

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM RESISTÊNCIA BACTERIANA

**AVALIAÇÃO DA COPRODUÇÃO DE KPC E NDM EM *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE:
CARACTERIZAÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS ENVOLVIDOS**

MAYANA KIELING HERNANDEZ BERDICHESVSKI

Porto Alegre, 2024

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
LABORATÓRIO DE PESQUISA EM RESISTÊNCIA BACTERIANA

**AVALIAÇÃO DA COPRODUÇÃO DE KPC E NDM EM *KLEBSIELLA*
PNEUMONIAE:
CARACTERIZAÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS ENVOLVIDOS**

Dissertação apresentada por Mayana Kieling Hernandez Berdichesvski como requisito para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luís Barth

Professor Titular da Faculdade de Farmácia da UFRGS/ Departamento de Análises Clínicas.

Coordenador do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS).

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andreza Francisco Martins

Professora Adjunta da UFRGS, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Imunologia.

Porto Alegre, 2024

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado/Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 30.01.2024, pela Banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Alexandre Macedo

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Franciele Maboni

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Profa. Dra. Juliana Caierão

Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Leonardo Neves de Andrade

Universidade de São Paulo (USP)

Kieling Hernandez Berdichevski, Mayana
AVALIAÇÃO DA COPRODUÇÃO DE KPC E NDM EM KLEBSIELLA
PNEUMONIAE: CARACTERIZAÇÃO DOS ELEMENTOS GENÉTICOS
MÓVEIS ENVOLVIDOS / Mayana Kieling Hernandez
Berdichevski. -- 2024.
103 f.
Orientadora: Afonso Luís Barth.

Coorientadora: Andreza Francisco Martins.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2024.

1. blaKPC-2 e blaNDM-1. 2. disseminação de
blaNDM-1. 3. Klebsiella pneumoniae coprodutora. 4.
plasmídios cointegrados. I. Barth, Afonso Luís,
orient. II. Francisco Martins, Andreza, coorient.
III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS



Estudo desenvolvido no **Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS)**, locado no Centro de Pesquisa Experimental – CPE, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) - Ramiro Barcelos 2350, Porto Alegre, RS, Brasil / CEP 90.035-903 - Fone: +55 51 33598607.



Faculdade de Farmácia da UFRGS

Av. Ipiranga 2752, Petrópolis, Porto Alegre, RS, Brasil / CEP 90.610-000 - Fone: +55 51 33082164.

FONTES FINANCIADORAS



Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA) - Projeto nº 2022-0375.



Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) / Ministério da Ciência.



Instituto Nacional de Pesquisa em Resistência aos Antimicrobianos - INPRA/ INCT.

À minha Bisavó Therezinha Ilse Roehe que sonhava em ser Farmacêutica e à minha família.

“You must always remember this: *Have courage and be kind.* You have more kindness in your little finger than most people possess in their whole body. And it has power. More than you know.”

Brittany Candau

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Marco Antônio D. Hernandez e Poliana K. Hernandez, por todo seu amor, paciência e dedicação. Graças a vocês hoje dou o primeiro passo na busca pelo sonho de ser professora. Vocês foram, são e sempre serão os meus maiores exemplos.

Ao meu irmão caçulinha, Rafael K. Hernandez, obrigada por desde tão pequenino me ensinar o significado de amizade e cumplicidade.

Ao meu amor da minha vida, Ricardo Berdichevski, por todo seu apoio e companhia nas idas à Porto Alegre, carinho, e, principalmente incentivo! O meu amor por você é imensurável e tu me guias sempre no caminho para me tornar uma pessoa melhor por mim, por nós e pela Valentina. Gratidão pela sua vida e pelo seu amor!

À minha amada filha Valentina que mal chegou e já irradia totalmente a minha vida e o meu coração. Gratidão por ter me escolhido como sua mamãe e me dar o privilégio de viver este momento tão especial da minha vida com você crescendo dentro de mim.

Aos meus avôs, Laurentino, Vera Maria, Liane, Paulo e Delmar por seu amor e amizade e à minha bisavó Therezinha que nos deixa grande saudade no coração.

A toda família Kieling Hernandez por todos os momentos maravilhosos juntos.

A toda a família Berdichevski e aos meus queridos sogros Ismael e Ieda, meus segundos pais que me receberam de braços abertos e sempre me incentivaram em todas as etapas.

Às minhas melhores amigas Alice, Isabela, Giordana, Mariana e Martina por todas as risadas que já demos e ainda teremos juntas.

Ao meu orientador, prof. Dr. Afonso Luis Barth e minha co-orientadora, profa. Dra. Andreza Francisco Martins, por todas as oportunidades, por todos os ensinamentos e por acreditarem em minha capacidade.

Às colegas do LABRESIS, pelo auxílio, cumplicidade e companheirismo durante todo o período. Agradeço também por nossa amizade.

Aos colaboradores do HCPA, funcionários dedicados que sempre estiveram dispostos a me auxiliar.

Ao Laboratório Vidally e minhas supervisoras por me proporcionarem um espaço de trabalho amistoso, de estudos e de conhecimento! Sempre serei grata pela oportunidade de trabalhar e crescer junto a esta empresa tão querida.

As minhas colegas de trabalho do Laboratório Vidally por seu apoio e cumplicidade.

EPÍGRAFE

“Seja a mudança que você quer ver no mundo.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Infecções causadas por *Enterobacteriales* produtoras de carbapenemases que abrigam mais de um gene de carbapenemases se espalham, principalmente, pela mobilização de plasmídios e transposons. É importante avaliar esses elementos genéticos móveis para compreender sua disseminação. Este estudo teve como objetivo analisar os elementos genéticos móveis carreadores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} de coprodutores de carbapenemases de *K. pneumoniae* (KpKN). Isolados de *K. pneumoniae* com suscetibilidade reduzida a carbapenêmicos foram obtidos de 2016 a 2023. Para avaliar o ambiente genético de KpKN, 22 isolados foram selecionados para perfil de suscetibilidade antimicrobiana e sequenciamento do genoma completo (WGS) usando plataformas MiSeq e Minlon. O gene *bla*_{KPC-2} foi carregado, principalmente, por IncN/IncFIB (~84.000 pb), um novo plasmídio cointegrado (16/22; 72%) no transposon *Tn4401b*, que também carregava genes que conferem resistência ao trimetoprim. O *bla*_{NDM-2} foi carregado nos únicos dois isolados KpKN recuperados antes de 2020 pelo plasmídio do tipo IncHI1B/IncFIB (~255.000 pb), carregando o gene no transposon *Tn3000*, que também apresentava genes de resistência a aminoglicosídeos. Digno de nota, os isolados obtidos desde 2020 mostraram o gene *bla*_{NDM-1} carregado pelo IncA/C (~170.000 pb) (18/22; 82%) em um “*IS26-flanked pseudo-composite transposon containing ISCR1*”, que também tinha genes que conferem resistência a sulfonamidas, aminoglicosídeos, macrolídeos, quinolonas, anfenicóis, tetraciclina, rifampicina, sulfonamida e trimetoprima. As alterações do plasmídio e do transposon durante os diferentes períodos podem estar relacionadas à maior disseminação de NDM e o grande número de genes de resistência presentes no transposon flanqueado IS26 pode ter aumentado a co-seleção deste plasmídio através do amplo uso de antibióticos durante a pandemia.

Palavras-chave: *bla*_{KPC-2} e *bla*_{NDM-1}; disseminação de *bla*_{NDM-1}; *Klebsiella pneumoniae* coprodutora; plasmídios cointegrados;

ABSTRACT

Evaluation Of The Co-Production Of KPC And NDM In *Klebsiella Pneumoniae*: Characterization Of The Mobile Genetic Elements Involved.

Infections due to carbapenemase-producing *Enterobacterales* harboring more than one carbapenemase gene spreads mainly by plasmid and transposon mobilization. It is important to evaluate these genetic mobile elements to understand their dissemination. This study aimed to analyze the mobile genetic elements carrying *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} of *K. pneumoniae* carbapenemase co-producers (KpKN). *K. pneumoniae* isolates with reduced susceptibility to carbapenems were obtained from 2016 to 2023. To evaluate the genetic environment of KpKN, 22 isolates were selected for antimicrobial susceptibility profile and whole genome sequencing (WGS) using MiSeq and Minlon platforms. The *bla*_{KPC-2} gene was carried mainly by IncN/IncFIB (~84,000 bp), a novel co-integrated plasmid (16/22; 72%) in the *Tn4401b* transposon, which also carried genes that confer resistance to trimethoprim. The *bla*_{NDM-2} was carried in the only two KpKN isolates recovered before 2020 by the IncHI1B/IncFIB plasmid type (~255,000 bp), carrying the gene in the *Tn3000* transposon, which also presented genes for resistance to aminoglycosides. Noteworthy, isolates obtained since 2020 showed the *bla*_{NDM-1} gene carried by the IncA/C plasmid type (~170,000 bp) (18/22; 82%) in an *IS26*-flanked pseudo-composite transposon containing *ISCR1*, which also had genes that confer resistance to sulfonamides, aminoglycosides, macrolides, quinolones, amphenicols, tetracyclines, rifampicin, sulfonamide, and trimethoprim. The plasmid and transposon changes during the different periods could be related to higher dissemination of NDM and the large number of resistance genes present in the *IS26*-flanked transposon may have increased the co-selection of this plasmid through the wide use of antibiotics during the pandemic.

KEYWORDS: co-integrated plasmids, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{NDM-1}, *K. pneumoniae* co-harboring, bioinformatics; spread of *bla*_{NDM-1}; genomic surveillance.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	21
OBJETIVOS	30
Objetivo Geral	30
Objetivos Específicos.....	30
REVISÃO BIBLIOGRAFICA.....	27
Epidemiologia das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS).....	27
Ordem Enterobacterales	27
Mecanismos de Resistência Bacteriana	28
Transferência Vertical de Genes	28
Transferência Horizontal de Genes	29
Mecanismos de Resistência Bacteriana em Bacilos Gram Negativos (BGN)	30
Enterobacterales produtores de Carbapenemases.....	33
Enterobacterales coprodutores de Carbapenemases	36
Grupos de Incompatibilidade Plasmidial e Transposons.....	37
Identificação Laboratorial de Carbapenemases	40
Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)	40
Métodos Fenotípicos.....	40
Métodos Genotípicos	41
JUSTIFICATIVA	45
ARTIGO	47
MATERIAIS E MÉTODOS (Não apresentados no artigo).....	77
Delineamento do Estudo.....	77
Extração Plasmidial.....	77

Preparo de Células Eletrocompetentes.....	77
Transformação Bacteriana.....	78
Análises Bioinformáticas.....	79
Montagem dos Genomas.....	79
Análises do Genoma Completo.....	79
Montagem dos Plasmídios.....	80
Análises dos Plasmídios.....	81
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	83
BIOGRAFIA.....	85
Colaboração em outros Artigos.....	85
Estágio de Pesquisa – FIOCRUZ.....	85
Trabalhos Enviados para Eventos Científicos.....	86
ASPECTOS ÉTICOS.....	87
REFERÊNCIAS.....	89
ANEXOS.....	99
Anexo I – Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP).....	99

INTRODUÇÃO

Uma ameaça global de saúde pública e notável por seu impacto econômico e social é a resistência aos antimicrobianos (AMR). A AMR é um desafio diário aos profissionais da área da saúde devido à escassez de tratamentos eficazes no combate às infecções por microrganismos multirresistentes. As infecções por estes microrganismos estão associadas a elevadas taxas de morbidade e mortalidade (COLOMB-COTINAT et al., 2016). Estima-se que, em 2050, a resistência bacteriana possa resultar em mais de 10 milhões de mortes anualmente e ser a maior causa de morte no mundo, superando os acidentes de trânsito e doenças crônicas como o câncer e o diabetes mellitus (O'NEILL, 2016).

O aumento da disseminação de isolados multirresistentes, em muitos casos se deve a programas de controle e de vigilância, pelo uso abusivo de antimicrobianos. Diante deste cenário, no Brasil foi desenvolvido o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), a fim de garantir a eficácia dos antimicrobianos prevenindo e tratando doenças infecciosas de forma segura e eficaz, ressaltando a responsabilidade na administração destes medicamentos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019). Ainda, com o objetivo de verificar o panorama nacional do gerenciamento de antibióticos em unidades de terapia intensiva surgiram as estratégias do projeto *Stewardship* Brasil (ANVISA, 2019). Através da otimização do uso de antimicrobianos foi possível verificar a redução nas infecções e colonizações por patógenos multirresistentes, no número de prescrições e no uso desnecessário de antimicrobianos, na redução de custos e no tempo de internação (BAUR et al., 2017).

Dentre os principais isolados que causam essas infecções estão os bacilos gram-negativos (BGN), ressaltando-se as espécies da ordem *Enterobacterales*, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (HAILEMARIAM et al., 2021; MOTA et al., 2018). Entre os múltiplos mecanismos de resistência que podem levar a ineficácia aos antimicrobianos, destaca-se a produção de enzimas β -lactamases (MUNITA, J. M. et al. 2016). A resistência aos carbapenêmicos, grupo de antimicrobianos utilizados para tratamento de pacientes com bactérias

multirresistentes, normalmente se deve a produção de enzimas denominadas carbapenemases (CIENFUEGOS-GALLET et al., 2022), cujos genes de resistência em destaque são *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{OXA-48-like} (ABRANTES et al., 2017).

O surgimento de *Enterobacterales* resistente aos carbapenêmicos (Carbapenemase-Producing *Enterobacterales* – CPE) se tornou um problema de saúde muito significativo, pois estes isolados podem ainda carrear genes que levam à sensibilidade diminuída aos monobactâmicos, às fluoroquinolonas, aos aminoglicosídeos e às polimixinas, dificultando ainda mais as opções terapêuticas (CIENFUEGOS-GALLET et al., 2022; MARTINEZ, L. M. et al., 2014).

Uma das espécies de CPE mais prevalentes é a *Klebsiella pneumoniae* (Kp), que é um patógeno oportunista e está associado a infecções graves como bacteremia e sepse (HAILEMARIAM et al., 2021). Além disso, devido à sua capacidade de adquirir diversos genes de resistência antimicrobiana, este patógeno é crítico e pertence à lista de patógenos prioritários da Organização Mundial da Saúde (OMS) para pesquisa e desenvolvimento de novos antibióticos. A produção de enzimas carbapenemases é o principal mecanismo relacionado à resistência aos carbapenêmicos em Kp, mas a prevalência dos genes de carbapenemases varia em todo o mundo, sendo o *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA-48-like} os mais prevalentes entre outros genes carbapenemases em Kp (MA et al., 2023a).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é, provavelmente, a enzima carbapenemase mais prevalente no mundo, embora possa existir uma diferença regional na prevalência das carbapenemases, sendo que a KPC está associada a um mau prognóstico (PORRECA et al., 2018). Entretanto, desde 2008, quando o gene *bla*_{NDM} foi identificado pela primeira vez, a disseminação deste gene tem aumentado significativamente no mundo e desde 2013 tem sido observado no Brasil (CARVALHO-ASSEF et al., 2013; WINK et al., 2021; YONG et al., 2009).

O cenário piora especialmente quando CPE abrigam mais de um gene carbapenemase principalmente por dois motivos: 1) CPE produtores de mais de uma carbapenemase (coprodutores) podem não ser detectados utilizando-se métodos fenotípicos com bloqueadores enzimáticos (ANVISA – Nota Técnica

01/2013); 2) Novos antimicrobianos como ceftazima-avibactam, muito eficientes contra serino-carbapenemases, como KPC, não são ativos no combate a metalo- β -lactamases como NDM (MARSHALL et al., 2017). Em 2022, uma nota técnica da ANVISA foi publicada com o intuito de alertar sobre o aumento da frequência de isolados co-produtores de KPC e NDM, reforçando a necessidade de vigilância e detecção destes patógenos que, principalmente, após a propagação do SARS-CoV-2 e o aumento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), se tornaram mais frequentes (ANVISA; BRCAST; CGLAB;, 2022).

Os genes de carbapenemases em sua maioria estão localizados em elementos genéticos móveis, mais especificamente, em plasmídios e transposons. Isso explica a rapidez com que a disseminação de genes de carbapenemase pode ocorrer visto que esses elementos podem ser transferidos horizontalmente e entre diferentes espécies. (REDONDO-SALVO et al., 2020). Estudo vem sugerindo que os isolados coprodutores de carbapenemases carregam os diferentes genes de carbapenemases em distintos grupos de incompatibilidade plasmidiais e que os elementos móveis envolvidos no processo podem ser disseminados entre diferentes espécies de bacilos gram-negativos. Embora o estudo do plasmidoma e do resistoma bacteriano, bem como do ambiente genético de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} sejam importantes para melhor compreender a rápida disseminação desses genes, apenas poucos trabalhos na literatura realizaram esta avaliação (GAO et al., 2020; ROZALES et al., 2017).

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Realizar avaliação molecular e fenotípica de isolados de *Klebsiella pneumoniae* coprodutores de NDM e KPC.

Objetivos Específicos

- Realizar levantamento epidemiológico dos isolados coprodutores de carbapenemase no Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Estabelecer um banco de amostras de isolados de *Klebsiella pneumoniae* coprodutores de NDM e KPC.
- Avaliar teste fenotípico para a identificação de isolados coprodutores de carbapenemases;
- Caracterizar o(s) plasmídeos dos isolados coprodutores;
- Caracterizar os transconjugantes e transformantes com genes de carbapenemases;
- Caracterizar isolados coprodutores através da técnica de sequenciamento do genoma bacteriano.

REVISÃO BIBLIOGRAFICA

Epidemiologia das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS)

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são notadamente diferentes daquelas que se estabelecem na comunidade. Isso ocorre porque apesar das medidas de controle e prevenção, o ambiente hospitalar e, em especial, os pacientes em cuidado crítico internados, devido a seu estado imunológico comprometido, tornam-se um reservatório para patógenos oportunistas como vírus, fungos e bactérias devido à complexidade dos tratamentos nas UTIs. Outros fatores inerentes à assistência do paciente como a superlotação de hospitais, tempo prolongado de internação, alta rotatividade de funcionários também contribuem de forma significativa para a disseminação de microrganismos patogênicos (CGLAB/DAEVS/SVS/MS, 2022).

Dentre os principais patógenos que causam IRAS estão às bactérias gram negativas, as quais também constituem significativa proporção de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Neste grupo, destacam-se os bacilos gram-negativos da ordem *Enterobacterales*, em especial, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii* e *Enterobacter cloacae*, além de bacilos gram-negativos não fermentadores como *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Acinetobacter baumannii* (HAILEMARIAM et al., 2021; MOTA et al., 2018).

Ordem Enterobacterales

A ordem *Enterobacterales* é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias composta por bacilos gram negativos com exigências nutricionais relativamente simples, portanto, considerados não fastidiosos. São fermentadores da glicose, oxidase negativos, catalase positivos, não esporulados e com características bioquímicas variáveis. São anaeróbios facultativos (crescem na presença e na ausência de oxigênio) e reduzem nitrato a nitrito (BRASILEIRO, I. X. C., & HOSPITALAR, 2004). Estes microorganismos têm capacidade de causar

infecções em basicamente todos os órgãos do ser humano, desde uretrites e infecções urinárias até meningites severas, bacteremias e sepse. São colonizadores da microbiota normal dos seres humanos, tornando o processo de infecção facilitado em determinadas condições clínicas dos pacientes (COLOMB-COTINAT et al., 2016). Além disso, a ordem *Enterobacterales* representa 80% ou mais dos gram negativos de importância clínica, os quais causam 70% das infecções urinárias e 50% da sepse (BRASILEIRO, I. X. C., & HOSPITALAR, 2004).

Uma das espécies mais prevalentes na resistência aos antimicrobianos e também mais preocupantes devido à sua capacidade de adquirir diversos genes de resistência antimicrobiana é a *Klebsiella pneumoniae* (Kp), que é um patógeno oportunista que está associado a infecções graves como bacteremia e sepse. Existem estirpes de Kp que são mais comuns em infecções graves como, por exemplo, o complexo clonal de alto risco 258 que inclui os clones ST11, ST258, ST512 e ST437 (ANDREY et al., 2020; TANG et al., 2020; WANG et al., 2020).

Mecanismos de Resistência Bacteriana

As bactérias apresentam duas formas básicas de resistência aos antimicrobianos: a resistência intrínseca e a resistência adquirida. A resistência adquirida pode ser inerente de dois processos, da pressão seletiva e levar a transferência vertical de genes e/ou devido à inserção de genes via elementos genéticos móveis, caracterizando a transferência horizontal de genes.

Transferência Vertical de Genes

A resistência induzida de genes é o processo mais comum de resistência bacteriana e pode ocorrer devido a uma pressão seletiva, que se dá, principalmente, pelo uso abusivo e irracional de antimicrobianos (LOUREIRO et al., 2016). Em um estudo que avaliou a suscetibilidade aos antimicrobianos durante a COVID 19 estimou que no mínimo 94% de pacientes com COVID-19 em UTIs receberam terapia antimicrobiana apesar de apenas 15% de pacientes apresentarem infecções bacterianas secundárias ao processo viral (GASPAR et al., 2021). Não surpreendentemente, associado a outros fatores, o uso excessivo de

antimicrobianos inapropriados aumentou a resistência durante a pandemia, sendo que a otimização e a responsabilidade na prescrição de antimicrobianos, de acordo com as estratégias *Stewardship*, ainda auxiliaram na prevenção da disseminação de isolados multirresistentes (LAI et al., 2021). O aumento da seleção de bactérias resistentes associa-se ainda ao despejo de medicamentos no solo e na água, à poluição, e, principalmente, ao uso pecuário de antibióticos para o desenvolvimento animal (BENGTSSON-PALME et al., 2018).

A partir dessa pressão seletiva ocorre o processo natural de resistência bacteriana adaptativo em que bactérias mais resistentes fazem uso de diversos mecanismos para sobreviver e evoluir, entre os quais se destacam: a diminuição da permeabilidade celular (alteração de canais de porinas); a ativação de bombas de efluxos (aumento da eliminação do antibiótico da célula); a alteração do sítio de ligação e a inativação enzimática (produção de enzimas hidrolíticas)(MUNITA, J. M. et al., 2016).

Transferência Horizontal de Genes

A disseminação de genes de resistência mais preocupante a nível epidemiológico e clínico ocorre devido à transferência horizontal de genes (HGT) através da mobilidade gênica via elementos genéticos móveis (transposons, plasmídios e integrons) a qual tende a ocorrer em maior frequência entre bactérias relacionadas filogeneticamente (BENGTSSON-PALME et al., 2018; SMILLIE, C. et al., 2011). Basicamente, existem três mecanismos de HGT - conjugação, transformação e transdução.

O principal e mais comum dos processos de HGT é a conjugação, em que através de um *pilus* sexual (codificado por plasmídio conjugativo), uma célula doadora (denominada "+") que apresenta região do DNA chamada de fator de fertilidade (ou fator F) transfere o DNA plasmidial para uma célula receptora (denominada "-"). Já, a transformação ocorre quando a célula bacteriana está apta (denominado estado competência) a receber DNA exógeno proveniente de fragmentação ou decomposição bacteriana. Em análises *in vitro* a captação de DNA extracelular ocorre através de poros gerados na membrana externa devido a

diferentes tipos de processos, dentro os quais se pode destacar a eletroporação e o choque térmico. Diferente do que ocorre na conjugação, na transformação, o DNA exógeno necessita integrar-se ao cromossomo bacteriano para adquirir estabilidade. Por outro lado, a transdução é uma mobilidade gênica realizada por bacteriófagos (vírus bacterianos) que apresentem ciclo não lisogênico, mais relacionado à gram positivos (REDONDO-SALVO et al., 2020; SOUCY et al., 2015).

Diante de uma variedade de elementos genéticos móveis vale ressaltar os plasmídios, os quais são constituídos de DNA extracromossomal circular, com capacidade autorreplicante e autotransmissão celular e com, relativamente, poucos genes. Os plasmídios são responsáveis por fornecerem às bactérias características acessórias, logo, apresentam genes não codificantes de características essenciais bacterianas, mas sim adaptativas. Portanto, não são todas as bactérias que os apresentam e uma mesma bactéria pode apresentar múltiplos plasmídios. Ainda, podem ser divididos em dois grande grupos: conjugativos, que apresentam os genes responsáveis por sua própria transmissão através da conjugação e os não conjugativos. Ainda, os plasmídios são classificados em diferentes grupos de incompatibilidade, sendo considerados vetores perfeitos para a disseminação da resistência aos antimicrobianos, devido sua capacidade replicativa em diferentes hospedeiros e de adquirir novos genes de resistência (BENGTSSON-PALME et al., 2018; CARATTOLI, 2013). Os plasmídios podem apresentar também alta frequência de recombinação (Hfr), ou seja, podem ainda mobilizar parte do cromossomo bacteriano (ADELBERG et al., 1965).

Mecanismos de Resistência Bacteriana em Bacilos Gram Negativos (BGN)

Os mecanismos que levam a resistência podem depender de alterações na estrutura biológica das bactérias. Diante disso, é importante ressaltar alguns componentes das bactérias gram negativas: A presença de duas membranas, uma interna e outra externa que contém lipopolissacarídeos (LPS), lipopoliproteína capaz de induzir de forma potente a resposta imune (OLIVEIRA, J. et al., 2020); A presença da proteína ligadora de penicilina (PBP), uma enzima transpeptidase que

é fundamental para síntese do peptídeoglicano, necessário para a integridade e rigidez da parede celular bacteriana; e o espaço periplasmático que se situa entre as duas membranas e são o local onde alguns antibióticos, as enzimas que os degradam e a PBP precisam se acumular e permanecer, para modular a síntese da parede celular (MACHADO, 2019).

A produção de enzimas que degradam antibióticos, como as β -lactamases, se destaca como um dos principais mecanismos de resistência nos BGN. Os β -lactâmicos são antibióticos que atuam na ligação a PBP devido à alta afinidade do anel β -lactâmico pela enzima, levando a uma lise osmótica, comprometimento da integridade celular e com isso a morte celular. Assim como os β -lactâmicos, as β -lactamases são enzimas que também são liberadas no espaço periplasmático, e, podem levar a hidrólise do anel β -lactâmico, através da quebra da ligação amida, e, conseqüentemente, a incapacidade de inibir a síntese da parede celular, resultando em falha terapêutica (MUNITA, J. M. et al., 2016).

As β -lactamases são enzimas de grande relevância clínica, uma vez que algumas dessas enzimas, em particular as carbapenemases, podem conferir resistência a praticamente todas as drogas da classe mais abundante de antimicrobianos: os β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) (MUNITA, J. M. et al., 2016). Existem basicamente dois esquemas para a classificação destas enzimas: 1) Classificação de Ambler de 1980, a qual se baseia na estrutura molecular da enzima de acordo com sua sequência de aminoácidos, compondo quatro grandes categorias: A, B, C e D (AMBLER, 1980); e 2) Classificação de Bush e Jacoby: originalmente descrita em 1995 e revisada em 2010 a qual se baseia numa classificação funcional das enzimas compondo três grupos (1, 2 e 3) (BUSH et al., 2020; BUSH et al., 2010). A tabela 1 mostra de forma resumida um quadro da classificação das β -lactamases.

Em BGN, as classes de enzimas hidrolíticas mais frequentes são as β -lactamases de espectro estendido ("*Extended-Spectrum β -Lactamases*" - ESBL) e as carbapenemases. As ESBL conferem resistência aos monobactâmicos e a maior parte das gerações de cefalosporinas e podem ser encontradas em BGNs

provenientes de infecções em pacientes hospitalizados, assim como na comunidade. Entre as ESBLs o gene mais prevalente é o *bla*_{CTX-M} e, na maioria das vezes, é identificado em isolados de *Escherichia coli* e/ou *Klebsiella pneumoniae*, tanto no Brasil quanto em outras regiões do mundo (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2022). Nestas infecções, o BGN pode ser suscetível à terapia com carbapenêmicos, grupo de β -lactâmicos que não são hidrolisados pelas ESBLs (ANVISA, 2019, 2020). Entretanto, muitos BGNs podem também apresentar resistência aos carbapenêmicos, o que normalmente se deve à produção de enzimas denominadas carbapenemases (CIENFUEGOS-GALLET et al., 2022)

Os isolados produtores de carbapenemases além de hidrolisarem todos os β -lactâmicos podem, muitas vezes, apresentar sensibilidade diminuída aos monobactâmicos, às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos, limitando ainda mais as opções terapêuticas. Entre as β -lactamases, as carbapenemases são as enzimas que apresentam maior capacidade hidrolítica dos carbapenêmicos (CIENFUEGOS-GALLET et al., 2022; MARTINEZ, L. M. et al., 2014).

Tabela 1. Classificação das principais β -lactamases. Adaptado de Bush and Fisher, 2016

Característica do sítio ativo	Serino			Metallo (Zn ²⁺)	
Enzimas β -lactamases representantes	KPC, BKC, GES	ESBLs (CTX-M)	AmpC	OXA-23, OXA-48	NDM, IMP, VIM, SPM
Classificação de Ambler	Classe A		Classe C	Classe D	Classe B
Grupo Molecular	Classe A		Classe C	Classe D	Classe B
Classificação de Bush e Jacoby	2 (Subgrupo 2f)	2 (Subgrupo 2be)	1	2 (Subgrupo 2df)	3
Grupo Funcional	Classe A		Classe C	Classe D	Classe B
Perfil de Sensibilidade	Avibactam			Aztreonam	

Enterobacterales produtores de Carbapenemases

A *K. pneumoniae* é a espécie predominante de CPE disseminando estas enzimas e um estudo apontado pela ANVISA, mostrou que até quase 50% dos isolados de *K. pneumoniae* hospitalares são resistentes aos carbapenêmicos e às cefalosporinas de última geração, como cefepime (ANVISA, 2017).

A presença de KPC não é exclusiva apenas em isolados de *Klebsiella* spp. e já foi descrita em praticamente todas as espécies da Ordem *Enterobacterales* (PORRECA et al., 2018). O primeiro gene de *bla*_{KPC} foi descrito em 1996 nos Estados Unidos e atualmente mais de 150 variantes já foram descritas em BGN, sendo a variante *bla*_{KPC-2} endêmica no Brasil e também a mais reportada no mundo (DING et al., 2023). A KPC, juntamente com as enzimas GES e BKC apresentam

como característica de seu sítio ativo o grupo serino, compondo o grupo das serino- β -carbapenemases, pertencem à classe A de Ambler ou 2f de Bush e Jacoby.

Na classe B de Ambler ou 3a de Bush e Jacoby, estão as enzimas que usam o zinco (Zn^{2+}) ou outros cátions divalentes como cofator enzimático, e, devido a esta característica de seu sítio ativo, foram denominadas metalo- β -Lactamases (M β Ls) (cujas principais são NDM, VIM e IMP). Por apresentarem esta característica, estas enzimas são inibidas por quelantes de metais, como o ácido etileno-diamino-tetrácetico (EDTA). Este grupo de carbapenemases não apresenta sensibilidade frente aos carbapenêmicos, mas podem apresentar perfil suscetível aos monobactâmicos, como o aztreonam. Em virtude disso, monobactâmicos poderiam ser indicados para o tratamento das infecções por bactérias produtoras de MBL com chance de sucesso terapêutico, no entanto, como os isolados com MBL podem apresentar outros genes de resistência (como ESBL), eles podem não responder ao tratamento com aztreonam (LIMA et al., 2022). No grupo das MBL, destaca-se a enzima *New Delhi Metallo β -Lactamase* (NDM) que tem apresentado aumento significativo nas Américas e na Europa, tendo sido isolada a primeira vez na Índia em 2008 (YONG et al., 2009). Isso indica a rápida disseminação deste gene de resistência via elementos genéticos moveis, principalmente, em um mundo globalizado e com intenso intercâmbio de pessoas (BUSH et al., 2020; KUMARASAMY et al., 2010). Desde 2013, a NDM está circulando no Brasil e um estudo que avaliou a presença do gene em bactérias recuperadas de nove estados diferentes mostrou sua intensa disseminação por todo o país, bem como resultados semelhantes foram verificados em hospitais do Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2022; ROZALES et al., 2014; WINK et al., 2021). Até 2023, já foram descritas 37 variantes de NDM e a variante NDM-1 é a principal M β L reportada mundialmente em diferentes espécies de enterobactérias (MA et al., 2023).

Inicialmente, se entendia que as enzimas carbapenemases fossem codificadas apenas por genes cromossômicos, mas com os avanços da biologia molecular, verificou-se que, na verdade, os genes que codificam estas enzimas

estão alocados em elementos genéticos móveis, mais especificamente, em plasmídios e transposons. A localização plasmidial dos genes de carbapenemases contribui de forma muito significativa para a sua disseminação, em função da transferência horizontal que pode ocorrer ainda entre espécies diferentes. A grande facilidade de transferência genética entre as bactérias, dificulta ainda mais o tratamento de pacientes com infecções causadas por CPE (BENGTSSON-PALME et al., 2018).

Embora a maior parte das infecções causadas por bactérias resistentes aos carbapenêmicos seja devido à produção de enzimas carbapenemases, outros mecanismos de resistência também podem levar a hidrólise dos carbapenêmicos, como por exemplo, a super expressão de bombas de efluxo e alterações na PBP. Assim, a resposta ao tratamento das infecções causadas por CPE é variável de acordo com o mecanismo e classe de carbapenemase identificada (CODJOE et al., 2017).

Avibactam é um exemplo de inibidor de β -lactamase não- β -lactâmico aprovado desde 2015 pelo FDA (Food and Drug Administration) e desde 2018 no Brasil pela ANVISA, em associação a uma cefalosporina, a ceftazidima, para tratamento de infecções causadas por BGN multirresistentes (WANG et al., 2016). Entretanto, apesar de serem ativos contra isolados produtores de serino- β -lactamases, ou seja, classe A (KPCs, ESBLs), classe C (AmpC) e, algumas enzimas da classe D (como OXA-23, OXA-48), não são eficientes no combate a isolados produtores de M β L (classe B) como NDM, VIM e IMP (ABBOUD et al., 2016). Entretanto, isolados carreando múltiplas carbapenemases vem sendo relatados, embora de forma esporádica, ao longo dos anos (BES et al., 2021; BORALLI et al., 2023; GAO et al., 2020; PEREIRA et al., 2015a, 2015b; ROZALES et al., 2017a; WEI et al., 2018; XU et al., 2020; YU et al., 2016). Esses isolados são denominados coprodutores e além de apresentarem duas ou mais carbapenemases podem ainda ter outros mecanismos de resistência e apresentar resistência à maioria das classes de antimicrobianos disponíveis de tratamento, tornando essas bactérias ainda mais resistentes à terapia (LORENZIN et al., 2022; SEIFFERT et al., 2014).

Enterobacterales coprodutores de Carbapenemases

Enterobactérias coprodutoras de enzimas de resistência são reportadas desde a década de 80, mas o aumento exponencial destes isolados se deu nos últimos cinco anos, quando emergiram as associações com múltiplas carbapenemases (CHANAL et al., 1988; GAO et al., 2020). *K. pneumoniae* é a principal espécie carreadora de duas ou mais carbapenemases, ainda que outras enterobactérias, como *E.coli* e *E. hormaechei* sejam relatadas com frequência (KIM et al., 2021; LIU et al., 2022).

Até 2023, no Brasil, as principais enzimas reportadas em *Enterobacterales* coprodutoras foram KPC e NDM (BORALLI et al., 2023; WINK et al., 2021). Este é um quadro divergente dos relatos em outros países das Américas e da Europa, onde a principal associação de *bla*_{KPC-2} se dá com *bla*_{VIM}, enquanto que *bla*_{NDM-1} está mais associada à *bla*_{OXA-48-like} (BUSH; BRADFORD, 2020). Em 2020 um estudo brasileiro que realizou um levantamento epidemiológico em *swabs* de vigilância a fim de verificar a relação genética entre isolados contendo *bla*_{NDM}, através da técnica de MLST (*Multilocus Sequence Typing*) verificou pela primeira vez no país quatro carbapenemases em isolados de *K. pneumoniae*, incluindo *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA-48-like} (FLORES et al., 2020).

A pandemia de COVID-19 fez aumentar as taxas de microorganismos multirresistentes, bem como o aumento da coprodução de enzimas de carbapenemases, como *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}. Dados da ANVISA obtidos durante 2022 mostraram que quase 60,0% dos isolados com esta coprodução foram Kp no Brasil (ANVISA; BRCAS; CGLAB, 2022). Acredita-se que o aumento e o uso inadequado de antimicrobianos durante o período pandêmico possam ter exercido pressão seletiva promovendo a seleção de bactérias resistentes aos antibióticos.

Isolados coprodutores podem apresentar resistência a altos níveis de carbapenêmicos - Concentração Inibitória Mínima (CIM) acima de 32 µg/mL, bem como aos aminoglicosídeos, às fluoroquinolonas, aos macrolídeos e às sulfonoamidas. Nestas situações pode se fazer necessário o uso de drogas mais antigas, mas mais tóxicas como as polimixinas E (colistina) e B. As polimixinas bem

como a tigeciclina, apesar de efeito farmacocinético e farmacodinâmico não ser tão eficiente, são utilizadas como último recurso eficaz para estes isolados (VARDAKAS et al., 2017). Associações promissoras e mais seguras para o tratamento de bactérias que apresentem a coprodução de KPC e NDM se baseiam na combinação de monobactâmicos, como aztreonam (ATM), com os novos inibidores de serino- β -carbapenemases, como avibactam (AVI) (MARSHALL et al., 2017; MAURI et al., 2021; ZHU et al., 2022). Entretanto, ainda não existem discos e fitas de gradiente de ATM-AVI para determinar a suscetibilidade *in vitro* destas drogas para uso pelo método tradicional de disco-difusão, sendo necessária a realização de testes sinérgicos (LIMA et al., 2022). Ainda, uma nova droga aprovada para este uso no Brasil é o Cefiderocol, uma cefalosporina siderófora capaz de ser absorvida pela bactéria através de ligação ao ferro (KAYE et al., 2023).

A caracterização dos elementos genéticos moveis que contêm os genes de isolados coprodutores em CPE, ainda é uma questão que requer mais estudos moleculares afim de verificar a correta alocação dos genes de resistência nestes elementos, principalmente em plasmídios. Sugere-se que estes múltiplos genes de resistência estejam abrigados em plasmídios diferentes uma vez que os poucos estudos que avaliaram o sequenciamento do genoma bacteriano e a extração plasmidial determinaram um padrão heterogêneo de plasmídios contendo genes diferentes (BORALLI et al., 2023; GAO et al., 2020; ROZALES et al., 2017a; TANG et al., 2020).

Grupos de Incompatibilidade Plasmidial e Transposons

Em 1971, a primeira classificação de tipagem molecular de plasmídios foi descrita a partir de técnicas de conjugação, dividindo-os em cinco grupos de incompatibilidade (Inc) (W, F, I, N e P). No final da década de 70, já haviam sido descritos 23 grupos de incompatibilidade plasmidial. Foi constatado que a interação entre dois plasmídios pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade resultaria na destruição de um deles, sendo assim, não podendo coexistir na mesma célula, em função de mecanismos de replicação em comum (DATTA, 1979; DATTA et al., 1971). Em *Enterobacterales* os plasmídios mais descritos e associados à

mobilização de genes de resistência são: IncF, IncI, IncA/C, IncL, IncN e IncH (ROZWANDOWICZ et al., 2018).

O gene *bla*_{KPC} foi relatado em diversos plasmídios Inc como IncF, IncL/M e, principalmente, o IncN (CARATTOLI, 2013). Além disso, o gene *bla*_{KPC} também está associado a um transposon, o *Tn4401* que apresenta diversas variantes, sendo o *Tn4401b* o mais comum no Brasil cujos genes do ambiente genético do transposon estão representados na Figura 1 abaixo (VERA-LEIVA et al., 2017).

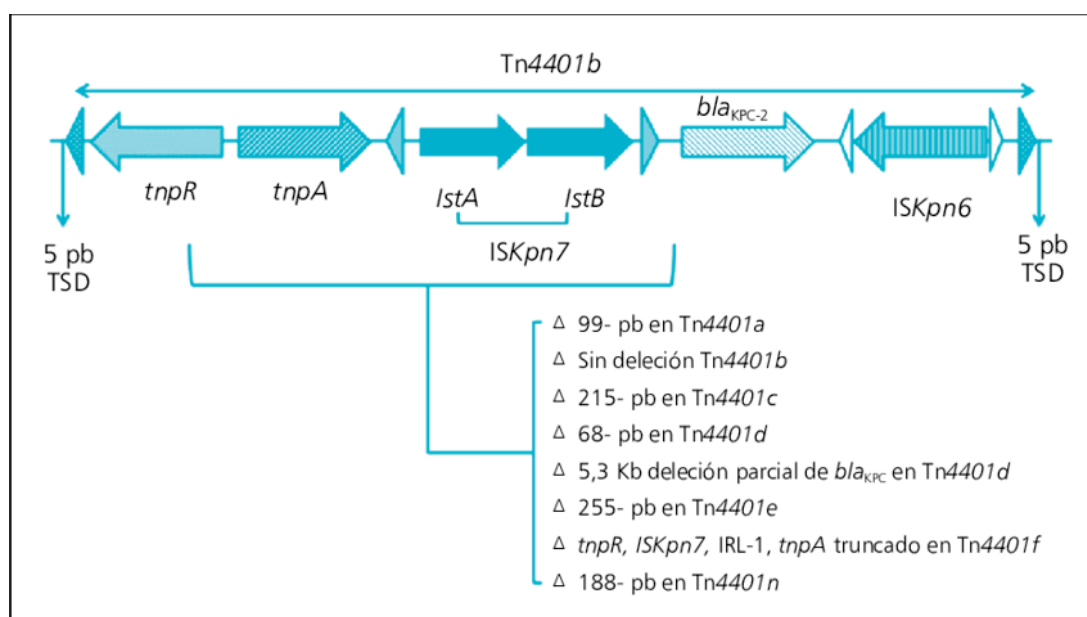


Figura 1. Representação esquemática do ambiente genético do gene *bla*_{KPC} no transposon *Tn4401* e suas isoformas (VERA-LEIVA et al., 2017).

Por outro lado, *bla*_{NDM} é comumente associado aos grupos IncF (IA, IB e II), IncL/M, IncA/C e IncHI1, sendo os dois últimos mais frequentes (CAMPOS et al., 2015; VILLA et al., 2012). Vale ressaltar ainda que o gene *bla*_{NDM} parece estar inserido entre sequências de inserção diretas, o *ISAb*₁₂₅, resultando em transposon composto, o *Tn125*, ou ainda, entre *IS3000* resultando no transposon *Tn3000* (ACMAN et al., 2022; CAMPOS et al., 2015). Estudos do *Tn125* mostraram novo gene de resistência *ble*_{MBL} que leva a resistência à bleomicina. O gene *ble*_{MBL} está associado ao gene *bla*_{NDM} sendo que ambos são expressos pelo mesmo promotor. Deve ser ressaltado que o ambiente genético do gene *bla*_{NDM}

Identificação Laboratorial de Carbapenemases

Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

Um isolado é caracterizado e encaminhado para a triagem de carbapenemases usualmente quando seu teste de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) apresenta perfil de sensibilidade reduzida ou quando é resistente aos carbapenêmicos, sendo o meropenem o antibiótico que apresenta melhor sensibilidade e especificidade para triagem de CPE utilizando o ponto de corte para triagem de carbapenemases o diâmetro de halo <28mm (BRCAST, 2017, 2021). Entretanto, é importante ressaltar que os valores de ponto de corte de triagem para possíveis produtores de carbapenemases são diferentes dos que categorizam a resistência/sensibilidade, uma vez que CPE podem apresentar halos de inibição maiores que os pontos de cortes clínicos para resistência. No Brasil, o comitê que regulamenta e padroniza o TSA é o *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (BrCAST) recomenda que a partir da sensibilidade reduzida os testes fenotípicos devem ser realizados para identificar a presença e a classe da enzima (BRCAST, 2022).

Métodos Fenotípicos

Existem diversas metodologias fenotípicas para detecção de carbapenemases, as quais incluem testes baseados no uso de inibidores (bloqueadores) enzimáticos associados a discos de carbapenêmicos; métodos de inativação de carbapenêmicos (mCIM e eCIM); reações colorimétricas/acidimétricas como o Carba NP e o Blue-Carba e as técnicas imunocromatográficas (Resist-3 OKN e o NG-Test Carba). Cabe mencionar que apenas as técnicas imunocromatográficas identificam de forma específica qual a enzima carbapenemase, sendo que os outros métodos fenotípicos mencionados acima permitem apenas identificar a presença ou ausência de carbapenemases, e/ou, classifica-las de acordo com seu sítio ativo (serino e/ou metalo) (ABRANTES, 2017; ANVISA, 2020; BIR, 2019). Os métodos de hidrólise de carbapenêmicos também podem ser realizados através de metodologias automatizadas como o MALDI-TOF, a fim de verificar a presença de carbapenemases, sendo que ainda, pela análise dos picos das enzimas pode-se identificar qual a classe de carbapenemase, no caso da enzima KPC (WILHELM et al., 2021).

Os testes fenotípicos tradicionais podem não apresentar a mesma sensibilidade e especificidade na detecção dos isolados coprodutores de carbapenemases (MARSHALL et al., 2017; MAURI et al., 2021). Dentre as técnicas mais utilizadas para identificação da coprodução das enzimas NDM (metalo-carbapenemase) com KPC (serino-carbapenemase) se destacam as técnicas baseadas na capacidade da NDM não ser hidrolisada pelo monobactâmico aztreonam (AZT) e KPC não ser hidrolisada pela combinação de ceftazidima + avibactam (CAZ-AVI). Desta forma, testes como o sinergismo através de disco aproximação de CAZ-AVI com AZT e a pré-difusão dos mesmos antibióticos mostram-se eficientes para esta identificação (LIMA et al., 2022).

Métodos Genotípicos

A maior parte dos testes fenotípicos, apesar de oferecerem resultados relativamente rápidos e acessíveis, não têm a capacidade discriminatória do tipo específico da enzima carbapenemase. Os testes moleculares permitem a identificação e confirmação da presença do gene de resistência ainda que a detecção do gene não garanta que ele esteja expresso no isolado. De toda forma, os métodos moleculares são considerados o padrão ouro para detecção de carbapenemases, entretanto, estas técnicas requerem mão de obra altamente qualificada, equipamentos de biologia molecular e outros custos adicionais. As técnicas moleculares mais utilizadas para detectar genes de resistência se baseiam na metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nas técnicas de PCR, primeiro é feita a extração do ácido nucléico bacteriano com posterior amplificação do gene com *primers* específicos para os diferentes genes. Existem outras técnicas moleculares como o *microarray* e o sequenciamento do genoma bacteriano mas essas já são técnicas de custo muito significativo (ANVISA, 2020; BAEZA et al., 2019).

A técnica de PCR com *primers* específicos seguida da análise de curva de dissociação (HRM, *High Resolution Melting Analysis*) é uma técnica que vem ganhando cada vez mais espaço nos laboratório pois é capaz de amplificar e identificar diferentes alvos de DNA em uma mesma reação (PCR multiplex). Assim,

com a técnica de PCR Multiplex HRM é possível detectar, por exemplo, os cinco principais genes de carbapenemases em *Enterobacteriales*: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{KPC}, *bla*_{GES} and *bla*_{OXA-48-like} (MONTEIRO et al., 2012).

O sequenciamento do genoma bacteriano é utilizado para caracterizar o resistoma bacteriano, apontando genes de resistência e, também, identificar a localização molecular dos genes de resistência através da análise do plasmidoma. Assim, é possível avaliar o contexto genético dos genes de carbapenemases nos isolados bacterianos. A primeira metodologia de sequenciamento proposta foi o método de Sanger que ainda é largamente utilizado, com algumas modificações. A técnica de Sanger apresenta custo relativamente baixo, entretanto, apenas pequenos fragmentos de DNA conhecidos podem ser sequenciados, o que permite apenas avaliar mutações pontuais no fragmento amplificado. O Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* - NGS) surgiu como técnica capaz de sequenciar uma parte maior do genoma bacteriano, ou ainda o genoma total. Os dados gerados pelo NGS são importantes no contexto de investigações epidemiológicas, pois além da detecção de genes de resistência (como as carbapenemases), permite avaliar o contexto genético no qual o gene está envolvido, além de gerar dados de tipagem molecular e várias outras informações do genoma bacteriano (mutações) (PAREEK, 2011).

De uma forma geral, o NGS pode ser feito através de técnicas que permitem o sequenciamento de sequências longas (*long-reads*) ou curtas (*short-reads*) do DNA bacteriano. O sequenciamento por *short-reads* produz sequências curtas após a montagem do genoma, podendo chegar até 300 pb de comprimento. Esse tipo de técnica é a mais disseminada e estima-se que contemple em torno de 90% dos sequenciamentos realizados no mundo, na maior parte das vezes com sequenciadores da ILLUMINA (PERVEZ et al., 2022). Por outro lado, a metodologia Minlon™ (Oxford Nanopore Technologies) faz parte da última geração de sequenciadores, é portátil e tem a capacidade de gerar longas sequências após a montagem do genoma (*long reads*), permitindo assim realizar de forma mais satisfatória a análise de plasmídios de forma completa que apresentam tamanho de

fragmentos de em média 1kb até mega-plasmídios de 400kb. Estima-se que cada *flow cell* do Minlon possa gerar até 30Gb de dados de sequências de DNA (GEORGE et al., 2017; LOMAN et al., 2014).

JUSTIFICATIVA

A emergência de CPE devido a um gene de carbapenemsase é um problema de saúde pública muito relevante, pois limita drasticamente as opções terapêuticas. CPE com mais de um gene de carbapenemase (cepas coprodutoras), tornam o problema ainda mais complexo devido à falta de antibióticos eficazes. A presença dos genes de carbapenemases em elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons contribuem significativamente para sua rápida e significativa disseminação entre os isolados bacterianos. Desta forma, se faz crucial entender e compreender as características destes isolados, assim como, identificar seus elementos genéticos móveis, em especial os plasmídios e transposons. O sequenciamento do genoma completo destaca a importância crítica do estabelecimento de programas de vigilância genômica ao gerar dados que auxiliam nas medidas de controle e de disseminação de isolados multirresistentes, assim como, identificando os principais genes do resistoma bacteriano pode-se auxiliar na escolha terapêutica dos pacientes. Desta maneira, este estudo busca avaliar isolados de *Klebsiella pneumoniae* coprodutores de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} e caracterizar seus elementos genéticos móveis.

ARTIGO

O presente trabalho foi submetido em janeiro de 2024 em revista internacional indexada no Qualis com classificação A1.

MATERIAIS E MÉTODOS (Não apresentados no artigo)

Delineamento do Estudo

O presente projeto trata de um estudo analítico transversal e longitudinal experimental que visa avaliar o contexto genético de múltiplos genes de resistência em isolados de *Klebsiella pneumoniae*. O projeto do estudo foi aprovado no comitê de ética em pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob número 2022-0375.

Extração Plasmidial

Os plasmídios foram extraídos e purificados a partir de isolado crescido overnight em 5mL de caldo Muller Hinton utilizando o kit QIAprep Miniprep da Qiagen, baseado na extração alcalina do plasmídio, conforme técnica descrita previamente por Birboim e Doly com algumas modificações (BIRNBOIM, H. C; DOLY, 1979). O princípio do procedimento é o isolamento plasmidial através da lise alcalina realizada por NaOH e a renaturação DNA circular por ação de acetato de sódio.

Realizamos pequenas modificações no protocolo do kit a fim de melhorar a desempenho da técnica. Os plasmídios foram eluídos da coluna de sílica utilizando água ultra-pura aquecida à 65°C a fim de facilitar a eluição de plasmídios maiores. Ainda, optamos por eluir apenas 30uL a fim de aumentar a concentração plasmidial no eluído final.

Os plasmídios eluídos foram submetidos a uma qPCR-HRM com primers para detectar *bla*_{NDM}, e *bla*_{KPC} para confirmar se os mesmos haviam sido eluídos da coluna de purificação. A partir desta confirmação os plasmídios foram armazenados a -20°C para realizar técnica de transformação.

Preparo de Células Eletrocompetentes

As células eletrocompetentes foram preparadas da seguinte forma: uma alíquota de *Escherichia coli* TOP10 armazenada em glicerol foi repicada em placa de Luria Bertani agar e incubada a 37°C overnight. Uma colônia pura foi

inoculada em 10 mL de LB caldo em falcon de 50mL a 37°C overnight sob agitação de 150 a 200 rpm. A OD_{600nm} da cultura foi medida em espectrofotômetro para determinar a diluição da próxima cultura, a fim de garantir que a mesma inicie na escala de 0,05, utilizando a seguinte formula: OD_{600nm} da cultura inicial X Volume da cultura inicial a ser “diluído” (Vii) = OD_{600nm} inicial da sua nova cultura (0,5) X volume final da nova cultura (LB caldo aquecido (Vi) + volume da cultura que vou adicionar (Vii)). Inoculamos 200mL de Vi de LB caldo pré-aquecido a 37°C para atingir a OD 0,05 em Erlenmeyer de 1L estéril. Ao atingir a OD desejada colocamos imediatamente em gelo picado por 30 minutos e dividimos o volume em falcons 50mL refrigerados. A partir deste momento foram realizadas múltiplas centrifugações em centrifugas refrigeradas a 4°C (3.500 - 3.800 x g por 12-15min). A primeira, segunda, terceira e quarta lavagem foram realizadas da seguinte forma: Centrifuga, descarta sobrenadante e ressuspende o pellets em $\frac{1}{2}$ Vi utilizando H2O Milli-Q. A terceira e quarta lavagens foram realizadas utilizando H2O Milli-Q + Glicerol a 10%. Após a ultima lavagem ressuspendemos em 60 uL de H2O Milli-Q + Glicerol a 10% e distribuímos em alíquotas de 40uL em eppendorf estéril e refrigerados. Armazenamos imediatamente em freezer -80°C (LESSARD, 2013).

Transformação Bacteriana

Os plasmídios extraídos foram transformados utilizando uma cepa de *Escherichia coli* TOP10 eletrocompetente. Todo o material a ser utilizado (cubas de eletroporação, eppendorf, ponteiras e pipetas) foi refrigerado. A programação do eletroporador para cubetas de 2mm foi: 2.5Kv (ou 2500V), 200 Oms, 25uF. Foram misturados 3uL de plasmídio em eppendorf junto de 2uL de água ultra-pura e adicionado 40uL da célula competente e colocadas na cubeta. Após ter dado o choque e foi colocado imediatamente 960uL de SOB pré-aquecido e transferir para eppendorf para recuperação das células por 1h sem agitação de 100 rpm a 37°C. Após o tempo, o eppendorf foi centrifugado a 8000 rpm por 5 minutos. 750 uL de sobrenadante foram retirados e o pellet ressuspenso no remanescente para ser inoculado na placa com pressão seletiva utilizando uma alça de Drigalsky.

Os transformantes foram selecionados em agar Luria-Bertani contendo 2 mg/L de imipenem e as placas incubadas a 37° C de 18 às 24h. As colônias foram identificadas em MALDI-TOF e três colônias de *E. coli* TOP10 transformadas foram submetidas a uma qPCR-HRM com *primers* para detectar *bla*_{NDM}, e *bla*_{KPC} para confirmar se os plasmídios haviam sido transferidos por eletroporação para a cepa competente de *E. coli* TOP10 (LESSARD, 2013; ROZALES et al., 2017b).

Análises Bioinformáticas

Montagem dos Genomas

As leituras (*reads*) brutas (Arquivo FastQ) geradas pelo sequenciamento de *short reads* foram trimadas em qualidade (Q>30). A montagem dos *contigs* foi realizada no software QIAGEN CLC Genomics Workbench (versão 5.5.2) tanto para a montagem de short reads quanto para a montagem híbrida (*short e long reads*) em que os *gaps* (buracos do genoma) foram fechados através da união dos dois sequenciamentos. Um arquivo FASTA foi gerado e submetido à anotação primária das CDS geradas na montagem através da ferramenta “*Rapid prokaryotic genome annotation*” (Prokka) dentro da plataforma Galaxy, gerando um arquivo genbank (gbk) (SEEMANN, 2014). Este arquivo foi aberto no *software* Geneious Prime® 2023.1.2 para realizar a curadoria manual das principais CDS e genes de interesse, as quais foram identificadas através do uso de um banco de dados de proteínas do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) que identifica regiões de similaridade entre as proteínas e nucleotídeos.

Análises do Genoma Completo

O Instituto Pasteur foi usado como preditor da tipagem molecular *in silico* dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* através da determinação da *Sequence Typing* (ST). Os genes de resistência aos antimicrobianos ou resistoma bacteriano foram identificados de forma *in silico* usando o banco de dados QIAGEN Microbial Insight-Antimicrobial Resistance (QMI-AR). Os plasmídios presentes na amostra ou plasmidoma bacteriano foram identificados através da

ferramenta “PlasmidFinder” presente na plataforma *Center for Genomic Epidemiology* (CGE) (CARATTOLI et al., 2014).

Montagem dos Plasmídios

A montagem dos plasmídios foi realizada de duas formas distintas, dependendo do tipo de dado gerado. As amostras que foram sequenciadas por short e *long reads* foram analisadas no Geneious Prime® 2023.1.2. Os *contigs* gerados que continham os genes de resistência de interesse para nosso estudo (*bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*) foram analisados. Cada *contig* inteiro (sem ser trimado ou concatenado) foi extraído e identificado no *PlasmidFinder* para predizer qual o grupo de incompatibilidade (Inc) plasmidial que estava carregando o gene. Identificando este plasmídio buscamos os genes que contemplam o pMLST e que são essenciais para caracterizar o Inc. Os genes foram identificados no *contig* e a origem de replicação (*ori*) (gene *repA*) foi marcada (CARATTOLI et al., 2014). A partir da *ori* podemos verificar as sobreposições antes e depois da mesma, concluindo se o plasmídio está circularizado ou não. Para a validação desta montagem *De novo* realizamos um alinhamento por referência através do *plugin* “Bowtie2” no Geneious utilizando as *reads* (leituras) do Illumina contra o *contig* montado como sendo o plasmídio inteiro. Já aquelas amostras que foram sequenciadas apenas pela tecnologia de short *reads* não se faz possível determinar se os plasmídios estão circularizados através da montagem *De novo*, uma vez que por não ter o sequenciamento por *long reads* não se pode realizar o *gap closer* e determinar o tamanho exato de cada um dos plasmídios. A montagem neste caso foi realizada através de um mapeamento e alinhamento por referência da seguinte maneira: Verificamos o plasmidoma e os possíveis plasmídios na amostra. Realizamos o alinhamento utilizando como referência os plasmídios circularizados pela montagem híbrida. A cobertura e os genes de interesse foram verificados e quando houvesse correspondência considerávamos como sendo o Inc de interesse.

Análises dos Plasmídios

Os plasmídios montados foram submetidos a um banco de dados de nucleotídeos do BLAST a fim de verificar se já haviam depósitos com sequencias similares as nossas ou se seriam dados novos. Ainda, desta forma pudemos realizar análises de comparação entre os nossos isolados e outros previamente depositados no *National Center for Biotechnology and Information* (NCBI). Alguns depósitos foram selecionados e as análises de comparação foram realizadas no Geneious, BLAST Ring Generator (BRIG) (ALIKHAN et al., 2011).

Para realizar a análise do ambiente genético móvel dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* buscamos por sequencias de inserções no *IS Finder* e acessamos ao CGE para utilizar a ferramenta *Mobile Elements Finder* a fim de verificar os alinhamentos dos transposons que continham os genes de resistência de interesse (SIGUIER, 2006). O *SnapGene* v.7.0.1 foi utilizado para representação gráfica do ambiente genético dos genes das carbapenemases. utilizado para representação gráfica do ambiente genético dos genes das carbapenemases.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Todos os isolados de *Klebsiella pneumoniae* coprodutores de carbapenemases (KPC e NDM) (KpKN) analisados neste trabalho apresentaram grupos de incompatibilidade plasmidiais distintos para cada um dos genes de carbapenemase;
- A associação dos plasmídios distintos carreando os genes de carbapenemase promove o aumento da resistência aos antibióticos, pois permite, na maioria dos casos, que o isolado possa apresentar mais genes de resistência;
- O principal plasmídio carreando o gene *bla*_{KPC-2} foi o IncN/IncFIB e o principal transposon incluso no contexto genético do gene foi o *Tn4401b*;
- O principal plasmídio carreando o gene *bla*_{NDM-1} foi o IncA/C (~170.000 pb) e o principal transposon incluído no contexto genético do gene foi o *IS26-flanked-pseudocomposite transposon* contendo *ISCR1*, contendo diversos genes de resistência aos antibióticos;
- Todas os isolados com data de coleta inferiores a 2020 (período pré-pandêmico) apresentaram o gene *bla*_{NDM-1} no plasmídio IncHI1B/IncFIB (~255.000 pb) no contexto genético do *Tn3000*, contendo apenas o gene da carbapenemase;
- O ambiente genético de *bla*_{NDM} em isolados de KpKN sofreu mudanças significativas ao longo dos anos, provavelmente contribuindo para a disseminação acelerada do gene;
- Plasmídios de menor tamanho, devido ao menor *fitness*, apresentam maior capacidade de transferência horizontal de genes;
- O elevado número de genes de resistência apresentados no transposon flanqueado por *IS26* pode ter contribuído na co-seleção deste transposon através do amplo uso de antibióticos durante a pandemia;
- Identificamos um novo plasmídio co-integrado carreando o gene *bla*_{KPC-2}, o IncN/IncFIB.

BIOGRAFIA

Colaboração em outros Artigos

Molecular epidemiology of carbapenem resistant *Serratia marcescens* outbreak during the COVID-19 pandemic - *Submetido em 11/01/2024 na “*Journal of Antimicrobial Chemotherapy*”.

First Report Of *Enterobacter hormaechei* Co-Harboring mcr-9.1, *bla*_{KPC-2} And *bla*_{NDM-1} From Brazil. *Em fase final para submissão.

Interspecies dissemination of the IncA/C plasmid harboring *bla*_{NDM-1}. *Em fase de escrita.

Estágio de Pesquisa – FIOCRUZ

Durante o mês de abril/2023 eu fiz uma visita técnica com duração de três semanas para realizar um treinamento no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz no Rio de Janeiro. Esta atividade foi realizada sob supervisão da Profa. Dra. Ana Paula Carvalho-Assef e financiamento do Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. A visita técnica foi realizada para aperfeiçoamento e desenvolvimento de técnicas clonagem de bacteriana (Extração plasmidial, Transformação e Conjugação) a fim de aprofundar meus estudos em *Enterobacterales* coprodutores de carbapenemases (genes KPC e NDM), para que assim pudesse contribuir para as análises de mestrado e futuras pesquisas no LABRESIS.

Trabalhos Enviados para Eventos Científicos

1) Characterization of *Klebsiella pneumoniae* Co-harboring *bla*_{KPC-2} And *bla*_{NDM-1} in Different Co-integrated Plasmids: IncN/IncFIB and IncHI1B/IncFIB.

*Selecionado para apresentação oral no ASM Microbe 2023, realizado em Houston-Texas/EUA.

2) Molecular Epidemiology and Genetic Environment Characterization of *K. pneumoniae* co-harboring *bla*_{KPC-2} And *bla*_{NDM-1}

*Selecionado para apresentação oral na 43.^a Semana Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS.

3) *bla*_{NDM-1} plasmid replacement in *Klebsiella pneumoniae* during the SARS-CoV-2 pandemic period.

*Enviado e apresentado no 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia em Foz do Iguaçu/PR.

4) Molecular Epidemiology and Genetic Environment Characterization of Plasmids carrying *bla*_{KPC-2} And *bla*_{NDM-1} from *K. pneumoniae*.

*1º Lugar na sessão de “Investigação de alvos Terapêuticos e Biomarcadores” do XV Encontro do PPGCF realizado na Universidade Federal do Rio Grande do Sul/RS.

ASPECTOS ÉTICOS

Os preceitos bioéticos foram respeitados de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadas de Pesquisas em Seres Humanos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. O projeto de mestrado foi submetido ao conselho de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre sob o nome *Enterobacterales* coprodutoras de NDM e KPC: detecção fenotípica e caracterização dos elementos genéticos móveis envolvidos (Projeto nº 2022-0375). As amostras utilizadas foram oriundas de um estudo de vigilância e a privacidade das informações dos pacientes foi preservada, de modo que, não agregará riscos, e, somente com o intuito de gerar informações e conhecimentos para comunidade científica e hospitalar.

REFERÊNCIAS

ABBOUD, M. I. et al. Interaction of Avibactam with Class B Metallo- β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5655–5662, out. 2016.

ABRANTES, J. A.; NOGUEIRA, J. M. DA R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenamases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, 2017.

ACMAN, M. et al. Role of mobile genetic elements in the global dissemination of the carbapenem resistance gene bla NDM. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.

ADELBERG, E. A.; PITTARD, J. Chromosome Transfer in Bacterial Conjugation. **Bacteriological Reviews**, v. 29, n. 2, p. 161–172, jun. 1965.

ALIKHAN, N.-F. et al. BLAST Ring Image Generator (BRIG): simple prokaryote genome comparisons. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 402, 8 dez. 2011.

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

ANDREY, D. O. et al. An Emerging Clone, Klebsiella pneumoniae Carbapenemase 2–Producing K. pneumoniae Sequence Type 16, Associated With High Mortality Rates in a CC258-Endemic Setting. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 7, p. e141–e150, 23 out. 2020.

ANVISA. **Nota Técnica N. 1/2013: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes.**

ANVISA. Plano Nacional para a Prevenção e o Controle da Resistência Microbiana nos Serviços de Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA**, p. 1–84, 2017.

ANVISA. Avaliação Nacional dos Programas de Gerenciamento. p. 2–3, 2019.

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde - Módulo 10 – Detecção dos Principais Mecanismos de**

Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos pelo Laboratório de Microbiologia Clínica. [s.l: s.n.].

ANVISA; BRCAS; CGLAB; Nota técnica nº 74/2022-CGLAB/DAEVS/SVS/MS. , 2022.

BAEZA, L. L. et al. Comparison of five methods for detection of carbapenemases in Enterobacterales with proposal of a new algorithm. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 10, p. 1286.e9-1286.e15, out. 2019.

BAUR, D. et al. Effect of antibiotic stewardship on the incidence of infection and colonisation with antibiotic-resistant bacteria and Clostridium difficile infection: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 990–1001, set. 2017.

BENGTSSON-PALME, J.; KRISTIANSSON, E.; LARSSON, D. G. J. Environmental factors influencing the development and spread of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 42, n. 1, p. 68–80, 2018.

BES, T. et al. Bloodstream Infections caused by Klebsiella pneumoniae and Serratia marcescens isolates co-harboring NDM-1 and KPC-2. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 20, n. 1, p. 57, 30 dez. 2021.

BIRNBOIM, H. C; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513- 1523., 1979.

BORALLI, C. M. DOS S. et al. Characterization of blaKPC-2 and blaNDM-1 Plasmids of a K. pneumoniae ST11 Outbreak Clone. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 926, 18 maio 2023.

BRASILEIRO, I. X. C., & HOSPITALAR, E. (. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. **Manual de Microbiologia Comemorativa Do IX Congresso Brasileiro de Controle de Infecção Hospitalar, unico**, v. 4, 2004.

BRCAS. EUCAST. **European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Orientações do EUCAST para a detecção mecanismos de resistência e resistências específicas de importância clínica e/ou epidemiológica.** [s.l: s.n.].

BRCAS. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos / Método de Disco-Difusão. p. 1–29, 2021.

BRCAS. **Tabelas de pontos de corte para interpretação de CIMs e diâmetros de halos.** , 2022.

BRITO, I. L. Examining horizontal gene transfer in microbial communities. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 442–453, 12 jul. 2021.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. Epidemiology of β -lactamase-producing pathogens. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 1–37, 2020.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

CAMPOS, J. C. et al. Characterization of Tn 3000 , a Transposon Responsible for bla NDM-1 Dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387–7395, dez. 2015.

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

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

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

CHANAL, C. M. et al. Comparative study of a novel plasmid-mediated β -lactamase, CAZ-2, and the CTX-1 and CAZ-1 enzymes conferring resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 11, p. 1660–1665, 1988.

CIENFUEGOS-GALLET, A. V. et al. Multicenter Genomic Analysis of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* from Bacteremia in China. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 2, 27 abr. 2022.

CODJOE, F.; DONKOR, E. Carbapenem Resistance: A Review. **Medical Sciences**, v. 6, n. 1, p. 1, 2017.

COLOMB-COTINAT, M. et al. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, n. 1, 2016.

DATTA, N. Plasmid classification: incompatibility grouping. In: KN Timmis, A Puhler, eds. *Plasmids of Medical, Environmental and Commercial Importance*. **Amsterdam: Elsevier**, p. 3–2, 1979.

DATTA, N.; HEDGES, R. W. Compatibility Groups among ϕ -R Factors. **Nature**, v. 234, n. 5326, p. 222–223, nov. 1971.

DE OLIVEIRA SANTOS, J. V. et al. Panorama of Bacterial Infections Caused by Epidemic Resistant Strains. **Current Microbiology**, v. 79, n. 6, p. 1–14, 2022.

DING, L. et al. Klebsiella pneumoniae carbapenemase variants: the new threat to global public health. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 36, n. 4, 20 dez. 2023.

DORTET, L.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Association of the Emerging Carbapenemase NDM-1 with a Bleomycin Resistance Protein in Enterobacteriaceae and Acinetobacter baumannii. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 1693–1697, abr. 2012.

FLORES, C. et al. Genetic Relatedness of NDM-Producing Klebsiella pneumoniae Co-Occurring VIM, KPC, and OXA-48 Enzymes from Surveillance Cultures from an Intensive Care Unit. **Microbial Drug Resistance**, v. 26, n. 10, p. 1219–1226, 1 out. 2020.

GAO, H. et al. The transferability and evolution of NDM-1 and KPC-2 co-producing Klebsiella pneumoniae from clinical settings. **EBioMedicine**, v. 51, 1 jan. 2020.

GASPAR, G. G. et al. Pre- and post-COVID-19 evaluation of antimicrobial susceptibility for healthcare-associated infections in the intensive care unit of a tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 54, 2021.

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

HAILEMARIAM, M. et al. Major bacterial isolate and antibiotic resistance from routine clinical samples in Southern Ethiopia. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–9, 2021.

KAYE, K. S. et al. Cefiderocol, a Siderophore Cephalosporin, as a Treatment Option for Infections Caused by Carbapenem-Resistant Enterobacterales. **Infectious Diseases and Therapy**, v. 12, n. 3, p. 777–806, 25 mar. 2023.

KIM, J. S. et al. Dissemination of an international high-risk clone of Escherichia coli ST410 co-producing NDM-5 and OXA-181 carbapenemases in Seoul, Republic of Korea. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 58, n. 6, p. 106448, dez. 2021.

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

LAI, C.-C. et al. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 57, n. 4, p. 106324, abr. 2021.

LESSARD, J. C. Transformation of E. coli Via Electroporation. Em: [s.l: s.n.]. p. 321–327.

LIMA, K. DE O. et al. A simple disk pre-diffusion test to predict in vitro aztreonam/avibactam activity against NDM-producing Klebsiella pneumoniae complex. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 28, p. 49–52, mar. 2022.

LIU, C. et al. Emergence of an ST1326 (CG258) Multi-Drug Resistant Klebsiella pneumoniae Co-harboring mcr-8.2, ESBL Genes, and the Resistance-Nodulation-Division Efflux Pump Gene Cluster tmexCD1-toprJ1 in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 17 mar. 2022.

LOMAN, N. J.; QUINLAN, A. R. Poretools: a toolkit for analyzing nanopore sequence data. **Bioinformatics**, v. 30, n. 23, p. 3399–3401, 1 dez. 2014.

LORENZIN, G. et al. Detection of NDM-1/5 and OXA-48 co-producing extensively drug-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in Northern Italy. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 28, p. 146–150, mar. 2022.

LOUREIRO, R. J. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas: breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 34, n. 1, p. 77–84, jan. 2016.

MA, J. et al. Global spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Epidemiological features, resistance mechanisms, detection and therapy. **Microbiological Research**, v. 266, p. 127249, jan. 2023a.

MA, W. et al. Genetic and enzymatic characterization of two novel blaNDM-36, -37 variants in *Escherichia coli* strains. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 42, n. 4, p. 471–480, 22 abr. 2023b.

MACHADO, O. V. O. **Antimicrobianos: revisão geral para graduandos e generalistas**. [s.l: s.n.].

MARSHALL, S. et al. Can Ceftazidime-Avibactam and Aztreonam Overcome β -Lactam Resistance Conferred by Metallo- β -Lactamases in Enterobacteriaceae? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 4, abr. 2017.

MARTINEZ, L. M.; LOPEZ, J. J. G. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Types and molecular epidemiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, n. 4, p. 4–9, 2014.

MAURI, C. et al. The Revival of Aztreonam in Combination with Avibactam against Metallo- β -Lactamase-Producing Gram-Negatives: A Systematic Review of In Vitro Studies and Clinical Cases. **Antibiotics**, v. 10, n. 8, p. 1012, 20 ago. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. DEPARTAMENTO DE VIGILÂNCIA DAS DOENÇAS. **Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única 2018-2022**. , 2019.

MONTEIRO, J. et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 4, p. 906–909, 1 abr. 2012.

MOTA, F. S. DA; OLIVEIRA, H. A. DE; SOUTO, R. C. F. Profile and prevalence of antimicrobial resistance of negative-Gram bacteria isolated from intensive care patients. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 50, n. 3, 2018.

MUNITA, J. M.; ARIAS, A. C. Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiol Spectr.**, v. 4, n. 2, 2016.

NICOLETTI, A. G. et al. Characterization of BKC-1 Class A Carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159–5164, set. 2015.

OLIVEIRA, J; REYGAERT, W. C. Gram Negative Bacteria. In: **StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls**, v. 4, p. 1–8, 2020.

O'NEILL, J. **TACKLING DRUG-RESISTANT INFECTIONS GLOBALLY: FINAL REPORT AND RECOMMENDATIONS. THE REVIEW ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE.** , 2016. Disponível em: <[https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final paper_with cover.pdf](https://amr-review.org/sites/default/files/160525_Final_paper_with_cover.pdf)>

PAREEK, C. S.; SMOCZYNSKI, R.; TRETYN, A. Sequencing technologies and genome sequencing. **Journal of Applied Genetics**, v. 52, n. 4, p. 413–435, 23 nov. 2011.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 234–236, abr. 2015a.

PEREIRA, P. S. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 2, p. 234–236, abr. 2015b.

PERVEZ, M. T. et al. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. **BioMed Research International**, v. 2022, p. 1–12, 29 set. 2022.

PORRECA, A. M.; SULLIVAN, K. V.; GALLAGHER, J. C. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. **Current Infectious Disease Reports**, v. 20, n. 6, 2018.

REDONDO-SALVO, S. et al. Pathways for horizontal gene transfer in bacteria revealed by a global map of their plasmids. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

ROZALES, F. P. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, ago. 2014.

ROZALES, F. P. et al. Characteristics of Enterobacteriaceae Isolates Coharboring Distinct Carbapenemase Genes. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 9, p. 1123–1126, 2017a.

ROZALES, F. P. et al. Characterization of Transformants Obtained From NDM-1-Producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 38, n. 5, p. 634–636, 7 maio 2017b.

ROZWANDOWICZ, M. et al. Plasmids carrying antimicrobial resistance genes in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 5, p. 1121–1137, 1 maio 2018.

SEEMANN, T. Prokka: rapid prokaryotic genome annotation. **Bioinformatics**, v. 30, n. 14, p. 2068–2069, 15 jul. 2014.

SEIFFERT, S. N. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* co-producing NDM-1, OXA-48, CTX-M-15, CMY-16, QnrA and ArmA in Switzerland. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 3, p. 260–262, set. 2014.

SHANKAR, C. et al. Hybrid Plasmids Encoding Antimicrobial Resistance and Virulence Traits Among Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* ST2096 in India. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, 27 abr. 2022.

SIGUIER, P. ISfinder: the reference centre for bacterial insertion sequences. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 90001, p. D32–D36, 1 jan. 2006.

SMILLIE, C., SMITH, M., FRIEDMAN, J. ET AL. Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome. **Nature**, v. 480, p. 241–244, 2011.

SOUICY, S. M.; HUANG, J.; GOGARTEN, J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. **Nature Reviews Genetics**, v. 16, n. 8, p. 472–482, 17 ago. 2015.

TANG, M. et al. Epidemiological Characteristics and Formation Mechanisms of Multidrug-Resistant Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 20 nov. 2020.

VARDAKAS, K. Z.; FALAGAS, M. E. Colistin versus polymyxin B for the treatment of patients with multidrug-resistant Gram-negative infections: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 49, n. 2, p. 233–238, fev. 2017.

VERA-LEIVA, A. et al. KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 476–484, out. 2017.

VILLA, L. et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1645–1650, jul. 2012.

WANG, D. Y. et al. The road to avibactam: the first clinically useful non- β -lactam working somewhat like a β -lactam. **Future Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 10, p. 1063–1084, jun. 2016.

WANG, G. et al. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 17, p. 6278, 28 ago. 2020.

WEI, D.-D.; WAN, L.-G.; LIU, Y. Draft Genome Sequence of an NDM-1- and KPC-2-Coproducing Hypervirulent Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strain Isolated from Burn Wound Infections. **Genome Announcements**, v. 6, n. 13, 29 mar. 2018.

WILHELM, C. M. et al. Establishing a quantitative index of meropenem hydrolysis for the detection of KPC- and NDM-producing bacteria by MALDI-TOF MS. **Journal of Microbiological Methods**, v. 187, p. 106268, ago. 2021.

WINK, P. L. et al. Increased frequency of bla_{NDM} in a tertiary care hospital in southern Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 52, n. 1, p. 299–301, 3 mar. 2021.

WU, W. et al. NDM Metallo- β -Lactamases and Their Bacterial Producers in Health Care Settings. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 2, 20 mar. 2019.

XU, J. et al. Unravelling the genome sequence of NDM-1 and KPC-2 co-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolated from a bloodstream infection. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 20, p. 339–341, mar. 2020.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, bla_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

YU, J. et al. Nosocomial outbreak of KPC-2- and NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal ward: a retrospective study. **BMC Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 563, 12 dez. 2016.

ZHU, Y.; HUANG, W. E.; YANG, Q. Clinical Perspective of Antimicrobial Resistance in Bacteria. **Infection and Drug Resistance**, v. Volume 15, p. 735–746, mar. 2022.

ANEXOS

Anexo I – Parecer Substanciado do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Enterobacterales coprodutoras de NDM e KPC: detecção fenotípica e caracterização dos elementos genéticos móveis envolvidos

Pesquisador: Afonso Luis Barth

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 62880622.8.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.642.240

Apresentação do Projeto:

As informações elencadas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram retiradas do arquivo do projeto e das Informações Básicas da Pesquisa "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1999142", de 01/09/2022.

Trata-se de um projeto acadêmico de mestrado vinculado ao PPG de Ciências Farmacêuticas. O projeto será realizado no Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), localizado no Centro de Pesquisa Experimental – CPE, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

O surgimento de Enterobacterales Produtoras de Carbapenemase (CPE) devido a um gene carbapenemase é um problema de saúde pública muito relevante, pois limita drasticamente as opções terapêuticas e devido à intensa disseminação de isolados, especialmente em CPE que abrigam mais de um gene carbapenemase. Preocupa porque antimicrobianos novos e eficientes contra serina-carbapenemases, como KPC, não são ativos no combate a metalo-lactamases como NDM. Esses genes estão localizados em elementos genéticos móveis, mais especificamente, em plasmídeos e isso poderia explicar como essa disseminação ocorre tão rapidamente e entre espécies diferentes, devido à transferência horizontal de genes (HGT). No entanto, não há um

Endereço: Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4
Bairro: Rio Branco **CEP:** 90.440-000
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-8248 **Fax:** (51)3359-8248 **E-mail:** cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.642.240

consenso caracterizando a forma de alocação em elementos genéticos móveis, bem como o funcionamento do HGT no CPE. Epidemiologicamente, de forma a reduzir a propagação destas cepas, é importante avaliar o contexto genético do(s) elemento(s) móvel(is) destas bactérias. Dessa forma, este estudo busca identificar coprodutores de CPE de KPC e NDM e caracterizar seus elementos genéticos móveis. Isolados caracterizados por RT-qPCR HRM para coprodução de KPC e NDM serão incluídos neste projeto. Os plasmídeos serão extraídos por lise alcalina de acordo com a técnica previamente descrita por Birboim e Doly com algumas modificações. Análises de transformação com E.coli TOP 10 e conjugação com E.coli J53 serão realizadas para verificar a transferência de genes KPC e NDM para transformantes e/ou transconjugantes. O DNA plasmidial será extraído e a construção da biblioteca genômica será realizada com o Wizard® HMW DNA Extraction Kit que realiza purificação de alta confiança para análises de long reads. O sequenciamento completo do genoma plasmidial será realizado pelo Minlon™, as sequências serão analisadas pelo BLAST e através do GenBank acessaremos as sequências já depositadas.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificação molecular e fenotípica de isolados de Enterobacterales coprodutores de NDM e KPC.

Objetivo Secundário:

- Realizar levantamento epidemiológico dos isolados coprodutores decarbapenemase no Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- Estabelecer um banco de amostras bem caracterizado de isolados de Enterobacterales coprodutoras de genes de carbapenemases;
- Avaliar testes fenotípicos para a identificação de isolados coprodutores decarbapenemases;
- Padronizar a técnica de extração plasmidial por lise alcalina; Caracterizar o(s) plasmídios dos isolados coprodutores;
- Caracterizar isolados coprodutores através da técnica de sequenciamento do genoma bacteriano;
- Realizar conjugação e/ou transformação bacteriana entre isolados coprodutores e E.coli TOP 10;

Endereço: Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4
Bairro: Rio Branco CEP: 90.440-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-8246 Fax: (51)3359-8246 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.642.240

- Caracterizar os transformantes com genes de carbapenemases.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com os autores, o projeto apresenta os seguintes riscos:

"Os preceitos bioéticos serão respeitados de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadas de Pesquisas em Seres Humanos da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde. As amostras utilizadas serão oriundas de um estudo de vigilância e a privacidade das informações dos pacientes será preservada, de modo que, não agregará riscos, e, somente com o intuito de gerar informações e conhecimentos para comunidade científica e hospitalar."

Entretanto, sempre existe o risco de quebra de confidencialidade, não citado pelos autores do projeto.

Em relação aos benefícios, foram citados os seguintes:

"A emergência de CPE devido a um gene de carbapenemase é um problema de saúde pública muito relevante, pois limita drasticamente as opções terapêuticas. CPE com mais de um gene de carbapenemase (cepas coprodutoras) podem tornar ainda mais difícil o tratamento. Assim, a identificação laboratorial de enzimas carbapenemases nestes isolados rápida e eficiente é necessária a fim de iniciar prontamente os tratamentos adequados, pois antimicrobianos novos e eficientes contra serinocarbapenemases não são ativos no combate as Metalolactamases como a NDM-1 (CIENFUEGOS-GALLET et al., 2022). A caráter epidemiológico, a fim de diminuir a disseminação de cepas coprodutoras de carbapenemases, é importante avaliar o contexto genético do(s) elemento(s) móveis, em especial o(s) plasmídeos, dessas bactérias."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto trata-se de um estudo analítico transversal e longitudinal experimental que visa avaliar múltiplos genes de resistência em isolados de CPE.

O estudo analisará 50 amostras de cepas de *Klebsiella pneumoniae* coprodutoras de NDM e KPC, e, ao final destas análises será realizado o cálculo do tamanho amostral para verificar a necessidade da inclusão de novas amostras. As amostras serão provenientes de um estudo de vigilância.

Endereço: Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4
Bairro: Rio Branco CEP: 90.440-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 Fax: (51)3359-6246 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.642.240

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Projeto propõe dispensa de TCLE com a seguinte justificativa:

As amostras utilizadas serão oriundas de um estudo de vigilância para o monitoramento de isolados resistentes ou com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos no estado do Rio Grande do Sul de diversos hospitais, incluindo o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de 2013 a 2022. As amostras previamente caracterizadas por RT-qPCR HRM quanto à coprodução de KPC e NDM serão incluídas neste projeto.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

- Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS N.º 466/2012 e na Norma Operacional CNS/Conep N.º 001/2013, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

- O projeto está aprovado para análise de 50 amostras de cepas de *K. pneumoniae* coprodutoras de NDM e KPC.

- Deverão ser apresentados relatórios semestrais e um relatório final.

- Os projetos executados no HCPA somente poderão ser iniciados quando seu status no sistema AGHUse Pesquisa for alterado para "Aprovado", configurando a aprovação final da Diretoria de Pesquisa.

- Textos e anúncios para divulgação do estudo e recrutamento de participantes deverão ser submetidos para apreciação do CEP, por meio de Notificação, previamente ao seu uso. A redação deverá atender às recomendações institucionais, que podem ser consultadas na Página da Pesquisa do HCPA.

Endereço: Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4
Bairro: Rio Branco CEP: 90.440-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 Fax: (51)3359-6246 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
RIO GRANDE DO SUL - HCPA
UFRGS



Continuação do Parecer: 5.642.240

- Eventos adversos deverão ser comunicados de acordo com as orientações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - Conep (Carta Circular N.º 13/2020-CONEP/SECNS/MS). Os desvios de protocolo também deverão ser comunicados em relatórios consolidados, por meio de Notificação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_1999142.pdf	01/09/2022 11:21:29		Aceito
Folha de Rosto	20220375.pdf	26/08/2022 15:14:16	Mayana Kieling Hernandez Berdichevski	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_mestrado_Mayana.pdf	12/08/2022 17:19:35	Mayana Kieling Hernandez Berdichevski	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PORTO ALEGRE, 14 de Setembro de 2022.

Assinado por:
Têmis Maria Félix
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Protásio Alves 211 5º andar Bloco C Portão 4
Bairro: Rio Branco CEP: 90.440-000
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-6246 Fax: (51)3359-6246 E-mail: csp@hcpa.edu.br