



UNIVERSIDADE CEUMA – UNICEUMA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
MESTRADO EM BIOLOGIA MICROBIANA



JOVELIANE DE MELO MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS DE  
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE SEDIMENTOS DO RIO ANIL-  
MARANHÃO**

Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup>. Andrea de Souza Monteiro

São Luís  
2021



UNIVERSIDADE CEUMA – UNICEUMA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
MESTRADO EM BIOLOGIA MICROBIANA



JOVELIANE DE MELO MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E PERFIL DE RESISTÊNCIA À ANTIBIÓTICOS DE  
BACTÉRIAS GRAM-NEGATIVAS ISOLADAS DE SEDIMENTOS DO RIO ANIL-  
MARANHÃO**

Exame de defesa apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Biologia microbiana da Universidade CEUMA, como requisito para obtenção do grau de Mestre (a) em Biologia Microbiana.

Orientadora: Dr<sup>a</sup> Andrea de Souza Monteiro

São Luís  
2021

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Mapa de localização de pontos de coleta ao longo do rio Anil São Luís – MA.. 3
- Figura 2:** Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos do sedimento do Rio Anil-MA bacterianos aos fármacos antimicrobianos isolados.....9
- Figura 3:** Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para cefepime em diferentes concentrações..... 11
- Figura 4:** Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para gentamicina em diferentes concentrações.....11
- Figura 5:** Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para meropenem em diferentes concentrações.....11
- Figura 6:** Categorização e distribuição dos subsistemas encontrados pelo RAST para a linhagem *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1.....15
- Figura 7:** Diagrama de Venn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas compartilhados entre o isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 e *Klebsiella pneumoniae* de referência: Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01..... 21
- Figura 8:** Sobreposições (*Overlaps*) presentes na análise OrthoVenn do isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 e *Klebsiella pneumoniae* de referência: Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01.....22
- Figura 9:** Análise de blocos gênicos encontrados no genoma de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU01, em relação *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-2146, KP58, KP69, KPCE1, KP13, KP36 e MGH 78578 obtido por MAUVE.....23
- Figura 10:** A árvore filogenômica de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 e cepas do gênero *Klebsiella* relacionadas disponíveis no banco de dados TYGS.....23
- Figura 11:** Análise dos genes associados a virulência das cepas de *Klebsiella*.....24

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Condições para ampliações das reações dos genes metalo- $\beta$ -lactamases e da enzima <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase .....	6
<b>Tabela 2:</b> Condições para montagem das reações dos genes metalo- $\beta$ -lactamases e da enzima <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase.....	6
<b>Tabela 3:</b> Iniciadores utilizados para os genes das enzimas $\beta$ -lactamases.....	7
<b>Tabela 4:</b> Iniciadores específicos utilizados para detecção de genes <i>intl-1</i> , <i>intl-2</i> , e <i>intl-3</i> dos isolados bacterianos.....	8
<b>Tabela 5:</b> Concentração inibitória mínima (CIM), em $\mu\text{g/mL}$ , dos antimicrobianos Cefepima, Gentamicina e Imipenem contra o isolado <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPCEU1 determinada manualmente e pelo sistema automatizado Vitex-2.....	10
<b>Tabela 6:</b> Concentração inibitória mínima (CIM), em $\mu\text{g/mL}$ , dos antimicrobianos Cefepima, Gentamicina e Imipenem contra os isolados <i>Ochrobactrum tritici</i> e <i>Ochrobactrum intermedium</i> .....	10
<b>Tabela 7:</b> Identificação de marcadores de resistência e suscetibilidade à fármacos antimicrobianos dos 32 isolados da coleta.....	13
<b>Tabela 8:</b> Dados do Sequenciamento do Isolado KPCEU1.....	15
<b>Tabela 9:</b> Perfil molecular da resistência à antibióticos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPCEU1 obtidos pelo <b>CARD</b> com buscas de similaridade e identidade.....	17
<b>Tabela 10:</b> Regiões de profago previstas pelo PHASTER no genoma de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPCEU1.....	25



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

### Siglas

THG  
EGMs  
AGRs  
AST  
CIM  
Br-EUCAST  
UFC  
PCR  
TEM  
SHV  
CTX-M  
KPC  
IMP  
NDM  
VIM  
GES  
SPM  
OXA  
RAST  
CARD  
MLST  
NaCl  
 $\mu\text{L}$   
 $\mu\text{g/mL}$   
 $\mu\text{g}$

### Nomes

Transferência horizontal de genes  
Elementos genéticos moveis  
Genes de resistência aos antibióticos  
Teste de suscetibilidade antimicrobiana  
Concentração inibitória mínima  
Comitê brasileiro de teste de suscetibilidade antimicrobiana  
Unidades formadoras de colônias  
Reação em cadeia da polimerase  
Temoniera  
Sulphidryl variable  
Cefotaximases munich  
*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase  
Imipenemase metalo  $\beta$ -lactamase  
New Delhi metalo  $\beta$ -lactamase  
Verona integron-borne metalo  $\beta$ -lactamase  
Guiana extended-spectrum  
São Paulo metalo  $\beta$ -lactamase  
Oxacilinase  
*Rapid annotation using subsystem technology*  
*The comprehensive antibiotic resistance database*  
Sequência multilocus  
Cloreto de sódio  
Microlitro  
Microgramas por mililitros  
Microgramas

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	9
<b>2. Material e métodos</b> .....	10
2.1 Área de estudo .....	10
2.2 Obtenção dos isolados bacterianos .....	11
2.3 Identificação dos isolados bacterianos.....	11
2.4 Determinação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobiana.....	11
2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para meropenem, cefepima e gentamicina.....	12
2.6 Time Kill-curve – Tempo de Curva de Morte.....	12
2.7 Análises Moleculares .....	12
2.7.1 Extração do DNA bacteriano .....	12
2.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes relacionados a enzimas $\beta$ -lactamases.....	12
2.7.3 Identificação molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes relacionados às enzimas oxacilinases ( <i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA23</sub></i> , <i>bla<sub>OXA24</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> e <i>bla<sub>OXA58</sub></i> ). .....	12
2.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase em multiplex-para detecção de integrons de classe 1, 2 e 3. ....	16
2.7.5 Caracterização dos grupos de Incompatibilidade dos plasmídeos .....	16
2.8 Sequenciamento do genoma e anotações .....	16
<b>3. Resultados</b> .....	17
3.1 Isolamento e Identificação de bactérias Gram-negativas obtidas de amostras coletadas de sedimentos rio Anil em São Luís-MA. ....	17
3.2 Determinação do perfil de suscetibilidade bacteriana aos fármacos antimicrobianos. ....	17
3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e Vitex- 2 para meropenem, cefepima e gentamicina. ....	18
3.4 Time Kill-curve (curva-de tempo-morte).....	18
3.5 Detecção de genes relacionados a enzimas $\beta$ - lactamases ( <i>bla<sub>SHV</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> e <i>bla<sub>TEM</sub></i> ) e enzima <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) .....	19
3.6 Detecção de genes relacionados a enzimas metalo $\beta$ -lactamases ( <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>IMP</sub></i> , <i>bla<sub>SPM1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> e <i>bla<sub>VIM2</sub></i> )......	20
3.7 Detecção dos genes codificadores das serino carbapenemases ( <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-23</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-24</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-51</sub></i> e <i>bla<sub>OXA-58</sub></i> ) .....	20
3.8 Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3. ....	20
3.9 Detecção dos grupos de Incompatibilidade dos plasmídeos.....	20



UNIVERSIDADE CEUMA – UNICEUMA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
MESTRADO EM BIOLOGIA MICROBIANA



3.10 Análise genômica .....	23
3.11 Caracterização do perfil de resistência à antibióticos do isolado de Klebsiella pneumoniae KPCEU1 .....	24
3.12 Análise comparativa do genoma: Orthovenn, VFDB, MAUVE, PHASTER e TYGS .....	29
<b>4. Discussão .....</b>	<b>34</b>
<b>5. Conclusões .....</b>	<b>36</b>
<b>Referências .....</b>	<b>36</b>

## RESUMO

O ecossistema manguezal sofre impactos com as ações antrópicas do homem, isso pode provocar transformações no genoma de microrganismos presentes naquele ambiente. Esse ecossistema é importante para manter o nível do mar, proteção da costa e constitui cerca de 60 a 70% do litoral em regiões com climas tropicais e subtropicais da Terra. O objetivo foi caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na disseminação dos genes de resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de sedimentos do Rio Anil - MA, bem como avaliar a presença de integrons e plasmídeos associados como disseminação dos genes de resistência. Os microrganismos isolados foram inoculados em meio Ágar Macconkey suplementado com os fármacos antibióticos ceftadizima e meropenem em concentrações crescentes (2-32 µg/mL). As espécies de bactérias portadoras de genes de resistência foram identificadas pelo MALDI-QTOF-Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz com analisador por tempo de voo. Os isolados bacterianos foram submetidos ao método de *Kirby-Bauer* para avaliação do perfil de suscetibilidade à antibióticos beta-lactâmicos. Em seguida, realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para alguns isolados que apresentaram um perfil de suscetibilidade satisfatório, além da determinação pelo sistema automatizado VITEK 2 e análise do *Time Kill Curve* para o isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1. Os determinantes genéticos foram detectados por técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em multiplex (mPCR). O esboço do genoma foi determinado por Illumina e anotado usando o software Prokka. A Rapid Annotation Subsystem Technology (RAST) foi usado para verificar as funções dos genes nos subsistemas encontrados no genoma. Além disso, a tipagem de sequência multilocus (MLST) foi usada para classificar o grupo de sequência tipo (ST). Para as análises *in silico* do genoma foram usados softwares, entre os quais o Comprehensive Antibiotic Resistance Database, Phaster, Orthoven2, Mauve4 e Virulence Factor Database (VFDB). Um total de trinta e duas bactérias foram identificadas, dentre estas 20 *Ochrobactrum intermedium*, 09 *Ochrobactrum tritici*, 02 *Stenotrophomonas maltophilia* e 01 *Klebsiella pneumoniae*. Um dos isolados apresentou um perfil multi-droga resistente e foi posteriormente sequenciado e identificado como *K. pneumoniae*, e então renomeado *K. pneumoniae*- KPCEU1. Todos isolados demonstraram resistência a cefepima e *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou susceptibilidade apenas a gentamicina. O RAST indicou a presença de 7 proteínas de adesão, 125 proteínas relacionadas a resistência a antibióticos e compostos tóxicos. A análise por MLST indicou que *K. pneumoniae* KPCEU1 pertence ao grupo ST11. Os genes para fatores de virulência que foram encontrados referem-se a enzimas de aderência, bomba de efluxo, proteínas captadoras de ferro associadas principalmente aos sideróforos, genes reguladores e sistemas de secreção. A detecção de isolados com o perfil acima descrito é de extrema importância, uma vez que evidencia a disseminação de bactérias virulentas e com perfil MDR, comumente encontradas na clínica, em ambientes aquáticos extra-hospitalares.

**Palavras-chave:** beta-lactâmicos, bactérias gram-negativas, resistência, mangue.



Article

# Caracterização molecular e perfil de resistência à antibióticos de bactérias Gram-negativas isoladas de sedimentos do mangue do Rio Anil- Maranhão

Joveliane de Melo Monteiro<sup>1,2</sup> e Andrea de Souza Monteiro<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Biologia Microbiana, Universidade CEUMA, 65075-120 São Luís, Brasil; jovelianemello53@gmail.com

<sup>2</sup> Laboratório de Microbiologia Aplicada, Universidade CEUMA, 65075-120 São Luís, Brasil

\* Correspondence: andreamont@gmail.com;

**Resumo:** O ecossistema manguezal sofre impactos com as ações antrópicas do homem, isso pode provocar transformações no genoma de microrganismos presentes naquele ambiente. O estudo identificou bactérias Gram negativas de sedimentos do Rio Anil-MA e caracterizou o perfil de resistência destes isolados a fármacos antimicrobianos, bem como avaliou a presença de integrons e plasmídeos associados com a disseminação dos genes de resistência. Os isolados obtidos foram submetidos método de *Kirby-Bauer*, identificados pelo MALDI-QTOF, e submetidos à técnica de PCR para detecção de genes para enzimas  $\beta$ -lactamases, para integrons e grupos plasmidiais. O esboço do genoma de *K. pneumoniae* KPCEU1 foi sequenciado com Illumina. O RAST expôs as funções dos genes nos subsistemas do genoma. A tipagem MLST classificou o grupo de sequência tipo ST. Para as Análises in silico usou-se o CARD, Phaster, Orthoven2, MAUVE4 e VFDB. Trinta e duas bactérias foram identificadas como das espécies *Ochrobactrum intermedium*, *Ochrobactrum tritici*, *Stenotrophomonas maltophilia* e *Klebsiella pneumoniae*, 100% dos isolados foram resistentes ao fármaco cefepima e 66,66% foram positivos para a detecção do integron de classe 1. KPCEU1 apresentou susceptibilidade apenas a gentamicina. O RAST indicou 125 proteínas relacionadas a resistência a fármacos antimicrobianos, além de ser portadora do gene *bla<sub>KPC-2</sub>*. O clone ST11 apresentou 100% de similaridade filogenética com outras linhagens portadoras do gene *bla<sub>KPC-2</sub>*. A detecção de isolados ambientais com o perfil MDR é de extrema importância já que destaca a disseminação extra-hospitalar de bactérias comumente encontradas na clínica em ambientes aquáticos.

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Microorganisms* 2021, 9, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

Academic Editor: Firstname  
Lastname  
Received: date  
Accepted: date  
Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Keywords:** mangue, beta-lactamicos, bacterias gram-negativas, resistência

## 1. Introdução

Áreas de manguezais constituem cerca de 60 a 70% do litoral em regiões de climas tropicais e subtropicais da Terra. Este ecossistema é importante para manter o nível do mar e proteção da costa. Sua condição ambiental

característica é a salinidade, por conta de sua proximidade ao mar, possuindo também uma condição anaeróbica ocasionada pela alteração da mare, deficiência em micronutrientes e em matéria orgânica [1]. No Brasil a extensão das áreas de manguezais chega a 8,5%, sendo caracterizado como o segundo país rico nesse tipo ecossistema [2]. Os manguezais sofrem impactos relacionados as ações da sociedade, tais como despejos de esgotos, lixo e resíduos industriais, atividades portuárias, atividades pesqueiras e extração de minerais e petróleo [3]. Estas atividades geram impactos no processo biogeoquímico deste ecossistema [4].

Os microrganismos dos ambientes de manguezais sofrem alteração na composição e estrutura providas da influência dos fatores bióticos e abióticos dos sedimentos do mangue [4]. Estes microrganismos, sofrem uma pressão adaptativa constante por conta das características encontradas no manguezal, como a alta salinidade, a inundação intermitente e as influências antrópicas [4]. Neste contexto se encontram os fatores genéticos, mediados pela transferência horizontal de genes (THG) que como resultado facilita a adequação das linhagens bacterianas às alterações ambientais [5].

A THG tem um papel importante na evolução microbiana, proporcionando a adaptação dos genomas de bactérias ao ambiente. Através dos processos de transferência como a conjugação, a transformação e a transdução, os elementos genéticos moveis (EGMs) (bacteriófagos, plasmídeos, transposons e integrons) medeiam a transferência de sequências de DNA entre as espécies bacterianas [6, 7]. Os ambientes aquáticos por sua vez, são meios mais propensos para combinação e dissipação de genes de resistência, por sofrerem intervenção humana [5]. Uma análise genômica demonstrou que os genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (ARGs) surgem de forma abundante em linhagens de bactérias ambientais e de origem clínica [8].

Os genes que codificam para fatores de resistência à fármacos antimicrobianos de patógenos bacterianos podem ser transferidos para bactérias ambientais e estas tornam-se reservatório de ARGs [9]. Desta forma, bactérias encontradas no ambiente atuam como receptoras de genes associados a resistência a antibióticos e, posteriormente, podem infectar os seres humanos [10]. A presença de bactérias dos gêneros *Clostridium* e *Escherichia* em amostras de água e sedimento tem sido reportada portando genes de resistência as tetraciclina, sulfonamidas e (fluoro) quinolonas [11]. E, em patógenos oportunistas encontrados no solo como *Ochrobactrum intermedium* onde foram detectados genes de resistência a quinolonas, sulfonamidas, tetraciclina, macrólidos e a estreptomicina aminoglicosídica, assim como a  $\beta$ -lactamase AmpC que confere resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos [12].

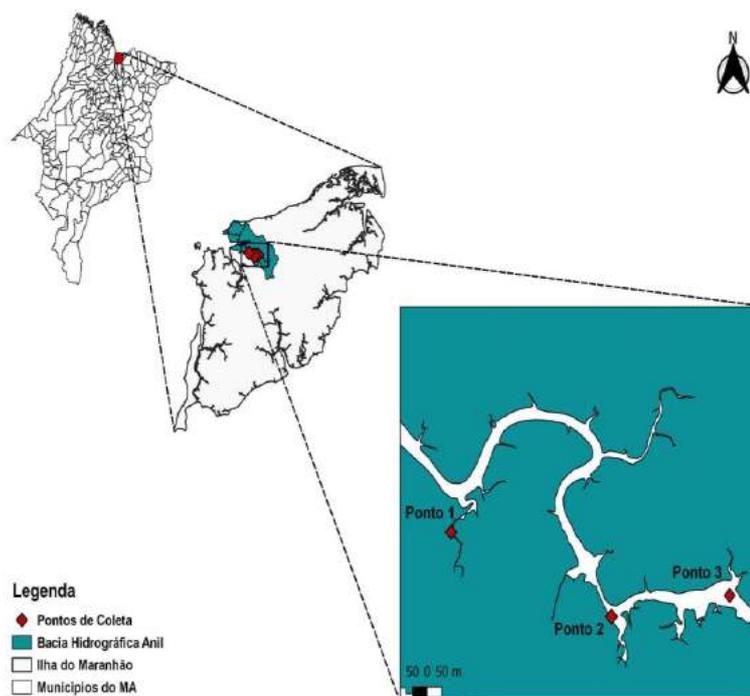
Os membros da família Enterobacteriaceae são compostos por bactérias gram-negativas como por exemplo dos gêneros, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter*, *Salmonella* e *Shigella*, que estão relacionadas a infecções graves em indivíduos internados em hospitais ou em indivíduos da comunidade em geral [13]. Por sua vez, espécies do gênero *Ochrobactrum* estão sendo consideradas patógenos oportunistas emergentes, que têm ganhado visibilidade com relação a infecções de pacientes atendidos clínica médica humana por apresentarem uma ascensão com relação ao perfil de resistência a múltiplas drogas antimicrobianas [14, 15].

O presente estudo, teve como objetivo isolar e identificar bactérias gram negativas de sedimentos do Rio Anil-MA, caracterizar os mecanismos moleculares envolvidos na disseminação dos genes de resistência de bactérias Gram-negativas isoladas de sedimentos do Rio Anil - MA, bem como avaliar a presença de integrons e plasmídeos associados como disseminação dos genes de resistência.

## 2. Material e métodos

### 2.1 Área de estudo

A bacia do Rio Anil localiza-se na porção Noroeste de São Luís entre as latitudes 02°29'14" e 02°34'47" S e as longitudes 44°19'15" e 44°12'55" W, limita-se com as bacias oceânicas ao Norte, com a bacia do Rio Paciência a Leste, com a do Bacanga ao Sul e com a baía de São Marcos a noroeste. Tem suas nascentes localizadas na Chapada do Tirirical (Bairro Aurora), descendo ao nível do mar aproximadamente 9,5 Km em linha reta, com o eixo direcional orientado de SE para NW a partir da nascente [16]. Os pontos de coletas desta pesquisa ocorreram em áreas estratégicas dos bairros Ipase, Liberdade e Vila Palmeira, em três pontos distintos (Figura 1). Esses bairros são totalmente urbanizados, compostos de Hospital, casas, faculdades, palafitas e uma antiga empresa de medicamentos ao longo do percurso sob o Rio Anil.



**Figura 1:** Mapa de localização de pontos de coleta ao longo do rio Anil São Luís – MA.

### 2.2 Obtenção e manutenção dos isolados bacterianos

A coleta ocorreu no ano de 2019 e cada ponto foi dimensionado em um 1 m<sup>2</sup>, onde três amostras do sedimento de mangue com 200 g foram retiradas de três pontos de coletas diferentes. As amostras de sedimentos foram levadas para o Laboratório de Microbiologia Aplicada da Universidade CEUMA onde foram processadas. As três amostras de cada ponto foram homogeneizadas, formando uma amostra composta de cada ponto. Da amostra composta retirou-se 1 g devidamente pesados em balança analítica. Posteriormente, adicionou-se em tubos contendo 9 mL de solução salina (NaCl, 0,9%) estéril. Logo após, foi feita uma diluição da amostra em fração decimal até a diluição de 10<sup>-3</sup>. Em seguida, cerca de 100 µL da amostra foi espalhado com alça de Drigalski estéril sobre a superfície de meio Ágar MacConkey (Difco, Laboratories, Detroit, Mich.), previamente preparado contendo de 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL dos antibióticos ceftadizima e meropenem. As placas de cultivo foram incubadas a temperatura de 37°C por até 72 h, para o crescimento das colônias. Após crescimento, fêz-se a contagem das colônias bacterianas e seus morfótipos caracterizados. Pela técnica de esgotamento, as colônias foram purificadas em meio ágar MacConkey (Difco, Laboratories, Detroit, Mich.) e incubadas até 72 h à 37°C. As colônias purificadas obtidas foram estocadas em caldo de infusão e cérebro (BHI, Difco) adicionado com glicerol a 20% e armazenadas -20 °C.

### 2.3 Identificação dos isolados bacterianos

A confirmação da identidade das espécies foi realizada por MALDI-TOF, e os espectros capturados foram analisados utilizando o controle de automatização MALDI Biotyper e o software Bruker Biotyper 2.0 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). Os critérios de identificação utilizados na análise foram os seguintes: um escore ≥2.000 indica a identificação em nível de espécie, um escore de 1.700 a 1.999 identifica em nível do gênero, e um escore <1.700 é interpretado como não identificado. A *Escherichia coli* ATCC 8739 foi utilizada como controle positivo [17].

### 2.4 Determinação do perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobiana

O perfil de suscetibilidade a drogas antimicrobianas para todos os isolados foi determinado pelo método de Kirby-Bauer [18]. Os fármacos antimicrobianos utilizados nos ensaios foram amicacina (30µg), ampicilina (10µg), ampicilina+sulbactam (20µg), piperaciclina+tazobactan (30/6µg), cefepima (30µg), ceftazidima (10µg), ceftriaxona (30µg), cefuroxima (30µg), cefotaxima (5µg), ofloxacina (5µg), norfloxacina (10µg), ciprofloxacina (5µg), meropenem (10µg) e imipenem (10µg). As análises de suscetibilidade foram feitas de acordo com as recomendações do fabricante e de acordo com as normas do Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana [19]. O sistema automatizado VITEK 2 (BioMerieux SA, Marcy-l'Étoile, França) foi utilizado para linhagem de *K. pneumoniae* KCEU1 com os cartões Teste de Suscetibilidade

Antimicrobiana (AST) nº 105, com as seguintes drogas amicacina, ampicilina, ampicilina+sulbactam, piperacidina+tazobactan, cefepima, ceftazidima, ceftriaxona, cefuroxima, cefuroxima axetil, cefotaxima, ofloxacina, norfloxacina, ciprofloxacina, gentamicina, tigeclina, meropenem e imipenem

#### 2.5 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para meropenem, cefepima e gentamicina.

Os isolados clínicos das espécies *O. anthropi*, *O. intermedium* e *K. pneumoniae* KCEU1 foram submetidos aos ensaios da CIM utilizando o teste de microdiluição em caldo, usando como referência o método descrito no Comitê Brasileiro de Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana [19]. Os breakpoints ou pontos de corte clínicos para *Pseudomonas* foram utilizados como parâmetro para interpretação dos dados.

As células dos isolados bacterianos foram reativadas em meio líquido BHI a 37° C, overnight (24h) e semeadas em ágar BHI por esgotamento. Após a incubação foram preparados os inóculos em concentração determinada pela escala McFarland ( $1,5 \times 10^8$  UFC/mL) diluídos em caldo Müeller Hinton. Foram utilizadas as concentrações de 4 a 512 µg/mL de meropenem, 1 a 512 µg/mL de ceftazidima e 64 µg/mL a 0,5 µg/mL de gentamicina. Os antimicrobianos foram filtrados em membrana estéril de 0,22 µm acopladas a seringas. Após a filtração, foram diluídos em caldo Müeller-Hinton na concentração de trabalho.

Nas placas de microdiluição de 96 poços (12X8) foram inoculados 100 µL de caldo Müeller Hinton, 5 µL do inóculo e 100 µL do fármaco. Fez-se então uma diluição de 100 µL em 100 µL da droga e os 100 µL retirados do último poço foram descartados, portanto, o volume final do conteúdo dos poços foi de 200 µL. Após o preparo das placas, estas foram incubadas à 37° C por até 24 h. Após a incubação, os poços foram monitorados para a determinação da CIM pelo método visual de crescimento das bactérias [19].

#### 2.6 Time Kill-curve – Curva de Tempo de Morte

O Time Kill-curve é utilizado para avaliar os tempos em que as concentrações de um determinado antimicrobiano matam um isolado bacteriano. Para a determinação das curvas de tempo de morte foram inoculadas  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC/mL) da cepa de *K. pneumoniae* KPCEU1 em 3 mL de caldo Mueller – Hinton ajustado de acordo com os fármacos antimicrobianos meropenem nas concentrações de 8 µg/mL a 64 µg/mL, gentamicina nas concentrações de 0,25 µg/mL a 2 µg/mL e cefepima nas concentrações de 4 µg/mL a 32 µg/mL, sempre de acordo com o CIM. As alíquotas das amostras foram retiradas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 30 horas após inoculação, sendo diluídas em escala decimal em solução de NaCl (0,9% estéril) e plaqueadas em ágar Trypticase Soy Broth (TSB, Difco). Após o plaqueamento as placas foram incubadas a 37°C em estufa bacteriológica, após o crescimento das colônias bacterianas estas foram contadas e os valores foram expressos em Log<sub>10</sub> CFU/mL. Todos os ensaios foram realizados em triplicata e em dois experimentos independentes.

#### 2.7 Análises Moleculares

##### 2.7.1 Extração do DNA bacteriano

O protocolo utilizado para extração de DNA é o descrito por Pitcher [20]. A concentração e a pureza do produto obtidos foram quantificadas em espectrofotômetro 1000 Nanodrop-TM 1000 a 260 e 280 nm. (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

##### 2.7.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para detecção dos genes relacionados a enzimas β-lactamases.

As reações de PCR para os genes codificadores das enzimas β-lactamases foram feitas em termociclador 2720 Thermal Cycler (California, USA). Nas reações de PCR foram utilizados a solução de GoTaq® Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA), acrescido de cada par específico do iniciador (10 pmol/L), água livre de nucleases e do molde DNA, correspondendo à aproximadamente 100 ng de DNA, descritos na tabela 1. O protocolo de amplificação foi realizado de acordo com o retratado na Tabela 2. Em seguida, os fragmentos foram visualizados em gel de agarose variando de 1,5% a 2% de acordo com o comprimento dos pares de bases e corado com UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience do Brasil, Brasil) de acordo com as recomendações do fabricante. Após a eletroforese o gel foi fotografado sob exposição de iluminação Ultra-Violeta [21]. A técnica Simplex-PCR foi usada para detecção de genes relacionados às enzimas *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC), *Verona imipenemase* (VIM2), *Nova Delhi metallo-β-lactamase* (NDM). A técnica de multiplex-PCR foi utilizada para os genes alvos relacionados às enzimas β-lactamases *Temoreira* (TEM), *Sulphydryl Variable* (SHV) e Cefotaxime enzyme (CTX-M), assim como para a amplificação dos genes *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>SPM1</sub>* e *bla<sub>GES</sub>* (tabela 3).

##### 2.7.3 Identificação molecular por reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes relacionados às enzimas oxacilinas (*bla<sub>OXA1</sub>*, *bla<sub>OXA23</sub>*, *bla<sub>OXA24</sub>*, *bla<sub>OXA51</sub>* e *bla<sub>OXA58</sub>*).

As reações de PCR para os genes codificadores de oxacilinas foram feitas em termociclador 2720 Thermal Cycler (California, USA) em um volume final de 25  $\mu$ L, contendo 0,5  $\mu$ L de cada iniciador específico (10 pmol/L) descritos na Tabela 3, acrescidos de 12,5  $\mu$ L de PCR Master Mix - Promega® (Promega, Madison, WI, USA (*Taq* DNA polimerase, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, tampão de PCR [pH 8,5]), 4,5  $\mu$ L de água livre de nuclease e 3  $\mu$ L do molde DNA, correspondendo à aproximadamente 100 ng de DNA. A reação de amplificação ocorreu nas seguintes condições: 94°C por 5 minutos (desnaturação inicial) seguidos de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 52°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 7 minutos. Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% e corados em solução para coloração de Ácido Nucleico – UniSafe Dye (20.000x) (Uniscience do Brasil, Brasil) de acordo com as normas do fabricante. Após a eletroforese o gel foi fotografado sob exposição de iluminação UV.

1 **Tabela 1:** Condições para ampliações das reações dos genes metalo-β-lactamases e à enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	<i>bla<sub>SPM1</sub></i>	<i>bla<sub>GES</sub></i>	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<i>bla<sub>VIM2</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
<b>Ciclos</b>	35	35	35	35	35	35	30	30	30
<b>Desnaturação inicial</b>	95 °C - 5 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min	94° C - 3 min
<b>Desnaturação</b>	95° C - 1 min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min	94° C - 1min
<b>Anelamento</b>	55° C - 40 s	55° C - 1min	55° C - 1min	55° C - 1min	55° C - 1min	55° C - 1min	54° C - 1min	54° C - 1min	54° C - 1min
<b>Extensão</b>	72° C - 90 s	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min	72° C - 2 min
<b>Extensão final</b>	72° C - 10 min	72° C - 7min	72° C - 7min	72° C - 7min	72° C - 7min	72° C - 7min	72° C - 5 min	72° C - 5 min	72° C - 5 min

2 Fonte: autor (2021)

3

4 **Tabela 2:** Condições para montagem das reações dos genes metalo-β-lactamases e à enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	<i>bla<sub>IMP</sub></i>	<i>bla<sub>SPM1</sub></i>	<i>bla<sub>GES</sub></i>	<i>bla<sub>NDM</sub></i>	<i>bla<sub>VIM2</sub></i>	<i>bla<sub>TEM</sub></i>	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	<i>bla<sub>CTX-M</sub></i>
<b>Volume inicial</b>	25 µL	30 µL	30 µL	30 µL	25 µL	25 µL	30 µL	30 µL	30 µL
<b>Iniciador (cada par)</b>	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)	1 µL(10 pmol/L)
<b>Solução de GoTaq® Green Master Mix</b>	12,5 µL	15 µL	15 µL	15 µL	12,5 µL	12,5 µL	15 µL	15 µL	15 µL
<b>DNA*</b>	3 µL	5 µL	5 µL	5 µL	3 µL	3 µL	4 µL	4 µL	4 µL
<b>Água livre de nucleases</b>	7,5 µL	8 µL	8 µL	8 µL	7,5 µL	7,5 µL	9 µL	9 µL	9 µL

5 \*concentração do DNA (50≅300 ng/mL)

6 Fonte: autor (2021)

**Tabela 3.** Iniciadores utilizados para os genes das enzimas  $\beta$ -lactamases

Iniciadores	Pares de bases	Sequência (5' 3')	Autores
TEM - fw	800	CATTTCCGTGTCGCCCTTATTC	[22]
TEM - rv	800	CGTTCATCCATAGTTGCCTGAC	
SHV - fw	713	AGCCGCTTGAGCAAATTA AAC	[22]
SHV - rv	713	ATCCCGCAGATAAATCACCAC	
CTX- M-fw	585	CGATGTGCAGTACCAGTAA	[22]
CTX- M-rv	585	TTAGTGACCAGAATCAGCGG	
KPC-fw	882	TGTCACTGTATCGCCGTC	[23]
KPC-rv	882	TCAGTGCTCTACAGAAAACC	
IMP - fw	740	TGAGCAAGTTATCTGTATTC	[22]
IMP - rv	740	TTAGTTGCTTGGTTTTGATG	
SPM1 - fw	648	CCTACAATCTAACGGCGACC	[22]
SPM1 - rv	648	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC	
GES - fw	860	ATGCGCTTCATTCACGCAC	[22]
GES - rv	860	CTATTGTCCGTGCTCAGG	
NDM - fw	984	CACCTCATGTTTGAATTCGCC	[24]
NDM - rv	984	CTCTGTCACATCGAAATCGC	
VIM2 - fw	865	AAAGTTATGCCGCACTCACC	[22]
VIM2 - rv	865	TGCAACTTCATGTTATGCCG	
OXA 01- fw	300	AGCTATGGCTAGCGTTAC	[25]
OXA 01- rv	300	GTCCTACTGCGGTA CTGTT	
OXA 23- fw	501	GATCGGATTGGAGAACCAGA	[25]
OXA 23- rv	501	ATTTCTGACCGCATTTCAT	
OXA 24 - fw	243	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA	[25]
OXA 24 - rv	243	AGTTGAGCGAAAAGGGATT	
OXA 51- fw	353	TAATGCTTTGATCGGCCTTG	[25]
OXA 51- rv	353	TGGATTGCACTTCATCTTGG	
OXA 58- fw	599	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG	[25]
OXA 58- rv	599	CCCCTCTGCGCTCTACATAC	

TEM: Temoniera, SHV: Sulphidryl Variable, CTX-M: Cefotaximases Munich, KPC: Klebsiela pneumoniae carbapenemase, IMP: Imipenemase metalo  $\beta$ -lactamase, NDM: New Delhi Metalo  $\beta$ -lactamase, VIM: Verona integron-borne Metalo  $\beta$ -lactamase, GES: Guiana extended-spectrum, SPM: São Paulo Metalo  $\beta$ -lactamase, Oxa: oxacilinase fw: forward, rv: reverse.

#### 2.7.4 Reação em Cadeia da Polimerase em multiplex-para detecção de integrons de classe 1, 2 e 3.

Para a caracterização dos integrons utilizou-se como alvos iniciadores específicos para as sequências *intI1*, *intI2* *intI3*, estas foram amplificadas pelo método de reação de PCR-Multiplex utilizando os iniciadores descritos por Goldstein [26], como demonstrado na Tabela 4. Nas reações de amplificação por mPCR foram feitas em um volume final de 30 µL contendo 15 µL de uma solução de DNA Polimerase Martex-mix (Promega, EUA), 10 pmol de cada iniciador e 3 µL de molde de DNA (100 ng de DNA/reação), conforme a Tabela 4. As amplificações foram realizadas em termociclador 2720 Thermal Cycler (California, USA). Os produtos da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% e corados em solução para coloração de Ácido Nucleico – UniSafe Dye (20.000x) (UNISCENCE, USA) de acordo com as normas do fabricante. E o gel foi fotografado sob exposição de iluminação UV.

**Tabela 4:** Iniciadores específicos utilizados para detecção de genes *intI-1*, *intI- 2*, e *intI-3* dos isolados bacterianos

Iniciadores	Sequência (5' - 3')	Amplicon (pb)	Ciclo	Referência
<i>IntI 1 – F</i>	CCTCCCGCACGATGATC	280	35 Ciclos	
<i>IntI 1 – R</i>	TCCACGCATCGTCAGGC		Desnaturação Inicial: 95°C- 5 min	
<i>IntI 2 – F</i>	TTATTGCTGGGATTAGGC	233	Desnaturação: 94°C- 1min	[26]
<i>IntI 2 – R</i>	ACGGCTACCCTCTGTTATC		Anelamento: 60°C – 1min	
<i>IntI 3 – F</i>	AGTGGGTGGCGAATGAGTG	600	Extensão: 72°C-1min	
<i>IntI 3 – R</i>	TGTTCTTGATCGGCAGGTG		Extensão Final: 72°C- 10 min	

Fonte: autor (2021)

#### 2.7.5 Caracterização dos grupos de Incompatibilidade dos plasmídeos

A caracterização dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos foi realizada por PCR utilizando 8 reações de amplificações, sendo 5 multiplex-PCR e 3 simplex-PCR. Usando primers relatados anteriormente [27], para detecção dos seguintes replicons: IncA / C, IncB / O, IncF (FIA, FIB, FIC, FIIA, subgrupos FrepB), IncHI1, IncHI2, IncI1-Ig, IncK, IncL / M, IncN, IncP IncT, IncW e IncY.

#### 2.8 Sequenciamento do genoma e anotações

O genoma da linhagem *K. pneumoniae* KPCEU1 foi submetido ao processo de montagem de dados obtidos pelo MiSeq, como auxílio do pipeline (**algoritmos executados por meio de uma sequência predeterminada p processar os dados**) A5 Este utiliza uma abordagem de sequenciamento de novo para genomas procaríotos A5 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23028432>, acesso em 05 de dezembro de 2020) [28]. O pipeline e os programas associados são de códigos abertos distribuídos sob licença GPLv3, executado em ambiente Linux, e está instalado no servidor local para análise bioinformática de Neoprosperta (Configuração: 03 servidores Linux, Core i7, 64 GB RAM, 2 TB HD). Os genes sequenciados foram previstos usando como inferência de proteínas constante no BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, acesso em 20 de dezembro de 2020)[29]. Com base nas sequências anotadas do genoma de *K. pneumoniae* KPCEU1 (extensão GBK) realizou-se as análises de subsistemas genéticos utilizando o programa *Rapid Annotation using Subsystem Technology* (RAST), uma ferramenta de bioinformática importante usada para a previsão de genes putativos (<http://rast.nmpdr.org>, acesso em 10 de janeiro de 2021) [30]. O programa *The Comprehensive Antibiotic Resistance Database* (CARD) (<https://card.mcmaster.ca>, acesso em 20 de janeiro de 2021) [31] foi utilizado para caracterizar o perfil de resistência a fármacos antimicrobianos

Análise de digitação da sequência Multilocus (MLST) (com base em sete locus genes: (*gapA*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *rpob*, and *tonB*) foram utilizados para a identificação de sequência tipo (ST) e complexo clonal. O ST foi obtido através do site <https://bigsd.bpasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>, acesso em 25 de janeiro de 2021) [32].

O alinhamento de múltiplas sequências genômicas foi realizado usando o algoritmo Mauve progressivo (<http://darlinglab.org/mauve/mauve.html>, acesso em 30 de janeiro de 2021) [33]. Também

realizamos uma comparação entre os genomas deste estudo com os genomas de *K. pneumoniae* ATCC BAA – 2146, *K. pneumoniae* KP58, *K. pneumoniae* KP69, *K. pneumoniae* Kp13, *K. pneumoniae* Kp36 depositados em Genbank, NCBI.

Para comparar os genomas selecionados com *K. pneumoniae* KPCEU1 em nível de proteína utilizou-se o servidor OrthoVenn2 uma importante plataforma da web que tem por finalidade a comparação e análise de clusters de genomas ortólogos. (<http://orthovenn2.bioinforkits.net/home>, acesso em 01 de fevereiro de 2021) [34, 35]. O PHASTER [36] e o banco de dados de fatores de virulência (VFDB) (<http://www.mgc.ac.cn/VFs/> acesso em 05 de fevereiro de 2021) [37] identificou os genes de virulência associados a esse isolado.

A filogenia do genoma foi gerada usando o servidor TYGS A sequência do genoma gerada foi usada para determinar os valores da OGR1 em relação às cepas de *Klebsiella* intimamente relacionadas, incluindo o DNA digital, valor de hibridização de DNA (dDDH) calculado usando a fórmula 2 do servidor web GGDC (<http://ggdc.dsmz.de/ggdc.php#>; <http://tygs.dsmz.de> acesso em 15 de fevereiro de 2021)[38].

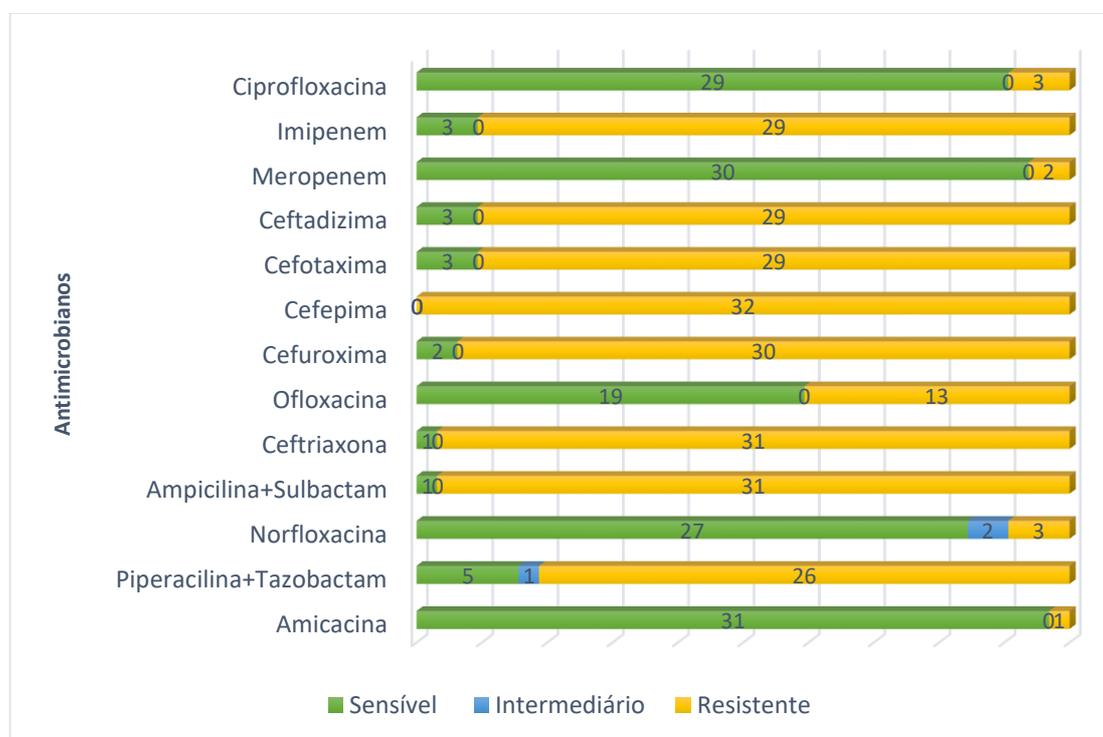
### 3. Resultados

#### 3.1 Isolamento e Identificação de bactérias Gram-negativas obtidas de amostras coletadas de sedimentos rio Anil em São Luís-MA.

Neste estudo foram isoladas e identificadas 32 bactérias Gram-negativas, distribuídas em 4 espécies distintas: *O. intermedium* 62,5% (n=20), *O. tritici* 27,27% (n=9), *Stenotrophomonas maltophilia* 6,06% (n=02) e *Klebsiella pneumoniae* 3,03% (n=01). As espécies mais detectadas pertencem às famílias *Brucellaceae* e *Enterobacteriaceae*.

#### 3.2 Determinação do perfil de susceptibilidade bacteriana aos fármacos antimicrobianos.

Neste estudo foram realizados testes de susceptibilidade às drogas antimicrobianas pelo método de disco difusão. Nos ensaios foram utilizadas 13 drogas diferentes para os isolados de bactérias Gram-negativas selecionados na primeira e segunda coleta. O perfil de resistência dos 32 isolados da coleta foi de 100% para cefepima, 96,8% (n=31) para ofloxacina e ceftriaxona e de 90,6% (n=29) para imipenem. Enquanto o perfil de sensibilidade foi de 96,8% (n=31) para ampicilina, seguido de 93,7% (n=30) para meropenem (Figura 2).



**Figura 2:** Perfil de susceptibilidade dos isolados bacterianos aos fármacos antimicrobianos isolados do sedimento do Rio Anil-MA

### 3.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e VITEK 2 para meropenem, cefepima e gentamicina.

Determinou-se a CIM para os fármacos antimicrobianos: gentamicina, imipenem e cefepima de acordo com o perfil obtido no antibiograma o isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 e a linhagem de referência de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700.603 com. O isolado de *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou de acordo com as normas do BrCAST-EUCAST (2020) suscetibilidade ao antimicrobiano gentamicina e resistência ao imipenem e cefepima, variando a CIM de 18 a 32 µg/mL (tabela 5). Já o isolado de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700.603 não apresentou CIM a nenhum dos 3 antibióticos testados de acordo com as concentrações utilizadas. O CIM manual foi realizado com 6 isolados do gênero *Ochrobactrum* tendo como critério de inclusão o perfil de suscetibilidade obtido através do método Kirby-Bauer, sendo assim os que mais apresentaram resistência a maior quantidade de drogas foi escolhido, dentre eles 3 isolados da espécie *Ochrobactrum tritici* e 3 de *Ochrobactrum intermedium* todos apresentaram suscetibilidade as concentrações testadas do antibiótico imipenem com o resultado abaixo de 4 µg/mL e todos isolados obtiveram crescimento com cefepima variando de 8 a 256 µg/mL (Tabela 6). A CIM em relação a KPCEU1 também foi determinada pelo VITEK e o resultado obtido foi comparado com o encontrado no teste realizado manualmente, para melhor determinar o perfil de resistência desse isolado (Tabela 5).

**Tabela 5:** Concentração inibitória mínima (CIM) e VITEK 2 em µg/mL aos antimicrobianos Cefepima, Gentamicina e Imipenem do isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1.

Antimicrobianos	Microrganismo	
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KPCEU1	
	CIM: Vitek 2	CIM: Manual
Cefepima	≥ 64 µg/mL (R)	18 µg/mL (R)
Gentamicina	≤ 1 µg/mL (S)	< 4 µg/mL (S)
Imipenem	≥ 16 µg/mL (R)	32 µg/mL (R)

R = resistente; S = sensível

**Tabela 6:** Concentração inibitória mínima (CIM) em µg/mL aos antimicrobianos Cefepima, Gentamicina e Imipenem obtidas para os isolados *Ochrobactrum tritici* e *Ochrobactrum intermedium*.

Microrganismos	Imipenem	Gentamicina	Cefepima
	µg/mL	µg/mL	µg/mL
<i>Ochrobactrum tritici</i> P11016C3	< 4 (S)	1 (S)	128 (R)
<i>Ochrobactrum intermedium</i> P1108C2	< 4 (S)	4 (S)	128 (R)
<i>Ochrobactrum tritici</i> P21016C5	< 4 (S)	< 4 (S)	128 (R)
<i>Ochrobactrum intermedium</i> P22C16	< 4 (S)	4 (S)	64 (R)
<i>Ochrobactrum tritici</i> P20C16	< 4 (S)	< 4 (S)	8 (S)
<i>Ochrobactrum intermedium</i> P2108C2	< 4 (S)	2 (S)	256 (R)

R = resistente; S = sensível

### 3.4 Time Kill-curve (curva-de tempo-morte)

A linhagem *K. pneumoniae* KPCEU1 quando submetida ao antimicrobiano cefepima apresentou crescimento após exposição de tempo 6h para as concentrações 4 µg/mL e 8µg/mL, já nas concentrações 16 µg/mL e 32 µg/mL não obteve crescimento nas primeiras 6 horas do ensaio (Figura 3). Entretanto, para gentamicina, *K. pneumoniae* KPCEU1 não apresentou crescimento em nenhuma das concentrações testadas, tendo um decaimento a partir do tempo de 6 horas em todas as concentrações, apresentado assim um efeito bactericida sob esse isolado (Figura 4). Quanto a resposta ao fármaco antimicrobiano meropenem, nas primeiras 6 horas, não houve crescimento bacteriano na concentração 64 µg/mL. Entretanto, foi observado o crescimento da linhagem *K. pneumoniae* nas demais concentrações em todos os tempos do ensaio (Figura 5). Apresentando no tempo de 30 horas de exposição 9.0 LogUFC/mL nas concentrações de 4 µg/mL a 32 µg/mL para o fármaco cefepime. Após 24 horas o isolado apresentou o 9.0 LogUFC/mL para o fármaco meropenem em todas as concentrações testadas. O efeito bacteriostático foi constatado nas primeiras 6 horas de ensaio com os fármacos antimicrobiano cefepima e meropenem.

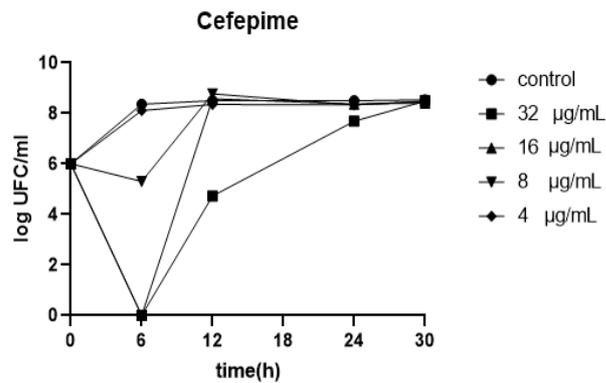


Figura 3: Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para cefepime em diferentes concentrações.

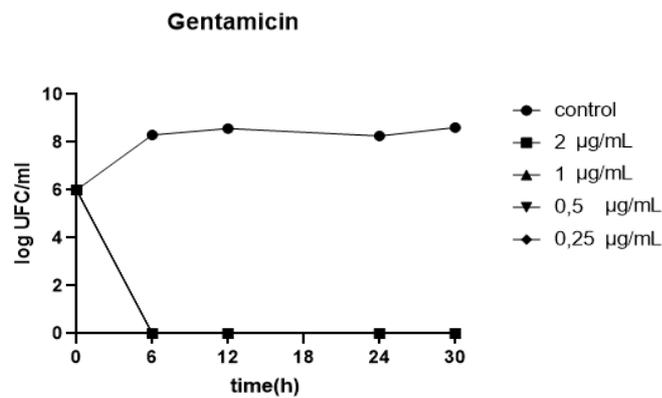


Figura 4: Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para gentamicina em diferentes concentrações.

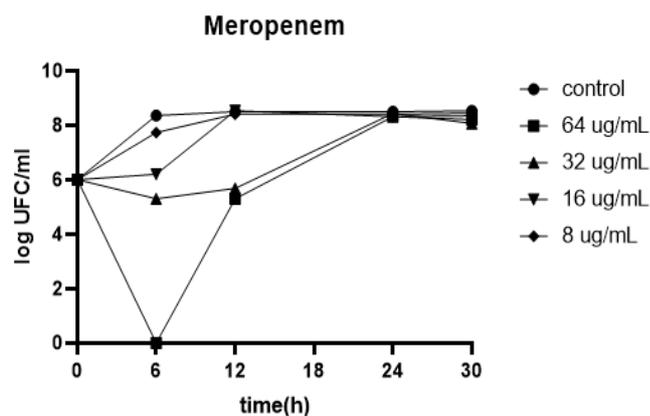


Figura 5: Curva de tempo-morte do isolado *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 para meropenem em diferentes concentrações.

### 3.5 Detecção de genes relacionados a enzimas $\beta$ -lactamases (*bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*) e enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (*KPC*)

Entre as 32 linhagens de bactérias isoladas e analisadas no presente estudo, 30,3% (n=10) apresentaram resultado positivo para o gene *bla<sub>SHV</sub>*. Quatro isolados (12,12%) apresentaram o gene *bla<sub>TEM</sub>*. Um isolado (3,03%)

identificado e previamente sequenciado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1, apresentou os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> (Tabela 7).

### 3.6 Detecção de genes relacionados a enzimas metalo $\beta$ -lactamases (*bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM1</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>VIM2</sub>).

Nenhuma dos isolados bacterianos apresentaram os genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM2</sub>. Entretanto, 48,4% (n=16) dos isolados bacterianos tiveram resultado positivo para o gene *bla*<sub>GES</sub>. Três isolados (9,09%) apresentaram o gene *bla*<sub>SPM1</sub>. Um isolado (3,03%) identificado como *Ochrobactrum intermedium* teve resultado positivo para o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> (Tabela 7).

### 3.7 Detecção dos genes codificadores das serino carbapenemases (*bla*<sub>OXA1</sub>, *bla*<sub>OXA23</sub>, *bla*<sub>OXA24</sub>, *bla*<sub>OXA51</sub> e *bla*<sub>OXA58</sub>)

O gene *bla*<sub>OXA1</sub> foi o mais detectado sendo encontrado em 12 (36,36%) isolados bacterianos analisados. Em adição o gene *bla*<sub>OXA51</sub> foi detectado em 5 isolados bacterianos (15,15%). O gene *bla*<sub>OXA58</sub> foi identificado em duas (6,06%) amostras da espécie *Ochrobactrum intermedium*. Os genes *bla*<sub>OXA23</sub> e *bla*<sub>OXA24</sub> foram detectados em um isolado (3,03%) bacteriano cada, ambos da espécie *Ochrobactrum intermedium* ((Tabela 7).

### 3.8 Detecção de integrons de classe 1, 2 e 3.

Neste estudo utilizou-se iniciadores específicos para o gene da integrase 1, 2 e 3. Dos 32 isolados 22 (66,66%) apresentaram o gene *intl* integron de classe 1 (com amplicons de 280 pb). Destes isolados, 84,21% (n=16/19) eram *Ochrobactrum intermedium*; 55,55% (n=5/9) eram da espécie *Ochrobactrum tritici* e 50% (n=1/2) eram *Stenotrophomonas maltophilia*. Para O gene *intl* integron de classe 3 (apresentando amplicons de 600pb), foi detectado em 15,78% (n=3/19) de *Ochrobactrum intermedium* e em 11,11% (n=1/9) de *Ochrobactrum tritici*. Nenhum isolado deste estudo apresentou o gene *intl* integron de classe 2 (Tabela 7).

### 3.9 Detecção dos grupos de Incompatibilidade dos plasmídeos

O resultado de PCR foi negativo para os grupos plasmidial IncA/C, IncB / O, IncF (FIA, FIB, FIC, FIIA, subgrupos FrepB), IncHI1, IncHI2, IncI1-Ig, IncK, IncL/M, IncN, IncP IncT, IncW e IncY.

**Tabela 7:** Identificação dos marcadores de resistência e suscetibilidade à fármacos antimicrobianos dos 32 isolados da coleta.

Amostras	Espécie	Perfil (R) antimicrobianos	Genes de resistência	Integrans	Plasmídeos
P20M4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CPM, CRO, IPM, ASB, AMI, CRX, MRP.	--	--	--
P20C16	<i>Ochrobactrum tritici</i>	CPM, CTX, OFX, CRO, CAZ, IPM, ASB, CRX, PTZ.	--	--	--
P21C16	<i>Ochrobactrum tritici</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, IPM, ASB, CRX, PTZ, AMP.	--	Int-1	--
P21M4	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	CPM, CTX, CRO, IPM, ASB, CRX, MRP.	--	Int-1	--
P22C16	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, OFX, CRO, CAZ, IPM, ASB, CRX, PTZ, NFX.	--	Int-1, Int-3	--
P31C2	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, IPM, ASB, PTZ, AMP.	--	--	--
P313M16	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CPM, CTX, OFX, CRO, CAZ, IPM, ASB, AMI, CRX, NFX, MRP, CIP.	<i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>OXA-1</sub></i> , <i>bla<sub>CTX-M</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	--	--
P32C8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, ASB, CRX, PTZ, AMP.	<i>bla<sub>OXA58</sub></i>	Int-1	--
P38C8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, ASB, PTZ.	--	Int-1	--
P37C8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, ASB, PTZ, IPM.	--	Int-1	--
P33C8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, CAZ, ASB, PTZ.	--	Int-1	--
P32M8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, OFX, CRO, CAZ, IPM, ASB, CRX,; NFX, CIP.	--	Int-1	--
P36C8	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CPM, CTX, CRO, IPM, ASB, PTZ, NFX, CIP.	<i>bla<sub>OXA24</sub></i> , <i>bla<sub>OXA58</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i>	Int-1	--
P110°16C3	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>SPM</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>	--	--
P110°8C1	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--
P110°8C2	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1, Int-3	--
P110°16C2	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>GES</sub></i>	Int-1	--
P110°16C4	<i>Ochrobactrum tritici</i>	ASB, CRX, CPM, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i>	Int-1	--
4CP110°2	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	CRO, CRX, AMP, CPM, CAZ, IPM	--	Int-1	--
P210°8C4	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA51</sub></i> , <i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--

<b>P210<sup>18</sup>C1</b>	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA51</sub></i> , <i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>	Int-3	--
<b>P210<sup>4</sup>C1</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	--	--
<b>P210<sup>16</sup>C5</b>	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA51</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>16</sup>C2</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA51</sub></i> , <i>bla<sub>SPM</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>NDM</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>18</sup>C3</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>16</sup>C3</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>8</sup>C2</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM, AMI	<i>bla<sub>SPM</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	--	--
<b>P210<sup>4</sup>C2</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA23</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i>	Int-1, Int-3	--
<b>P210<sup>4</sup>C5</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>16</sup>C1</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	<i>bla<sub>OXA1</sub></i> , <i>bla<sub>OXA51</sub></i> , <i>bla<sub>GES</sub></i> , <i>bla<sub>SHV</sub></i>	Int-1	--
<b>P210<sup>16</sup>C4</b>	<i>Ochrobactrum intermedium</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	--	--	--
<b>P210<sup>18</sup>C2</b>	<i>Ochrobactrum tritici</i>	PTZ, ASB, CRO, CRX, AMP, CPM, CTX, CAZ, IPM	--	--	--

CPM, Cefepima; CTX, Cefotaxima; OFX, Ofloxacin; CRO, Ceftriaxona; CAZ, Ceftazidime; IPM, Imipenem; ASB, Ampicillin+Sulbactam, AMI Amicacina; CRX, Cefuroxime; GEN, Gentamicin; PTZ, Piperacillin+Tazobactam; NFX, Norfloxacin; AMP, Ampicillin; MRP, Meropenem; CIP, Ciprofloxacin, --, negativo.

### 3.10 Análise genômica

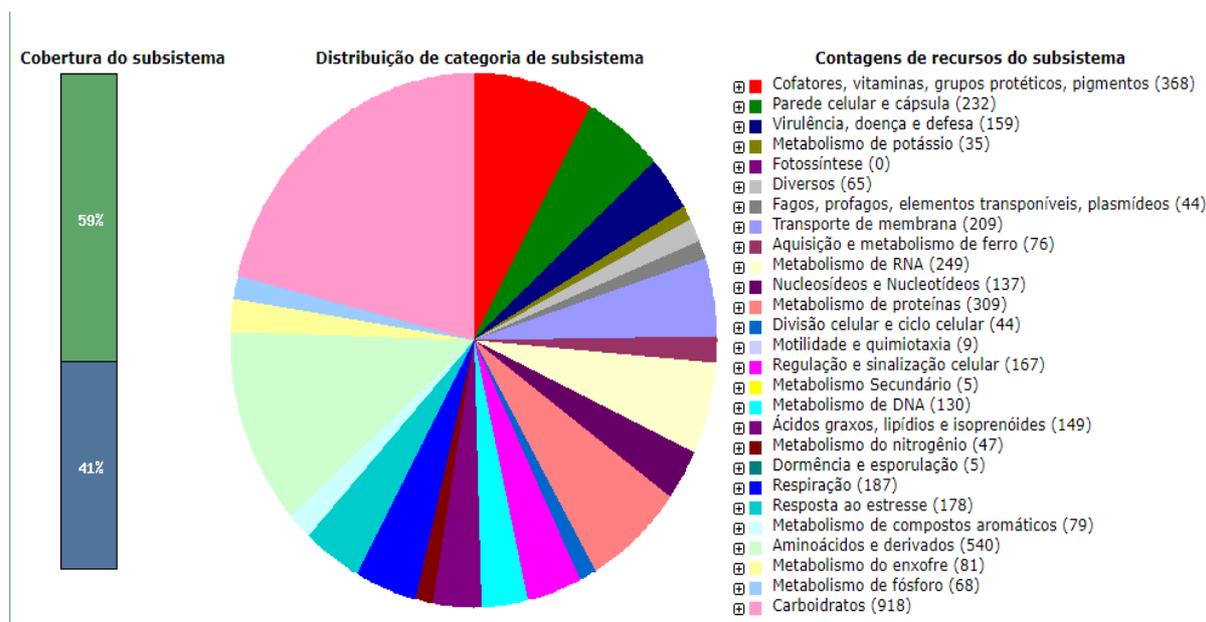
A análise do genoma da linhagem *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 pelo RAST indicou a presença de subsistemas genéticos divididos em genes tabulados no sistema com 59% já tabulados e identificados pelo RAST. Entranto, ressalta-se que 15,26% das sequências nucleotídicas foram identificadas como proteínas hipotéticas relacionadas ou não com genes conhecidos. O rascunho do genoma anotado de *K. pneumoniae* KPCEU1 foi depositado no GenBank com a identificação PRJNA721300 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/?term=PRJNA721300>), SRR14219769 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/search/all/?term=SRR14219769>), e a sequência parcial do gene ribossomal 16 S foi depositada com a identificação MW917235 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MW917235>).

Na categorização dos genes obtidos pelos sub-sistemas, a *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou um total de 3072 genes sendo 2915 relacionados a proteínas não hipotéticas e 157 genes relacionados a proteínas hipotéticas (Figura 7, Tabela 8). Baseado nos dados obtidos pelo MLST de *K. pneumoniae* KPCEU1 o clone prevalente foi a sequência do tipo 11 (ST11).

**Tabela 8:** Dados do Sequenciamento do Isolado KPCEU1

ID's	DATABASE
Strain	KPCEU1
Taxonomy	Bactéria: <i>Klebsiella pneumoniae</i> ; <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPCEU1
Size	5,480,460
GC Content	57,4
N50	250959
L50	7
Number of Contigs (with PEGs)	56
Number of Subsystems	593
Number of Coding Sequences	5275
Number of RNAs	94

Fonte: autor (2021)



**Figura 6:** Categorização e distribuição dos subsistemas encontrados pelo RAST para a linhagem *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1.

### 3.11 Caracterização do perfil de resistência à antibióticos do isolado de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1

Na linhagem *K. pneumoniae* KPCEU1 foi identificado a presença de genes relacionados as enzimas beta-lactamases, sendo as do tipo CTX-M, SHV, OXA e KPC apresentado identidade e similaridade de 100% com sequências nucleotídicas depositadas no *GenBank* e essas sequências apresentaram um alto padrão de qualidade quando analisadas pelo programa CARD.

Muitas proteínas e seus genes correlacionados encontrados em *K. pneumoniae* KPCEU1 associados a resistência a fármacos antimicrobianos, mostraram uma relação direta com o perfil de resistência observado no teste de susceptibilidade, pois, as bombas de efluxo presentes neste isolado podem promover resistência a vários fármacos antimicrobianos, tais como fluoroquinolonas (ciprofloxacina e norfloxacina), tetraciclina, a classe dos macrolídeos, aminoglicosídeos, monobactâmico, cefalosporina, cefamicina e aos carbapenêmicos. (Tabela 9).

**Tabela 9:** Perfil molecular da resistência à antibióticos em *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1 obtidos pelo CARD com buscas de similaridade e identidade.

RGI	ARO Term	SNP	Detection	AMR	Drug	Resistance	% Identity of Matching Region	% Length of Reference Sequence
Criteria			Criteria	Gene Family	Class	Mechanism		
Perfect	oqxA		protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, glycylcycline, tetracycline antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, nitrofurantoin antibiotic	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	oqxB		protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, glycylcycline, tetracycline antibiotic, diaminopyrimidine antibiotic, nitrofurantoin antibiotic	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	CTX-M-15		protein homolog model	CTX-M beta-lactamase	cephalosporin	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	SHV-11		protein homolog model	SHV beta-lactamase	carbapenem, cephalosporin, penam	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnF		protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, aminoglycoside antibiotic, cephalosporin, tetracycline antibiotic, peptide antibiotic, rifamycin antibiotic	antibiotic efflux	100.0	100.00
Perfect	mphA		protein homolog model	macrolide phosphotransferase (MPH)	macrolide antibiotic	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	sul1		protein homolog model	sulfonamide resistant sul	sulfonamide antibiotic	antibiotic target replacement	100.0	100.00
Perfect	arr-3		protein homolog model	rifampin ADP-ribosyltransferase (Arr)	rifamycin antibiotic	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	catB3		protein homolog model	chloramphenicol acetyltransferase (CAT)	phenicol antibiotic	antibiotic inactivation	100.0	100.00

Perfect	OXA-1	protein homolog model	OXA beta-lactamase	cephalosporin, penam	antibiotic inactivation	100.0	105.43
Perfect	AAC(6')-Ib-cr	protein homolog model	AAC(6')	fluoroquinolone antibiotic, aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Perfect	KPC-2	protein homolog model	KPC beta-lactamase	monobactam, carbapenem, cephalosporin, penam	antibiotic inactivation	100.0	100.00
Strict	emrR	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic efflux	92.57	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnG	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, aminoglycoside antibiotic, carbapenem, cephalosporin, penam, peptide antibiotic, penem	antibiotic efflux	99.74	100.00
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnH	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, aminoglycoside antibiotic, carbapenem, cephalosporin, penam, peptide antibiotic, penem	antibiotic efflux	93.95	100.00
Strict	H-NS	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump, resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, cephalosporin, cephamycin, penam, tetracycline antibiotic	antibiotic efflux	94.07	98.54
Strict	baeR	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	aminoglycoside antibiotic, aminocoumarin antibiotic	antibiotic efflux	92.05	100.00

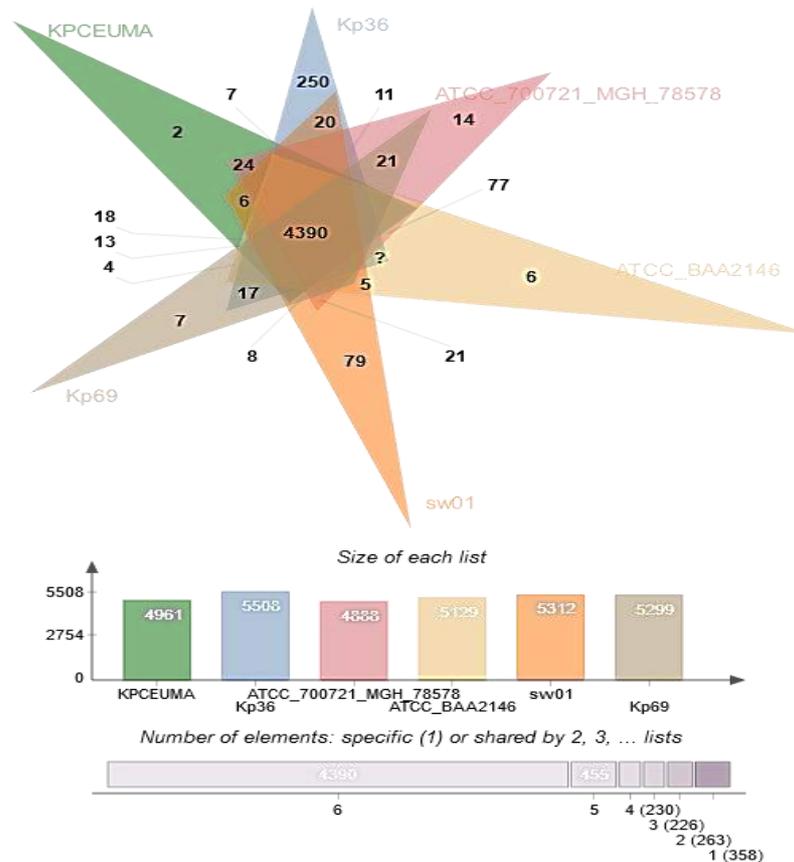
Strict	FosA6	protein homolog model	fosfomycin thiol transferase	fosfomycin	antibiotic inactivation	97.84	100.00
Strict	msbA	protein homolog model	ATP-binding cassette (ABC) antibiotic efflux pump	nitroimidazole antibiotic	antibiotic efflux	92.78	100.00
Strict	CRP	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, fluoroquinolone antibiotic, penam	antibiotic efflux	99.05	100.00
Strict	marA	protein homolog model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump, General Bacterial Porin with reduced permeability to beta-lactams	fluoroquinolone antibiotic, monobactam, carbapenem, cephalosporin, glycylcycline, cephamycin, penam, tetracycline antibiotic, rifamycin antibiotic, phenicol antibiotic, triclosan, penem	antibiotic efflux, reduced permeability to antibiotic	92.74	97.64
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> OmpK37	protein homolog model	General Bacterial Porin with reduced permeability to beta-lactams	monobactam, carbapenem, cephalosporin, cephamycin, penam, penem	reduced permeability to antibiotic	94.27	102.67
Strict	<i>Klebsiella pneumoniae</i> KpnE	protein homolog model	major facilitator superfamily (MFS) antibiotic efflux pump	macrolide antibiotic, aminoglycoside antibiotic, cephalosporin, tetracycline antibiotic, peptide antibiotic, rifamycin antibiotic	antibiotic efflux	99.17	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> ampH beta-lactamase	protein homolog model	ampC-type beta-lactamase	cephalosporin, penam	antibiotic inactivation	85.71	100.26
Strict	APH(3')-Ia	protein homolog model	APH(3')	aminoglycoside antibiotic	antibiotic inactivation	98.52	100.00
Strict	QnrB10	protein homolog model	quinolone resistance protein (qnr)	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic target protection	99.12	100.00

Strict	<i>Escherichia coli</i> parC conferring resistance to fluoroquinolone	S80I	protein variant model	fluoroquinolone resistant parC	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic target alteration	94.41	100.00
Strict	<i>Haemophilus influenzae</i> PBP3 conferring resistance to beta-lactam antibiotics	D350N, S357N	protein variant model	Penicillin-binding protein mutations conferring resistance to beta-lactam antibiotics	cephalosporin, cephamycin, penam	antibiotic target alteration	52.37	96.39
Strict	<i>Escherichia coli</i> UhpT with mutation conferring resistance to fosfomicin	E350Q	protein variant model	antibiotic-resistant UhpT	fosfomicin	antibiotic target alteration	95.03	100.00
Strict	<i>Escherichia coli</i> gyrA conferring resistance to fluoroquinolones	S83I	protein variant model	fluoroquinolone resistant gyrA	fluoroquinolone antibiotic	antibiotic target alteration	92.23	100.23
Strict	<i>Escherichia coli</i> EF-Tu mutants conferring resistance to Pulvomycin	R234F	protein variant model	elfamycin resistant EF-Tu	elfamycin antibiotic	antibiotic target alteration	97.21	88.51
Strict	<i>Escherichia coli</i> marR mutant conferring antibiotic resistance		protein overexpression model	resistance-nodulation-cell division (RND) antibiotic efflux pump	fluoroquinolone antibiotic, cephalosporin, glycyclycline, penam, tetracycline antibiotic, rifamycin antibiotic, phenicol antibiotic, triclosan	antibiotic target alteration, antibiotic efflux	83.33	100.00

Fonte: autor (2021)

3.12 Análise comparativa do genoma: Orthovenn, VFDB, MAUVE, PHASTER e TYGS

Clusters de ortólogos nas linhagens *K. pneumoniae* KPCEU1, Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01 sendo analisados usando o software OrthoVenn 2. A análise das linhagens indicou que elas formam 5922 aglomerados, sendo 1583 aglomerados ortólogos (contém pelo menos duas espécies) e 4390 ortólogos do genoma do núcleo (Figura 8 e 9). *K. pneumoniae* KPCEU1 apresentou dois grupos únicos (exclusivos) com proteínas. Detectou-se genes contendo sequências de cinco linhagens distintas de *K. pneumoniae*, dos quais 455 (7,68%), 230 (3,88%), 226 (3,81%), 263 (4,44%) e 358 (6,04%) compartilhadas em cinco, quatro, três, duas e uma das espécies analisadas.



**Figura 7:** Diagrama de Venn representando os agrupamentos de proteínas ortólogas compartilhados entre o isolado de *K. pneumoniae* KPCEU1 e *K. pneumoniae* de referência: Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01.



**Figura 8:** Sobreposições (*Overlaps*) presentes na análise OrthoVenns do isolado de *K. pneumoniae* KPCEU1 e *K. pneumoniae* de referência: Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01.

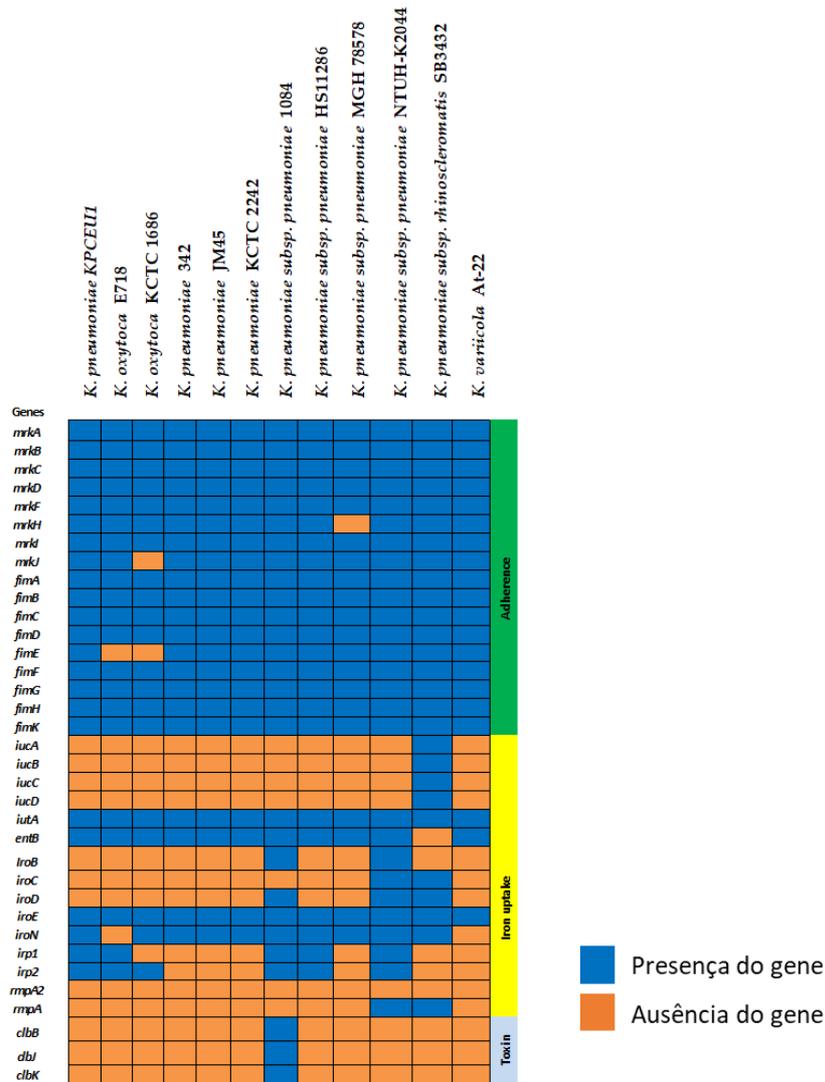
A análise comparativa genômica entre os isolados de *K. pneumoniae* KPCEU1 e as linhagens *K. pneumoniae* ATCC BAA-2146, *K. pneumoniae* KP58, *K. pneumoniae* KP69, *K. pneumoniae* KP13, *K. pneumoniae* KP36 e *K. pneumoniae* MGH 78578, demonstrou a existência de mudanças de sobreposição/prioridade dos blocos gênicos, contendo regiões de inversões nos isolados KPCEU1, SWU01, em toda a visualização dos genomas (Figura 9), na sequência entre 2.200.000-5.400.00 e 800.000 e 1.600.000 pb respectivamente, variando dentro da sequência genica de 5.800.000 pb. O baixo grau de divergência de nucleotídeos entre genes ortólogos visto pelo alinhamento do Mauve, demonstrou que a sintaxe dos genes entre os cromossomos são conservados (Figura 9).

Através da análise do genoma da cepa *K. pneumoniae* KPCEU1 pelo programa PHASTER reconheceu-se a existência de cinco regiões diferentes para sequências de bacteriófago (Tabela 10). Destas quatro regiões detectadas formam sequências incompletas de 14,3kb; 23,7kb; 10,3kb e 8,4 kb. Foi verificada uma sequência intacta com região maior com 34,6 kb, contendo 47 proteínas. Os fagos mais comuns identificados foram PHAGE\_Escher\_pro483\_NC\_028943(17), PHAGE\_Salmon\_ST64B\_NC\_004313(3), PHAGE\_Enterolambda\_NC\_001416(2), PHAGE\_Enterophi92\_NC\_023693(4) e PHAGE\_Escher\_RCS47\_NC\_042128(3).

O banco de dados TYGS foi utilizado para estimar a hibridação digital DNA-DNA (dDDH) [29]. Os resultados indicaram alta similaridade entre *K. pneumoniae* KPCEU1 e *K. pneumoniae* JM45, SMN007259326 e SMN072559328 com respectivamente 99,1%, 98,7% e 98,7%. As espécies *K. pneumoniae* KPCEU1 e *K. pneumoniae* JM45 apresentaram uma diferença de 0,09% no conteúdo G + C. (figura 10).

Com base nos dados obtidos em relação aos fatores de virulência no VFDB, verificou-se um grande espectro de genes para virulência expresso nos resultados, comparando-se sua ausência e presença relacionado ao isolado de *K. pneumoniae* KPCEU1 em relação a 11 cepas do gênero *Klebsiella*, destas *K. oxytoca* E718, *K. oxytoca* KCTC 1686, *K. pneumoniae* 342, *K. pneumoniae* JM45, *K. pneumoniae* KCTC 2242, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* 1084, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* HS11286, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* MGH 78578, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* NTUH-K2044, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* SB3432 e *K. variicola* At-22. Um total de 118 genes foram correlacionados aos fatores de virulência, como os genes que codificam para as enzimas de adesão, bomba de efluxo, proteínas captadoras de ferro, genes reguladores e sistemas de secreção (figura 11).





**Figura 11:** Análise dos genes associados a virulência das cepas de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *Rhinoscleromatis* e *K. variicola*. A presença de genes de virulência em um genoma específico é representada pela caixa azul e a ausência de genes de virulência é representada por uma caixa laranja.

**Tabela 10:** Regiões de profago previstas pelo PHASTER no genoma de *Klebsiella pneumoniae* KPCEU1.

	Region Length	Completeness	Score	Total Protein	Region position	Most Common Phage	GC%
<b>ABEKHFPE_1</b>	34.6Kb	intact	150	47	<a href="#">13423-48102</a>	PHAGE_Escher_pro483_NC_028943(17)	53.82%
	14.3Kb	incomplete	50	17	<a href="#">809097-823440</a>	PHAGE_Salmon_ST64B_NC_004313(3)	53.56%
<b>ABEKHFPE_3</b>	23.7Kb	incomplete	30	9	<a href="#">91392-115181</a>	PHAGE_Enterolambda_NC_001416(2)	54.57%
	10.3Kb	incomplete	10	11	<a href="#">303387-313775</a>	PHAGE_Enterophi92_NC_023693(4)	48.52%
<b>ABEKHFPE_7</b>	8.4Kb	incomplete	10	7	<a href="#">242256-250730</a>	PHAGE_Escher_RCS47_NC_042128(3)	56.93%

Fonte: autor (2021)

#### 4. Discussão

Os ambientes aquáticos por sua vez sofrem com a ação constante do homem [42]. Nestes ambientes já foram encontrados patógenos microbianos com perfis de resistência a vários antimicrobianos [43]. Neste estudo, a maioria dos isolados foram resistentes a mais de um fármaco antimicrobiano, com 100% destes resistentes a cefepima, uma cefalosporinas de 4ª geração, e 96,8% aos fármacos ampicilina+sulbactam e ceftriaxona. A resistência aos antibióticos beta-lactâmicos já foi descrita em isolados obtidos em estuários de manguezais [45], em sedimentos de mangue na Índia [43] e em reservas naturais de mangue [46]. Estes resultados são relevantes visto que bactérias Gram-negativas com perfis MDR são um grande problema de saúde global, pois a maioria delas já não possui sensibilidade aos antimicrobianos comumente utilizados na prática clínica. Este problema tem sido atribuído ao uso irracional destes fármacos [44].

As espécies dos gêneros *Ochrobactrum* e *Klebsiella* detectadas nas amostras de sedimentos analisadas no presente estudo são consideradas patógenos oportunistas e apontadas como suscetíveis a vários antimicrobianos [15, 39]. *Ochrobactrum* spp. já foram detectadas tanto em meio ambiente quanto na clínica com a maioria das infecções relacionadas ao uso de cateteres em pacientes imunocomprometidos. Endocardite, peritonite, meningite, osteomielite, endoftalmite, artrite séptica e bacteremia são infecções também associadas a este gênero [15]. A espécie *K. pneumoniae* por sua vez, uma das mais importantes do gênero do ponto de vista clínico, está constantemente associada a infecções graves e seus isolados possuem um perfil MDR [40, 41].

O gênero *Ochrobactrum* apresenta limitação por não possuir um ponto de corte da concentração inibitória mínima e normas para o perfil de suscetibilidade definidos, apesar dos constantes relatos associados a infecções oportunistas. Desta forma, os resultados obtidos são interpretados de uma forma generalizada com base em estudos disponíveis. As espécies aqui isoladas apresentaram resistência a cefepima e sensibilidade a imipenem e gentamicina. Esses achados se assemelham aos dados obtidos em um estudo a partir de cinco isolados de *Ochrobactrum* de origem animal [15]. Estudos apontam que a resistência aos beta-lactâmicos é devido a presença do gene *bla<sub>OCH</sub>*, que equivale a uma beta-lactamase de classe C descrito por Ambler [15, 47].

*K. pneumoniae* KPCEU1 se destacou dos demais por apresentar resistência a maioria dos antimicrobianos testados. *K. pneumoniae* é considerada um patógeno oportunista responsável por uma gama de infecções nosocomiais tornando-se assim uma preocupação em saúde pública, cujo perfil na maioria desses isolados está associado a várias infecções bacterianas multirresistentes [48]. *K. pneumoniae* KPCEU1 foi sensível a gentamicina e resistente a cefepima e imipenem. Outros estudos corroboram estes resultados [49, 50, 51]. De fato, o ensaio de curva de tempo-morte mostrou que o antibiótico gentamicina inibiu o crescimento de *K. pneumoniae* KPCEU1 sendo bactericida em todos os tempos e concentrações testadas. Em um outro estudo, com resultado semelhante para testes de inibição de crescimento utilizando gentamicina e doxiciclina, mostrou que existe sinergismo na associação contra isolados de *K. pneumoniae* [52].

Bactérias portadoras de genes para a expressão de enzimas beta-lactamases estão presentes em diversos ambientes desde o nosocomial até em locais imprevisíveis. Em se tratando do ambiente aquático, já foram detectadas bactérias portando os genes *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>GES-2</sub>*, *bla<sub>GES-4</sub>*, *bla<sub>GES-13</sub>* em rios [53, 54], genes *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* em canais de água potável [55], o *bla<sub>IMP-1</sub>*, *bla<sub>IMP-2</sub>*, *bla<sub>OXA-23</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, *bla<sub>CTX-M-8</sub>* e *bla<sub>SFC-1</sub>*, *bla<sub>VIM-1</sub>* e *bla<sub>VIM-13</sub>* em águas residuais domésticas e hospitalares [56]. O ecossistema manguezal por sua vez é descrito como um veiculador importante de microrganismos portadores de genes responsáveis pela resistência aos antibióticos (AGRs) entre espécies bacterianas [46]. Vários fatores corroboram para a presença dos AGRs em ambientes aquáticos, uma vez que estão intimamente relacionadas as ações antrópicas do homem, este ambiente serve de reservatório desses microrganismos que através de mecanismos genéticos processam a troca de elementos genéticos, móveis e imóveis, disseminando os mesmos entre as espécies bacterianas ali presentes [57].

As metalo beta-lactamases são enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos, seus genes que tiveram origem em bactérias no solo e sua disseminação entre bactérias gram-negativas e observada em diversos ambientes ambientais [58]. Dentre os isolados obtidos, 16 do gênero *Ochrobactrum* apresentaram o gene *bla<sub>GES-3</sub>*, 3 isolados do mesmo gênero positivaram para *bla<sub>SPM-1</sub>*. Na literatura não há relatos sobre a detecção desses genes em espécies de *Ochrobactrum*. É interessante notar que o gene *bla<sub>NDM-1</sub>* foi detectado em um isolado da espécie *O. intermedium* avaliada no presente estudo, em um estudo anterior este gene já foi detectado em um isolado de *O. anthropi* em amostras de carne de cabra [59]. Em amostras de solo detectou-se o gene *bla<sub>OXA-1</sub>* em isolados de *Ochrobactrum* spp [60]. O gene *bla<sub>OXA-48</sub>* foi amplificado em um isolado de *O. intermedium* [61].

As bactérias portadoras do gene *bla*<sub>OXA-58</sub> são consideradas responsáveis vários surtos nosocomiais e as linhagens de bactérias ambientais, como *Pseudomonas*, *Rheinheimera*, *Shewanella*, *Raoultella*, *Stenotrophomonas*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Algoriphagus*, *Bowmanella* e *Thalassospira* são apontadas como reservatórios deste gene [62]. Estudos anteriores detectaram a presença dos genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> nos isolados de *Ochrobactrum spp* e *O. anthropi* respectivamente, em amostras de sedimento de Rio urbano [63], em amostras de solo [60], e em amostras de carne de cabra [59].

Em estudos na Itália o isolado de *K. pneumoniae* apresentou positividade para os genes *bla*<sub>CTX-M15</sub>, *bla*<sub>SHV-28</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> [64, 65]. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi identificado em bactérias ambientais no Rio anil [66]. O *bla*<sub>KPC-2</sub> é comumente descrito em vários estudos que descreveram linhagens da espécie *K. pneumoniae* com fenótipos hipervirulentos [67], isoladas de pacientes transplantados [68], isoladas a partir de amostras de efluente de estação de esgoto doméstico [69] em isolados obtidos de águas residuais de hospital e da comunidade em estação de tratamento [70].

Nas linhagens *O. intermedium*, *O. tritici* e *Stenotrophomonas spp*, foram observados os integrons de classe 1 e integron de classe 3, estas sequencias de DNA, contribuem significativamente para distribuição e propagação da resistência aos antimicrobianos, pois possuem a capacidade de inserir cassetes contendo genes de resistência em sua estrutura, dessa forma são tem importância significativa na adaptação e evolução dos isolados bacterianos [71]. Esses resultados são semelhantes aos observados em outros estudos com bactérias Gram-negativas de ambientes aquáticos. Por exemplo, já se tem registro destes elementos genéticos em bactérias de sistemas ribeirinhos [72], em isolados de rio urbano [73, 74] e naqueles provenientes de estação de tratamento de águas residuais [75]. O integron de classe 1 é o mais comumente encontrado no meio ambiente e em ambiente nosocomial. Este dispõe em sua estrutura genes de resistência a desinfetantes e metais pesados e são frequentemente associados a resistência antimicrobiana por ser facilmente transferidos de forma horizontal a diferentes isolados bacterianos [76, 77]. Deste modo, baseado na alta prevalência do gene integron *int11* os isolados bacterianos podem se tornar veículos para a disseminação de genes de resistências a antibióticos entre bactérias presente no ecossistema manguezal.

Os plasmídeos são elementos extracromossomiais capazes de transferir de forma horizontal genes de resistência a antibióticos entre diferentes espécies bacterianas [27]. As análises de PCR para plasmídeo foram negativas, entretanto os resultados com RAST apontam a existência do grupo plasmidial IncQ associado ao genoma das espécies *O. intermedium* e *O. tritici*. Os plasmídeos da família IncQ estão associados a resistência a antibióticos, como estreptomicina e sulfonamidas, estes conseguem se disseminar a uma ampla gama de isolados bacterianos de diferentes ambientes [78, 79].

A capacidade do *K. pneumoniae* KPCEU1 em ser patogênico foi mostrado pelo sistema RAST, o qual indicou vários genes relacionados a proteínas no subsistema de virulência, doença e defesa. Os fatores de virulência foram previamente estabelecidos pelo VFDB no tocante a aderência, este isolado possui fimbrias do tipo 1 e fimbrias do tipo 3, a presença destas foi observado em um isolado *K. pneumoniae* hipervirulenta ST11 [80]. Estes resultados fenotípicos foram confirmados pelo CARD que identificou bombas de efluxo, enzimas beta-lactamases associadas a resistência aos antibióticos beta-lactâmicos em *K. pneumoniae* KPCEU1. O clone ST11 é comumente encontrado em isolados de *K. pneumoniae* e é considerado uma grande ameaça à saúde pública, uma vez que isolados com este clone são apontados como cepas hipervirulentas, com perfil MDR e com elevado potencial de transmissibilidade [80, 81]. Esse clone tem uma correlação com o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, quase todos isolados com ST11 produzem esse gene, estudos relataram esta hipótese, cuja importância dessa associação pode contribuir para a disseminação de resistência aos antibióticos, como beta-lactâmicos entre os isolados bacterianos [82, 83].

A bomba de efluxo AcrAB é comumente encontrada em *K. pneumoniae*, e está associado ao efluxo de drogas, como penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas, macrolídeos, cloranfenicol e tetraciclina levando a sobrevivência bacteriana, ocasionando assim a resistência antimicrobiana [84]. O cluster de Yersiniabactina um importante sideroforo foi detectado em *K. pneumoniae* KPCEU1, este fator já foi descrito em conjunto com o transportador YbtPQ envolvidos respectivamente no efluxo de fármacos antimicrobianos, tendo assim uma importância significativa no que tange a resistência antimicrobiana [85].

Na análise realizada por MAUVE, observamos regiões blocos colineares locais conservados, entre as linhagens de *K. pneumoniae*. O esboço do genoma *K. pneumoniae* KPCEU1 apresenta vários blocos com alta similaridade e regiões homólogas sem rearranjos. Essa semelhança entre os genomas das linhagens pode ser atribuída a funções importantes, como genes de captação de ferro, resistência a antibióticos, como *bla*<sub>KPC</sub>,

*bla<sub>CTXM</sub>*, *bla<sub>OXA1</sub>* e *bla<sub>SHV</sub>* [86, 87]. A plataforma TYGS é muito utilizada para exibir a taxonomia de uma ampla gama de bactérias e Archaeas baseado no genoma microbiano, de acordo com a análise realizada o isolado sequenciado do presente estudo pertence a espécie de *K. pneumoniae* [38].

O programa Phaster é usado para identificar os fagos presentes no genoma bacteriano [36] em uma análise genômica foi identificado 40 fagos diferentes em 16 linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase [88] em relação ao isolado do estudo apresentou cinco regiões diferentes para sequências de bacteriófago. O programa OrthoVenn faz uma análise do genoma de gêneros das mesmas espécies e o agrupa de acordo com os genes semelhantes encontrados [34, 35], relacionado a *K. pneumoniae* KPCEU1 o diagrama de Venn indicou um número de genes ortólogos compartilhados entre as sete espécies analisadas e dentre estas foram encontrados 4390 ortólogos do núcleo entre KPCEU1, Kp36, ATCC 700721, ATCC BAA2146, Kp 69 e Sw01. A análise realizada que inclui *K. pneumoniae* KPCEU1 sugere como resultado um total de 5136 proteínas, 4961 clusters e 151 singletons. As proteínas relacionadas aos genes ortólogos que estão associadas a estas linhagens geralmente têm funções semelhantes nestes micro-organismos, o que diz muito a respeito do nicho ecológico que estas linhagens estão inseridas associadas à sua fisiologia celular [35].

## 5. Conclusões

O presente estudo confirma que ambientes aquáticos como o manguezal, atuam como reservatórios de bactérias resistente a múltiplas drogas de uso clínico, estas por sua vez se tornam um risco para a saúde humana. No manguezal avaliado detectou-se várias espécies dentre elas um isolado de *K. pneumoniae* KPCEU1 altamente virulento e resistente a antimicrobianos carbapenêmicos, como meropenem e imipenem utilizados como última escolha em tratamentos contra microorganismos ESBL, este isolado apresentou-se sensível apenas a gentamicina. O perfil genômico de *K. pneumoniae* KPCEU1 corroborou os resultados identificados durante o estudo. De acordo com as análises do genoma esse isolado apresenta uma alta diversidade de fatores e mecanismos de resistência a drogas antimicrobianas. Esta pesquisa abrangeu também isolados ambientais que já se encontram na clínica causando algumas infecções, dentre este os isolados pertencentes ao gênero *Ochrobactrum*. A grande preocupação com este gênero é devido a escassez de trabalhos assim como parâmetros associados à sua identificação e ao seu perfil de resistência. Então estudos como esse são de grande importância para haver uma devida notoriedade para esse gênero, assim como alerta a comunidade acadêmica que mais testes são necessários a este gênero uma vez que não possuem normas estabelecidas pelo CSLI ou EUCAST. Por fim, a detecção desses isolados destaca a disseminação que ocorre extra-hospitalar de bactérias comumente encontradas na clínica em ambientes aquáticos representando assim um sério risco para a saúde de humanos e animais.

**Financiamento:** Esta pesquisa teve o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa e Desenvolvimento Científico do Maranhão-FAPEMA (Números do processo: BM-02298/19).

**Declaração de disponibilidade de dados:** Não aplicável.

**Conflitos de interesse:** Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

## Referências

1. Andreote, F.; Jimenez, D.; Chaves, D.; Armando Cavalcante Franco.; Luvizotto, D.; Andreote, F.; Fasannella, C.; Lopez, M.; Baena, S.; Taketani, R.; Melo, I. The microbiome of Brazilian mangrove sediments as revealed by metagenomics. *PLoS One*, **2012**, *7*, e38600.
2. Spalding, M.; Kainuma, M.L. Collins. *World Atlas of Mangroves*. **2010**.
3. Freitas, F.; Capeti, K.; Sampaio, C. Use and occupation of mangroves in the urban area of Paranaguá: a historical and socioenvironmental approach. *Unisantia BioScience*, **2017**, *6*, 93-100.
4. Arpita, C.; Amit, B.; Arghya, M.; Parunava, R.; Anish, B.; Sohan, S.; Bebojyoti, R.; Sudip, N.; Abhrajyoti, G.; Dhruvajyoti, C.; Maitree, B. Changing bacterial profile of sundarbans, the world heritage mangrove: Impact of anthropogenic interventions. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **2015**, *31*, 593-610.
5. Von Wintersdorff, C. J.; Penders, J.; Van Niekerk, J.; Mills, N.; Majumder, S.; Van Alphen, L. B.; Wolffs, P. F. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Frontiers in Microbiology*, **2016**, *7*, 173.

6. Blair, J. M. A.; Webber, M. A.; Baylay, A. J.; Ogbolu, D. O.; Piddock, L. J. V. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* **2014**, *13*, 42–51.
7. Hu, Y.; Zhu, Y.; Ma, Y.; Liu, F.; Lu, N.; Yang, X.; Chunguang, L.; Yi, Y.; Zhu, B. Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 1152–1161.
8. Yang, Y.; Li, Z.; Canção, W.; Du, L.; Zhao, B.; Liu, W.; Deng, D.; Pan, Y.; Lin, H.; Cao, X. Metagenomic insights into the abundance and composition of resistance genes in aquatic environments: Influence of stratification and geography. *Environment International*, **2019**, *127*, 371–380.
9. Qiao, M.; Ying, G. G.; Singer, A. C.; Zhu, Y. G. Review of antibiotic resistance in China and its environment. *Environment International*, **2018**, *110*, 160–172.
10. Ben, Y.; Fu, C.; Hu, M.; Liu, L.; Wong, M. H.; Zheng, C. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental research*, **2019**, *169*, 483–493.
11. Xiong, W.; Sun, Y.; Zhang, T.; Ding, X.; Li, Y.; Wang, M.; Zeng, Z. Antibiotics, antibiotic resistance genes, and bacterial community composition in fresh water aquaculture environment in China. *Microbial Ecology*, **2015**, *70*, 425–432.
12. Johnning, A.; Moore, E. R.; Svensson-Stadler, L.; Shouche, Y. S.; Larsson, D. J.; Kristiansson, E. Acquired genetic mechanisms of a multiresistant bacterium isolated from a treatment plant receiving wastewater from antibiotic production. *Applied and environmental microbiology*, **2013**, *79*, 7256–7263.
13. Tanner, W. D.; VanDerslice, J. A.; Goel, R. K.; Leecaster, M. K.; Fisher, M. A.; Olstadt, J.; Gurley, C. M.; Morris, A. G.; Seely, K. A.; Chapman, L.; Korando, M.; Shabazz, K. A.; Stadsholt, A.; VanDeVelde, J.; Braun-Howland, E.; Minihane, C.; Higgins, P. J.; Deras, M.; Jaber, O.; Jette, D.; Gundlapalli, A. V. Multi-state study of Enterobacteriaceae harboring extended-spectrum beta-lactamase and carbapenemase genes in US drinking water. *Scientific reports*, **2019**, *9*, 1–8.
14. Caron, Y.; Chheang, R.; Puthea, N.; Soda, M.; Boyer, S.; Tarantola, A.; Kerléguer, A. Beta-lactam resistance among Enterobacteriaceae in Cambodia: the four-year itch. *International Journal of Infectious Diseases*, **2018**, *66*, 74–79.
15. Yagel, Y.; Sestito, S.; Motro, Y.; Shnaiderman-Torban, A.; Khalfin, B.; Sagi, O.; Navon-Venezia, S.; Steinman, A.; Moran-Gilad, J. Genomic characterization of antimicrobial resistance, virulence, and phylogeny of the genus *Ochrobactrum*. *Antibiotics*, **2020**, *9*, 177.
16. Alcântara, E. H.; Mochel, F. R.; Amorim, A. D. J. E.; Thevand, A. Modeling of the secchi depth and of the chlorophyll a concentration in estuã? Rio do rio Anil, São Luã? S-MA. *Paths of Geography*, **2004**, *5*.
17. Egli, A.; Tschudin-Sutter, S.; Oberle, M.; Goldenberger, D.; Frei, R.; Widmer, A. F. "Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass-Spectrometry (MALDI-TOF MS) Based Typing of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Producing *E. coli*—A Novel Tool for Real-Time Outbreak Investigation." *PLoS One*, **2015**, *10*, e0120624.
18. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C.; Turck, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single-disc method. *Am J Clin Pathol.* **1966**, *45*, 493–496.
19. Brazilian Antimicrobial Susceptibility Test Committee (BrCAST) (2020) Breakpoint tables for interpreting MICs and zone diameters [Cut-off tables for interpreting MICs and halo diameters]. Version 9.0. Available at: <http://brcast.org.br/documentos/>.
20. Pitcher, D. G.; Sanders, N. A.; Owen, R. J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. *Letters Applied Microbiology*, **1989**, *8*, 151–156.
21. Nordmann, P.; Boulanger, A. E.; Poirel, L. NDM-4 Metallo- $\beta$ -Lactamase with Increased Carbapenemase Activity from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, **2012**, *56*, 2184–2186.
22. Dallenne, C.; Da Costa, A.; Decré, D.; Favier, C.; Arlet, G. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2010**, *65*, 490–495.
23. Mosca, A.; Miragliotta, L.; Del Prete, R.; Tzakis, G.; Dalfino, L.; Bruno, F.; MigliaVacca, R.; Piazza, A.; Miragliotta, G. Rapid and sensitive detection of blaKPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay, *US National Library of Medicine*, **2013**, *31*, 31.
24. Liu, W.; Zou, D.; Li, Y.; Wang, X.; He, X.; Wei, X.; Shao, C.; Li, X.; Shang, W.; Yu, K.; Liu, D.; Li, Y.; Guo, J.; Yin, Z.; Yuan, J. Sensitive and rapid detection of the new Delhi metallo-beta-lactamase gene by loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Clinical Microbiology*, **2012**, *50*, 1580–1585.

25. Woodford, N.; Ellington, M. J.; Coelho, J.M.; Turton, J.F.; Ward, M. E.; Brown, S.; Amyes, S. G.B.; Livermore, D.M. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2006**, *27*, 351-353.
26. Goldstein, C.; Lee, M. D.; Sanchez, S.; Hudson, C.; Phillips, B.; Register, B.; Grady, M.; Liebert, C.; Summers, A.; White, D. G.; Maurer, J. J. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. *Antimicrob Agents Chemother*, **2001**, *45*, 723-726.
27. Carattoli, A. Plasmids and the spread of resistance. *International Journal of Medical Microbiology*, **2013**, *303*, 298-304.
28. Coil, D.; Jospin, G.; Darling, A.E. A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data. *Bioinformatics*, **2015**, *31*, 587-9.
29. Johnson, M.; Zaretskaya, I.; Raytselis, Y.; Merezhuk, Y.; McGinnis, S.; Madden, T. L. NCBI BLAST: a better web interface. *Nucleic acids research*, **2008**, *36*, W5-W9.
30. Aziz, R.; Bartels, D.; Best, A. A.; DeJongh, M.; Disz, T.; Edwards, R. A.; Formsma, K.; Gerdes, S.; Glass, E. M.; Kubal, M.; Meyer, F.; Olsen, G. J.; Olson, R.; Osterman, A. L.; Overbeek, R. A.; McNeil, L. K.; Paarmann, D.; Paczian, T.; Parrello, B.; Pusch, G. D.; Reich, C.; Stevens, R.; Vassieva, O.; Vonstein, V.; Wilke, A.; Zagnitko, O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC genomics*, **2008**, *9*, 1, 1-15.
31. McArthur, A. G.; Waglechner, N.; Nizam, F.; Yan, A.; Azad, M. A.; Baylay, A. J.; Bhullar, K.; Canova, M. J.; Pascale, G.; Ejim, L.; Kalan, L.; King, A. M.; Koteva, K.; Morar, M.; Mulvey, M. R.; O'Brien, J. S.; Pawlowski, A. C.; Piddock, L. J. V.; Spanogiannopoulos, P.; Sutherland, A. D.; Tang, I.; Taylor, P. L.; Thaker, M.; Wang, W.; Yan, M.; Yu, T.; Wright, G. D. The comprehensive antibiotic resistance database. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2013**, *57*, 3348-3357.
32. Enright, M. C.; Spratt, B. G. Multilocus sequence typing. *Trends in microbiology*, **1999**, *7*, 12, 482-487.
33. Darling, A. C. E.; Mau, B.; Blattner, F. R.; Perna, N. T. Mauve: multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome research*, **2004**, *14*, 1394-1403.
34. Wang, Y.; Coleman-Derr, D.; Chen, G.; Gu, Y. Q. OrthoVenn: a web server for genome wide comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research*, **2015**, *43*, W78-W84.
35. Xu, L.; Dong, Z.; Fang, L.; Luo, Y.; Wei, Z.; Guo, H.; Zhang, G.; Gu, Y. Q.; Coleman-Derr, D.; Xia, Q.; Wang, Y. OrthoVenn2: a web server for whole-genome comparison and annotation of orthologous clusters across multiple species. *Nucleic acids research*, **2019**, *47*, W52-W58.
36. Arndt, D.; Grant, J. R.; Marcu, A.; Sajed, T.; Pon, A.; Liang, Y.; Wishart, D. S. PHASTER: a better, faster version of the PHAST phage search tool. *Nucleic Acids Res*, **2016**, *44*, W16-W21.
37. Chen, L.; Yang, J.; Yu, J.; Yao, Z.; Sun, L.; Shen, Y.; Jin, Q. VFDB: a reference database for bacterial virulence factors. *Nucleic acids research*, **2005**, *33*, D325-D328.
38. Meier-Kolthoff, J. P.; Göker, M. TYGS is an automated high-throughput platform for state-of-the-art genome-based taxonomy. *Nature communications*, **2019**, *10*, 1-10.
39. Navon-Venezia, S.; Kondratyeva, K.; Carattoli, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, **2017**, *41*, 252-275.
40. Caneiras, C.; Lito, L.; Melo-Cristino, J.; Duarte, A. Community- and hospital-acquired *Klebsiella pneumoniae* urinary tract infections in Portugal: virulence and antibiotic resistance. *Microorganisms*, **2019**, *7*, 138.
41. Fasciana, T.; Gentile, B.; Aquilina, M.; Ciammaruconi, A.; Mascarella, C.; Anselmo, A.; Fortunato, A.; Fillo, S.; Petralito, G.; Lista, F.; Giammanco, A. Co-existence of virulence factors and antibiotic resistance in new *Klebsiella pneumoniae* clones emerging in south of Italy. *BMC infectious diseases*, **2019**, *19*, 1-10.
42. Zhao, H.; Yan, B.; Mo, X.; Li, P.; Li, B.; Li, Q.; Li, N.; Mo, S.; Ou, Q.; Shen, P.; Wu, B.; Jiang, C. Prevalence and proliferation of antibiotic resistance genes in the subtropical mangrove wetland ecosystem of South China Sea. *MicrobiologyOpen*, **2019**, *8*, e871.
43. Imchen, M.; Vennapu, R. K.; Ghosh, P.; Kumavath, R. Insights into Antagonistic Interactions of Multidrug Resistant Bacteria in Mangrove Sediments from the South Indian State of Kerala. *Microorganisms*, **2019**, *7*, 678.
44. Banin, E.; Hughes, D.; Kuipers, O. P. Bacterial pathogens, antibiotics and antibiotic resistance. *FEMS microbiology reviews*, **2017**, *41*, 450-452.

45. Ghaderpour, A.; Ho, W. S.; Chew, L. L.; Bong, C. W.; Chong, V. C.; Thong, K. L.; Chai, L. C. Diverse and abundant multi-drug resistant *E. coli* in Matang mangrove estuaries, Malaysia. *Frontiers in microbiology*, **2015**, *6*, 977.
46. Liu, T.; Lun, J.; Zheng, P.; Feng, J.; Meng, S.; Peng, T.; Hu, Z. Diversity and distribution of antibiotics and antibiotic resistance genes in seven national mangrove nature reserves, South China. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **2020**, *153*, 105000, 2020.
47. Ryan, M. P.; Pembroke, J. T. The Genus *Ochrobactrum* as Major Opportunistic Pathogens. *Microorganisms*, **2020**, *8*, 1797.
48. Wyres, K. L.; Lam, M. M.C.; Holt, K. E. Population genomics of *Klebsiella pneumoniae*. *Nature Reviews Microbiology*, **2020**, *18*, 344-359.
49. Vivan, A. C. P.; Rosa, J. F.; Rizek, C. F.; Pelisson, M.; Costa, S. F.; Hungria, M.; Kobayashi, R. K. T.; Vespero, E. C. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from a university hospital in Brazil. *Embrapa Soja-Artigo em periódico indexado (ALICE)*, **2017**, *11*, 379-386.
50. Tekeli, A.; Dolapci, İ.; Evren, E.; Oguzman, E.; Karahan, Z. C. Characterization of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC and NDM-1 Carbapenemases from Turkey. *Microbial Drug Resistance*, **2020**, *26*, 118-125.
51. Soria-Segarra, C.; González-Bustos, P.; López-Cerero, L.; Fernández-Cuenca, F.; Rojo-Martín, M. D.; Fernández-Sierra, M. A.; Gutiérrez-Fernández, J. Tracking KPC-3-producing ST-258 *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a third-level hospital in Granada (Andalusia, Spain) by risk factors and molecular characteristics. *Molecular biology reports*, **2020**, *47*, 1089-1097.
52. Tang, H. J.; Lai, C. C.; Chen, C. C.; Zhang, C. C.; Weng, T. C.; Chiu, Y. H.; Toh, H. S.; Chiang, S. R.; Yu, W. L.; Ko, W. C.; Chuang, Y. C. Colistin-sparing regimens against *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates: combination of tigecycline or doxycycline and gentamicin or amikacin. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, **2019**, *52*, 273-281.
53. Yamashita, N.; Katakawa, Y.; Tanaka, H. Occurrence of antimicrobial resistance bacteria in the Yodo River basin, Japan and determination of beta-lactamases producing bacteria. *Ecotoxicology and environmental safety*, **2017**, *143*, 38-45.
54. Marathe, N. P.; Janzon, A.; Kotsakis, S. D.; Flach, C. F.; Razavi, M.; Berglund, F.; Larsson, D. J. Functional metagenomics reveals a novel carbapenem-hydrolyzing mobile beta-lactamase from Indian river sediments contaminated with antibiotic production waste. *Environment international*, **2018**, *112*, 279-286.
55. Adesoji, A. T.; Ogunjobi, A. A. Detection of extended spectrum beta-lactamases resistance genes among bacteria isolated from selected drinking water distribution channels in southwestern Nigeria. *BioMed research international*, **2016**, 2016.
56. Khan, F. A.; Söderquist, B.; Jass, J. Prevalence and diversity of antibiotic resistance genes in Swedish aquatic environments impacted by household and hospital wastewater. *Frontiers in microbiology*, **2019**, *10*, 688.
57. Hooban, B.; Joyce, A.; Fitzhenry, K.; Chique, C.; Morris, D. The role of the natural aquatic environment in the dissemination of extended spectrum beta-lactamase and carbapenemase encoding genes: A scoping review. *Water Research*, **2020**, 115880.
58. Fonseca, E. L.; Andrade, B. G.N.; Vicente, A. C.P. The resistome of low-impacted marine environments is composed by distant metallo- $\beta$ -lactamases homologs. *Frontiers in microbiology*, **2018**, *9*, 677.
59. Singh, F.; Hirpurkar, S. D.; Rawat, N.; Shakya, S.; Kumar, R.; Rajput, P. K.; Kumar, S. Occurrence of the genes encoding carbapenemases, ESBLs and class 1 integron-integrase among fermenting and non-fermenting bacteria from retail goat meat. *Letters in Applied Microbiology*, **2020**, *71*, 611-619.
60. Furlan, J. P. R.; Stehling, E. G. High-level of resistance to  $\beta$ -lactam and presence of  $\beta$ -lactamases encoding genes in *Ochrobactrum* sp. and *Achromobacter* sp. isolated from soil. *Journal of global antimicrobial resistance*, **2017**, *11*, 133-137.
61. Shanthini, T.; Manohar, P.; Samna, S.; Srividya, R.; Bozdogan, B.; Rameshpathy, M.; Ramesh, N. Emergence of plasmid-borne bla oxa-181 gene in *Ochrobactrum* intermedium: first report from India. *Access Microbiology*, **2019**, *1*, e000024.
62. Xin, R.; Zhang, K.; Wu, N.; Zhang, Y.; Niu, Z. The pollution level of the blaOXA-58 carbapenemase gene in coastal water and its host bacteria characteristics. *Environmental Pollution*, **2019**, *244*, 66-71.
63. Lu, S. Y.; Zhang, Y. L.; Geng, S. N.; Li, T. Y.; Ye, Z. M.; Zhang, D. S.; Zhou, H. High diversity of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in an urban river sediment habitat. *Applied and environmental microbiology*, **2010**, *76*, 5972-5976.

64. Gona, F.; Bongiorno, D.; Aprile, A.; Corazza, E.; Pasqua, B.; Scuderi, M. G.; Chiacchiareta, M.; Cirillo, D. M.; Stefani, S.; Mezzatesta, M. L. Emergence of two novel sequence types (3366 and 3367) NDM-1- and OXA-48-co-producing *K. pneumoniae* in Italy. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2019**, *38*, 1687-1691.
65. Ripabelli, G.; Sammarco, M. L.; Salzo, A.; Scutellà, M.; Felice, V.; Tamburro, M. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM-1) - producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type ST11: first identification in a hospital of central Italy. *Letters in Applied Microbiology*, **2020**, *71*, 652-659.
66. Neto, W. R. N.; Araujo, J. M. M.; da Silva, D. F.; Melo, J.M.; Pacheco, W. B.; Santos, J. R. N.; Silva, M. R. C. S.; Bomfim, M. R.Q.; Souza, A. M. Detection of Gram-Negative Bacteria Carrying the blaKPC-2 Gene from Mangrove Sediments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **2019**, *7*, 485-492.
67. Mataseje, L. F.; Boyd, D. A.; Mulvey, M. R.; Longtin, Y. Two hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a blaKPC-2 carbapenemase from a Canadian patient. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2019**, *63*, e00517-19.
68. Raro, O. H. F.; da Silva, R. M. C.; Sukiennik, T. C. T.; Stadnik, C.; Dias, C. A. G.; Oteo Iglesias, J., Iglesias, J. O.; Pérez-Vázquez, M. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* From Transplanted Patients in Brazil: Phylogeny, Resistome, Virulome and Mobile Genetic Elements Harboring blaKPC-2 or blaNDM-1. *Frontiers in Microbiology*, **2020**, *11*, 1563.
69. Sekizuka, T.; Yatsu, K.; Inamine, Y.; Segawa, T.; Nishio, M.; Kishi, N.; Kuroda, M. Complete genome sequence of a blaKPC-2-positive *Klebsiella pneumoniae* strain isolated from the effluent of an urban sewage treatment plant in Japan. *Msphere*, **2018**, *3*, e00314-18.
70. Rodríguez, E. A.; Aristizábal-Hoyos, A. M.; Morales-Zapata, S.; Arias, L.; Jiménez, J. N. High frequency of gram-negative bacilli harboring blaKPC-2 in the different stages of wastewater treatment plant: A successful mechanism of resistance to carbapenems outside the hospital settings. *Journal of Environmental Management*, **2020**, *271*, 111046
71. Akrami, F.; Rajabnia, M.; Pournajaf, A. Resistance integrons; A mini review. *Caspian journal of internal medicine*, **2019**, *10*, 370.
72. Chaturvedi, P.; Singh, A.; Chowdhary, P.; Pandey, A.; Gupta, P. Occurrence of emerging sulfonamide resistance (sul1 and sul2) associated with mobile integrons-integrase (intI1 and intI2) in riverine systems. *Science of The Total Environment*, **2021**, *751*, 142217.
73. Kaushik, M.; Khare, N.; Kumar, S.; Gulati, P. High prevalence of antibiotic resistance and integrons in *Escherichia coli* isolated from urban river water, India. *Microbial drug resistance*, **2019**, *25*, 359-370.
74. Singh, N. S.; Singhal, N.; Kumar, M.; Viridi, J. S. High prevalence of drug resistance and class 1 integrons in *Escherichia coli* isolated from river Yamuna, India: a serious public health risk. *Frontiers in Microbiology*, **2021**, *12*, 621564.
75. An, X. L.; Chen, Q. L.; Zhu, D.; Zhu, Y. G.; Gillings, M. R.; Su, J. Q. Impact of wastewater treatment on the prevalence of integrons and the genetic diversity of integron gene cassettes. *Applied and environmental microbiology*, **2018**, *84*, e02766-17.
76. Huyan, J.; Tian, Z.; Zhang, Y.; Zhang, H.; Shi, Y.; Gillings, M. R.; Yang, M. Dynamics of class 1 integrons in aerobic biofilm reactors spiked with antibiotics. *Environment International*, **2020**, *140*, 105816.
77. Deng, Y.; Bao, X.; Ji, L.; Chen, L.; Liu, J.; Miao, J.; Chen, D.; Bian, H.; Li, Y.; Yu, G. Resistance integrons: class 1, 2 and 3 integrons. *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, **2015**, *14*, 1-11.
78. Oliva, M.; Monno, R.; D'Addabbo, P.; Pesole, G.; Dionisi, A. M.; Scarscia, M.; Chiara, M.; Horner, D. S.; Manzari, C.; Luzzi, I.; Calia, C.; D' Erchia, A. M.; Pazzani, C. A novel group of IncQ1 plasmids conferring multidrug resistance. *Plasmid*, **2017**, *89*, 22-26.
79. Li, R.; Ye, L.; Zheng, Z.; Chan, E. W. C.; Chen, S. Genetic characterization of broad-host-range IncQ plasmids harboring blaVEB-18 in *Vibrio* species. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2017**, *61*, e00708-17.
80. Gu, D.; Dong, N.; Zheng, Z.; Lin, D.; Huang, M.; Wang, L.; Chan, E. W.C.; Shu, L.; Yu, J.; Zhang, R.; Chen, S. A fatal outbreak of ST11 carbapenem-resistant hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: a molecular epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, **2018**, *18*, 37-46.
81. Zheng, B.; Xu, H.; Lv, T.; Guo, L.; Xiao, Y.; Huang, C.; Zhang, S.; Chen, Y.; Han, H.; Shen, P.; Xiao, Y.; Li, L. Stool Samples of Acute Diarrhea Inpatients as a Reservoir of ST11 Hypervirulent KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae*. *Msystems*, **2020**, *5*, e00498-20
82. Dong, N.; Yang, X.; Zhang, R.; Chan, E. W. C.; Chen, S. Tracking microevolution events among ST11 carbapenemase-producing hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* outbreak strains. *Emerging microbes & infections*, **2018**, *7*, 1-8.

83. Liao, W.; Liu, Y.; Zhang, W. Virulence evolution, molecular mechanisms and prevalence of ST11 Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in China: A review over ten last years. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, **2020**, *23*, 174-180.
84. Xu, Q.; Sheng, Z.; Hao, M.; Jiang, J.; Ye, M.; Chen, Y.; Xu, X.; Guo, Q.; Wang, M. RamA upregulates multidrug resistance efflux pumps AcrAB and OqxAB in *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **2020**, 106251.
85. Farzand, R.; Rajakumar, K.; Barer, M. R.; Freestone, P. P.; Mukamolova, G. V.; Oggioni, M. R.; O'Hare, H. M. A Virulence Associated Siderophore Importer Reduces Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology*, **2021**, *12*, 52.
86. Ramos, P. I. P.; Picão, R. C.; de Almeida, L. G. P.; Lima, N. C. B.; Girardello, R.; Vivan, A. C. P.; Xavier, D.; Barcellos, F. G.; Pelisson, M.; Vespero, E. C.; Médigue, C.; Vasconcelos, A. T. R.; Gales, A. C.; Nicolás, M. F. 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*, **2014**, *15*, 1-16.
87. Majkowska-Skrobek, G., Łątka, A., Berisio, R., Maciejewska, B., Squeglia, F., Romano, M., Lavigne, R.; Struve, C.; Drulis-Kawa, Z. Capsule-targeting depolymerase, derived from *Klebsiella* KP36 phage, as a tool for the development of anti-virulent strategy. *Viruses*, **2016**, *8*, 324.
88. Bleriot, I.; Trastoy, R.; Blasco, L.; Fernández-Cuenca, F.; Ambroa, A.; Fernández-García, L.; Pacios, O.; Perez-Nadales, E.; Torre-Cisneros, J.; Oteo-Iglesias, J.; Navarro, F.; Miro, E.; Pascual, A.; Bou, G.; Martínez-Martínez, L.; Tomas, M. Genomic analysis of 40 prophages located in the genomes of 16 carbapenemase-producing clinical strains of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial genomics*, **2020**, *6*, 5.