvimento de resistência em enterobactérias é a produção de enzimas, em especial as  $\beta$ -lactamases, considerando que os fármacos hidrolisados por estas (os  $\beta$ -lactâmicos) são o tratamento de escolha para infecções por microrganismos dessa família. Entre essas enzimas, destacam-se as carbapenemases, enzimas que

hidrolisam carbapenêmicos, as quais figuram entre as mais recentes, potentes e relevantes  $\beta$ -lactamases em enterobactérias.

A produção de carbapenemases em enterobactérias é um fator de grande importância para a saúde pública, uma vez que os genes codificadores para essas enzimas estão normalmente localizados em elementos genéticos móveis (Queenan e Bush, 2007). Além disso, o elevado poder hidrolítico de algumas carbapenemases faz com que os isolados produtores das mesmas sejam resistentes não somente aos carbapenêmicos, mas a todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos. As carbapenemases podem ser classificadas, de acordo com Ambler, em três grupos: A (serino-carbapenemases), B (metalo-enzimas) e D (oxacilinases) (Nordmann e Poirel, 2002). Tanto as carbapenemases de classe A, como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), quanto de classe D, como a OXA-48 e suas variantes, são denominadas serino- $\beta$ -lactamases, por apresentarem um resíduo de serina em seu sítio ativo; já as  $\beta$ -lactamases de classe B, como a New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM), são chamadas de metalo- $\beta$ -lactamases por apresentarem um ou dois íons zinco em seu sítio ativo (Nordmann e Poirel, 2002; Queenan e Bush, 2007).

O sequenciamento de nova geração (do inglês, *next-generation sequencing* – NGS) apresenta atualmente os menores custos para o sequenciamento de grandes fragmentos de ácidos nucleicos. Esta tecnologia propiciou a popularização do sequenciamento de genoma completo (do inglês, *whole genome sequencing* – WGS), visto que o sequenciamento de grandes cadeias de ácidos nucleicos tornou-se mais rápido e preciso. Esta premissa também pode ser aplicada na área da Microbiologia, tanto básica, quanto aplicada. Inúmeros artigos publicados recentemente apresentam aplicações desta tecnologia em diversas áreas do conhecimento (Larsen *et al.*, 2012; Bertelli e Greub, 2013; Zankari *et al.*, 2013). Esta metodologia tem sido de grande auxílio na caracterização de surtos (Lewis *et al.*, 2010; Mellmann *et al.*, 2011) e existem especulações de que, em um futuro próximo, esta tecnologia estará presente em laboratórios de rotina de grande porte como uma ferramenta para a identificação bacteriana (Didelot *et al.*, 2012; Dunne, Westblade e Ford, 2012; Calistri *et al.*, 2013). No que diz respeito à resistência bacteriana, é crescente o número de trabalhos publicados envolvendo a caracterização de microrganismos portadores de genes de resistência por meio do sequenciamento de nova geração, seja por sequenciamento

do genoma completo quanto pelo sequenciamento dos plasmídeos contendo os genes de resistência (Kumar *et al.*, 2011; Dolejska *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014).

A utilização do sequenciamento de nova geração na caracterização de microrganismos fenotipicamente resistentes a uma ou mais classes de antimicrobianos é uma ferramenta importante para a identificação e caracterização dos mecanismos de resistência apresentados por um isolado clínico.



## **2. OBJETIVOS**



### **2.1. Objetivo Geral**

Caracterizar os mecanismos adquiridos de resistência em enterobactérias produtoras de carbapenemases a partir da obtenção do genoma completo por sequenciamento de nova geração.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Identificar, através da análise do genoma completo, genes relacionados a mecanismos de resistência presentes nos isolados analisados, bem como possíveis correlações com o fenótipo apresentado;
- Caracterizar o ambiente genético das carbapenemases apresentadas pelos isolados estudados, comparando-os com sequências disponíveis na literatura.



### **3. REVISÃO DA LITERATURA**



### 3.1. Família *Enterobacteriaceae*

Os organismos da família *Enterobacteriaceae* são considerados por alguns autores como um desafio para a classificação taxonômica. A identificação molecular de espécies bacterianas é normalmente baseada no sequenciamento do gene rRNA 16S, mas, para algumas espécies, é necessária a avaliação de outros genes de manutenção (*housekeeping genes*), como *gyrB* ou *rpoB* (Abbott, 2011). Apesar das dificuldades de classificação, algumas características são comuns a todos os membros dessa família: as Enterobactérias são bacilos ou cocobacilos Gram-negativos, fermentadores facultativos da glicose, oxidase negativa, que, em sua maioria, podem ser encontrados como microbiota normal do trato gastrointestinal humano (Murray, Rosenthal e Pfaller, 2009).

A variedade de características bioquímicas das Enterobactérias é um importante parâmetro para a identificação laboratorial desses microrganismos. Entre essas características podemos citar a capacidade de utilização de diferentes fontes de carbono como substratos para a produção de energia (lactose, maltose, citrato, entre outros), a motilidade, a produção de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), e a capacidade de descarboxilação de aminoácidos. Essas características podem ser avaliadas tanto por técnicas manuais quanto por métodos automatizados, nos quais, normalmente, há uma variedade ainda maior de testes disponíveis para a correta identificação de gênero e espécie (Oplustil, Zocoli e Tobouti, 2010).

A popularização das técnicas de biologia molecular permitiu que essas metodologias pudessem ser incorporadas aos laboratórios de rotina. Em 2008, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicou um guia para padronização da utilização da sequência parcial do 16S para identificação bacteriana e sugerindo, quando necessário, os genes adicionais que devem ser avaliados (Clisi, 2008). A caracterização das proteínas ribossomais por espectroscopia de massas também tem se apresentado como uma alternativa comparável às técnicas de sequenciamento para a identificação de bactérias de interesse clínico (Holland *et al.*, 1996; Krishnamurthy e Ross, 1996; Jamal, Albert e Rotimi, 2014) e, atualmente, podem ser encontradas no Brasil duas plataformas especializadas nessa identificação.

Sabe-se que as Enterobactérias estão entre os principais causadores de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade, e podem ser isoladas em

diversos outros importantes sítios de infecção, como o líquido cefalorraquidiano, a corrente sanguínea e o trato respiratório inferior (Donnenberg, 2010). No entanto, não é possível encontrar dados na literatura que indiquem a real prevalência de infecções causadas por Enterobactérias. De acordo com os dados obtidos pelo SENTRY de 2008 a 2010, aproximadamente 40% das infecções de corrente sanguínea são causadas por microrganismos dessa família e a incidência de pneumonia pode chegar a 25%, nos países da América Latina (Gales *et al.*, 2012). Esses dados são ainda mais significativos do que os coletados nos Estados Unidos e no Canadá, onde a prevalência de bacteremias causadas por Gram-negativos foi de aproximadamente 33%, no primeiro semestre de 1997 (Pfaller *et al.*, 1998). Fica clara, portanto, a necessidade de se estudar cada vez mais esses microrganismos, buscando conhecer não somente os fatores determinantes para o estabelecimento de uma infecção, mas também aqueles que podem interferir no sucesso da terapia antimicrobiana.

### **3.2. Resistência a antimicrobianos em Enterobactérias**

Os membros da família *Enterobacteriaceae* apresentam perfis variáveis de susceptibilidade às diferentes classes de antimicrobianos. A resistência a esses fármacos pode ser intrínseca ou adquirida e é classificada em quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana; mecanismos de efluxo; alterações na proteína-alvo do antimicrobiano; e produção de enzimas capazes de degradar estes fármacos (Levinson e Jawetz, 2005).

#### **3.2.1. Alteração de permeabilidade da membrana externa**

A grande maioria dos alvos dos antimicrobianos encontra-se no interior das células bacterianas. Sendo assim, fica claro que, para que sejam efetivos, é necessário que os antibióticos atravessem as membranas celulares (Rice e Bonomo, 2011). A membrana externa presente nos bacilos Gram-negativos se torna, dessa maneira, a primeira defesa desses microrganismos contra agentes quimioterápicos (Nikaido, 2003). Antimicrobianos hidrofóbicos, como os aminoglicosídeos e os macrolídeos, são capazes de atravessar a membrana externa por difusão simples. Já as tetraciclina e as quinolonas são capazes de atravessar a membrana tanto por difusão simples quanto através de canais protéicos, as denominadas “porinas”. Por último, antibióticos hidrofílicos, como os  $\beta$ -lactâmicos, dependem exclusivamente das porinas para atingir o espaço periplasmático e a membrana citoplasmática (Delcour, 2009).

A principal função das porinas vai muito além do transporte de antimicrobianos. As denominadas “porinas clássicas”, presentes e estudadas pela primeira vez em *Escherichia coli* (Nikaido e Vaara, 1985), facilitam, de forma inespecífica, a entrada de nutrientes e outros pequenos solutos na célula bacteriana. As porinas da família OmpC têm preferência por moléculas catiônicas pequenas, enquanto que as da família OmpF aumentam a permeabilidade da membrana externa para moléculas um pouco maiores, mas de mesma carga. Já as porinas do tipo PhoE facilitam a entrada de moléculas aniônicas (Nikaido, 2003). Em *Klebsiella pneumoniae*, a OmpK35 apresenta papel semelhante à OmpF, enquanto a OmpK36 possui função homóloga à OmpC (Hernandez-Alles *et al.*, 1999).

Muitos estudos que descrevem o papel das porinas no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos avaliam sua influência na redução do influxo dos  $\beta$ -lactâmicos na célula bacteriana (Jaffe, Chabbert e Semonin, 1982; Sturenburg *et al.*, 2002; Doumith *et al.*, 2009). Esses fármacos não são capazes de atravessar a membrana externa sem o auxílio de proteínas transportadoras, o que faz com que alterações na expressão e/ou na estrutura dessas proteínas tenham grande influência na sua efetividade clínica. As variações mais comumente estudadas são aquelas na região de constrição do poro, o que faz com que seu diâmetro seja reduzido e, conseqüentemente, limite a entrada desses antimicrobianos (Vidal *et al.*, 2005). A redução da expressão das porinas também é um mecanismo adaptativo utilizado pelas bactérias para reduzir o influxo dos  $\beta$ -lactâmicos através da membrana. Isolados de *Escherichia coli* produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (do inglês *extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* - ESBL) desenvolveram resistência aos carbapenêmicos através da modulação da expressão de OmpC e OmpF, em decorrência de mutações do gene regulatório *ompR* (Tangden *et al.*, 2013). Em isolados obtidos no Chile, por exemplo, a alteração de porinas foi mais significativa para o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos do que a produção de enzimas (Wozniak *et al.*, 2012).

A resistência às quinolonas também pode ser mediada por modificações na permeabilidade de membrana. Em *E. coli*, a entrada destes antibióticos é possível através de OmpF, enquanto que, em *K. pneumoniae*, esse papel é representado pela OmpK35. Nesses casos, o desenvolvimento da resistência parece ser resultado da

sinergia entre as mutações na topoisomerase (proteína-alvo desses fármacos) e a redução na expressão de porinas (Chen *et al.*, 2003; Kishii e Takei, 2009).

### 3.2.2. Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são um mecanismo de transporte ativo cuja principal função é remover compostos tóxicos do interior da célula bacteriana (Li, Plesiat e Nikaido, 2015). As primeiras bombas de efluxo descritas em bacilos Gram-negativos foram as da família Tet, as quais são específicas para a extrusão de tetraciclinas (Levy, 1992).

A superfamília RND (do inglês, *Resistance-Nodulation-Division*) de transportadores está presente nos principais bacilos Gram-negativos de importância clínica. Essas proteínas estão localizadas na membrana citoplasmática, mas são capazes de se ancorar em porinas presentes na membrana externa, criando um canal de passagem que permite que diversas substâncias sejam transportadas diretamente do citoplasma para o espaço extracelular, sem que seja necessária a passagem pelo espaço periplasmático (Blair e Piddock, 2009). Em *E. coli*, o acoplamento de AcrB (pertencente à família RND) com a proteína de ligação AcrA e a porina TolC promove a saída ativa de diversas classes de antimicrobianos, como cefalosporinas, fluoroquinolonas e tetraciclinas (Nikaido e Takatsuka, 2009). A efetiva extrusão desses fármacos pode causar elevações expressivas na concentração inibitória mínima (CIM) quando essas proteínas estão superexpressas (Sulavik *et al.*, 2001). O contrário também é válido, considerando que reduções de até 256 vezes a CIM podem ser observadas quando os genes codificantes para essas bombas estão deletados (Nishino e Yamaguchi, 2001), fenômeno que pode acarretar na inibição do crescimento bacteriano (Nichols *et al.*, 2011).

Diversos mecanismos regulatórios influenciam a relação entre as bombas de efluxo e a resistência às diferentes classes de antimicrobianos. Existem evidências de que a resistência às quinolonas mediada por esse mecanismo está relacionada com mutações no gene repressor *marR*, o qual aumenta a expressão do ativador de transcrição MarA e, conseqüentemente, de *acrAB* (Oethinger *et al.*, 1998). MarA também parece interferir, porém de maneira negativa, na expressão de porinas, aumentando ainda mais os níveis de resistência (Swick *et al.*, 2011). Em relação aos  $\beta$ -lactâmicos, alterações no influxo desses fármacos parecem ser mais representativas no desenvolvimento de resistência do que as modificações no efluxo.

No entanto, manipulações gênicas nos reguladores da expressão das proteínas que compõem a bomba são capazes de conferir altos níveis de resistência a penicilinas, cefalosporinas e até aos carbapenêmicos (Seecoomar, Marmol e Kwon, 2013).

Em *K. pneumoniae*, AcrAB não só apresenta um papel semelhante ao desempenhado em *E. coli*, no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência a fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos, mas também parece influenciar na virulência desses microrganismos (Padilla *et al.*, 2010). Essa espécie também apresenta outras bombas capazes de mover antimicrobianos para o exterior da célula bacteriana. As proteínas OqxAB e KpgABC, por exemplo, estão envolvidas na diminuição de sensibilidade à tigeciclina (Kim *et al.*, 2009; Nielsen *et al.*, 2014).

O papel dos sistemas de efluxo em *S. marcescens* é mais relevante no desenvolvimento de resistência às quinolonas. Dentre eles, destaca-se a bomba SdeAB, pertencente à família RND e que apresenta atividade quando acoplada à proteína TolC-like HasF (Begic e Worobec, 2008). Esta proteína de membrana externa ainda pode estar acoplada com outra bomba, SdeXY, conferindo resistência também à tigeciclina (Hornsey *et al.*, 2010). As bombas das famílias MFS e SMR, SmfY e SsmE, respectivamente, também apresentam atividade contra quinolonas e estão presentes em isolados de *S. marcescens* (Shahcheraghi *et al.*, 2007; Minato *et al.*, 2008).

Embora a maioria das bombas de efluxo seja constitutiva e, portanto, cromossomal, importantes exemplos de bombas de efluxo que conferem resistência a antimicrobianos são codificados por genes encontrados em plasmídeos (Li, Plesiat e Nikaido, 2015). O mais importante deles parece ser aquele codificado pelos genes *tet*, os quais codificam bombas do tipo MFS (Levy, 1992). Ao contrário das bombas tipo RND, que são triméricas e capazes de transportar uma diversidade de substratos, esse grupo é composto por proteínas únicas e são específicas para determinados tipos de substratos: as proteínas Tet são capazes de transportar tetraciclinas (Mcmurry, Petrucci e Levy, 1980), enquanto a bomba QepA2 é capaz de transportar quinolonas (Cattoir, Poirel e Nordmann, 2008).

Considerando a importância das bombas de efluxo nas resistências intrínseca e adquirida<sup>1</sup>, parece natural que se busquem inibidores específicos para essas

---

<sup>1</sup> Resistência intrínseca pode ser definida como aquela universalmente encontrada no genoma de uma determinada espécie bacteriana, a qual é independente de pressão seletiva por antimicrobianos e que não tem capacidade de transmissão horizontal. Já a resistência adquirida é aquela decorrente de

proteínas. Além de reduzir o impacto da superexpressão das mesmas, a utilização de inibidores como adjuvantes da terapia antimicrobiana pode permitir que alguns fármacos que não eram utilizados no tratamento de determinados microrganismos passem a ter efetividade clínica (Li, Plesiat e Nikaido, 2015). A inibição das bombas também pode interferir na formação de biofilme (Baugh *et al.*, 2014), o qual também é um fator relevante a ser considerado em alguns tipos de infecção, pois o acesso do antimicrobiano à célula bacteriana é ainda mais limitado (Costerton *et al.*, 1987).

O inibidor mais estudado das bombas de efluxo bacterianas é o PA $\beta$ N (do inglês *Phenyl-Arginine-Beta-Naphthylamide*). Essa substância, descoberta em 2001 (Lomovskaya *et al.*, 2001), é capaz de inibir as principais bombas de efluxo em bacilos Gram-negativos (a saber, MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN em *P. aeruginosa*, e AcrAB-TolC em *E. coli*). A presença do inibidor em meio de cultura também é capaz de reduzir a frequência de surgimento de mutantes resistentes (Lomovskaya *et al.*, 2001). A utilização clínica dessa substância, no entanto, ainda não é possível. Em suas concentrações efetivas, a presença de dois grupos catiônicos em sua estrutura faz com que a molécula seja capaz de se acumular nos tecidos e, conseqüentemente, apresente elevado potencial nefrotóxico (Watkins *et al.*, 2003; Lomovskaya e Bostian, 2006). A busca por potenciais inibidores de bomba permanece, pois esse parece ser um caminho promissor na luta contra a resistência a antimicrobianos, uma vez que sua utilização pode afetar a susceptibilidade a diversos fármacos.

### **3.2.3. Modificação dos sítios de ligação dos antimicrobianos**

Quando pensamos na alteração de proteínas de ligação como forma de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, a primeira lembrança que muitos de nós temos diz respeito às mutações nas proteínas de ligação das penicilinas (do inglês *Penicillin Binding Protein* - PBP) em cocos Gram-positivos, que conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, principalmente no gênero *Staphylococcus* (Katayama, Ito e Hiramatsu, 2000). Embora já existam estudos sobre o papel das PBPs na resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em bacilos Gram-negativos (Cayo *et al.*, 2011; Vashist *et al.*, 2011; Moya *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015), as principais modificações de

---

mutações cromossômicas espontâneas que, posteriormente, podem ser transmitidas verticalmente, mas que são mais comumente transmitidas horizontalmente, através de elementos genéticos móveis (Cox e Wright, 2013).

proteína-alvo envolvidas na resistência a antimicrobianos em enterobactérias são aquelas que conferem resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos.

Quinolonas estão entre os fármacos mais prescritos para o tratamento de diversos tipos de infecções causadas por enterobactérias, especialmente aquelas do trato urinário (Kim e Hooper, 2014). Esses antimicrobianos são capazes de se ligar às enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV, e a formação do complexo enzima-fármaco acarreta na interrupção da replicação do DNA e, conseqüentemente, na inibição da divisão celular (Hiasa e Shea, 2000). Embora a resistência às quinolonas possa estar relacionada com a superexpressão de bombas de efluxo e até com mecanismos plasmidiais de inativação dos fármacos, as mutações na “região determinante de resistência às quinolonas” (do inglês *Quinolone-Resistance Determining Region* - QRDR) parecem ser o mecanismo mais eficiente de resistência às quinolonas (Shigemura *et al.*, 2012). É importante ressaltar que, para gerar níveis clínicos de resistência, geralmente são necessárias diversas mutações pontuais na região QRDR dos genes *gyrA* e *parC* (Robicsek, Jacoby e Hooper, 2006). A proteção conferida pelas proteínas Qnr à DNA girase também é capaz de impedir a ligação das quinolonas nessa enzima, impedindo, portanto, a ação desses fármacos (Hooper e Jacoby, 2015). Diversas variantes dos genes *qnr* já foram descritas, sendo que a maior parte delas é localizada em plasmídeos, especialmente os das famílias A/C, L/M e N (Jacoby, Strahilevitz e Hooper, 2014).

A efetividade clínica dos aminoglicosídeos, por sua vez, está diretamente relacionada com a sua capacidade de se ligar a subunidade 16S do ribossomo bacteriano. Sua ligação com o sítio A dessa organela é capaz de interromper a tradução proteica, a qual é fundamental para a sobrevivência da célula (Magnet e Blanchard, 2005). Mecanismos capazes de diminuir a afinidade dessa classe de antimicrobianos são uma das alternativas encontradas pelo microrganismo para sobreviver à presença desses fármacos. A metilação de resíduos específicos da subunidade menor do ribossomo impede a ligação de diversos aminoglicosídeos, e pode ser considerada uma maneira mais abrangente de aquisição de resistência do que aquela provocada por modificações enzimáticas nos fármacos (Doi e Arakawa, 2007).

As metilases codificadas pelo gene *armA* são as mais prevalentes entre aquelas responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos aminoglicosídeos,

seguidas por aquelas codificadas por *rmtB* (Lioy *et al.*, 2014). Outro fator notável é que essas enzimas são facilmente transferidas horizontalmente, uma vez que seus genes codificantes estão presentes em elementos genéticos móveis, como transposons (Wachino e Arakawa, 2012). Além de facilitar a disseminação desses determinantes de resistência, alguns transposons ainda carregam outros genes de resistência. À montante de *rmtB*, por exemplo, é possível encontrar o gene *bla*<sub>TEM-1</sub>, o qual codifica uma ESBL e, em alguns contextos, observa-se a presença de DNA codificante para a proteína de efluxo de quinolonas Qep2 (Perichon, Courvalin e Galimand, 2007).

### **3.2.4. Produção de enzimas**

Não há dúvida de que o mecanismo mais importante para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em enterobactérias é a produção de enzimas capazes de degradar os antibióticos. A efetividade das principais opções terapêuticas – aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e  $\beta$ -lactâmicos – para o tratamento de infecções por membros da família *Enterobacteriaceae* é comprometida pela aquisição desses determinantes de resistência. Além disso, a maioria dos genes codificantes de enzimas podem ser transferidos de forma horizontal, pois estão presentes em uma diversidade de elementos genéticos móveis (Paterson, 2006).

#### **3.2.4.1. Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs)**

Embora a produção de metilases seja, clinicamente, o mecanismo mais relevante de resistência aos aminoglicosídeos, uma vez que uma única proteína é capaz de conferir resistência a diversos fármacos dessa classe, a produção de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (do inglês *aminoglycosides modifying enzymes* - AMEs) apresenta expressiva relevância epidemiológica, uma vez que os genes codificantes para as AMEs podem ser encontrados em elementos genéticos móveis (Ramirez e Tolmasky, 2010). De acordo com o tipo de modificação que realizam no fármaco, as AMEs podem ser classificadas em três grupos: acetiltransferases (do inglês *aminoglycosides N-acetyltransferases* – AACs), fosfotransferases (do inglês *aminoglycosides O-phosphotransferases* – APHs) e nucleotidiltransferases (do inglês *aminoglycosides O-nucleotidyltransferases* – ANTs). O primeiro grupo se destaca porque um de seus membros também possui fluoroquinolonas como substrato, conferindo, portanto, resistência às mesmas (Strahilevitz *et al.*, 2009).

Entre as acetiltransferases, as mais frequentes e relevantes são as do tipo AAC(6'). Além de estarem presentes tanto em cromossomos quanto em elementos genéticos móveis, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, essas enzimas têm como substratos alguns dos aminoglicosídeos mais usados clinicamente: amicacina e gentamicina (Tolmasky, 2000). As acetiltransferases apresentam uma grande dificuldade de organização em subclasses, uma vez que, em alguns casos, o perfil de resistência é semelhante a um determinado grupo, mas a identidade dos aminoácidos pode colocá-la em outro (Ramirez e Tolmasky, 2010). Além disso, o aumento no número de estudos referentes a esse mecanismo de resistência fez com que, em determinado momento, duas enzimas diferentes recebessem a mesma nomenclatura (Vanhoof, Hannecart-Pokorni e Content, 1998). A atividade de acetiltransferase ainda pode ser encontrada em proteínas fusionadas, que acumulam funções de APH, ANT e até outras AACs (Ramirez e Tolmasky, 2010).

Uma subclasse que se destaca entre as acetiltransferases é a AAC(6')-Ib. Microrganismos produtores de enzimas do tipo AAC(6')-Ib-cr apresentam reduzida susceptibilidade não somente aos aminoglicosídeos, mas também às quinolonas (Robicsek, Jacoby e Hooper, 2006). Também chama a atenção a diversidade de elementos genéticos em que os genes codificantes para essas enzimas podem ser encontrados, bem como sua capacidade de associação com outros determinantes de resistência. Além de serem encontrados junto a outros genes causadores de resistência às quinolonas, como os da família *qnr*, as enzimas dessa subclasse são amplamente associadas com  $\beta$ -lactamases, especialmente as ESBLs do tipo CTX-M (Strahilevitz *et al.*, 2009). Por último, quando incorporados a transposons do tipo Tn1331, genes *aac(6')-Ib* são parcialmente fusionados com o gene *bla*<sub>TEM</sub> (Tolmasky, 2000).

Os genes codificantes para as fosfotransferases comumente apresentam mais de uma nomenclatura. O gene *aph(6)-Ia*, por exemplo, também pode ser referido como *aphD* ou *strA*; já o *aph(6)-Id* é também denominado *strB* ou *orfI*; o *aph(3')-IIa* pode ser encontrado na literatura como *aphA-2* (Ramirez e Tolmasky, 2010). Independentemente do nome que recebem, esses dois últimos são encontrados de forma contígua no transposon Tn5, o que permitiu a disseminação dessas APHs em Gram-positivos e Gram-negativos (Steiniger-White, Rayment e Reznikoff, 2004), e hoje é utilizado como marcador em alguns sistemas de clonagem (Wright e Thompson,

1999). Clinicamente, as fosfotransferases são mais relevantes em Gram-positivos, nos quais diversas subclasses têm importância epidemiológica no desenvolvimento de resistência aos aminoglicosídeos (Ramirez e Tolmasky, 2010). Em Gram-negativos, dois aspectos chamam a atenção: a presença concomitante de *strA* e *strB* em isolados clínicos, os quais conferem resistência a estreptomicina; e a disseminação de genes da subclasse APH(3') em uma variedade de plasmídeos e transposons (Vakulenko e Mobashery, 2003).

As nucleotidiltransferases mais relevantes em Gram-negativos são as das subclasses ANT(2'') e ANT(3''), sendo que as últimas também podem ser encontradas na literatura com o nome de *aadA*. O contexto genético destas é bastante diverso e, assim como as AACs, também podem ser encontrados em transposons carreadores de  $\beta$ -lactamases. De fato, o transposon Tn 1331 carrega tanto *aac(6')-Ib* quanto *aadA1*, além de *bla<sub>OXA-9</sub>* e *bla<sub>TEM-1</sub>* (Sarno *et al.*, 2002). Transposons do tipo Tn21 também carregam genes codificantes de ANTs, e acredita-se que o sucesso de sua disseminação esteja relacionado com a presença concomitante de *ant(3'')-Ia* e de um operon de resistência ao mercúrio (Liebert, Hall e Summers, 1999).

#### 3.2.4.2. $\beta$ -lactamases

As  $\beta$ -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico presente nos fármacos dessa classe. Assim como os fármacos, que são divididos em subclasses, de acordo com o substituinte ligado ao anel, as  $\beta$ -lactamases podem ser classificadas em diferentes grupos. Em 1980, Ambler propôs a divisão dessas enzimas em duas classes, de acordo com suas características estruturais – a classe A, que compreendia a maior parte das  $\beta$ -lactamases, as quais possuíam um resíduo de serina no sítio ativo; e a classe B, que é caracterizada pela necessidade de íons de zinco como cofator (Ambler, 1980). Posteriormente, as classes C e D foram adicionadas a essa classificação, visto que as enzimas do tipo AmpC e as oxacilinasas, embora também sejam consideradas serino- $\beta$ -lactamases, apresentavam motivos distintos das duas primeiras classes (Jaurin e Grundstrom, 1981; Ouellette, Bissonnette e Roy, 1987).

A classificação de Ambler pode ser considerada a forma mais simples de dividir as aproximadamente 1500  $\beta$ -lactamases descritas até o momento<sup>2</sup>, mas apresenta pouca correlação com o fenótipo apresentado pelos isolados clínicos. Sendo assim,

<sup>2</sup> Dados disponíveis em <http://www.lahey.org/studies/>. Acesso em 7 de janeiro de 2016.

Bush, Jacoby e Medeiros propuseram, em 1995, uma classificação que leva em consideração os substratos e os inibidores de cada tipo de enzima e ainda apresenta correlações com os grupos de Ambler (Bush, Jacoby e Medeiros, 1995). Essa classificação foi atualizada pelos autores em 2010, para incluir novas enzimas descritas no período, e é apresentada na tabela 1 (Bush e Jacoby, 2010). Resumidamente, o grupo 1 é composto por cefalosporinases pertencentes à classe C de Ambler, as quais são inibidas pela cloxacilina mas não sofrem ação dos inibidores comumente utilizados na prática clínica; o grupo 2 contém as  $\beta$ -lactamases de classe A e D, e apresenta o maior espectro de atividade, que vai desde as penicilinas até os carbapenêmicos, e variável inibição por ácido clavulânico ou tazobactam, de acordo com o subgrupo; o grupo 3 corresponde às metalo- $\beta$ -lactamases, que compõem a classe B de Ambler, são inibidas por agentes quelantes e têm ação contra carbapenêmicos.

A diversidade das  $\beta$ -lactamases vai além de suas características estruturais e funcionais. Essas enzimas podem ser encontradas em uma infinidade de contextos genéticos, os quais serão responsáveis pela expressão e disseminação desses mecanismos de resistência. Em microrganismos do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganella morganii*), por exemplo, as cefalosporinases do tipo AmpC são cromossomais e induzíveis na presença de antimicrobianos como amoxicilina e imipenem (Jacoby, 2009). Já o *Acinetobacter baumannii* apresenta oxacilinases cromossomais que, dependendo do promotor presente, são superexpressos e apresentam atividade contra carbapenêmicos (Turton *et al.*, 2006). *Stenotrophomonas maltophilia* é intrinsecamente resistente aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem, devido à produção das carbapenemases cromossomais L1 e L2 (Lin *et al.*, 2009).

**Tabela 1:** Esquema de classificação das  $\beta$ -lactamases bacterianas.

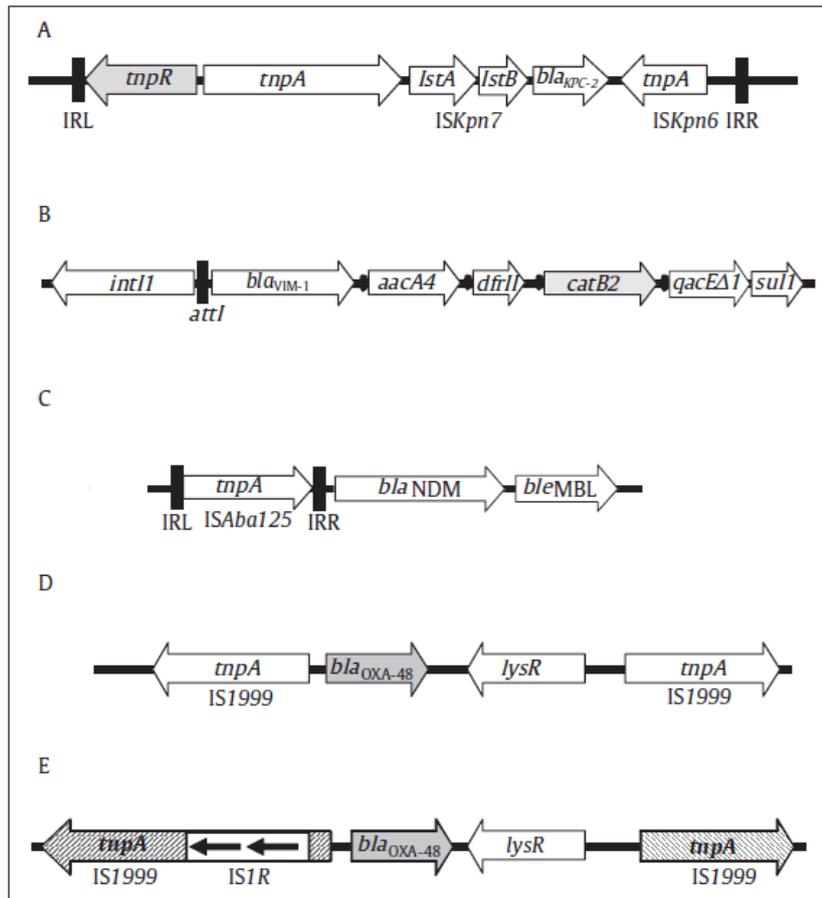
Grupo de Bush-Jacoby	Classe Molecular	Substrato característico	Inibidas por		Característica do grupo
			CA ou TZB	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise mais pronunciada de cefalosporinas do que de benzilpenicilinas; hidrolisam cefamicinas
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	Elevada hidrólise de ceftazidima e de outros oximino- $\beta$ -lactâmicos
2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrólise mais pronunciada de benzilpenicilinas do que de cefalosporinas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de 1 <sup>a</sup> e 2 <sup>a</sup> gerações	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas
2be	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactâmicos	Sim	Não	Elevada hidrólise de oximino- $\beta$ -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)
2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2ber	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactâmicos	Não	Não	Elevada hidrólise de oximino- $\beta$ -lactâmicos combinada com resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Elevada hidrólise de carbenicilina
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Elevada hidrólise de carbenicilina, cefepime e cefpiroma
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Elevada hidrólise de cloxacilina ou oxacilina
2de	D	Cefalosporinas de espectro ampliado	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e oximino- $\beta$ -lactâmicos
2df	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos
2e	A	Cefalosporinas de espectro ampliado	Sim	Não	Hidrolisam cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico, mas não por aztreonam
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Elevada hidrólise de carbapenêmicos, oximino- $\beta$ -lactâmicos e cefamicinas
3 <sup>a</sup>	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise de $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro, incluindo carbapenêmicos, mas não os monobactâmicos
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos

CA, ácido clavulânico; TZB, tazobactam. Adaptado de Bush e Jacoby (2010).

Embora a presença de mecanismos cromossômicos interfira na escolha do tratamento com  $\beta$ -lactâmicos, são os genes transferíveis por elementos genéticos móveis que apresentam maior relevância clínica e epidemiológica. A transferência horizontal desses mecanismos de resistência chama ainda mais atenção quando se considera o espectro de ação das  $\beta$ -lactamases codificadas por genes plasmidiais, uma vez que as mais disseminadas são aquelas que atuam sobre cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e sobre os carbapenêmicos. Em um artigo de revisão, Carattoli (2009) apresentou os principais plasmídeos relacionados com a disseminação de  $\beta$ -lactamases pelo mundo. A autora destacou que ESBLs do tipo CTX-M-15 são comumente encontrados em plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncF e podem estar associados com outros genes de resistência, como *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> e *aac(6')-Ib-cr*. Em outra publicação, Mathers, Peirano e Pitout (2015) destacam os *sequence types* (STs) com relevante disseminação global e que estão associados com mecanismos de resistência em enterobactérias – a ST131 de *E. coli* está fortemente associada com a produção de CTX-M-15, enquanto a ST258 de *K. pneumoniae* é uma das principais responsáveis pela produção de KPC-2.

### 3.3. Carbapenemases

As carbapenemases configuram-se como as  $\beta$ -lactamases de maior relevância clínica em enterobactérias, considerando que o elevado poder hidrolítico de algumas dessas enzimas faz com que os isolados produtores sejam resistentes não somente aos carbapenêmicos, mas a todas as classes de  $\beta$ -lactâmicos. Essas enzimas encontram-se nas classes A, B e D de Ambler, ou nos grupos 2df, 2f e 3 de Bush e Jacoby. Para a descrição das principais carbapenemases de relevância clínica, nessa revisão, será utilizada apenas a classificação de Ambler. As carbapenemases são epidemiologicamente importantes, uma vez que os genes codificadores para essas enzimas estão normalmente localizados em elementos genéticos móveis (Queenan e Bush, 2007). Os contextos genéticos nos quais as carbapenemases são encontradas são bastante diversos. Uma representação esquemática do ambiente genético em que as principais carbapenemases são encontradas é apresentada na Figura 1.



**Figura 1:** Representação esquemática de diversos ambientes genéticos associados com genes codificadores de carbapenemases em isolados da família *Enterobacteriaceae*. A) Estrutura de um transposon do tipo Tn4401, que codifica o gene *bla*<sub>KPC</sub>. B) Estrutura de um integron de classe I contendo o gene *bla*<sub>VIM-1</sub>. C) Estrutura do gene *bla*<sub>NDM</sub> associado a ISAba125. D) Estrutura do transposon Tn1999, contendo o gene *bla*<sub>OXA-48</sub>. E) Estrutura do transposon Tn1999.2, contendo o gene *bla*<sub>OXA-48</sub>. Extraído de Martinez-Martinez & Gonzalez-Lopez (2014).

### 3.3.1. Carbapenemases de classe A

As carbapenemases de classe A podem ser de origem cromossomal ou plasmidial. No primeiro grupo, temos como exemplo as enzimas IMI/NMC e SME, enquanto a KPC e a Guiana Extended-Spectrum (GES) são as principais carbapenemases plasmidiais dessa classe (Nordmann e Poirel, 2002). Recentemente, uma nova carbapenemase de classe A codificada em um plasmídeo foi descrita no Brasil, mas a extensão de sua prevalência ainda não é conhecida (Nicoletti *et al.*, 2015). Algumas enzimas dessa classe apresentam o maior espectro de ação entre as carbapenemases, incluindo todas as penicilinas e cefalosporinas, além dos monobactâmicos, e são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico (Martinez-Martinez e Gonzalez-Lopez, 2014). Outra característica relevante da classe é a sua

inibição pelo ácido fenilborônico, a qual tem sido amplamente utilizada para a detecção fenotípica dessas enzimas (Pasteran *et al.*, 2009).

A KPC é considerada a carbapenemase de classe A mais importante da família *Enterobacteriaceae*. O gene *bla<sub>KPC</sub>* é carregado por plasmídeos e tem se destacado em função da sua rápida disseminação mundial (Nordmann, Cuzon e Naas, 2009). O primeiro relato de um isolado produtor de KPC ocorreu nos Estados Unidos em 2001, (Yigit *et al.*, 2001), enquanto que, no Brasil, sua detecção se deu somente em 2009, em diversos estados (Monteiro *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2009), inclusive no Rio Grande do Sul (Zavascki *et al.*, 2009), e, atualmente, encontra-se amplamente disseminada no país. Essa amplitude não é apenas geográfica, mas também pode ser percebida em relação às espécies nas quais pode ser encontrada – KPC já foi descrita em virtualmente todas as espécies de enterobactérias de importância clínica (Ribeiro *et al.*, 2012), bem como em *P. aeruginosa* (Villegas *et al.*, 2007) e *A. baumannii* (Robledo *et al.*, 2010).

O gene *bla<sub>KPC</sub>* normalmente está associado a transposons do tipo Tn4401, o qual é caracterizado pela presença de duas sequências de inserção (*ISKpn6* e *ISKpn7*) em torno do gene da carbapenemase. Uma região variável de 200bp pode ser encontrada entre *ISKpn7* e o gene *bla<sub>KPC</sub>* (Naas *et al.*, 2008). Vale ressaltar que Ribeiro e colaboradores (2013) encontraram variações na estrutura clássica desse transposon ao avaliarem o contexto genético de *bla<sub>KPC</sub>* em enterobactérias produtoras dessa carbapenemases isoladas no Brasil. Esses transposons, por sua vez, podem ser encontrados em diversas famílias de plasmídeos e podem estar associados a outros genes determinantes de resistência. Uma correlação bastante descrita do gene *bla<sub>KPC</sub>* é com o gene *aac(6')-Ib-cr*, que confere resistência às quinolonas, bem como com outras  $\beta$ -lactamases, como TEM-1. Essa associação, em muitos casos, é produto da inserção do transposon Tn4401 em um outro transposon, o Tn1331, cuja estrutura contém *aac(6')-Ib-cr*, *bla<sub>OXA-9</sub>*, *aadA1* e *bla<sub>TEM-1</sub>* (Chen, Mathema, Chavda, *et al.*, 2014).

Enquanto a atividade carbapenemase da KPC foi responsável pela denominação dada à enzima, as primeiras  $\beta$ -lactamases da família GES foram assim identificadas por se tratarem de ESBLs (Poirel *et al.*, 2000). Modificações na sequência de aminoácidos, no entanto, fizeram com que suas variantes passassem a ter maior afinidade pelos carbapenêmicos, especialmente imipenem (Bae *et al.*, 2007). Em

enterobactérias, a variante com atividade de carbapenemase mais relevante é a GES-5, sendo que, no Brasil, ela já foi descrita tanto em amostras clínicas quanto de ambientes hospitalares (Picao *et al.*, 2010; Ribeiro, Falci, *et al.*, 2014; Ribeiro, Zavascki, *et al.*, 2014). Recentemente, os plasmídeos de dois isolados de *E. coli* e dois isolados de *Serratia marcescens* contendo o gene *bla*<sub>GES-5</sub> foram sequenciados no Canadá. A análise do sequenciamento destacou que o gene pode ser encontrado em integrons das classes 2 e 4 e que continham outros determinantes de resistência, tais como *aacA4* e *sul1*. Nas conclusões do estudo, os autores ainda destacam que foi possível, posteriormente, identificar outro isolado de *S. marcescens*, obtido da pia do hospital em que os primeiros isolados foram obtidos, carregando o mesmo plasmídeo das amostras clínicas, indicando, portanto, que essa poderia ser a origem dos genes de resistência (Boyd *et al.*, 2015).

### 3.3.2. Carbapenemases de classe B

As metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs) são as carbapenemases mais antigas descritas em bacilos Gram-negativos e, por muito tempo, foram clinicamente relevantes apenas entre os não-fermentadores. As enzimas do tipo imipenemase (IMP) e *Verona Integron-Mediated Metallo- $\beta$ -Lactamase* (VIM), as primeiras dessa classe a serem codificadas em plasmídeos, eram encontradas primariamente em isolados clínicos de *P. aeruginosa* (Queenan e Bush, 2007). No Brasil, ainda foi caracterizada uma terceira enzima, também prevalente em *P. aeruginosa*, denominada São Paulo Metallo- $\beta$ -Lactamase (SPM), cuja relevância epidemiológica ficou, até o momento, restrita ao nosso país (Gales *et al.*, 2003).

A importância das MBLs na família *Enterobacteriaceae* aumentou rápida e drasticamente após o isolamento da primeira *K. pneumoniae* produtora de NDM, em um paciente sueco que havia estado na Índia (Yong *et al.*, 2009). Nos cinco anos que sucederam a sua descrição, essa enzima se espalhou rapidamente pela Europa, Ásia e América do Norte, e é considerada, hoje, endêmica em seu país de origem (Johnson e Woodford, 2013). Os primeiros relatos de enterobactérias produtoras de NDM em isolados brasileiros ocorreram em 2013 em *P. rettgeri* e *E. cloacae* (Carvalho-Assef *et al.*, 2013; Rozales *et al.*, 2014). Da mesma forma que a KPC, a detecção do gene *bla*<sub>NDM</sub> não é restrita às enterobactérias, e ele pode ser encontrado em bacilos Gram-negativos não-fermentadores, como os do complexo

*Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* (Karthikeyan, Thirunarayan e Krishnan, 2010; Pfeifer *et al.*, 2011; Fu *et al.*, 2012; Pagano *et al.*, 2015).

A elevada capacidade de disseminação da NDM pode ser devido ao contexto genético no qual o gene *bla*<sub>NDM</sub> está inserido. Diferentemente das outras MBLs plasmidiais, que normalmente estão inseridas em integrons de classe I (Shibata *et al.*, 2003), esse gene se encontra associado à sequência de inserção *ISAba125*, à montante (*upstream*), e ao gene de resistência à bleomicina *ble*<sub>MBL</sub>, à jusante (*downstream*) (Dortet, Nordmann e Poirel, 2012). Essa estrutura ainda pode estar inserida em um transposon do tipo Tn21, o qual carrega outros determinantes de resistência, como AMEs e um operon de resistência ao mercúrio (Liebert, Hall e Summers, 1999).

### 3.3.3. Carbapenemases de classe D

As oxacilinas são o segundo maior grupo de  $\beta$ -lactamases descritas até o momento, e representam aproximadamente 1/3 do total de  $\beta$ -lactamases. Embora todas sejam pertencentes à classe D de Ambler, Bush e Jacoby (2010) propõem que elas sejam divididas em, ao menos, três grupos: o grupo 2d inclui aquelas capazes de hidrolisar apenas cloxacilina e oxacilina; o grupo 2de apresenta atividade também contra cefalosporinas de espectro ampliado; e o grupo 2df pode degradar inclusive os carbapenêmicos. Apesar de possuir afinidade pelos carbapenêmicos, as enzimas dessa classe são as que apresentam menor poder hidrolítico entre as carbapenemases (Evans e Amyes, 2014).

As carbapenemases de classe D tem sua importância mais significativa no gênero *Acinetobacter*, sendo que o gene *bla*<sub>OXA-51</sub> é constitutivo e pode ser utilizado para a identificação e tipagem molecular dos principais clones internacionais da espécie *A. baumannii* (Pournaras *et al.*, 2014). Entre as carbapenemases codificadas em plasmídeos, destacam-se ainda a OXA-23 e a OXA-58, que, quando associadas à sequência de inserção *ISAba1*, têm sua expressão muito aumentada, gerando elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos (Turton *et al.*, 2006).

Na família *Enterobacteriaceae*, a OXA-48 parece ser a enzima epidemiologicamente mais relevante, especialmente na Europa, sendo considerada endêmica em alguns países mediterrâneos (Nordmann e Poirel, 2014). O gene *bla*<sub>OXA-48</sub> está localizado em um transposon do tipo Tn1999, o qual é caracterizado pela presença de duas cópias da IS1999 flanqueando o gene da  $\beta$ -lactamase. A

presença dessas ISs é fundamental para a expressão e mobilização desse gene, uma vez que elas atuam tanto como sequências promotoras da  $\beta$ -lactamase, como facilitam sua transposição (Aubert *et al.*, 2006). A variante desse transposon, denominada Tn1999.2, apresenta a IS1R inserida na cópia de IS1999 localizada à montante de *bla*<sub>OXA-48</sub>, que atua como um segundo promotor, aumentando ainda mais a expressão da enzima (Carrer *et al.*, 2008).

Diversas variantes de OXA-48 já foram descritas, tais como OXA-163, OXA-181, OXA-232, OXA-244 (Martinez-Martinez e Gonzalez-Lopez, 2014), sendo que, dessas, apenas a OXA-163 não possui atividade de carbapenemase (Poirel *et al.*, 2011). No Brasil, já existem relatos de isolados produtores de uma variante dessa enzima, denominada OXA-370, cuja sequência de aminoácidos apresenta 99% de identidade com a OXA-48. A análise do ambiente genético de *bla*<sub>OXA-370</sub> revelou que esse gene é flanqueado por uma sequência de inserção IS5075-like, à montante, e por IS4-like, à jusante (Sampaio *et al.*, 2014), fazendo com que sua mobilização seja, portanto, bastante distinta. Um estudo de Pereira e colaboradores (2015) detectou a presença de *bla*<sub>OXA-370</sub> em 24 isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*, especialmente *K. pneumoniae*. Esses achados revelam a rápida disseminação dessa enzima, uma vez que, menos de um ano após sua primeira detecção, ela já podia ser encontrada em uma região geográfica e uma espécie distinta daquela na qual foi identificada.

### 3.4. Sequenciamento de nova geração

Há algum tempo, a biologia molecular é considerada uma importante ferramenta auxiliar nos estudos de microbiologia clínica. Ela pode ser utilizada a) para a identificação de espécies, através do sequenciamento parcial de genes, como 16S ribossomal ou *rpoB*; b) para detecção de importantes genes de resistência, como as mutações que conferem resistência aos antimicrobianos em *Mycobacterium tuberculosis*; c) para caracterização de surtos, por técnicas de tipagem. O papel da biologia molecular no diagnóstico clínico tende a crescer cada vez mais com o advento de tecnologias novas e de baixo custo para o sequenciamento de cadeias de ácidos nucleicos, uma vez que, teoricamente, todas as informações clinicamente relevantes sobre um determinado isolado podem ser obtidas a partir de uma única metodologia (Didelot *et al.*, 2012).

O sequenciamento de nova geração, também conhecido como sequenciamento de segunda geração, apresenta atualmente os menores custos para o sequenciamento de grandes fragmentos de ácidos nucleicos. Com as plataformas disponíveis atualmente, é possível sequenciar o genoma completo de uma amostra bacteriana por aproximadamente 500 dólares em menos de 24 horas após o isolamento do microrganismo (Didelot *et al.*, 2012). Essa tecnologia é baseada em quatro grandes passos: 1) a obtenção de uma biblioteca, composta por pequenos fragmentos de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou ácido ribonucleico (RNA) da amostra a ser sequenciada; 2) a amplificação desses fragmentos por reação em cadeia da polimerase (PCR) em emulsão, utilizando-se um único par de iniciadores; 3) o sequenciamento simultâneo destes produtos de amplificação; 4) os fragmentos são alinhados a uma sequência conhecida (alinhamento por referência) ou não (alinhamento *de novo*), para a determinação da sequência completa (Bentley *et al.*, 2008).

As plataformas disponíveis para a realização do sequenciamento de segunda geração são diferenciadas de acordo com o tamanho do fragmento sequenciado e com a tecnologia utilizada para a detecção da incorporação de novos nucleotídeos. A primeira plataforma de NGS disponível, denominada 454, era comercializada pela Roche. Esse sistema utiliza o pirosequenciamento para a detecção da incorporação de nucleotídeos à fita de DNA, o qual é baseado em reações de fluorescência associadas a liberação de uma molécula de pirofosfato no momento da adição de um nucleotídeo a uma cadeia. A intensidade do sinal luminoso detectada é proporcional ao número de nucleotídeos incorporados (Ronaghi, Uhlen e Nyren, 1998). Atualmente, a plataforma 454 é capaz de gerar, em uma corrida, até 1Mb de dados, obtidos a partir de fragmentos que podem se estender a até 1000 pares de bases (bp, do inglês *base pair*) (Mayo *et al.*, 2014).

Outra plataforma, muito utilizada para NGS em microbiologia clínica, é o sistema Illumina MiSeq. Esse sistema é capaz de gerar uma quantidade total maior de dados – até 15Gb em uma corrida –, obtidos a partir de fragmentos de até 300bp. Essa plataforma utiliza a tecnologia de sequenciamento por síntese, em que quatro tipos de nucleotídeos terminadores podem ser incorporados ao fragmento de DNA. Após a incorporação, eles são removidos para que possam ser detectados em uma reação química fluorimétrica (Bentley *et al.*, 2008). O sistema PacBio SMRT também utiliza a

tecnologia de síntese, mas se baseia no sequenciamento em tempo real utilizando uma única molécula de polimerase. A engenharia empregada na construção dos poços onde ocorre a extensão da cadeia nucleotídica faz com que apenas a fluorescência detectada no fundo do mesmo seja analisada, permitindo que leituras de até 7kb sejam obtidas. A grande desvantagem desse sistema está na quantidade total de dados gerados em uma corrida – os valores chegam a, no máximo, 50kb (Eid *et al.*, 2009).

Finalmente, o sistema Ion Personal Genome Machine (PGM)<sup>TM</sup> é capaz de sequenciar, em uma única corrida, até 1 bilhão de bases, divididas em fragmentos de até 400bp, utilizando a tecnologia de semicondutor (Liu *et al.*, 2012). Esta técnica baseia-se na detecção da alteração de pH do sistema em função da liberação de um H<sup>+</sup> devido à incorporação de um nucleotídeo a uma cadeia. A variação de pH é linearmente proporcional à quantidade de nucleotídeos incorporados (Merriman e Rothberg, 2012). Com essa tecnologia simples, não é necessária a utilização de nucleotídeos marcados, reduzindo ainda mais os custos necessários para o sequenciamento.

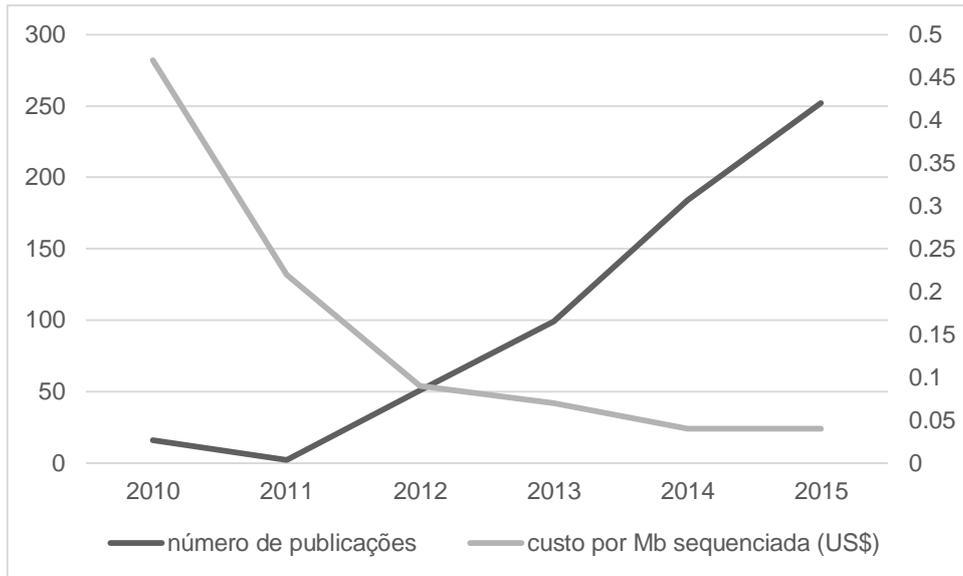
A tecnologia de semicondutor entrou no mercado em 2011, acoplada a um chip capaz de detectar essas mudanças de pH, fazendo com que a síntese e a detecção da incorporação de novas nucleotídeos fosse feita de maneira simultânea, em mais de um milhão de poços (Rothberg *et al.*, 2011). As plataformas de sequenciamento Ion Torrent são capazes de sequenciar tanto DNA quanto RNA, e em uma mesma corrida, podem ser incluídas diversas amostras, que são diferenciadas ao término da corrida através da identificação dos “códigos de barras” (*barcodes*) – pequenas sequências únicas de nucleotídeos que são adicionadas na extremidade 3’ dos *primers* utilizados para amplificação e iniciação das reações de sequenciamento (Whiteley *et al.*, 2012). Vale ressaltar que este foi o sistema utilizado em um dos primeiros estudos empregando a tecnologia de NGS para a caracterização de cepas clínicas, mais precisamente, para a identificação de um surto de uma nova variante de *E. coli* O104:H4 produtora de Shiga-toxina na Alemanha (Rohde *et al.*, 2011).

A partir desse primeiro estudo, o número de publicações aplicando NGS nas diversas áreas da microbiologia cresceu exponencialmente. A partir da geração de uma grande quantidade de sequências relacionadas a um único isolado, tem-se sugerido modificar a forma como as espécies bacterianas são classificadas

taxonomicamente, uma vez que mais de um gene de manutenção tem sua sequência determinada (Allard *et al.*, 2015; Westcott e Schloss, 2015). Em um dos primeiros estudos abordando a utilização de NGS para identificação bacteriana, Konstatinidis *et al.* (2005) sugere que o compartilhamento de, no mínimo, 95% do genoma completo de dois isolados os caracterizaria como pertencentes à mesma espécie. Além disso, dentro de uma mesma espécie, avançou-se muito na análise filogenética e sua relação com a patogenicidade de algumas cepas (Cheng *et al.*, 2015). A caracterização de comunidades microbianas ambientais pode ser feita em um período de tempo muito mais curto, uma vez que diversas espécies podem ser identificadas simultaneamente, através de estudos de metagenômica, sem a necessidade de isolamento prévio (Uyaguari-Diaz *et al.*, 2015; Wood *et al.*, 2015). A caracterização do microbioma humano, seja em condições de saúde ou de doença, também tem sido avaliada com essa mesma tecnologia (Hiergeist *et al.*, 2015; Kistler *et al.*, 2015), sendo que o principal desafio nesse aspecto é isolar e concentrar o DNA bacteriano que se encontra misturado ao DNA humano (Hasan *et al.*, 2016).

Na área de Microbiologia Clínica, os avanços na utilização de dados obtidos a partir de NGS também chamam a atenção. Entre 2010 e 2015, houve um crescimento acelerado no número de publicações contendo as palavras-chave “next-generation sequencing” ou “whole-genome sequencing” e “clinical microbiology” na base de dados PubMed, como pode ser observado na Figura 2. Neste gráfico, também são apresentados o valor estimado para sequenciar um milhão de pares de bases utilizando as plataformas de sequenciamento de nova geração.

Os relatos do uso dessa tecnologia para a caracterização de surtos crescem a cada dia (Gilchrist *et al.*, 2015; Stoesser *et al.*, 2015; Tong *et al.*, 2015; Deng, Den Bakker e Hendriksen, 2016). Além disso, tornou-se possível avaliar de forma mais rápida a evolução de linhagens bacterianas com elevada patogenicidade (Lo *et al.*, 2015), bem como caracterizar a dinâmica da transferência de cepas multirresistentes do meio hospitalar para a comunidade (Stoesser *et al.*, 2014). A parceria entre a microbiologia clínica e as plataformas de NGS se tornou tão promissora que, atualmente, já existem ferramentas de bioinformática especializadas em caracterizar cepas que tenham seu genoma sequenciado utilizando plataformas de NGS (Rowe *et al.*, 2015).



**Figura 2:** Gráfico representando o número de publicações envolvendo a área de microbiologia clínica e a tecnologia de sequenciamento de nova geração e o custo aproximado para sequenciar 1 milhão de pares de bases, em dólares. A busca foi realizada na base de dados PubMed, utilizando as palavras-chave “next-generation sequencing” ou “whole-genome sequencing” e “clinical microbiology”, no período entre 2010 e 2015. Os valores de sequenciamento foram obtidos na página do *National Human Genome Research Institut*. Todos os resultados encontrados foram incluídos no gráfico.

O Centro de Epidemiologia Genômica (em inglês, *Center for Genomic Epidemiology*), com sede na Dinamarca, disponibiliza atualmente ferramentas *online* que utilizam dados brutos de sequenciamento para a identificação de espécies bacterianas (Larsen *et al.*, 2014), caracterização do potencial patogênico de determinadas espécies (Cosentino *et al.*, 2013), identificação de genes de virulência (Joensen *et al.*, 2014) e sorotipagem de cepas de *E. coli* e *Salmonella* (Joensen *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), detecção de genes de resistência (Zankari *et al.*, 2012), tipagem molecular por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (Larsen *et al.*, 2012), identificação e tipagem de plasmídeos (Carattoli *et al.*, 2014), construção de árvores filogenéticas (Kaas *et al.*, 2014); entre outras.

A área da resistência bacteriana parece ser a que mais utiliza o potencial que o sequenciamento de segunda geração tem a oferecer. A Biologia Molecular deixou de ser uma ferramenta apenas confirmatória – que ficava restrita às reações de PCR para a confirmação da presença de determinados genes de resistência – para se tornar uma ferramenta exploratória, que permite caracterizar, com melhor relação custo-benefício, todos os potenciais determinantes de resistência antimicrobiana, bem como seus contextos genéticos. A redução no tempo necessário para a identificação desses determinantes permite que medidas de controle de infecção sejam tomadas

de forma mais rápida, quase em tempo real, podendo ser usada inclusive como uma ferramenta de vigilância epidemiológica de cepas multirresistentes (Koser, Ellington e Peacock, 2014; Punina *et al.*, 2015).

Uma breve pesquisa no PubMed demonstra a extensão da contribuição do NGS para a pesquisa em resistência bacteriana. Ao buscarmos as palavras-chave “antimicrobial resistance” e “next-generation sequencing”, encontramos mais de 200 publicações<sup>3</sup>, que datam do mesmo ano em que essa tecnologia começou a ser utilizada no genoma humano (Bentley *et al.*, 2008). Plasmídeos de inúmeras cepas multirresistentes foram sequenciados em sua totalidade utilizando essas plataformas, permitindo um estudo aprofundado do contexto genético dos determinantes de resistência, que facilitou a observação das relações entre genes que codificam resistência para diversas classes de antimicrobianos. Um exemplo é o trabalho publicado por Poirel e colaboradores, o qual sequenciou o genoma completo de um isolado de *E. coli* produtor de NDM-1 (Poirel, Bonnin e Nordmann, 2011). A análise do sequenciamento revelou que o isolado apresentava quatro plasmídeos, de diferentes tamanhos, carreando diversos genes de resistência. O plasmídeo intitulado p271B, por exemplo, apresentava, em sua sequência de 110kb, os genes *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *armA*, *aadA1*, *mph2*, *dfrA12*, *sul1*, *arr2*, *mel*, *cmlA5* e *qacED1*. Já Jiang e colaboradores sequenciaram o plasmídeo de uma *K. pneumoniae* contendo os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *fosA3*, conferindo resistência a duas das classes de antimicrobianos mais potentes para o tratamento de infecções por enterobactérias (Jiang *et al.*, 2015).

No Brasil, também já existem estudos utilizando o NGS para a pesquisa de genes de resistência, sendo, em grande parte, associados com o surgimento dos primeiros relatos de isolados produtores de NDM-1 em nosso país. São exemplos o estudo de Pereira e colaboradores (2015), que apresenta o *draft genome* de três isolados de espécies distintas carreando o gene *bla*<sub>NDM-1</sub>; o estudo de Carvalho-Assef (2014), que descreve os genes de resistência encontrados em um isolado de *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* obtido de um swab de vigilância, através do sequenciamento do genoma completo do isolado; e a publicação de Campos e colaboradores (2015), que explora o contexto genético de *bla*<sub>NDM-1</sub> em dois plasmídeos, um obtido de uma *K. pneumoniae* e outro obtido de uma *E. coli*, e estabelece relações entre a disseminação dos mesmos e a presença de um

---

<sup>3</sup> Acesso em 26 de janeiro de 2016.

transposon Tn3000, o qual também foi encontrado em cepas presentes no Marrocos, no Nepal e na Índia. No entanto, ainda faltam estudos deste tipo que avaliem outras carbapenemases importantes em nosso país, tais como KPC-2, que já é considerada endêmica em algumas regiões; a OXA-370, uma variante de OXA-48 que foi descrita, até o momento, apenas no Brasil e que parece estar emergindo como um relevante determinante de resistência aos carbapenêmicos (Pereira, Borghi, *et al.*, 2015); e a GES-5, cuja relevância epidemiológica ainda não foi bem estabelecida, considerando que ainda são escassos os relatos dessa enzima em isolados clínicos de enterobactérias.

Aprofundar os conhecimentos sobre os aspectos moleculares envolvidos no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em isolados brasileiros tem grande relevância para medidas eficazes de saúde pública no país, e foi tema deste trabalho, no qual os determinantes adquiridos de resistência a antimicrobianos de quatro isolados de enterobactérias produtoras de carbapenemases foram avaliados através do sequenciamento de seus genomas.





A metodologia e os resultados dessa dissertação serão apresentados na forma de dois manuscritos. O primeiro, intitulado “**Resistome Comparative Analysis of three Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* isolated in Brazil**”, foi submetido ao periódico *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. O segundo, intitulado “**Draft Genome Sequence of a GES-5-Producing *Serratia marcescens* Isolated in Southern Brazil**”, foi submetido na forma de “genome announcement” ao *Brazilian Journal of Microbiology*

.



**4.1. Manuscrito I – “Resistome Comparative Analysis of three Carbapenemase-Producing *Escherichia coli* isolated in Brazil”**



1 **Resistome Comparative Analysis of three Carbapenemase-Producing**  
2 ***Escherichia coli* isolated in Brazil**

3

4 **Running title:** Resistome of carbapenemase-producing *Escherichia coli*

5

6 Carolina Silva Nodari <sup>1,2</sup>, Daiana de Lima Morales <sup>2</sup>, Afonso Luís Barth <sup>1,2#</sup>

7

8 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio  
9 Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana  
10 (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.

11 # Corresponding author: albarth@hcpa.edu.br

12

13

14 **ABSTRACT**

15 Carbapenemase production is the most relevant resistance mechanism to  $\beta$ -lactams,  
16 in particular to carbapenems, among *Enterobacteriaceae*. The next-generation  
17 sequencing is a recently developed tool that can help understanding the genetic  
18 features regarding antibiotic resistance. The aim of this study was to characterise the  
19 resistance features of three carbapenemase-producing *Escherichia coli* by whole  
20 genome sequencing. Each isolate presented one carbapenemase gene: *bla*<sub>OXA-370</sub>,  
21 *bla*<sub>KPC-2</sub> and *bla*<sub>NDM-1</sub>, as previously evaluated by RT-PCR and confirmed by  
22 sequencing. Libraries were obtained from genomic DNA submitted to enzymatic  
23 fragmentation and were sequenced using the Ion Torrent PGM™ platform. The genetic  
24 environment of the carbapenemase genes was only partially elucidated and presented  
25 similar features with plasmids deposited in GenBank. All three isolates also presented  
26 *bla*<sub>TEM-1-type</sub>, genes for aminoglycoside-modifying enzymes, a gene codifying for  
27 tetracycline efflux pump and mutated genes from the folate synthesis pathway,  
28 preventing sulphonamide and trimethoprim action. Our findings highlighted that  
29 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* presented not only the genetic  
30 capability to resist to  $\beta$ -lactams, but also to many other antibiotic classes.

31 **Keywords:** Carbapenemases, genetic context, whole-genome sequencing.

## 32 INTRODUCTION

33 Carbapenem resistance among *Enterobacteriaceae* is nowadays of major  
34 concern. These bacteria may become resistant to this antibiotic class through three  
35 mechanisms (isolated or combined): overexpression of efflux pumps that extrude  
36 antibiotics through the outer membrane; permeability loss or decrease due to  
37 alterations in porins; and carbapenemase production (1). This last mechanism  
38 represents a growing worry, considering that these enzymes hydrolyses not only  
39 carbapenems, but all the  $\beta$ -lactams and their high capacity of dissemination, which is  
40 usually plasmid-mediated (2).

41 According to Ambler, carbapenemases can be classified in class A, B or D  
42  $\beta$ -lactamases (3), based on their molecular structure. The *Klebsiella pneumoniae*  
43 Carbapenemase (KPC) is a worldwide most disseminated Class A carbapenemase  
44 and it has been described in virtually all *Enterobacteriaceae* species (4). It is usually  
45 encoded in a *Tn4401*-type transposon and the plasmids carrying this enzyme often  
46 harbour other resistance genes, specially genes that codify for fluoroquinolone  
47 resistance (5). KPC is already considered endemic in some countries, including Brazil  
48 (2). The New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) is a recent but very important Class B  
49 Carbapenemase. Since the first description of NDM in 2008 (6), it has rapidly spread  
50 around the globe and since 2013 it can be also found in Brazil (7). The most relevant  
51 genetic feature related to *bla*<sub>NDM</sub> is the presence of the insertion sequence IS<sub>Aba125</sub>  
52 upstream this gene. Because IS<sub>Aba125</sub> was originally described in *Acinetobacter*  
53 *baumannii* from the environment, it was suggested that this carbapenemase was  
54 originated from non-fermenter rods (8). OXA-48 and its variants are the Class D  
55 carbapenemases present among *Enterobacteriaceae*. Their hydrolysis spectrum  
56 usually comprises the carbapenems but not the expanded-spectrum cephalosporins,

57 with exception of the OXA-163 (9). OXA-48 has become endemic in the Mediterranean  
58 area over the last years but it is only sporadically reported around the rest of the world  
59 (10). In Brazil, only the OXA-370 variant has been described (11).

60 The Next-Generation Sequencing represents a valuable tool for the  
61 understanding of the genetic features regarding bacterial metabolism, virulence and  
62 antibiotic resistance, and it also provides data that can be used for molecular typing  
63 (12-15). Over the last years, many studies have reported the use of the new  
64 sequencing platforms (next generation sequencing – NGS) for resistome and plasmid  
65 description. Among *Enterobacteriaceae*, most NGS studies were performed in  
66 *Klebsiella pneumoniae*, the specie in which novel  $\beta$ -lactamases are usually firstly  
67 described (16-18).

68 The aim of this study was to characterise the resistance features of three  
69 carbapenemase-producing *Escherichia coli* by whole genome sequencing.

70

## 71 MATERIAL AND METHODS

72 **Bacterial strains.** Three *E. coli* with reduced susceptibility to carbapenems from a  
73 surveillance study (19) were identified by VITEK2 system (BioMérieux, France) and  
74 species confirmation was performed by 16S RNA amplification and sequencing. They  
75 were recovered from surveillance swabs from three different patients at two tertiary  
76 hospitals in Porto Alegre, southern Brazil, from October 2013 to April 2014. All three  
77 isolates were submitted to a real time multiplex PCR for the detection of the following  
78 carbapenemase genes: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48-type</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> (20).

79 **Susceptibility testing.** Minimal Inhibitory Concentration (MIC) to imipenem,  
80 meropenem, ertapenem, doripenem, piperacilin-tazobactam, ceftazidime, cefepime,  
81 ciprofloxacin, aztreonam, gentamicin, amikacin, polymyxin B, colistin and tigecyclin

82 were determined by Etest (BioMérieux, France). The results were interpreted  
83 according to EUCAST (21). Results for polymyxin B were evaluated using the same  
84 breakpoints as for colistin.

85 **DNA extraction and fragmentation.** Total genomic DNA was extracted using RBC  
86 Genomic DNA extraction kit (Real Biotech, Taiwan), according to manufacturer  
87 instructions. DNA concentration was verified with Qubit Fluorometer® (Invitrogen,  
88 Cergy Pontoise, France) and a DNA input of 100ng was submitted to enzymatic  
89 fragmentation using the Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit (Life Technologies,  
90 Foster City, CA, USA). Fragments of ~300bp were selected with PippinPrep (Sage  
91 Science, Beverly, MA) for further amplification and sequencing.

92 **DNA amplification and sequencing.** Emulsion PCR was performed with the Ion  
93 PGM™ Template OT2 400 Kit in an Ion OneTouch™ 2 System (Life Technologies,  
94 Foster City, CA, USA). Ion Sphere™ Particles (ISP) were collected with OneTouch™  
95 ES system, loaded in an Ion 316™ Chip v2 and sequenced with the Ion Personal  
96 Genome Machine® (PGM™) System (Life Technologies, Foster City, CA, USA), with  
97 850 flows.

98 **Genome assembling and annotation.** After sequencing, reads were assembled in  
99 contigs using SPAdes software (22), with the *E. coli* K12 substrain DH10B genome  
100 sequence as reference. Contigs were annotated using RAST (23, 24) and ResFinder  
101 (25) databases. The IS Finder tool was also used to identify insertion sequences (26).  
102 The carbapenemases genetic environment was curated manually, using NCBI  
103 databank. Isolates Multilocus Sequence Types (MLST) were also determined (14).

104

105 **RESULTS**

106 **Susceptibility profile.** The three isolates presented distinct MICs for the antibiotics  
107 evaluated in this study (Table 1).

108 **Genome sequencing and annotation.** Around one million reads were obtained from  
109 each genome sequenced in this study. These reads were assembled into 222, 263 and  
110 133 contigs, for *E. coli* 1099F (*bla*<sub>OXA-370</sub> positive), 1326F (*bla*<sub>KPC-2</sub> positive) and 2610F  
111 (*bla*<sub>NDM-1</sub> positive) respectively, resulting in 4,723,513bp for strain 1099F, 5,390,500bp  
112 for strain 1326F and 4,982,289bp for strain 2610F. The GC content was 50% for the  
113 three genomes sequenced (Table 2).

114 Only the contigs larger than 500bp were used for annotation and the N50 from these  
115 contigs was between 105 kb and 240 kb. The three resulting annotated genomes  
116 consisted of approximately 5 thousand coding sequences (CDS), and around 80 other  
117 sequences coding for RNAs (Table 2). According to the molecular typing scheme 1 for  
118 *E. coli*, strain 1099F belonged to ST617, strain 1326F, to ST648 and strain 2610F, to  
119 ST707 type.

120 Annotation revealed several sequences coding for resistance markers (Table 2). As  
121 expected, we were able to identify the presence of the carbapenemase genes  
122 (*bla*<sub>OXA-370</sub> in strain1099F; *bla*<sub>KPC-2</sub> in strain 1326F and *bla*<sub>NDM-1</sub> in strain 2610F)  
123 previously detected by RT-PCR

124 . In addition, sequences coding for several IncF plasmid incompatibility group proteins  
125 were observed in all strains, as well as IncI1 plasmid incompatibility group proteins,  
126 however only in strains 1326F and 2610F.

127

## 128 **DISCUSSION**

129 **General characteristics.** Considering the analysis of the basic genomic features of all  
130 isolates, we found a few similarities. All of them presented a similar GC content (around

131 50%), which can be also found in other reports in the literature (27-29) and in the *E. coli*  
132 sequences deposited on GenBank (30). The total length of the genome is also similar  
133 to other deposited genomes, which varies between 4,5Mbp and 5,8Mbp.

134 The isolates belonged to STs usually related to antimicrobial resistance. *E. coli*  
135 1099F (*bla*<sub>OXA-370</sub> harbouring isolate), was classified as ST617, which usually harbours  
136 *bla*<sub>CTX-M-type</sub> genes (31, 32). Therefore, it was not surprising the fact that our isolate  
137 1099F carries the *bla*<sub>CTX-M-8</sub> gene. In fact, ST617 was also related to  
138 OXA-48-like-producing isolates (33). A relationship between carbapenemase  
139 production and a particular ST was also observed in *E. coli* 1326F (*bla*<sub>KPC-2</sub> harbouring  
140 isolate); this strain was classified as ST648, a sequence type that was associated with  
141 KPC production in China (34, 35), and NDM production in Australia and the United  
142 States (28, 29). This ST also is the founder of a clonal complex (CC) that includes  
143  $\beta$ -lactamase-producing isolates (usually ESBL-producers) (36). *E. coli* 2610F (*bla*<sub>NDM-</sub>  
144 <sub>1</sub> harbouring isolate) was classified as ST707, but, to the best of our knowledge, there  
145 is no correlation between this ST and antimicrobial resistance. However, this ST  
146 presents a double locus variation with ST442, a sequence type that is highly correlated  
147 with the hemolytic uremic syndrome (37). Furthermore, a phylogenetic tree comprising  
148 all STs described in the literature included ST707 in the CC10, a clonal complex that  
149 also comprises ST617 (data not shown).

150 **Genetic environment of carbapenemases.** The genetic environment of *bla*<sub>OXA-370</sub>, in  
151 isolate 1099F, was similar to the one found in the first description of this Class D  
152 carbapenemase (accession number KJ488943.1), in an *Enterobacter hormaechei*  
153 isolate (11). We were able to find, upstream the *bla*<sub>OXA-370</sub> gene, an inverted copy of an  
154 insertion sequence IS5075-like (Figure 1A). The annotation also revealed other  
155 sequences codifying for transposases nearby the carbapenemase gene, suggesting

156 that other insertion sequences might surround it. The sequences coding for those  
157 transposases were not related to any IS already deposited, suggesting that a novel IS  
158 composes the genetic environment of *bla*<sub>OXA-370</sub>. On the other hand, we could not find  
159 any of the other recurrent genetic features presented among OXA-48 producing  
160 isolates, such as the transposon *Tn1999*, *lysR* and a non-functional acetyl-CoA  
161 carboxylase gene (38, 39). This suggests that, although OXA-370 and OXA-48 are  
162 very similar (99% of protein identity), their genetic environments are distinct.

163         Regarding to 1326F strain (*bla*<sub>KPC-2</sub> positive), we were able to find an inverted  
164 copy of *ISKpn6* downstream *bla*<sub>KPC-2</sub> and a copy of *ISKpn7* upstream the  
165 carbapenemase gene (Figure 2A). This is a common genetic environment in KPC  
166 producers, which is usually part of a transposon *Tn4401*, a feature that influences the  
167 rapid transmission and dissemination of the carbapenemase gene (40) and was  
168 identified in other Brazilian isolates (41).

169         Concerning to 2610F (*bla*<sub>NDM-1</sub> positive), some common features with other  
170 isolates producing this carbapenemase were identified. Upstream the *bla*<sub>NDM-1</sub>, we  
171 found a partial sequence of *ISAba125* and downstream this carbapenemase gene we  
172 were able to identify the *ble*<sub>EMBL</sub> gene, which confers resistance to bleomicin and can  
173 be found in several plasmid sequences carrying *bla*<sub>NDM-1</sub> (42). As a matter of fact, the  
174 genetic environment of this carbapenemase gene is very similar to another NDM-1  
175 producer, *E. coli* 6409, isolated in Colombia (NCBI accession number NZCP010373)  
176 and to an *E. coli* recently described in Brazil (43). We could also identify a partial  
177 sequence of the chaperonin gene *groEL* (truncated) and the complete sequence of  
178 *groES*, a twin-arginine translocation (TAT) pathway signal sequence, and *trpF*, which  
179 codifies a phosphoribosylanthranilate isomerase (Figure 3A).

180 **Other resistance genes.** Antimicrobial resistance in the isolates reported in this study  
181 was not restricted to carbapenemase production. All isolates presented genes  
182 encoding other  $\beta$ -lactamases. It is of note that the  $\beta$ -lactamases presented by the  
183 isolate 1099F (*bla*<sub>OXA-370</sub> harbouring isolate) are the same observed in a plasmid  
184 harbouring *bla*<sub>OXA-370</sub> recovered from an *E. hormaechei* isolate (accession number  
185 KJ488943.1), suggesting that they might present plasmids with similar backbones. The  
186 presence of *bla*<sub>CTX-M-8</sub> might be responsible for the resistance to third- and fourth-  
187 generation cephalosporins observed in this strain (Table 1). It is also noteworthy that  
188 we could find a genetic cluster with three resistance markers: *aadA1* (also known as  
189 *sat1*), *sul2* and *dfrA1* (figure 1B). The first one encodes an aminoglycoside-  
190 adenylyltransferase; the second one confers resistance to sulphonamides; and the third  
191 one, to trimethoprim. A similar cluster, lacking *sul2*, was also found in *E. coli* 79  
192 (accession number FJ155843.1), a zoonotic strain recovered in Ireland. Despite the  
193 presence of two genes encoding aminoglycoside-transferases (besides *aadA1*, we  
194 could also find the *aph(3')-Ia* gene), the isolate did not present aminoglycoside  
195 resistance *in vitro* (Amikacin MIC = 2mg/L; Gentamicin MIC = 1mg/L). This lack of  
196 correlation can be explained if we look further into the spectrum of these enzymes. The  
197 aminoglycoside O-nucleotidyltransferases, which include *aadA1*, confer resistance  
198 only to spectinomycin and streptomycin; the aminoglycoside O-phosphotransferases,  
199 such as *aph(3')-Ia*, are active against kanamycin, neomycin, paromomycin,  
200 ribostamycin and lividomycin, but not against gentamicin or amikacin (44). On the other  
201 hand, although the isolate 1099F presented high resistance level to fluoroquinolones,  
202 no resistance genetic marker for this antibiotic class was found after sequencing.  
203 Regarding tetracyclines and chloramphenicol, we were not able to confirm phenotypic  
204 resistance. The presence of *tet(A)* did not confer resistance to tigecycline in this isolate.

205 Although this efflux pump should not affect glycylicyclines such as tigecycline, Tuckman  
206 and colleagues reported that some mutations in this gene could enhance the activity  
207 of this protein against this antibiotic class (45), which was not found in our strain 1099F.

208 *E. coli* 1326F (*bla*<sub>KPC-2</sub> harbouring isolate) also harbours additional  $\beta$ -lactamase  
209 genes. The *bla*<sub>OXA-1</sub> gene, for example, was found in a major resistance cluster, that  
210 carries genes related to resistance to aminoglycosides, sulphonamides, rifampicin and  
211 chloramphenicol (Figure 2B). This cluster can be also found in several plasmids from  
212 different *Enterobacteriaceae* isolates, such as *Citrobacter freundii* strain Iona 2, an  
213 environmental isolate from Canada (46-48), including a quinolone resistant *E. coli*  
214 without any carbapenemase genes (49). Noteworthy, a few papers have described the  
215 presence of *bla*<sub>OXA-30</sub> in these clusters, but both  $\beta$ -lactamases have indistinguishable  
216 sequences (50). The observed *in vitro* resistance to gentamicin in strain 1326F was  
217 probably due to the presence of *aac(3)-IIa* which has gentamicin as substrate but not  
218 amikacin. The relationship between KPC-2- and aminoglycoside-modifying enzymes  
219 (AMEs)-production has also been described in previous studies (51). The gene variant  
220 *bla*<sub>TEM-1A</sub> of this  $\beta$ -lactamase type is usually transferable by the Tn3 transposon type  
221 (52). The *bla*<sub>KPC-2</sub> gene is also commonly found in transposons of this type, such as  
222 Tn4401 (53). These findings support the hypothesis that this carbapenemase is  
223 located in a plasmid in isolate 1326F.

224 *E. coli* 2610F (*bla*<sub>NDM-1</sub> harbouring isolate) also harbours a relevant antibiotic  
225 resistance cluster, comprising almost every resistance marker found in its genome. In  
226 the same contig, we were able to identify *sul2*, *strA* (also known as *aph-(3'')-Ib*), *strB*  
227 (can be referred as *aph-(6)-Id*), *dfrA1*, *aadA1* and *su1* (Figure 3B). Once again, the  
228 presence of AMEs did not confer aminoglycoside resistance *in vitro*. The narrow  
229 spectrum of both *strA* and *strB*, which confer resistance only to streptomycin (44),

230 would explain why we did not observe high MICs of the aminoglycosides evaluated  
231 (amikacin and gentamicin). This resistance cluster was found in some strains of  
232 *Salmonella* spp. (54, 55) and in a zoonotic and potential ExPEC strain of *E. coli*, in  
233 plasmid pAPEC-O103-colIBM (56). A mercury resistance operon was found  
234 downstream, in the same contig, in agreement with what was reported in an *E. coli*  
235 (O83:H1) strain NRG 857C, deposited on GenBank (57). This operon was also  
236 described in transposons Tn21-type, which are related to the dissemination of  
237 metallo- $\beta$ -lactamases (58).

238 Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* are nowadays of major  
239 concern. The genetic environment of these genes encoding for antimicrobial resistance  
240 are very diverse and their dissemination is not restricted to a few STs. In our study, we  
241 reported a ST which was never related to antibiotic resistance. We also highlighted  
242 that the simple detection of a resistance determinant does not imply in resistance *in*  
243 *vitro*, and that the spectrum of action of these determinants should be carefully  
244 analysed. These broad-spectrum  $\beta$ -lactamases not only narrow the therapeutic options  
245 for treating infections due to these organisms, they also often carry other resistance  
246 genes. Understanding its genetic features and epidemiology is crucial for the  
247 development of new drugs targeting this public health threat.

248 **Accession numbers.** The GenBank accession number for the contig sequences of  
249 *E. coli* 1099F is LNYS000000000; for *E. coli* 1326F is LNZA000000000 and for *E. coli*  
250 2610F is LNZV000000000.

251

## 252 REFERENCES

- 253 1. **Paterson DL.** 2006. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae.  
254 *Am J Med* **119**:S20-28; discussion S62-70.

- 255 2. **Nordmann P, Naas T, Poirel L.** 2011. Global spread of Carbapenemase-  
256 producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis* **17**:1791-1798.
- 257 3. **Ambler RP.** 1980. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B*  
258 *Biol Sci* **289**:321-331.
- 259 4. **Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC,**  
260 **Sampaio JL, Barth AL.** 2012. Detection of *bla*<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant  
261 *Kluyvera georgiana*. *J Antimicrob Chemother* **67**:2776-2777.
- 262 5. **Martinez-Martinez L, Gonzalez-Lopez JJ.** 2014. Carbapenemases in  
263 Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol*  
264 *Clin* **32 Suppl 4**:4-9.
- 265 6. **Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR.** 2009.  
266 Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel  
267 erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella*  
268 *pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* **53**:5046-  
269 5054.
- 270 7. **Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Beriao GC, Chagas TP, Timm LN,**  
271 **Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD.** 2013. Isolation of NDM-producing *Providencia*  
272 *rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* **68**:2956-2957.
- 273 8. **Nordmann P, Dortet L, Poirel L.** 2012. Carbapenem resistance in  
274 Enterobacteriaceae: here is the storm! *Trends Mol Med* **18**:263-272.
- 275 9. **Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J,**  
276 **Nordmann P.** 2011. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with  
277 extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents*  
278 *Chemother* **55**:2546-2551.

- 279 10. **Evans BA, Amyes SG.** 2014. OXA beta-lactamases. Clin Microbiol Rev **27**:241-  
280 263.
- 281 11. **Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR,**  
282 **da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochevis LC, Barth AL,**  
283 **Zavascki AP.** 2014. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-  
284 lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. Antimicrob Agents Chemother  
285 **58**:3566-3567.
- 286 12. **Bertelli C, Greub G.** 2013. Rapid bacterial genome sequencing: methods and  
287 applications in clinical microbiology. Clin Microbiol Infect **19**:803-813.
- 288 13. **Carrico JA, Sabat AJ, Friedrich AW, Ramirez M.** 2013. Bioinformatics in  
289 bacterial molecular epidemiology and public health: databases, tools and the next-  
290 generation sequencing revolution. Euro Surveill **18**:20382.
- 291 14. **Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL,**  
292 **Jelsbak L, Sicheritz-Ponten T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O.** 2012.  
293 Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. J Clin Microbiol  
294 **50**:1355-1361.
- 295 15. **Zankari E, Hasman H, Kaas RS, Seyfarth AM, Agerso Y, Lund O, Larsen MV,**  
296 **Aarestrup FM.** 2013. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic  
297 alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing.  
298 J Antimicrob Chemother **68**:771-777.
- 299 16. **Lee Y, Kim BS, Chun J, Yong JH, Lee YS, Yoo JS, Yong D, Hong SG, D'Souza**  
300 **R, Thomson KS, Lee K, Chong Y.** 2014. Clonality and Resistome analysis of  
301 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in Korea using whole  
302 genome sequencing. Biomed Res Int **2014**:352862.

- 303 17. **Kumar V, Sun P, Vamathevan J, Li Y, Ingraham K, Palmer L, Huang J, Brown**  
304 **JR.** 2011. Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different  
305 antibiotic resistance profiles. *Antimicrob Agents Chemother* **55**:4267-4276.
- 306 18. **Ramos PI, Picao RC, Almeida LG, Lima NC, Girardello R, Vivan AC, Xavier**  
307 **DE, Barcellos FG, Pelisson M, Vespero EC, Medigue C, Vasconcelos AT,**  
308 **Gales AC, Nicolas MF.** 2014. Comparative analysis of the complete genome of  
309 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome  
310 plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. *BMC*  
311 *Genomics* **15**:54.
- 312 19. **Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, Machado**  
313 **A, Barth AL, Zavascki AP.** 2014. Emergence of NDM-1-producing  
314 Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis* **25**:79-81.
- 315 20. **Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S.** 2012. Rapid  
316 detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob*  
317 *Chemother* **67**:906-909.
- 318 21. **EUCAST.** 2015. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters.
- 319 22. **Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, Lesin**  
320 **VM, Nikolenko SI, Pham S, Prjibelski AD, Pyshkin AV, Sirotkin AV, Vyahhi N,**  
321 **Tesler G, Alekseyev MA, Pevzner PA.** 2012. SPAdes: A new genome assembly  
322 algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol* **19**:455-477.
- 323 23. **Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K,**  
324 **Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL,**  
325 **Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD,**  
326 **Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O.** 2008. The

- 327 RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. BMC Genomics  
328 **9:75.**
- 329 24. **Overbeek R, Olson R, Pusch GD, Olsen GJ, Davis JJ, Disz T, Edwards RA,**  
330 **Gerdes S, Parrello B, Shukla M, Vonstein V, Wattam AR, Xia F, Stevens R.**  
331 2014. The SEED and the Rapid Annotation of microbial genomes using  
332 Subsystems Technology (RAST). Nucleic Acids Res **42:D206-214.**
- 333 25. **Zankari E, Hasman H, Cosentino S, Vestergaard M, Rasmussen S, Lund O,**  
334 **Aarestrup FM, Larsen MV.** 2012. Identification of acquired antimicrobial  
335 resistance genes. J Antimicrob Chemother **67:2640-2644.**
- 336 26. **Siguié P, Perochon J, Lestrade L, Mahillon J, Chandler M.** 2006. ISfinder: the  
337 reference centre for bacterial insertion sequences. Nucleic Acids Res **34:D32-36.**
- 338 27. **Chavez-Bueno S, Day MW, Toby IT, Akins DR, Dyer DW.** 2014. Genome  
339 sequence of SCB34, a Sequence Type 131 multidrug-resistant *Escherichia coli*  
340 isolate causing neonatal early-onset sepsis. Genome Announc **2:e00514-00514.**
- 341 28. **de Man TJ, Perry KA, Avillan JJ, Rasheed JK, Limbago BM.** 2015. Draft  
342 genome sequence of a New Delhi Metallo-beta-Lactamase-5 (NDM-5)-producing  
343 multidrug-resistant *Escherichia coli* isolate. Genome Announc **3:e00017-00015.**
- 344 29. **Wailan AM, Paterson DL, Caffery M, Sowden D, Sidjabat HE.** 2015. Draft  
345 genome sequence of NDM-5-producing *Escherichia coli* sequence type 648 and  
346 genetic context of *bla*<sub>NDM-5</sub> in Australia. Genome Announc **3:e00194-00115.**
- 347 30. **NCBI.** 2015. *Escherichia coli* - Genome Assembly and Annotation Report,  
348 Bethesda, USA.
- 349 31. **Ben Sallem R, Ben Slama K, Estepa V, Cheikhna EO, Mohamed AM, Chairat**  
350 **S, Ruiz-Larrea F, Boudabous A, Torres C.** 2015. Detection of CTX-M-15-  
351 producing *Escherichia coli* isolates of lineages ST410-A, ST617-A and ST354-D in

- 352 faecal samples of hospitalized patients in a Mauritanian hospital. J Chemother  
353 **27**:114-116.
- 354 32. **Smet A, Martel A, Persoons D, Dewulf J, Heyndrickx M, Claeys G, Lontie M,**  
355 **Van Meensel B, Herman L, Haesebrouck F, Butaye P.** 2010. Characterization  
356 of extended-spectrum beta-lactamases produced by *Escherichia coli* isolated from  
357 hospitalized and nonhospitalized patients: emergence of CTX-M-15-producing  
358 strains causing urinary tract infections. Microb Drug Resist **16**:129-134.
- 359 33. **Charfi K, Mansour W, Ben Haj Khalifa A, Mastouri M, Aouni M, Mammeri H.**  
360 2015. Emergence of OXA-204 beta-lactamase in Tunisia. Diagn Microbiol Infect  
361 Dis **82**:314-317.
- 362 34. **Xu G, Jiang Y, An W, Wang H, Zhang X.** 2015. Emergence of KPC-2-producing  
363 *Escherichia coli* isolates in an urban river in Harbin, China. World J Microbiol  
364 Biotechnol **31**:1443-1450.
- 365 35. **Cai JC, Zhang R, Hu YY, Zhou HW, Chen GX.** 2014. Emergence of *Escherichia*  
366 *coli* sequence type 131 isolates producing KPC-2 carbapenemase in China.  
367 Antimicrob Agents Chemother **58**:1146-1152.
- 368 36. **Sherchan JB, Hayakawa K, Miyoshi-Akiyama T, Ohmagari N, Kirikae T,**  
369 **Nagamatsu M, Tojo M, Ohara H, Sherchand JB, Tandukar S.** 2015. Clinical  
370 epidemiology and molecular analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-  
371 producing *Escherichia coli* in Nepal: characteristics of sequence types 131 and  
372 648. Antimicrob Agents Chemother **59**:3424-3432.
- 373 37. **Mellmann A, Fruth A, Friedrich AW, Wieler LH, Harmsen D, Werber D,**  
374 **Middendorf B, Bielaszewska M, Karch H.** 2009. Phylogeny and disease  
375 association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. Emerg Infect Dis  
376 **15**:1474-1477.

- 377 38. **Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P.** 2012. Genetic features of the widespread  
378 plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother*  
379 **56:559-562.**
- 380 39. **Beyrouthy R, Robin F, Delmas J, Gibold L, Dalmasso G, Dabboussi F, Hamze**  
381 **M, Bonnet R.** 2014. IS1R-mediated plasticity of IncL/M plasmids leads to the  
382 insertion of *bla*<sub>OXA-48</sub> into the *Escherichia coli* chromosome. *Antimicrob Agents*  
383 *Chemother* **58:3785-3790.**
- 384 40. **Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P.** 2012. Role of ISKpn7 and deletions  
385 in *bla*<sub>KPC</sub> gene expression. *Antimicrob Agents Chemother* **56:4753-4759.**
- 386 41. **Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, Barth**  
387 **AL.** 2013. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-  
388 producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol* **62:1721-1727.**
- 389 42. **Dortet L, Nordmann P, Poirel L.** 2012. Association of the emerging  
390 carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae  
391 and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* **56:1693-1697.**
- 392 43. **Campos JC, da Silva MJ, dos Santos PR, Barros EM, Pereira Mde O, Seco**  
393 **BM, Magagnin CM, Leiroz LK, de Oliveira TG, de Faria-Junior C, Cerdeira LT,**  
394 **Barth AL, Sampaio SC, Zavascki AP, Poirel L, Sampaio JL.** 2015.  
395 Characterization of Tn3000, a transposon responsible for *bla*<sub>NDM-1</sub> dissemination  
396 among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. *Antimicrob*  
397 *Agents Chemother* **59:7387-7395.**
- 398 44. **Ramirez MS, Tolmasky ME.** 2010. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug*  
399 *Resist Updat* **13:151-171.**

- 400 45. **Tuckman M, Petersen PJ, Projan SJ.** 2000. Mutations in the interdomain loop  
401 region of the *tetA(A)* tetracycline resistance gene increase efflux of minocycline  
402 and glycylicyclines. *Microb Drug Resist* **6**:277-282.
- 403 46. **Compain F, Frangeul L, Drieux L, Verdet C, Brisse S, Arlet G, Decre D.** 2014.  
404 Complete nucleotide sequence of two multidrug-resistant IncR plasmids from  
405 *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4207-4210.
- 406 47. **Yim G, Kwong W, Davies J, Miao V.** 2013. Complex integrons containing *qnrB4*-  
407 *ampC* (*bla<sub>DHA-1</sub>*) in plasmids of multidrug-resistant *Citrobacter freundii* from  
408 wastewater. *Can J Microbiol* **59**:110-116.
- 409 48. **Verdet C, Benzerara Y, Gautier V, Adam O, Ould-Hocine Z, Arlet G.** 2006.  
410 Emergence of DHA-1-producing *Klebsiella* spp. in the Parisian region: genetic  
411 organization of the *ampC* and *ampR* genes originating from *Morganella morganii*.  
412 *Antimicrob Agents Chemother* **50**:607-617.
- 413 49. **Wang M, Tran JH, Jacoby GA, Zhang Y, Wang F, Hooper DC.** 2003. Plasmid-  
414 mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from  
415 Shanghai, China. *Antimicrob Agents Chemother* **47**:2242-2248.
- 416 50. **Bush K, Palzkill T, Jacoby G.** 2015. Beta-Lactamase classification and amino  
417 acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant  
418 enzymes. <http://www.lahey.org/studies/webt.asp#OXA>. Accessed December 28.
- 419 51. **Almaghrabi R, Clancy CJ, Doi Y, Hao B, Chen L, Shields RK, Press EG, Iovine  
420 NM, Townsend BM, Wagener MM, Kreiswirth B, Nguyen MH.** 2014.  
421 Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains exhibit diversity in  
422 aminoglycoside-modifying enzymes, which exert differing effects on plazomicin  
423 and other agents. *Antimicrob Agents Chemother* **58**:4443-4451.

- 424 52. **Partridge SR, Hall RM.** 2005. Evolution of transposons containing *bla*<sub>TEM</sub> genes.  
425 Antimicrob Agents Chemother **49**:1267-1268.
- 426 53. **Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC,**  
427 **Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P.** 2010. Worldwide diversity of *Klebsiella*  
428 *pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. Emerg Infect Dis  
429 **16**:1349-1356.
- 430 54. **Kariuki S, Okoro C, Kiiru J, Njoroge S, Omuse G, Langridge G, Kingsley RA,**  
431 **Dougan G, Revathi G.** 2015. Ceftriaxone-resistant *Salmonella enterica* serotype  
432 typhimurium sequence type 313 from Kenyan patients is associated with the  
433 *bla*<sub>CTX-M-15</sub> gene on a novel IncHI2 plasmid. Antimicrob Agents Chemother  
434 **59**:3133-3139.
- 435 55. **Daly M, Villa L, Pezzella C, Fanning S, Carattoli A.** 2005. Comparison of  
436 multidrug resistance gene regions between two geographically unrelated  
437 *Salmonella* serotypes. J Antimicrob Chemother **55**:558-561.
- 438 56. **Johnson TJ, Jordan D, Kariyawasam S, Stell AL, Bell NP, Wannemuehler YM,**  
439 **Alarcon CF, Li G, Tivendale KA, Logue CM, Nolan LK.** 2010. Sequence analysis  
440 and characterization of a transferable hybrid plasmid encoding multidrug  
441 resistance and enabling zoonotic potential for extraintestinal *Escherichia coli*.  
442 Infect Immun **78**:1931-1942.
- 443 57. **Nash JH, Villegas A, Kropinski AM, Aguilar-Valenzuela R, Konczy P,**  
444 **Mascarenhas M, Ziebell K, Torres AG, Karmali MA, Coombes BK.** 2010.  
445 Genome sequence of adherent-invasive *Escherichia coli* and comparative  
446 genomic analysis with other *E. coli* pathotypes. BMC Genomics **11**:667.

- 447 58. Ho PL, Lo WU, Chan J, Cheung YY, Chow KH, Yam WC, Lin CH, Que TL. 2014.  
448 pIMP-PH114 carrying *bla*<sub>IMP-4</sub> in a *Klebsiella pneumoniae* strain is closely related  
449 to other multidrug-resistant IncA/C2 plasmids. *Curr Microbiol* **68**:227-232.  
450

**Table 1.** Susceptibility profile of three carbapenemase-producing *Escherichia coli*.

Isolate	Hospital	Date of Recovery	Carbapenemase	MIC (mg/L)													
				IPM	MEM	ERT	DOR	TZP	CAZ	FEP	CIP	ATM	GEN	AMK	PMB	CST	TGC
1099F	A	Oct/2013	OXA-370	1	0.125	0.38	0.19	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;32</b>	<b>8</b>	<b>&gt;32</b>	<b>4</b>	1	2	0.75	0.25	0.25
1326F	A	Nov/2013	KPC-2	<b>&gt;32</b>	<b>6</b>	<b>&gt;32</b>	<b>&gt;32</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;32</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;32</b>	<b>&gt;256</b>	<b>32</b>	4	0.38	0.125	0.25
2610F	B	Apr/2014	NDM-1	<b>6</b>	<b>&gt;32</b>	<b>16</b>	<b>&gt;32</b>	<b>&gt;256</b>	<b>&gt;256</b>	<b>192</b>	<b>&gt;32</b>	0.064	0.75	3	0.38	0.19	1.5

IPM, imipenem; MEM, meropenem; ERT, ertapenem; DOR, doripenem; TZP, piperacillin-tazobactam; CAZ, ceftazidime; FEP, cefepime; CIP, ciprofloxacin; ATM, aztreonam; GEN, gentamicin; AMK, amikacin; PMB, polymyxin B; CST, colistin; TGC, tigecycline. MICs classified as Resistant are highlighted in bold.



**Table 2.** Summary of the sequencing data of three carbapenemase-producing *Escherichia coli*.

Isolate	1099F	1326F	2610F	
<b>Reads</b>	1,344,052	953,001	1,018,117	
<b>Contigs (&gt;500bp)</b>	123	138	81	
<b>Total length</b>	4,723,513bp	5,390,500bp	4,982,289bp	
<b>CDS<sup>a</sup></b>	4889	5652	5081	
<b>GC%</b>	50.66	50.58	50.84	
<b>MLST</b>	ST617	ST648	ST707	
<b>Resistance Determinants<sup>b</sup></b>	<b>Aminoglycosides</b>	<i>aadA1, aph(3')-Ia</i>	<i>aac(3)-IIa, strA, strB, aac(6')Ib-cr</i>	<i>strA, strB, aadA1</i>
	<b>Beta-lactams</b>	<i>bla<sub>TEM-1B</sub>, bla<sub>OXA-370</sub>, bla<sub>CTX-8</sub></i>	<i>bla<sub>TEM-1A</sub>, bla<sub>KPC-2</sub>, bla<sub>OXA-1</sub></i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>TEM-1B</sub></i>
	<b>Fluoroquinolones</b>	ND	<i>QnrB49, aac(6')Ib-cr</i>	ND
	<b>Rifampicin</b>	ND	<i>ARR-3</i>	ND
	<b>Phenicol</b>	<i>floR</i>	<i>catB3</i>	ND
	<b>Sulphonamides</b>	<i>sul2</i>	<i>sul1, sul2</i>	<i>sul1, sul2</i>
	<b>Tetracyclines</b>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i>	<i>tet(A)</i>
	<b>Trimethoprim</b>	<i>dfrA1</i>	<i>dfrA14</i>	<i>dfrA1</i>

bp, base pair; CDS, coding sequences; GC%, GC content; MLST, Multilocus Sequence Typing; ND, not detected. The carbapenemase genes are highlighted in bold. <sup>a</sup> according to RAST annotation. <sup>b</sup> according to ResFinder results.

451 **FIGURE LEGENDS**

452 **Figure 1:** Organization of the gene clusters involved in antibiotic resistance by *E. coli*  
 453 1099F. (A) Genetic context of *bla*<sub>OXA-370</sub>, gene clusters of *Enterobacter hormaechei*,  
 454 plasmid p87F-2 and *Klebsiella pneumoniae* Kp11978, plasmid pOXA-48 were used  
 455 for comparison. (B) Additional gene clusters involved in antibiotic resistance,  
 456 *Escherichia coli* 79 was used for comparison. Cross dashes indicates truncated genes.  
 457 Black arrows indicate target genes and *hyp* means hypothetical proteins. The  
 458 percentage of sequence identity between the encoded proteins of *E. coli* 1099F and  
 459 the encoded proteins from the comparisons gene clusters are shown below *E. coli*  
 460 1099F gene clusters, \* indicate comparison between *bla*<sub>OXA-370</sub> and *bla*<sub>OXA-48</sub>.

461

462 **Figure 2:** Organization of the gene clusters involved in antibiotic resistance by *E. coli*  
 463 1326F. (A) Genetic context of *bla*<sub>KPC-2</sub> in strain 1326F - gene cluster of plasmid  
 464 pRYCKPC3.1 of *Klebsiella pneumoniae* 09138475RyC was used for comparison. Note  
 465 that ISKpn7 is composed by *IstA* and *IstB* genes. (B) Additional gene clusters involved  
 466 in antibiotic resistance, *Citrobacter freundii* strain Iona 2, plasmid pCFI-1 was used for  
 467 comparison. Cross dashes indicates truncated genes. Black arrows indicate target  
 468 genes and *hyp* means hypothetical proteins. The percentage of sequence identity  
 469 between the encoded proteins of *E. coli* 1326F and the encoded proteins from the  
 470 comparisons gene clusters are shown below *E. coli* 1326F gene clusters.

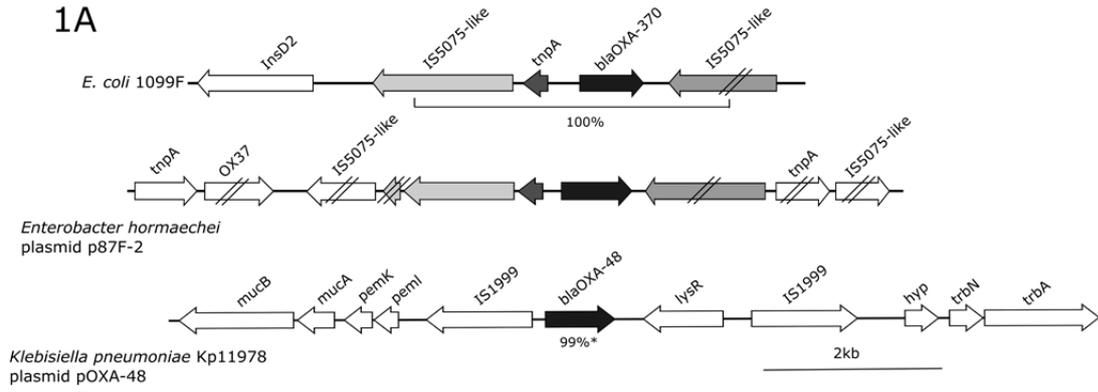
471

472 **Figure 3:** Organization of the gene clusters involved in antibiotic resistance by *E. coli*  
 473 2610F. (A) Genetic context of *bla*<sub>NDM-1</sub> - gene cluster of plasmid p6409-202 of  
 474 *Escherichia coli* 6409 was used for comparison. (B) Additional gene clusters involved  
 475 in antibiotic resistance, *Escherichia coli*, plasmid pAPEC-O103-ColBM and

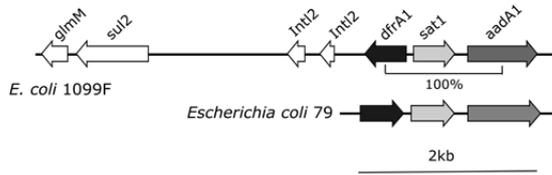
476 *Escherichia coli* O83:H1 str. NRG 857C, plasmid pO83\_CORR were used for  
477 comparison. Cross dashes indicates truncated genes. Black arrows indicate target  
478 genes and *hyp* means hypothetical proteins. The percentage of sequence identity  
479 between the encoded proteins of *E. coli* 2610F and the encoded proteins from the  
480 comparisons gene clusters are shown below *E. coli* 2610F gene clusters.

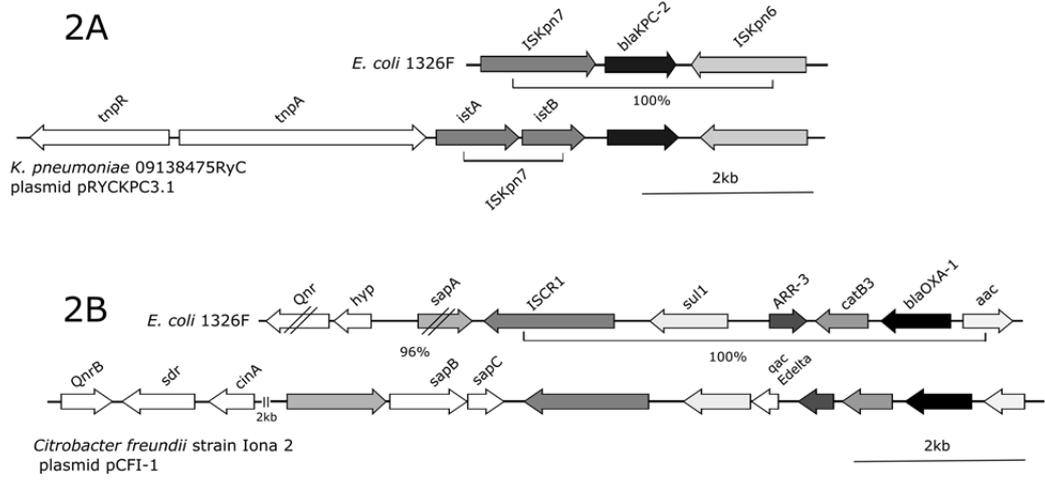
481 **FIGURE 1**

**1A**



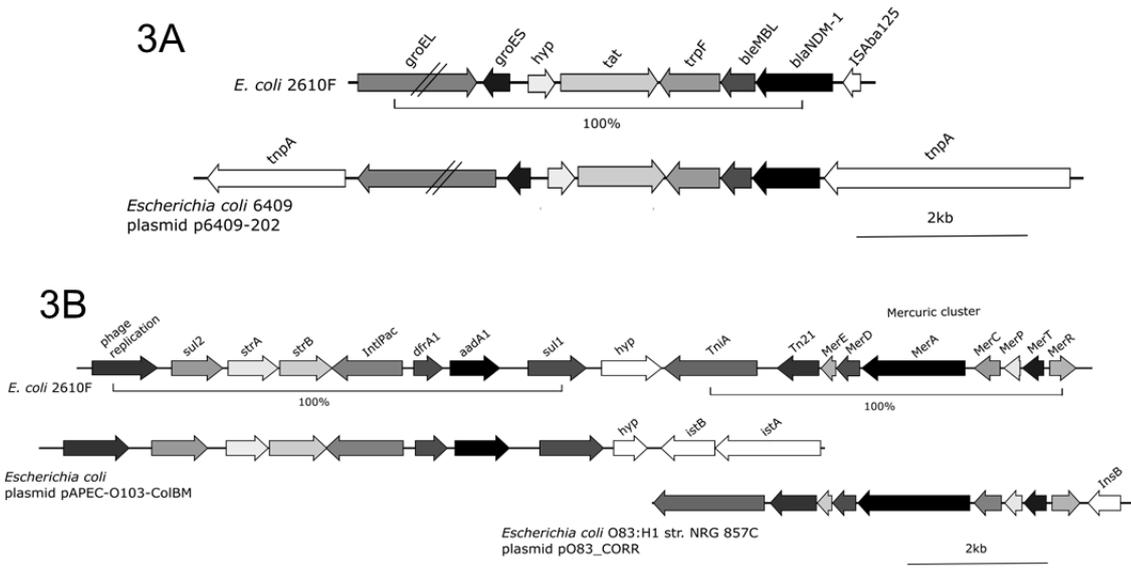
**1B**



483 **FIGURE 2**

484

485 **FIGURE 3**



486

**4.2. Manuscrito II – “Draft Genome Sequence of a GES-5-producing  
*Serratia marcescens* Isolated in Southern Brazil**



1

2 **Draft Genome Sequence of a GES-5-producing *Serratia marcescens* Isolated in**  
3 **Southern Brazil**

4 **Running title:** Draft Genome of GES-5-producing *Serratia marcescens*

5 **Section:** Genome announcement

6 Carolina Silva Nodari<sup>1,2</sup>; Marina Siebert<sup>3</sup>; Ursula da Silveira Matte<sup>4,5</sup>; Afonso Luís  
7 Barth<sup>1,2</sup>.

8 <sup>1</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do  
9 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>2</sup> Laboratório de Pesquisa em Resistência  
10 Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup>  
11 Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre,  
12 Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup> Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto  
13 Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>5</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do  
14 Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

15 **Abstract:** *Serratia marcescens* is a Gram-negative rod intrinsically resistant to  
16 polymyxins and usually associated with wound, respiratory and urinary tract infections.  
17 The whole genome of the first GES-5-producing *Serratia marcescens* isolated from a  
18 Brazilian patient was sequenced using Ion Torrent PGM System. Besides *bla*<sub>GES-5</sub>, we  
19 were able to identify genes encoding for other  $\beta$ -lactamases, for aminoglycosides  
20 modifying enzymes and for an efflux pump to tetracyclines.

21 **Keywords:** GES-5, *Serratia marcescens*, whole-genome sequencing.

22 Nowadays carbapenemase production is the main carbapenem resistance mechanism  
23 among *Enterobacteriaceae*<sup>1</sup>. The Guiana Extended-Spectrum (GES)  $\beta$ -lactamase  
24 family comprises several Ambler class A enzymes with distinguished  $\beta$ -lactam  
25 hydrolysis profiles. The original GES were classified as extended-spectrum  
26  $\beta$ -lactamases (ESBL), but amino acid substitutions in the GES-type ESBLs enhanced  
27 their activity against carbapenems<sup>2</sup>. The GES-5 is the GES-carbapenemase which  
28 hydrolyses imipenem most efficiently<sup>3</sup>. Here we report the draft genome of the first  
29 GES-5-producing *Serratia marcescens* reported in Brazil.

30 As part of a surveillance study, isolates with reduced susceptibility to carbapenems  
31 were submitted to Real Time (RT) High Resolution Melting (HRM) Multiplex PCR with  
32 specific primers for *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub> and *bla*<sub>IMP</sub><sup>4</sup>. One isolate,  
33 obtained from an ascitic fluid from a female patient in a tertiary hospital in Porto Alegre  
34 (Brazil) in October 2014, and identified as *Serratia marcescens* by Vitek2 system,  
35 presented an amplicon with a Temperature of Melting (T<sub>m</sub>) similar to the *bla*<sub>GES</sub> positive  
36 control in the RT-PCR. Antimicrobial susceptibility was determined by Etest and the  
37 isolated presented high resistance levels to carbapenems (MIC>32mg/L) and  
38 polymyxins (MIC>256mg/L), but remained susceptible to fluoroquinolones and  
39 tigecycline.

40 Whole genome sequencing (WGS) was performed using the Ion Torrent PGM™  
41 system, with a 400bp-read kit and a 316™ Chip. Library was previously obtained by  
42 enzymatic fragmentation. We obtained 997,155 reads with a mean read length of  
43 232bp. The reads were assembled in contigs using SPAdes<sup>5</sup>. The assembling revealed  
44 a 5,378,959bp length genome, distributed in 208 contigs ( $\geq$ 500bp), with a total GC  
45 content of 59%.

46 The contigs were annotated using RAST<sup>6,7</sup> and manually curated using Artemis<sup>8</sup>, when  
47 necessary. We also submitted the contigs to ResFinder Database<sup>9</sup>. Annotation  
48 revealed 5775 CDS, as well as 78 tRNA and 2 rRNA. As expected, we were able to  
49 identify the presence of *bla*<sub>GES-5</sub> after annotation, as well as genes codifying for other  
50  $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>CTX-M-2</sub> and *bla*<sub>OXA-2</sub>), and aminoglycoside modifying enzymes  
51 (*aac*(3)-IIa, *aac*(6')-Ib and *aac*(6')-Ic). We were also able to observe the presence of a  
52 gene codifying for an efflux pump to tetracyclines (*tet*(41)). To the best of our  
53 knowledge, this is the first report of a GES-5-producing *Serratia marcescens* in Brazil.  
54 We also demonstrated that NGS platforms can be used as a quick tool to evaluate  
55 resistance determinants among *Enterobacteriaceae*.

56 **Accession number:** This draft genome was submitted to GenBank under the  
57 accession number LNZT00000000.

## 58 REFERENCES

- 59 1. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: here  
60 is the storm! Trends Mol Med, 2012, 18:263-272.
- 61 2. Walsh TR. Clinically significant carbapenemases: an update. Curr Opin Infect Dis,  
62 2008, 21:367-371.
- 63 3. Bae IK, Lee YN, Jeong SH, *et al.* Genetic and biochemical characterization of GES-  
64 5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. Diagn  
65 Microbiol Infect Dis, 2007, 58:465-468.
- 66 4. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, *et al.* Rapid detection of carbapenemase genes  
67 by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother, 2012, 67:906-909.
- 68 5. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, *et al.* SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm  
69 and Its Applications to Single-Cell Sequencing. J Comput Biol, 2012, 19:455-477.

- 70 6. Aziz RK, Bartels D, Best AA, *et al.* The RAST Server: rapid annotations using  
71 subsystems technology. *BMC Genomics*, 2008, 9:75.
- 72 7. Overbeek R, Olson R, Pusch GD, *et al.* The SEED and the Rapid Annotation of  
73 microbial genomes using Subsystems Technology (RAST). *Nucleic Acids Res*, 2014,  
74 42:D206-214.
- 75 8. Carver T, Harris SR, Berriman M, *et al.* Artemis: an integrated platform for  
76 visualization and analysis of high-throughput sequence-based experimental data.  
77 *Bioinformatics*, 2012, 28:464-469.
- 78 9. Zankari E, Hasman H, Cosentino S, *et al.* Identification of acquired antimicrobial  
79 resistance genes. *J Antimicrob Chemother*, 2012, 67:2640-2644.



## **5. DISCUSSÃO GERAL**



A disseminação global das carbapenemases está intimamente ligada aos contextos genéticos nos quais elas estão inseridas. O sucesso de enzimas como a KPC e a NDM não se deve apenas ao fato de os genes que codificam as mesmas estarem inseridos em plasmídeos, mas também à linhagem dos mesmos e aos complexos clonais a que os isolados carreadores desses genes pertencem. Os plasmídeos do grupo de incompatibilidade F, por exemplo, são capazes de carrear uma diversidade de genes de resistência, e estão associados com alguns dos clones multirresistentes com elevada prevalência mundial, como *E. coli* ST131 e *K. pneumoniae* ST258 (Mathers, Peirano e Pitout, 2015).

O complexo clonal (CC) 258 de *K. pneumoniae* é o principal responsável pelo aumento da incidência de infecções por isolados produtores de KPC, apesar de essa carbapenemase já ter sido descrita em mais de 100 STs distintas (Munoz-Price *et al.*, 2013). Embora as razões pelas quais esse CC se difundiu tão facilmente ainda sejam desconhecidas, sabe-se que os isolados pertencentes ao mesmo estão relacionados com maiores taxas de mortalidade do que aqueles que estão filogeneticamente mais distantes, provavelmente em função de alterações únicas que estes apresentam na composição de sua cápsula (Deleo *et al.*, 2014). Outra característica marcante desse clone é que ele possui genes que codificam para *pili* tipo IV, o qual aumenta a taxa de transferência de material genético entre diferentes bactérias, podendo, portanto, estar associado com a mobilidade de genes de resistência (Chen, Mathema, Pitout, *et al.*, 2014). A presença do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em plasmídeos é comumente associada com o transposon Tn4401, uma plataforma com algumas regiões variáveis que já foi descrita em isolados ao redor de todo o mundo, inclusive no Brasil, não somente em *K. pneumoniae* (Ribeiro *et al.*, 2013; Ramos *et al.*, 2014), e pode ser identificada no isolado produtor de KPC-2 incluído em nosso estudo.

A rápida disseminação mundial do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> ainda não foi relacionada com nenhum clone específico, mas esse gene é mais frequentemente encontrado em plasmídeos do tipo IncA/C (Johnson e Woodford, 2013). Recentemente, Campos e colaboradores (2015) caracterizaram um transposon contendo este gene, o qual foi encontrado em isolados da Índia, do Nepal, do Marrocos e do Brasil e pode estar relacionado com a rápida disseminação dessa carbapenemase em todo o planeta, nas mais diversas espécies. Um ambiente genético semelhante foi encontrado no

isolado produtor de NDM-1 incluído em nosso estudo, sugerindo que essa estrutura pode estar associada com a transmissão desse gene de resistência a diferentes espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, visto que ele foi encontrado tanto em *K. pneumoniae*, o carreador mais comum dessa carbapenemase, quanto em *E. coli*, como a descrita neste trabalho.

Considerando que ainda são raros os relatos acerca da OXA-370, ainda não é possível determinar qual o ambiente genético mais favorável para a sua disseminação. Sua primeira descrição, em um isolado de *E. hormaechei*, apresentou uma sequência de inserção semelhante à IS5075 e outra semelhante à IS4 flaqueando *bla*<sub>OXA-370</sub> (Sampaio *et al.*, 2014). Posteriormente, esse gene foi identificado em *K. pneumoniae* (Pereira, Borghi, *et al.*, 2015) e, neste trabalho, descrevemos essa carbapenemase em *E. coli*, cujo contexto genético foi bastante semelhante ao do primeiro isolado. Estudos futuros poderão mensurar qual a influência dessas sequências de inserção da expansão desta enzima relativamente nova, que ainda parece estar restrita ao nosso país.

Carbapenemases cujo genes encontram-se inseridos em integrons de classe I, como GES-5, IMP e VIM (Martinez-Martinez e Gonzalez-Lopez, 2014), podem ser considerados de menor impacto epidemiológico do que KPC ou NDM, uma vez que sua disseminação parece ser mais lenta do que a destas enzimas. Ainda assim, enterobactérias carreando genes *bla*<sub>GES-type</sub> com atividade sobre os carbapenêmicos já foram descritas em diversas partes do mundo, em uma grande variedade de espécies (Jeong *et al.*, 2005; Picao *et al.*, 2010; Ribeiro, Zavascki, *et al.*, 2014; Boyd *et al.*, 2015). Neste trabalho, descrevemos a primeira *S. marcescens* produtora de GES-5 isolada no Brasil, ressaltando assim a capacidade de mobilização do gene *bla*<sub>GES-5</sub> em diferentes espécies bacterianas. Nosso relato ainda ressalta a importância da vigilância contínua dos isolados resistentes aos carbapenêmicos, a qual não deve ficar restrita à detecção dos genes mais disseminados mundialmente.

## **6. CONCLUSÃO**



A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias representa hoje um grave problema de saúde pública, pois restringe ainda mais as opções terapêuticas para o tratamento de infecções graves por esses microrganismos. O principal mecanismo envolvido no desenvolvimento de resistência a essa classe de fármacos é a produção de carbapenemases, enzimas com elevado poder hidrolítico contra todos os  $\beta$ -lactâmicos. Conhecer os fatores genéticos envolvidos na transmissão desses mecanismos é, portanto, de elevada importância. O sequenciamento de nova geração tem auxiliado muito na identificação desses fatores, pois essa tecnologia fornece uma grande quantidade de dados acerca de um mesmo isolado, permitindo identificar diversas características pouco exploradas antes do advento dessas plataformas.

Neste estudo, avaliamos o resistoma de três isolados de *E. coli* produtores de diferentes carbapenemases – OXA-370, KPC-2 e NDM-1, e de um isolado de *S. marcescens* produtor de GES-5, através do sequenciamento de seus genomas completos, utilizando a plataforma Ion Torrent PGM. No que diz respeito à tipagem molecular das cepas, os isolados de *E. coli* foram classificados em diferentes STs. A amostra carreadora do gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, nesse aspecto, chama a atenção, pois pertence a uma linhagem que, até o momento, não havia sido relacionada com a aquisição de genes codificantes para carbapenemases.

A análise dos dados gerados utilizando ferramentas de bioinformática especializadas na identificação de genes adquiridos de resistência permitiu a identificação de outros genes clinicamente relevantes, além das carbapenemases já citadas, tais como outras  $\beta$ -lactamases, enzimas modificadoras de aminoglicosídeos e genes de resistência às sulfonamidas e ao trimetoprim. Vale destacar que, em alguns casos, a presença desses genes não conferiu resistência *in vitro* à classe de antimicrobianos contra a qual possuem atividade. Sendo assim, embora bastante úteis para identificar aspectos importantes de um isolado a partir de uma grande quantidade de dados, as ferramentas disponíveis atualmente ainda devem ser utilizadas com cautela, e o espectro de ação dos determinantes de resistência encontrados em um isolado deve ser conhecido, a fim de evitar possíveis erros na classificação da susceptibilidade do microrganismo a um determinado fármaco baseada apenas em dados *in silico*.

O contexto genético dos genes codificantes para as carbapenemases avaliadas nesse estudo foi semelhante ao de outros isolados publicados anteriormente. Vale ressaltar que, em alguns casos, o microrganismo carreador do ambiente genético previamente descrito era de uma espécie diferente daquele incluído em nosso estudo, corroborando, assim, dados que sugerem que alguns determinantes de resistência se encontram em elementos genéticos de elevada mobilidade, não somente intra-espécies, como também interespecies.

Finalmente, devemos destacar que, neste estudo, foi possível obter uma grande quantidade de dados sobre isolados clínicos carreadores de algumas carbapenemases ainda pouco descritas em nosso país. A OXA-370, por exemplo, ainda não teve seu contexto genético completamente elucidado, mas nossos achados indicam que este é bastante distinto daquele encontrado para a OXA-48, embora as duas enzimas tenham elevada similaridade. Também apresentamos o genoma completo de uma *S. marcescens* produtora de GES-5, achado que, até o momento, parece ser o único em nosso país. Com esse trabalho, ainda ressaltamos a capacidade de microrganismos usualmente sensíveis aos carbapenêmicos, como *E. coli* e *S. marcescens*, de adquirir mecanismos de resistência essa classe de antimicrobianos. A produção de carbapenemases por *S. marcescens* é ainda mais preocupante, uma vez que este microrganismo apresenta resistência intrínseca às polimixinas, uma das principais opções terapêuticas para o tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



ABBOTT, S. L. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas*, and other *Enterobacteriaceae*. In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C., *et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington, DC: ASM Press, v.1, 2011.

ALLARD, G. *et al*. SPINGO: a rapid species-classifier for microbial amplicon sequences. **BMC Bioinformatics**, v. 16, p. 324, 2015.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v. 289, n. 1036, p. 321-31, 1980.

AUBERT, D. *et al*. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. **J Bacteriol**, v. 188, n. 18, p. 6506-14, 2006.

BAE, I. K. *et al*. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 58, n. 4, p. 465-8, 2007.

BARTH, A. L. *et al*. Resistência Bacteriana. In: BARROS, E.; MACHADO, A., *et al* (Ed.). **Antimicrobianos: consulta rápida**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

BAUGH, S. *et al*. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. **J Antimicrob Chemother**, v. 69, n. 3, p. 673-81, 2014.

BEGIC, S.; WOROBEK, E. A. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. **Microbiology**, v. 154, n. Pt 2, p. 454-61, 2008.

BENTLEY, D. R. *et al*. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry. **Nature**, v. 456, n. 7218, p. 53-9, 2008.

BERTELLI, C.; GREUB, G. Rapid bacterial genome sequencing: methods and applications in clinical microbiology. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 9, p. 803-13, 2013.

BLAIR, J. M.; PIDDOCK, L. J. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. **Curr Opin Microbiol**, v. 12, n. 5, p. 512-9, 2009.

BOYD, D. *et al*. Complete sequence of four multidrug-resistant MOBQ1 plasmids harboring *bla*<sub>GES-5</sub> isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* persisting in a hospital in Canada. **Microb Drug Resist**, v. 21, n. 3, p. 253-60, 2015.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 969-76, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 39, n. 6, p. 1211-33, 1995.

BUSH, K.; PALZKILL, T.; JACOBY, G. Beta-lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant

enzymes. 2015. Disponível em: < <http://www.lahey.org/studies/webt.asp#OXA> >. Acesso em: December 28.

CALISTRÌ, A. *et al.* New generation sequencing in pathogen discovery and microbial surveillance. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 11, n. 9, p. 877-9, 2013.

CAMPOS, J. C. *et al.* Characterization of Tn3000, a transposon responsible for *bla*<sub>NDM-1</sub> dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 12, p. 7387-95, 2015.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2227-38, 2009.

CARATTOLI, A. *et al.* In silico detection and typing of plasmids using PlasmidFinder and plasmid multilocus sequence typing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 7, p. 3895-903, 2014.

CARRER, A. *et al.* Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2950-4, 2008.

CARVALHO-ASSEF, A. P. *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 12, p. 2956-7, 2013.

\_\_\_\_\_. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and QnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 4, p. 2475-6, 2014.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 10, p. 3801-4, 2008.

CAYO, R. *et al.* Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 12, p. 5907-13, 2011.

CHEN, F. J. *et al.* The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Microb Drug Resist**, v. 9, n. 3, p. 265-71, 2003.

CHEN, L. *et al.* Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends Microbiol**, v. 22, n. 12, p. 686-96, 2014.

\_\_\_\_\_. Epidemic *Klebsiella pneumoniae* ST258 is a hybrid strain. **MBio**, v. 5, n. 3, p. e01355-14, 2014.

CHENG, C. K. *et al.* Next generation genome sequencing reveals phylogenetic clades with different level of virulence among *Salmonella typhimurium* clinical human isolates in Hong Kong. **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 688, 2015.

CLSI. **Interpretive Criteria for Identification of Bacteria and Fungi by DNA Target Sequencing; Approved Guideline**. Wayne, Pennsylvania, USA 2008.

COSENTINO, S. *et al.* PathogenFinder--distinguishing friend from foe using bacterial whole genome sequence data. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77302, 2013.

COSTERTON, J. W. *et al.* Bacterial biofilms in nature and disease. **Annu Rev Microbiol**, v. 41, p. 435-64, 1987.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. **Int J Med Microbiol**, v. 303, n. 6-7, p. 287-92, 2013.

DELCOUR, A. H. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 808-16, 2009.

DELEO, F. R. *et al.* Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 111, n. 13, p. 4988-93, 2014.

DENG, X.; DEN BAKKER, H. C.; HENDRIKSEN, R. S. Genomic epidemiology: whole-genome-sequencing-powered surveillance and outbreak investigation of foodborne bacterial pathogens. **Annu Rev Food Sci Technol**, 2016.

DIDELOT, X. *et al.* Transforming clinical microbiology with bacterial genome sequencing. **Nat Rev Genet**, v. 13, n. 9, p. 601-12, 2012.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis**, v. 45, n. 1, p. 88-94, 2007.

DOLEJSKA, M. *et al.* Complete sequencing of an IncHI1 plasmid encoding the carbapenemase NDM-1, the ArmA 16S RNA methylase and a resistance-nodulation-cell division/multidrug efflux pump. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 1, p. 34-9, 2013.

DONNENBERG, M. S. Enterobacteriaceae. In: MANDELL, G. L.; BENNETT, J. E., *et al* (Ed.). **Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases**. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier, v.2, 2010.

DORTET, L.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 1693-7, 2012.

DOUMITH, M. *et al.* Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 4, p. 659-67, 2009.

DUNNE, W. M., JR.; WESTBLADE, L. F.; FORD, B. Next-generation and whole-genome sequencing in the diagnostic clinical microbiology laboratory. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 8, p. 1719-26, 2012.

EID, J. *et al.* Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules. **Science**, v. 323, n. 5910, p. 133-8, 2009.

EUCAST. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters** 2015.

EVANS, B. A.; AMYES, S. G. OXA beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 27, n. 2, p. 241-63, 2014.

FU, Y. *et al.* Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*<sub>NDM-1</sub> in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 9, p. 2114-22, 2012.

GALES, A. C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 73, n. 4, p. 354-60, 2012.

\_\_\_\_\_. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother**, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GILCHRIST, C. A. *et al.* Whole-genome sequencing in outbreak analysis. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 541-63, 2015.

HASAN, M. R. *et al.* Depletion of human DNA in spiked clinical specimens to improve the sensitivity of pathogen detection by next generation sequencing. **J Clin Microbiol**, 2016.

HERNANDEZ-ALLES, S. *et al.* Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**, v. 145 ( Pt 3), p. 673-9, 1999.

HIASA, H.; SHEA, M. E. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. **J Biol Chem**, v. 275, n. 44, p. 34780-6, 2000.

HIERGEIST, A. *et al.* Analyses of intestinal microbiota: culture versus sequencing. **Ilar j**, v. 56, n. 2, p. 228-40, 2015.

HO, P. L. *et al.* pIMP-PH114 carrying *bla*<sub>IMP-4</sub> in a *Klebsiella pneumoniae* strain is closely related to other multidrug-resistant IncA/C2 plasmids. **Curr Microbiol**, v. 68, n. 2, p. 227-32, 2014.

HOLLAND, R. D. *et al.* Rapid identification of intact whole bacteria based on spectral patterns using matrix-assisted laser desorption/ionization with time-of-flight mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 10, n. 10, p. 1227-32, 1996.

HOOPER, D. C.; JACOBY, G. A. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1354, p. 12-31, 2015.

HORNSEY, M. *et al.* Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiprome. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 3, p. 479-82, 2010.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 1, p. 161-82, Table of Contents, 2009.

JACOBY, G. A.; STRAHILEVITZ, J.; HOOPER, D. C. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Microbiol Spectr**, v. 2, n. 5, 2014.

JAFFE, A.; CHABBERT, Y. A.; SEMONIN, O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 22, n. 6, p. 942-8, 1982.

JAMAL, W.; ALBERT, M. J.; ROTIMI, V. O. Real-time comparative evaluation of bioMerieux VITEK MS versus Bruker Microflex MS, two matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry systems, for identification of clinically significant bacteria. **BMC Microbiol**, v. 14, p. 289, 2014.

JAURIN, B.; GRUNDSTROM, T. AmpC cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 78, n. 8, p. 4897-901, 1981.

JEONG, S. H. *et al.* First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4809-10, 2005.

JIANG, Y. *et al.* Dissemination of a clone carrying a *fosA3*-harbouring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Int J Antimicrob Agents**, v. 45, n. 1, p. 66-70, 2015.

JOENSEN, K. G. *et al.* Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of verotoxigenic *Escherichia coli*. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1501-10, 2014.

\_\_\_\_\_. Rapid and easy *in silico* serotyping of *Escherichia coli* isolates by use of whole-genome sequencing data. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 8, p. 2410-26, 2015.

JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 4, p. 499-513, 2013.

KAAS, R. S. *et al.* Solving the problem of comparing whole bacterial genomes across different sequencing platforms. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104984, 2014.

KARTHIKEYAN, K.; THIRUNARAYAN, M. A.; KRISHNAN, P. Coexistence of *bla*<sub>OXA-23</sub> with *bla*<sub>NDM-1</sub> and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 10, p. 2253-4, 2010.

KATAYAMA, Y.; ITO, T.; HIRAMATSU, K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 6, p. 1549-55, 2000.

KIM, E. S.; HOOPER, D. C. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. **Infect Chemother**, v. 46, n. 4, p. 226-38, 2014.

KIM, H. B. *et al.* *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3582-4, 2009.

KISHII, R.; TAKEI, M. Relationship between the expression of *ompF* and quinolone resistance in *Escherichia coli*. **J Infect Chemother**, v. 15, n. 6, p. 361-6, 2009.

KISTLER, J. O. *et al.* The oral microbiome in human immunodeficiency virus (HIV)-positive individuals. **J Med Microbiol**, v. 64, n. 9, p. 1094-101, 2015.

KONSTANTINIDIS, K. T.; TIEDJE, J. M. Genomic insights that advance the species definition for prokaryotes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 7, p. 2567-72, 2005.

KOSER, C. U.; ELLINGTON, M. J.; PEACOCK, S. J. Whole-genome sequencing to control antimicrobial resistance. **Trends Genet**, v. 30, n. 9, p. 401-7, 2014.

KRISHNAMURTHY, T.; ROSS, P. L. Rapid identification of bacteria by direct matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric analysis of whole cells. **Rapid Commun Mass Spectrom**, v. 10, n. 15, p. 1992-6, 1996.

KUMAR, V. *et al.* Comparative genomics of *Klebsiella pneumoniae* strains with different antibiotic resistance profiles. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 9, p. 4267-76, 2011.

LARSEN, M. V. *et al.* Benchmarking of methods for genomic taxonomy. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1529-39, 2014.

\_\_\_\_\_. Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 4, p. 1355-61, Apr 2012. ISSN 0095-1137. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1128/jcm.06094-11>>.

LEE, M. *et al.* Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of *Pseudomonas aeruginosa*, a nexus for the induction of beta-lactam antibiotic resistance. **J Am Chem Soc**, v. 137, n. 1, p. 190-200, 2015.

LEVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEVY, S. B. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 36, n. 4, p. 695-703, 1992.

LEWIS, T. *et al.* High-throughput whole-genome sequencing to dissect the epidemiology of *Acinetobacter baumannii* isolates from a hospital outbreak. **J Hosp Infect**, v. 75, n. 1, p. 37-41, 2010.

LI, X. Z.; PLESIAT, P.; NIKAIDO, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 2, p. 337-418, 2015.

LIEBERT, C. A.; HALL, R. M.; SUMMERS, A. O. Transposon Tn21, flagship of the floating genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 63, n. 3, p. 507-22, 1999.

LIN, C. W. *et al.* The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. **Res Microbiol**, v. 160, n. 2, p. 152-8, 2009.

LIOY, V. S. *et al.* Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. **Rna**, v. 20, n. 3, p. 382-91, 2014.

LIU, L. *et al.* Comparison of next-generation sequencing systems. **J Biomed Biotechnol**, v. 2012, p. 251364, 2012.

LO, Y. *et al.* Whole-genome sequencing of uropathogenic *Escherichia coli* reveals long evolutionary history of diversity and virulence. **Infect Genet Evol**, v. 34, p. 244-50, 2015.

LOMOVSKAYA, O.; BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 910-8, 2006.

LOMOVSKAYA, O. *et al.* Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 105-16, 2001.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chem Rev**, v. 105, n. 2, p. 477-98, 2005.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GONZALEZ-LOPEZ, J. J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 32 Suppl 4, p. 4-9, 2014.

MATHERS, A. J.; PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Rev**, v. 28, n. 3, p. 565-91, 2015.

MAYO, B. *et al.* Impact of next generation sequencing techniques in food microbiology. **Curr Genomics**, v. 15, n. 4, p. 293-309, 2014.

MCMURRY, L.; PETRUCCI, R. E., JR.; LEVY, S. B. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 77, n. 7, p. 3974-7, 1980.

MELLMANN, A. *et al.* Phylogeny and disease association of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 9, p. 1474-7, 2009.

\_\_\_\_\_. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. **PLoS One**, v. 6, n. 7, p. e22751, 2011.

MERRIMAN, B.; ROTHBERG, J. M. Progress in ion torrent semiconductor chip based sequencing. **Electrophoresis**, v. 33, n. 23, p. 3397-417, 2012.

MINATO, Y. *et al.* Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. **Biol Pharm Bull**, v. 31, n. 3, p. 516-9, 2008.

MONTEIRO, J. *et al.* First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, p.333-4, 2009.

MOYA, B. *et al.* Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 9, p. 4771-8, 2012.

MUNOZ-PRICE, L. S. *et al.* Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v. 13, n. 9, p. 785-96, 2013.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 948.

NAAS, T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1257-63, 2008.

NICHOLS, R. J. *et al.* Phenotypic landscape of a bacterial cell. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 143-56, 2011.

NICOLETTI, A. G. *et al.* Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 9, p. 5159-64, 2015.

NIELSEN, L. E. *et al.* IS5 element integration, a novel mechanism for rapid in vivo emergence of tigecycline nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 10, p. 6151-6, 2014.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NIKAIDO, H.; TAKATSUKA, Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. **Biochim Biophys Acta**, v. 1794, n. 5, p. 769-81, 2009.

NIKAIDO, H.; VAARA, M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. **Microbiol Rev**, v. 49, n. 1, p. 1-32, 1985.

NISHINO, K.; YAMAGUCHI, A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. **J Bacteriol**, v. 183, n. 20, p. 5803-12, 2001.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 4, p. 228-36, 2009.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect**, v. 8, n. 6, p. 321-31, 2002.

\_\_\_\_\_. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. **Clin Microbiol Infect**, v. 20, n. 9, p. 821-30, 2014.

OETHINGER, M. *et al.* Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 8, p. 2089-94, 1998.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. São Paulo: Sarvier, 2010. 530.

OUELLETTE, M.; BISSONNETTE, L.; ROY, P. H. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into Tn21-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 84, n. 21, p. 7378-82, 1987.

PADILLA, E. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 1, p. 177-83, 2010.

PAGANO, M. *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 45, n. 4, p. 444-5, 2015.

PASTERAN, F. *et al.* Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 6, p. 1631-9, 2009.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. **Am J Med**, v. 119, n. 6 Suppl 1, p. S20-8; discussion S62-70, 2006.

PEIRANO, G. *et al.* Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 265-8, 2009.

PEREIRA, P. S. *et al.* Draft genome sequences of three NDM-1-producing Enterobacteriaceae species isolated from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 580-2, 2015.

\_\_\_\_\_. Clonal Dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 59, n. 8, p. 4453-6, 2015.

PERICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic

fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 7, p. 2464-9, 2007.

PFALLER, M. A. *et al.* Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 7, p. 1762-70, 1998.

PFEIFER, Y. *et al.* Molecular characterization of *bla*<sub>NDM-1</sub> in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 9, p. 1998-2001, 2011.

PICAO, R. C. *et al.* Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 4, p. 796-7, 2010.

POIREL, L.; BONNIN, R. A.; NORDMANN, P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 9, p. 4224-9, 2011.

POIREL, L. *et al.* OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 6, p. 2546-51, 2011.

\_\_\_\_\_. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, n. 3, p. 622-32, 2000.

POURNARAS, S. *et al.* Single-locus-sequence-based typing of *bla*<sub>OXA-51</sub>-like genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. **J Clin Microbiol**, v. 52, n. 5, p. 1653-7, 2014.

PUNINA, N. V. *et al.* Whole-genome sequencing targets drug-resistant bacterial infections. **Hum Genomics**, v. 9, p. 19, 2015.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, 2007.

RAMIREZ, M. S.; TOLMASKY, M. E. Aminoglycoside modifying enzymes. **Drug Resist Updat**, v. 13, n. 6, p. 151-71, 2010.

RAMOS, P. I. *et al.* Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. **BMC Genomics**, v. 15, p. 54, 2014.

RIBEIRO, V. B. *et al.* Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 11, p. 1721-7, 2013.

\_\_\_\_\_. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 18, n. 2, p. 231-2, 2014.

\_\_\_\_\_. Detection of *bla*<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2776-7, 2012.

\_\_\_\_\_. Detection of *bla*<sub>GES-5</sub> in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 1, p. 622-3, 2014.

RICE, L. B.; BONOMO, R. A. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents In: VERSALOVIC, J.; CARROLL, K. C., *et al* (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. Washington: ASM Press, v.1, 2011.

ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. **Lancet Infect Dis**, v. 6, n. 10, p. 629-40, 2006.

ROBLEDO, I. E. *et al*. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 1354-7, 2010.

ROHDE, H. *et al*. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. **N Engl J Med**, v. 365, n. 8, p. 718-24, 2011.

RONAGHI, M.; UHLEN, M.; NYREN, P. A sequencing method based on real-time pyrophosphate. **Science**, v. 281, n. 5375, p. 363, 365, 1998.

ROTHBERG, J. M. *et al*. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. **Nature**, v. 475, n. 7356, p. 348-52, 2011.

ROWE, W. *et al*. Search engine for antimicrobial resistance: a cloud compatible pipeline and web interface for rapidly detecting antimicrobial resistance genes directly from sequence data. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. e0133492, 2015.

ROZALES, F. P. *et al*. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis**, 2014.

SAMPAIO, J. L. *et al*. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, 2014.

SARNO, R. *et al*. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 11, p. 3422-7, 2002.

SEECOOMAR, G. D.; MARMOL, B. C.; KWON, D. H. Promoter deletions of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-encoding genes (*bla*<sub>KPC-2</sub>) and efflux pump (AcrAB) on beta-lactam susceptibility in KPC-producing Enterobacteriaceae. **FEMS Microbiol Lett**, v. 348, n. 2, p. 120-6, 2013.

SHAHCHERAGHI, F. *et al.* Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. **Biol Pharm Bull**, v. 30, n. 4, p. 798-800, 2007.

SHIBATA, N. *et al.* PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. **J Clin Microbiol**, v. 41, n. 12, p. 5407-13, 2003.

SHIGEMURA, K. *et al.* Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study. **Int J Antimicrob Agents**, v. 40, n. 6, p. 516-20, 2012.

STEINIGER-WHITE, M.; RAYMENT, I.; REZNIKOFF, W. S. Structure/function insights into Tn5 transposition. **Curr Opin Struct Biol**, v. 14, n. 1, p. 50-7, 2004.

STOESSER, N. *et al.* Genome sequencing of an extended series of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from neonatal infections in a Nepali hospital characterizes the extent of community- versus hospital-associated transmission in an endemic setting. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, n. 12, p. 7347-57, 2014.

\_\_\_\_\_. Dynamics of MDR *Enterobacter cloacae* outbreaks in a neonatal unit in Nepal: insights using wider sampling frames and next-generation sequencing. **J Antimicrob Chemother**, v. 70, n. 4, p. 1008-15, 2015.

STRAHILEVITZ, J. *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 22, n. 4, p. 664-89, 2009.

STURENBURG, E. *et al.* Cloning and sequencing of *Enterobacter aerogenes* OmpC-type osmoporin linked to carbapenem resistance. **Int J Med Microbiol**, v. 291, n. 8, p. 649-54, 2002.

SULAVIK, M. C. *et al.* Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1126-36, 2001.

SWICK, M. C. *et al.* Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-toIC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 2, p. 921-4, 2011.

TANGDEN, T. *et al.* Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 6, p. 1319-26, 2013.

TOLMASKY, M. E. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the Tn1331 transposon paradigm. **Front Biosci**, v. 5, p. D20-9, 2000.

TONG, S. Y. *et al.* Genome sequencing defines phylogeny and spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a high transmission setting. **Genome Res**, v. 25, n. 1, p. 111-8, 2015.

TURTON, J. F. *et al.* The role of IS*Aba1* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 258, n. 1, p. 72-7, 2006.

UYAGUARI-DIAZ, M. I. *et al.* Automated Gel Size Selection to Improve the Quality of Next-generation Sequencing Libraries Prepared from Environmental Water Samples. **J Vis Exp**, n. 98, 2015.

VAKULENKO, S. B.; MOBASHERY, S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev**, v. 16, n. 3, p. 430-50, 2003.

VANHOOF, R.; HANNECART-POKORNI, E.; CONTENT, J. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, n. 2, p. 483, 1998.

VASHIST, J. *et al.* Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 332-8, 2011.

VIDAL, S. *et al.* Beta-lactam screening by specific residues of the OmpF eyelet. **J Med Chem**, v. 48, n. 5, p. 1395-400, 2005.

VILLEGAS, M. V. *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1553-5, 2007.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resist Updat**, v. 15, n. 3, p. 133-48, 2012.

WATKINS, W. J. *et al.* The relationship between physicochemical properties, *in vitro* activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-containing efflux pump inhibitors. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 13, n. 23, p. 4241-4, 2003.

WESTCOTT, S. L.; SCHLOSS, P. D. De novo clustering methods outperform reference-based methods for assigning 16S rRNA gene sequences to operational taxonomic units. **PeerJ**, v. 3, p. e1487, 2015.

WHITELEY, A. S. *et al.* Microbial 16S rRNA Ion Tag and community metagenome sequencing using the Ion Torrent (PGM) Platform. **J Microbiol Methods**, v. 91, n. 1, p. 80-8, 2012.

WOOD, M. *et al.* Athletic equipment microbiota are shaped by interactions with human skin. **Microbiome**, v. 3, p. 25, 2015.

WOZNIAK, A. *et al.* Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. **J Med Microbiol**, v. 61, n. Pt 9, p. 1270-9, 2012.

WRIGHT, G. D.; THOMPSON, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. **Front Biosci**, v. 4, p. D9-21, 1999.

YIGIT, H. *et al.* Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 4, p. 1151-61, 2001.

YONG, D. *et al.* Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, 2009.

ZANKARI, E. *et al.* Identification of acquired antimicrobial resistance genes. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2640-4, 2012.

\_\_\_\_\_. Genotyping using whole-genome sequencing is a realistic alternative to surveillance based on phenotypic antimicrobial susceptibility testing. **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 4, p. 771-7, 2013.

ZAVASCKI, A. P. *et al.* KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 3, p. 286-8, 2009.

ZHANG, S. *et al.* *Salmonella* serotype determination utilizing high-throughput genome sequencing data. **J Clin Microbiol**, v. 53, n. 5, p. 1685-92, 2015.





## 8.1. Parecer do comitê de ética em pesquisa



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE  
GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA

A Comissão Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre analisou o projeto:

**Projeto:** 140421

**Data da Versão do Projeto:** 29/07/2014

**Pesquisadores:**

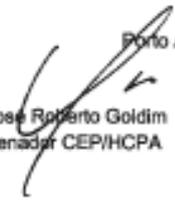
AFONSO LUIS BARTH  
CAROLINA SILVA NODARI  
DIOGO ANDRÉ PILGER

**Título:** Caracterização genotípica de enterobactérias produtoras de carbapenemases por sequenciamento de nova geração

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG)

Porto Alegre, 27 de setembro de 2014.

  
Prof. José Roberto Goldim  
Coordenador CEP/HCPA