



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CURSO DE BACHARELADO EM  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

MICHELLY MARIA PEREIRA E OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS NA EXPRESSÃO DO  
GENE *BLA*<sub>KPC</sub>**

RECIFE  
2021

MICHELLY MARIA PEREIRA E OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS NA EXPRESSÃO DO  
GENE *BLA*<sub>KPC</sub>**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anna Carolina Soares Almeida.

RECIFE  
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal Rural de Pernambuco  
Sistema Integrado de Bibliotecas  
Gerada automaticamente, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

O48a Oliveira, Michelly Maria Pereira  
ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS NA EXPRESSÃO DO GENE ? BLAKPC / Michelly  
Maria Pereira Oliveira. - 2021.  
22 f. : il.

Orientadora: Anna Carolina Soares Almeida.  
Inclui referências.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco,  
Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2021.

1. blaKPC. 2. qPCR. 3. Enterobacteriaceae. I. Almeida, Anna Carolina Soares, orient. II. Título

CDD 574

---

MICHELLY MARIA PEREIRA E OLIVEIRA

**ANÁLISE DA INFLUÊNCIA DO NÚMERO DE CÓPIAS NA EXPRESSÃO DO  
GENE *BLA*<sub>KPC</sub>**

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Anna Carolina Soares Almeida DBio - UFRPE

---

Msc Paula Mariana Salgueiro de Souza - UPE

---

Msc Ana Caroline Oliveira Alves Ribeiro - UPE

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>8</b>
<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>9</b>
LINHAGENS BACTERIANAS.....	9
PRIMERS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE qPCR.....	9
ISOLAMENTO DO DNA.....	10
VALIDAÇÃO DOS PRIMERS PARA qPCR.....	10
ENSAIOS DE QUANTIFICAÇÃO ABSOLUTA.....	10
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>20</b>

## RESUMO

As enterobactérias tem se destacado na prática clínica pela detecção de mecanismos enzimáticos que conferem resistência a antimicrobianos, destacando-se a *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) devido a sua rápida disseminação mundial ocasionada pela localização do gene *bla*<sub>KPC</sub> em grandes plasmídios transferíveis e transposons. A expressão do gene *bla*<sub>KPC</sub> pode ser afetadas por características intrínsecas do hospedeiro que o abriga ou número de cópias. Um fenótipo não usual foi observado em isolados clínicos de *P. stuartii* e *M. morgani* e seus respectivos transformantes, onde as células de *E. coli* receptoras de plasmídeos que carregavam o gene *bla*<sub>KPC</sub>, apresentaram valores de CIMs, para alguns beta-lactâmicos, maiores do que nos isolados clínicos. O objetivo deste trabalho foi analisar o número de cópias do gene *bla*<sub>KPC</sub>, relacionando-os com seus respectivos CIMs. O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído a partir do kit Promega™ Wizard™ Genomic DNA Purification conforme orientações do fabricante, e em seguida, foi quantificado por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop™ Lite da Thermo Fisher Scientific. Os genes de controle endógenos foram escolhidos a partir da literatura depois de uma busca robusta, em seguida foram analisados *in silico*. Utilizando bancos de dados, softwares e outras ferramentas, os primers foram desenhados. Para a realização da quantificação absoluta, foi realizada uma estimativa baseada em uma proporção da relação quantitativa relativa entre alvo e o controle endógeno, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Cq}$ . Para os experimentos foi utilizado o equipamento Stepone™ Real-time PCR System (Applied Biosystems) e o corante SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). Os primers desenhados passaram por uma etapa de validação visando avaliar sua eficiência (tufMm - 93.019, tufPs - 90.228 e tufKp - 103.474, ambos com R<sup>2</sup> próximos de 1). Os dados gerados pelos experimentos de qPCR absoluta foram associados com os distintos perfis fenotípicos observados e a partir dos ensaios foi determinado que o número de cópias do gene *bla*<sub>KPC</sub> para os isolados transformantes e para os isolados clínicos não variam significativamente, apontando que outro mecanismo deve estar interferindo na expressão do gene *bla*<sub>KPC</sub>, influenciando diretamente os níveis de resistência.

**Palavras-Chave:** *bla*<sub>KPC</sub>, qPCR, *Enterobacteriaceae*.

## ABSTRACT

*Enterobacteria* has stood out in clinical practice by detecting enzymatic mechanisms that confer resistance to antimicrobials, especially *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) due to its rapid worldwide dissemination caused by the location of the *bla*<sub>KPC</sub> gene in large transferable plasmids and transposons. The expression of the *bla*<sub>KPC</sub> gene can be affected by intrinsic characteristics of the host that hosts it or the number of copies. An unusual phenotype was observed in clinical isolates of *P. stuartii* and *M. morgani* and their respective transformants, where *E. coli* cells that received plasmids that carried the *bla*<sub>KPC</sub> gene, showed MIC values, for some beta-lactams, higher than in clinical isolates. The objective of this work was to analyze the number of copies of the *bla*<sub>KPC</sub> gene, relating them to their respective MICs. The genomic DNA of the bacterial isolates was extracted from the Promega™ Wizard™ Genomic DNA Purification kit according to the manufacturer's guidelines, and was then quantified by spectrophotometry using the NanoDrop™ Lite equipment from Thermo Fisher Scientific. The endogenous control genes were chosen from the literature after a robust search, after which they were analyzed in silico. Using databases, software and other tools, primers were designed. To carry out absolute quantification, an estimate was made based on a proportion of the relative quantitative relationship between target and endogenous control, using the formula  $2^{-\Delta Cq}$ . For the experiments, the Stepone™ Real-time PCR System (Applied Biosystems) and the SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used. The designed primers underwent a validation step to evaluate their efficiency (*tuf*<sub>Mm</sub> - 93,019, *tuf*<sub>Ps</sub> - 90,228 and *tuf*<sub>Kp</sub> - 103,474, both with R<sup>2</sup> close to 1). The data generated by the absolute qPCR experiments were associated with the different phenotypic profiles observed and from the tests it was determined that the number of copies of the *bla*<sub>KPC</sub> gene for transforming isolates and clinical isolates does not vary significantly, pointing out that another mechanism must be interfering in the expression of the *bla*<sub>KPC</sub> gene, directly influencing resistance levels.

**Keywords:** *bla*<sub>KPC</sub>, qPCR, *Enterobacteriaceae*.

## INTRODUÇÃO

Uma das maiores ameaças à saúde global, nos últimos anos, tem sido a resistência bacteriana aos antibióticos, destacando-se nesse panorama as enterobactérias, grupo heterogêneo de bactérias, que compõem o trato gastrointestinal de seres humanos e outros animais, mas em condições de desequilíbrio, quando essas bactérias crescem em número no nosso organismo mais do que podemos suportar, podem atuar como patógenos oportunistas. Algumas espécies pertencentes a essa família, dentre elas a tribo *Proteae* que engloba os gêneros *Proteus*, *Morganella* e *Providencia*, têm se destacado nos últimos anos pela sua alta ocorrência como causadores de infecções hospitalares e por apresentarem a capacidade de adquirir um extenso aparato de mecanismos de resistência (K Halloway, L Van Dijk (2011); Hui Liu et al. (2016); Hamid Vaez et al. (2019)).

Antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos são os mais utilizados para o tratamento de infecções por esses microrganismos devido a sua eficácia terapêutica e baixa toxicidade. No entanto, seu uso exacerbado/inadequado vem favorecendo a emergência de isolados bacterianos apresentando diferentes níveis de resistência, o que reduz as opções de terapêuticas e impacta diretamente nos índices de morbimortalidade (Gabriela Meyer, Simone Ulrich Picoli (2011); Francesca Del Bianco et al. (2019)).

A resistência aos beta-lactâmicos pode ocorrer por diversos mecanismos, porém as alterações de permeabilidade da membrana e a hidrólise dessas drogas por meio de enzimas (beta-lactamases) são os mais descritos. As  $\beta$ -lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e negativas e em patógenos Gram-negativos, a sua produção representa o maior fator de resistência a  $\beta$ -lactâmicos, sobretudo em enterobactérias. Elas agem degradando o anel beta-lactâmico característico desse grupo de antimicrobianos, provocando a formação do ácido penicilóico, isento de atividade antimicrobiana, impedindo a ligação da droga ao seu sítio alvo. Dessa forma a bactéria consegue continuar normalmente com a síntese da parede celular (RP Ambler AFW Coulson et al. (1991); Walter Tavares (2014)).

Entre as beta-lactamases existentes, os grupos mais desafiadores para a antibioticoterapia são as enzimas ESBLs (beta-lactamases de espectro estendido) e as carbapenemases (Gabriela Seibert et al. (2014)). Além de conferir resistência a todos os beta-lactâmicos disponíveis e não serem facilmente inibidas, tem uma alta capacidade de disseminação, uma vez que o gene *bla<sub>KPC</sub>*, que codifica essa enzima, é principalmente mediado por grandes plasmídios transferíveis e sua associação



com transposons e elementos IS, resultam na expansão mundial da resistência (Hesna Yigit et al. (2008)).

Recentemente, um fenótipo não usual foi observado em isolados clínicos de *Providencia stuartii* e *Morganella morganii* e seus respectivos transformantes, onde as células de *Escherichia coli* receptoras de plasmídeos que carregavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, utilizadas nos experimentos de transformação, apresentaram valores de CIMs (Concentração inibitória mínima), para alguns beta-lactâmicos, maiores do que nos isolados clínicos. Estudos sugerem que o gene *bla<sub>KPC</sub>* pode apresentar diferentes níveis de expressão a depender das características intrínsecas do hospedeiro que o abriga, por sua localização em elementos genéticos distintos, tais como plasmídeos e transposons, bem como por rearranjos ocorridos na região circundante desse gene, influenciando diretamente nos níveis de resistência aos carbapenêmicos (Amanda L. Roth et al. (2011); Brandon Kitchel et al. (2010)). No entanto, pouco se sabe a respeito dos mecanismos genéticos envolvidos na regulação da expressão deste gene nestes isolados. O objetivo desse trabalho foi analisar o número de cópias do gene *bla<sub>KPC</sub>*, relacionando-os com seus respectivos CIMs.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### Linhagens Bacterianas

Os isolados incluídos no presente estudo foram obtidos pelo laboratório da bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz, que presta serviços à Universidade de Pernambuco, coletados entre os anos de 2008 a 2012. Foram utilizadas culturas previamente identificadas e caracterizadas de duas espécies bacterianas, *Morganella morganii* (Mm01) obtida a partir de amostras de hemocultura no ano de 2008 e *Providencia stuartii* (Ps28) obtida de amostras de urocultura no ano de 2012. As *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  receptoras dos respectivos plasmídeos dos isolados bacterianos, portando o gene *bla<sub>KPC</sub>* (TMm01, TPs28) também foram incluídas no estudo. A cepa de *Klebsiella pneumoniae* (KP125) obtida a partir de swab retal no ano de 2008, e seu isolado transformante (TF125) foram utilizados como amostras de referência nos ensaios de qPCR.

### Primers utilizados nos ensaios de qPCR

Para a construção dos *primers* (Tabela 1) foi admitido como gene alvo o *bla<sub>KPC</sub>* para todos os isolados deste estudo. Para os *primers*, inicialmente foi

pesquisado na literatura genes de controle endógeno comuns as 4 espécies bacterianas desse estudo como forma de padronização para evitar quaisquer possíveis vieses nos resultados. Os genes de controle endógenos selecionados, depois de análises *in silico* pelo depósito de genomas do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para cada espécie, foram incluídos no estudo.

**Tabela 1.** Características dos *primers* que serão utilizados neste estudo.

Primer	5'>3'	Tam. Primer	Produto	Gene alvo	GC%	Tm	Referências
<i>tufMm</i> - F	GCTGCCAATCGAAGACGTA	19	75pb		52,60%	62,1°C	
<i>tufMm</i> - R	ATGATACCGCGCTCAACAC	19			52,60%	62,4°C	
<i>tufPs</i> - F	AGAAGAAAAAGCGCGTGGTA	20	71pb	Fator de alongamento TU	45,00%	62,4°C	Este Estudo
<i>tufPs</i> - R	CGTAGTGGCGAGTTGGTGTA	20			55,00%	63,6°C	
<i>tufKp</i> - F	GGTAGGCGTTCCGTACATCA	20	82pb		55,00%	63,5°C	
<i>tufKp</i> - R	CATCTCAACCAGTTCCAGCA	20			50,00%	62,1°C	
KPC-F	GTAAGTTACCGCGCTGAGGA	20	59pb	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	45,00%	61,1°C	Nascimento, 2017
KPC-R	GCAAGAAAGCCCTTGAATGA	20			45,00%	63,6°C	
HKEc-F	GCGAGCGATCCAGAAGATCT	20	87pb	DNA Polimerase I	55,00%	63,6°C	Skulj et al., 2008
HKEc-R	GGGTAAAGGATGCCACAGACA	21			52,40%	64,1°C	

Foi utilizado o banco de dados GenBank para obtenção das sequências dos genes incluídos no estudo. Softwares como o *in silico* PCR *amplification*, *Oligo analyzer*, BioEdt e o *Blast* foram ferramentas utilizadas para identificar as sequências conservadas de cada gene, além da confecção dos *primers* e análise de acordo com os parâmetros sugeridos pela BIO-RAD (temperatura de melting, conteúdo GC%, Número de pares de base, tamanho do produto, entre outros) para experimentos utilizando o fluoróforo SYBR® Green.

#### Isolamento do DNA

O DNA genômico dos isolados bacterianos foi extraído a partir do kit Promega™ Wizard™ Genomic DNA Purification conforme orientações do fabricante, e em seguida, foi quantificado por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop™ Lite da Termo Fisher Scientific, para ser utilizado posteriormente nos experimentos de validação de *primers* e ensaios de qPCR absoluta.

#### Validação dos *primers* para qPCR

A validação dos *primers* (Tabela 1) utilizados nos ensaios de PCR em Tempo Real, foi realizada a partir do método da curva padrão, utilizando-se cinco diluições seriadas de gDNA. As amostras foram testadas em triplicatas técnicas, no equipamento Real Time StepOne™ (Applied Biosystems®) utilizando SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems®).

## Ensaio de Quantificação absoluta

As reações de PCR em Tempo Real foram realizadas em triplicatas técnicas utilizando o detector SYBR Green® PCR Master Mix (Applied Biosystems®). As reações foram realizadas no equipamento Real Time StepOne™ (Applied Biosystems®). Foi admitido um no template control (NTC) para cada reação.

Para a quantificação absoluta, foi realizada uma estimativa baseada em uma proporção da relação quantitativa relativa entre alvo e o controle endógeno, utilizando a fórmula  $2^{-\Delta Cq}$ . Os resultados foram analisados estatisticamente pelo software BioEstat 5.0 por meio do teste t de Student, com intervalo de confiança de 95%.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores da CIM de cada antimicrobiano testado estão demonstrados na tabela 2. A resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos ceftazidima, cefotaxima, cefepime, imipenem e meropenem foi observada para todas as cepas testadas neste estudo. As células de *E. coli* receptoras de plasmídeos TMm01 e TPs28, que carregavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, utilizadas nos experimentos de transferência gênica, exibiam um fenótipo incomum, apresentando valores de CIMs para alguns beta-lactâmicos maiores aos de seus isolados clínicos doadores de plasmídeos *M. morganii* e *P. stuartii*.

**Tabela 2.** Perfil fenotípico de susceptibilidade aos antimicrobianos beta-lactâmicos.

Amostras	Antimicrobianos				
	CAZ	CTX	FEP	IMP	MEM
Mm01	2	2	4	4	4
TMm01	64	128	64	8	8
Ps28	128	4	64	128	8
TPs28	64	256	512	8	4
Kp125	32	256	32	32	32
TF125	4	4	8	8	8

CAZ, ceftazidima; CTX, cefotaxima; FEP, cefepime; IMP, imipenem; MEM, meropenem. As unidades para quantidades de antimicrobiano são mg/L.

## Busca, desenho e análise dos parâmetros dos *primers*

Para os *primers*, inicialmente foi pesquisado na literatura genes de controle endógeno comuns as 4 espécies bacterianas desse estudo como forma de padronização para evitar quaisquer possíveis vieses nos resultados. Em um estudo publicado por Paradis et al. (2005), o qual analisou aspectos filogenéticos da família *enterobacteriaceae*, apontou o gene *tuf* como altamente conservado entre os membros da família. Este gene é um gene de cópia dupla e codifica para o fator de alongamento TU que é responsável por trazer o aminoacil-tRNA ao ribossomo, durante o processo de alongação da síntese proteica (Sonia Paradis et al. (2005)).

O desenho dos *primers* foi realizado após uma etapa de análise e comparação de sequências dos genes alvos oriundas de 2 genomas distintos de cada espécie, disponíveis no *GenBank* (Tabela 3). As sequências foram alinhadas no software Bioedit e a região conservada de cada gene foi utilizada para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores por meio da ferramenta Primer3, como mostra a Tabela 1. O software *in silico PCR amplification* (<http://insilico.ehu.es/PCR/>), que gerou resultados de confirmação do tamanho do produto de PCR e da amplificação contra genomas de diversos depósitos da mesma espécie. A ferramenta *Oligo Analyzer* (<http://idtdna.com/calc/analyzer>), foi utilizada para análise dos parâmetros dos mesmos e por fim, utilizou-se o Blast (*Basic Local Alignment Search Tool* – Ferramenta básica de pesquisa de alinhamento local) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi>) para confirmar a especificidade do primer para os genes alvo escolhidos, além de determinar o número exato de cópias do gene nos genomas analisados, baseado na quantidade de alinhamentos no mesmo genoma/depósito.

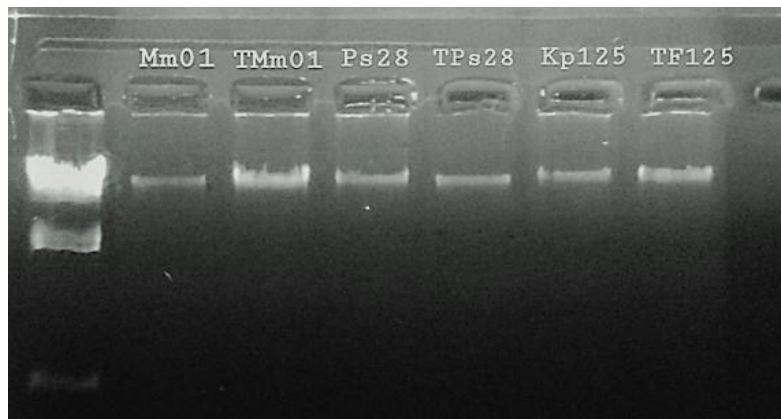
**Tabela 3.** Código de acesso das sequências utilizadas para o alinhamento e confecção dos *primers*.

<b>Espécies bacterianas</b>	<b>GenBank</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	FO834906.1
	LAKK01000012.1
<i>Morganella morganii</i>	NZ_CP033056.1
	NRQY01000002.1
<i>Providencia stuartii</i>	NZ_CP008920.1
	AX109419.1
<i>Escherichia coli</i>	AE014075.1
	CP007394.1

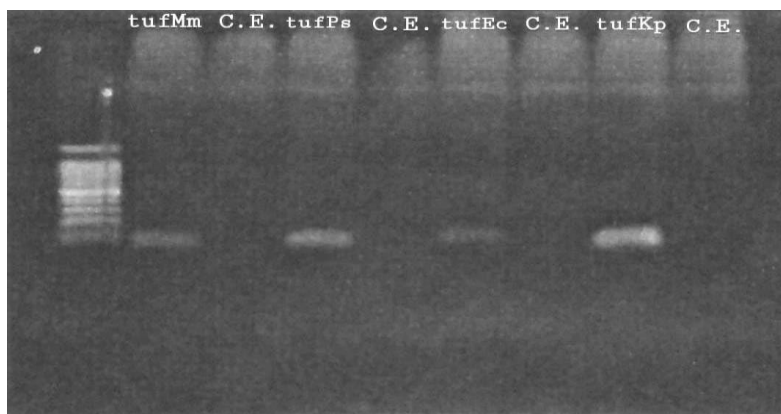
### Análise da eficiência dos primers

O DNA genômico dos isolados clínicos e doadores que foram utilizados nas etapas de validação e quantificação absoluta foram extraídos, mostrando que eles se apresentam íntegros (Figura 1). A PCR teste dos *Primers* mostrou resultados positivos e possibilitou o início das validações (Figura 2).

**Figura 1.** Eletroforese em gel de agarose (GBT Biosciences) a 1% do DNA genômico dos isolados incluídos neste estudo. Da esquerda para a direita: Marcador Lambda DNA/HindIII Marker (Thermo Scientific); Isolados Mm01, TMm01, Ps28, TPs28, Kp125, Tf125.



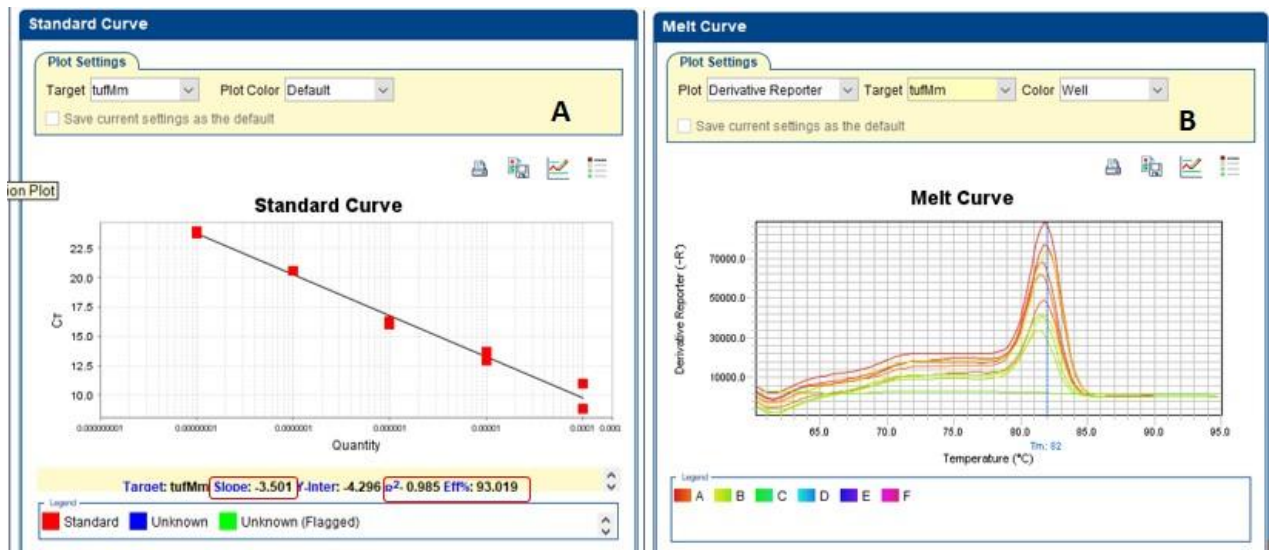
**Figura 2.** Eletroforese em gel de agarose (GBT Biosciences) a 1% da PCR utilizando os *primers* selecionados para serem incluídos neste estudo. Da esquerda para a direita: Marcador de 100bp (Sinapse); PCRs para dos primer *tufMm*, *tufPs* e *tufKp* e seus respectivos controles.



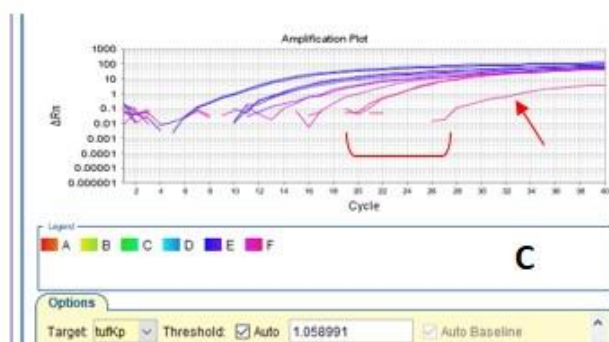
Após os experimentos de validação, os *primers* mostraram-se específicos em amplificar apenas o produto dos seus genes alvo. Os *primers tufMm*, *tufKp* e *tufPs* foram validados (Figura 3, 4 e 5 respectivamente). Todos mostraram a dissociação do corante com o DNA na temperatura esperada (representado pela curva de melting) e eficiência dentro do esperado (93.019%, 103.474% e 90.228%

respectivamente). As curvas padrões para esses genes mostraram que o  $R^2$  (0.985, 0.996 e 0.996) estava dentro do valor esperado, mostrando a confiabilidade dos dados de eficiência. Os *primers tufKp* e *tufPs* apresentaram curvas no NTC (*No Template Control*), entretanto assumimos ser fruto de nenhuma contaminação ou dimerização que pudesse interferir nos resultados devido à amplificação tardia após 10 ciclos do NTC, quando comparada a última diluição.

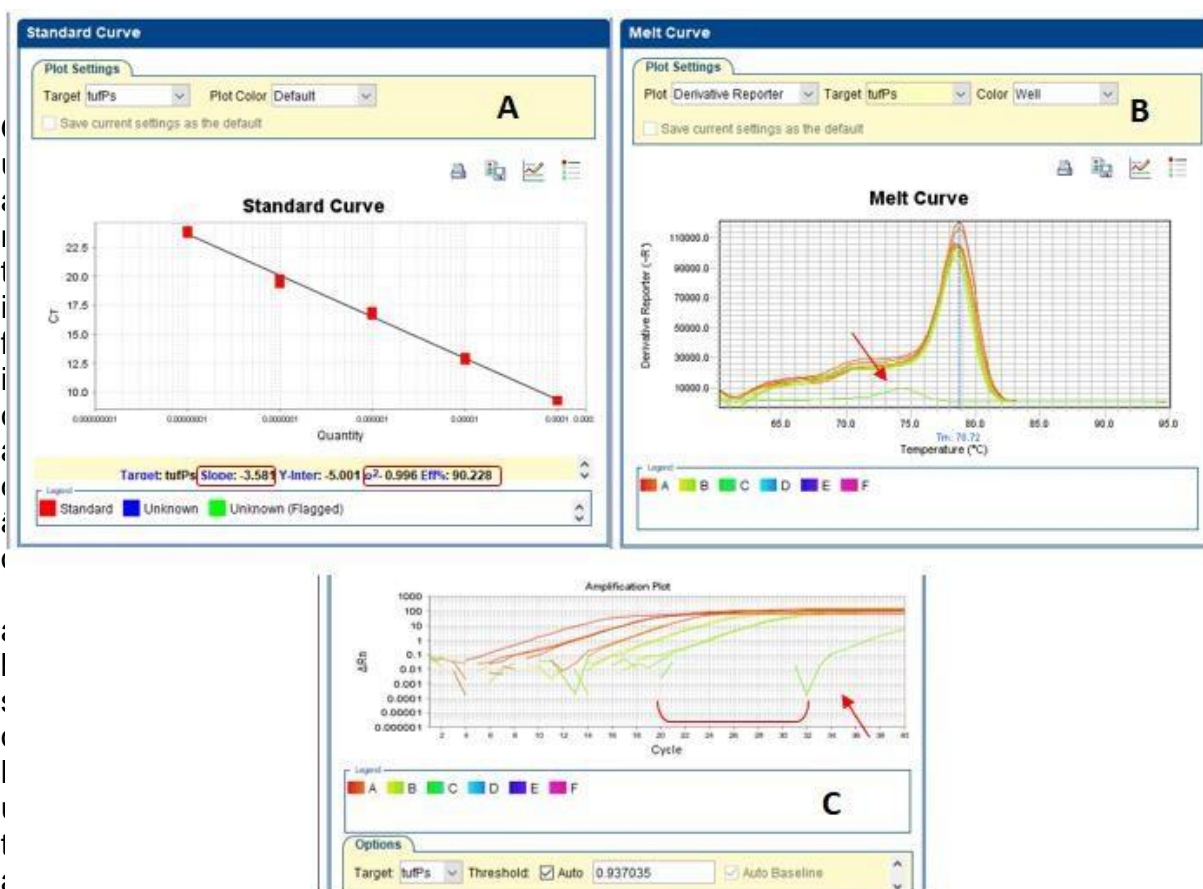
Figura 3a e b. a) Curva padrão do primer *tufMm*. b) Curva de melt do mesmo primer.



e c. a) Curva padrão do primer *tufKp*. b) Curva de melt do mesmo primer. c) Amplificação do NTC.



**Figura 5a, b e c.** a) Curva padrão do primer *tufPs*. b) Curva de melt do mesmo primer. c) Amplificação do NTC.

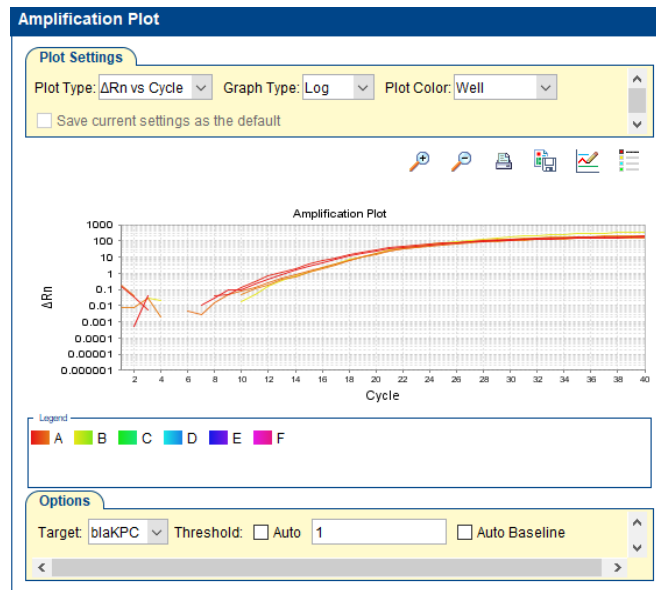


Os experimentos de quantificação absoluta foram realizados utilizando o gene alvo *bla<sub>KPC</sub>* e os genes de controle endógenos das espécies incluídas neste estudo, *tufMm*, para *M. morganii*; *tufPs*, para *P. stuartii*; *tufKp*, para *K. pneumoniae* e *HKEc*, para *E. coli*. A quantidade de molde utilizado nas reações foi de 20ng. Os dados gerados pelos experimentos de qPCR foram associados com os distintos perfis fenotípicos observados pelos isolados.

As amplificações do gene *bla<sub>KPC</sub>* na reação apareceram todas no mesmo Cq (ciclo) ou em Cqs muito próximos, com diferença de até 3 ciclos (Figura 9a e b).

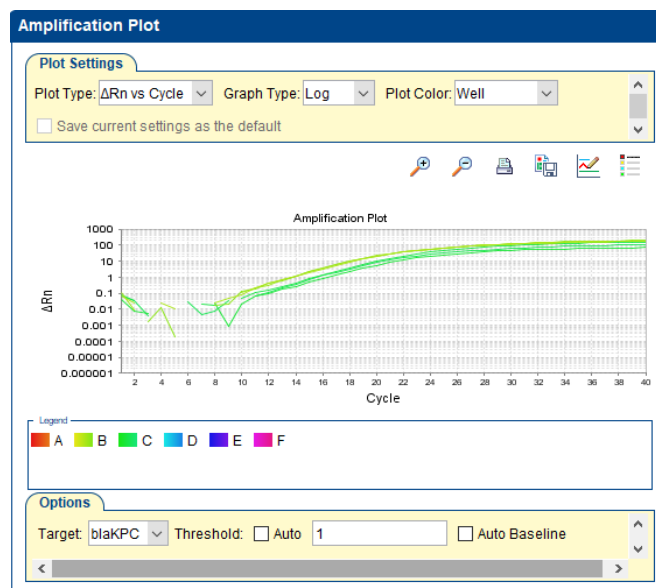
Para *M. morganii* e sua *E. coli* transformante, os valores dos Cqs médio para o gene alvo, *bla<sub>KPC</sub>*, variaram 0.5 ciclos aproximadamente (Mm01 *bla<sub>KPC</sub>* = 14.544/ TMm01 *bla<sub>KPC</sub>* = 14.988) (Figura 6). De acordo com o teste t, considerando o ponto de corte 5%, o p-valor para essas amostras foi de 0.5, significando que não existe diferença significativa entre o número de cópias para esse gene.

**Figura 6.** Curva de amplificação do gene *blaKPC*, nas amostras de Mm01 e TMm01 respectivamente.



Para *P. stuartii* e sua *E. coli* transformante os valores dos Cqs médio para o gene alvo variaram 2 ciclos aproximadamente ( $Ps28\ bla_{KPC} = 13.687 / TP28\ bla_{KPC} = 15.807$ ) (Figura 7). De acordo com o teste t, considerando o ponto de corte 5%, o p-valor para essas amostras foi de 1.0, significando que não existe diferença significativa entre o número de cópias para esse gene.

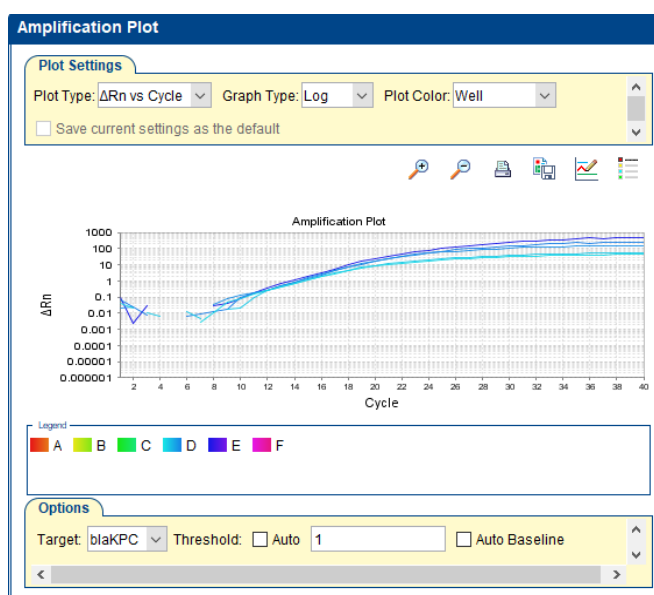
**Figura 7.** Curva de amplificação do gene *blaKPC*, nas amostras de Ps28 e TP28 respectivamente.





A *K. pneumoniae* e sua *E. coli* transformante, que foram incluídas no estudo para servirem como comparação nos ensaios, apresentaram padrão semelhante, variando 0.5 aproximadamente ( $Kp125\ bla_{KPC} = 14.74 / TF\ 125\ bla_{KPC} = 14.135$ ) (Figura 8). De acordo com o teste t, o p-valor para essas amostras foi de 1.0, significando que não existe diferença significativa entre o número de cópias para esse gene.

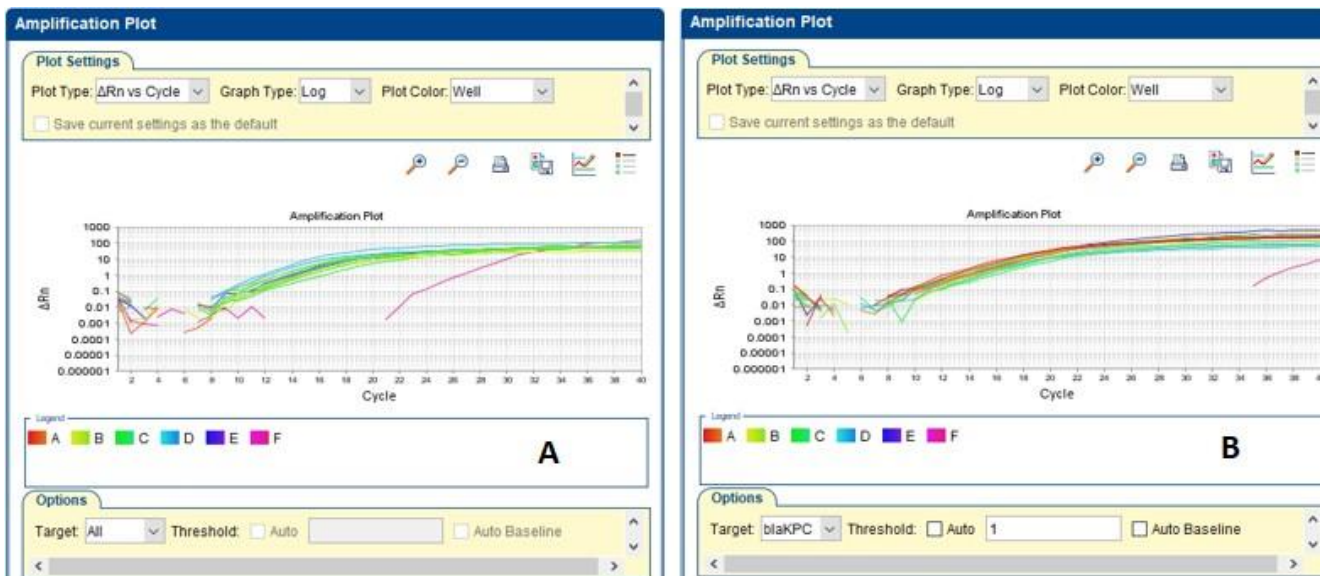
**Figura 8.** Curva de amplificação do gene  $bla_{KPC}$ , nas amostras de Kp125 e TF125 respectivamente.



Nos perfis fenotípicos de *M. morganii* e sua *E. coli* transformante, observa-se que os CIMs (Concentração Inibitória Mínima) do isolado transformante é muito maior do que o isolado doador para todos os antimicrobianos testados. Esse perfil também pode ser visto em *P. stuartii* e sua *E. coli* transformante, para alguns antimicrobianos testados. A hipótese inicial é de que uma resposta para esses perfis seria algum mecanismo desconhecido da *E. coli* que resultaria na multiplicação do plasmídeo inserido, aumentando o número de cópias do gene  $bla_{KPC}$ .

Devido aos ensaios de quantificação absoluta, foi constatado que essa hipótese é falha. As evidências sugerem que as *E. coli* transformantes apresentam o mesmo número de cópias do gene  $bla_{KPC}$  que os isolados clínicos doadores devido os valores do teste estatístico apresentados. Uma suposição é de que as espécies bacterianas *M. morganii* e *P. stuartii* podem ter mecanismos regulatórios diferenciados das demais *Enterobacteriaceae*, indicando uma possível característica evolutiva relacionada à tribo *Proteeae*, e que há a possibilidade da atuação de um mecanismo de regulação negativa do gene  $bla_{KPC}$  presente nos membros dessa tribo.

**Figura 9.** a) Curva de amplificação dos controles externos (*tufMm*, *tufKp*, *tufPs* e HKEc) e seus respectivos controles externos. b) Curva de amplificação do gene alvo (*blaKPC*) e seu respectivo controle externo.



## CONCLUSÃO

Comparando os resultados dos perfis fenotípicos dos isolados com os experimentos de qPCR absoluta realizados, as evidências sugerem que as *E. coli* transformantes apresentam o mesmo número de cópias do gene *blaKPC* que os isolados clínicos doadores devido os valores encontrados pelo teste estatístico apresentados. Acreditamos que outros mecanismos devem estar interferindo na expressão do gene *blaKPC*, influenciando diretamente os altos níveis de resistência para os isolados transformantes.

## REFERÊNCIAS

- AMBLER RP. The Structure of beta - Lactamases. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Biological Sciences*. 1980; 289 (1036): 321-331. 8.
- BRADFORD AP. Extended-Spectrum  $\beta$ - Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 4(14): 933-51. 2001.
- BUSTIN SA ; BENES V; GARSON JA; J HELLEMANS J; HUGGETT J; M KUBISTA M; MUELLER R; T NOLAN T; MW PFAFFL MW; GL SHIPLEY GL; VANDESOMPELE J ; CT WITTEWER CT. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 55(4):611-22. 2009.
- CAI JC; YANG W; HU YY; ZHANG R; ZHOU HW; CHEN G-X. Detection of KPC-2 and qnrS1 in clinical isolates of *Morganella morganii* from China. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 73(2): 207–209. 2012.
- CHIU, S.; CHAN, M.; HUANG, L.; LIN, Y.; LIN, J.; LU, P.; SIU, P. CHANG, F.; YEH, K. Tigecycline resistance among carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: Clinical characteristics and expression levels of efflux pump genes. *Plos One*, v. 12, n. 4, p. 1-15, 2017.
- COQUE TM; BAQUERO F; CANTON R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance*. 13(47). 2008.
- COULSON, RP; AMBLER AFW.; FRERE, FM.; GHUYSEN, JM.; JORIS, B.; FORSMAN, M.; LEVESQUE, RC.; TIRABY, G.; WALEY, SG. A standard numbering scheme for the class a beta-lactamases. *Journal of Biochemical*. 276(1): 269-270. 1991.
- DEL BIANCO, F; MOROTTI, M; ZANNOLI, S; DIRANI, G; FANTINI, M; PEDNA, M F.; FARABEGOLI, P; SAMBRI, V. 2019. "Comparison of Four Commercial Screening Assays for the Detection of bla<sub>KPC</sub>, bla<sub>NDM</sub>, bla<sub>IMP</sub>, bla<sub>VIM</sub>, and bla<sub>OXA48</sub> in Rectal Secretion Collected by Swabs" *Microorganisms* 7, no. 12: 704.
- GOMES AÉI; STUCHI LP; SIQUEIRA NMG; HENRIQUE JB; VICENTINI R; RIBEIRO ML; DARRIEUX M; FERRAZ LFC. Selection and validation of reference genes for gene expression. studies in *Klebsiella pneumoniae* using reverse Transcription quantitative real-time PCR. *Scientific Repots*, 2018.
- HALLOWAY K; VAN DIJK L. The World Medicines Situation: Rational use of antibiotics. **Geneva, Switzerland**: 2011.
- LEVERSTEIN-VAN HALL, MAURINE A.; BLOK, HETTY E.M.; DONDEERS, A.; ROGIER T. PAAUW, ARMAND FLUIT, AD C.; VERHOE, JAN. Multidrug Resistance among Enterobacteriaceae Is Strongly Associated with the Presence of Integrons and Is Independent of Species or Isolate Origin. *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 187, Issue 2, Pages 251–259. 2003.
- LIU H; ZHU J; HU Q; RAO X. *Morganella morganii*, a non-negligent opportunistic pathogen. *International Journal of Infectious Diseases*. 50(9): 10-17. 2016.
- MEYER, G.; PICOLI, S.U.; Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. v. 74, p .25-31, 2011.

MUNITA J.M.; ARIAS C.A.; Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Microbiology Spectrum**. 2016.

NAAS, T.; CUZON, G.; TRUONG, H.; E NORDMANN, P. Role of ISKpn7 and Deletions in bla<sub>KPC</sub> Gene Expression. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington DC. 2012.

NASCIMENTO, C.P.S. **Análise da expressão do gene blaKPC em isolados clínicos de Morganella morganii e Providencia stuartii**. Dissertação (mestrado) – Universidade de Pernambuco, Recife/PE, 2017.

**NCCLS - National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically-Sixth Edition: Approved Standard M7-A6. Wayne, PA, USA, 2003.

NORDMANN P; NAAS T; POIREL L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**. (10): 1791–1798. 2011.

PARADIS S ; BOISSINOT M; PAQUETTE N.; BÉLANGER SD; MARTEL EA; BOUDREAU DK; PICARD FJ; OUELLETTE M.; ROY PH; BERGERON MG. Phylogeny of the *Enterobacteriaceae* based on genes encoding elongation factor Tu and F-ATPase  $\beta$ -subunit. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology** 55: 2013-2025. 2005.

PATERSON D.L.; BONOMO R.A. Clinical Update Extended-Spectrum Beta-Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**. v.18, n.4, p. 657-86. 2005.

QUEENAN AM; BUSH K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. Jul;20(3):440–58. 2007.

ROTH, AMANDA L.; KURPIEL, PHILIP M.; LISTER, PHILIP D.; HANSON, NANCY D. bla KPC RNA expression correlates with two transcriptional start sites but not always with gene copy number in four genera of gram-negative pathogens **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 55(8): 3936–3938. 2011.

SADER, HELIO S.; JONES, RONALD N.; GALES, ANA C.; SILVA, JULIANA B.; PIGNATARI, ANTONIO C. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. (1):25-79. 2004.

SEIBERT G; HÖRNER R; MENEGHETTI B H; RIGHI R A; FORNO N L F D; SALLA A. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de Klebsiella pneumoniae carbapenemase em um hospital escola. **Einstein**. 12(3):282-6. 2014.

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico/Walter Tavares. – 3. ed. rev. e atual. -- São Paulo: **Editora Atheneu**, 2015, pág. 197.

THORNTON, B.; BASU, C. Real-Time PCR (qPCR) primer design using free online software. **Biochemistry and Molecular Biology Education**, v. 39, n. 2, p. 145-154. 2011.

VAEZ H; SAHEBKAR A; KHADEMI F. Carbapenem-Resistant Klebsiella Pneumoniae no Iran: a Systematic Review and Meta-Analysis. **J Chemother**. 2019 Fev;31(1):1-8. doi: 10.1080/1120009X.2018.1533266. Epub 2018 Dez 30. 30595129.

VANDESOMPELE J; DE PRETER K ; PATTYN F ; POPPE B ; VAN ROY N ; DE PAEPE UM ; SPELEMAN F. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biology**. 2002.

YIGIT H; QUEENAN AM; ANDERSON GJ; DOMENECH-SANCHEZ A; BIDDLE JW; STEWARD CD; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Ant Agen Chem**. 2008; 45(4): 1151–61.

ZIMERMAN, R.A. Uso indiscriminado de antimicrobianos e resistência microbiana, **Ministério da Saúde**, Porto Alegre-RS, 2010.

