



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

LARISSA ALMEIDA DA SILVA

**PERFIS GENÔMICOS DO *TRANSPOSON* TN4401 DE ISOLADOS DE *Proteus*
sp., *Providencia sp.* E *Morganella sp.***

RECIFE
2022

LARISSA ALMEIDA DA SILVA

PERFIS GENÔMICOS DO *TRANSPOSON* TN4401 DE ISOLADOS DE *Proteus* sp.,
Providencia sp. E *Morganella* sp.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nara Suzy Aguiar de Freitas

Co-orientadora: Msc. Dayane da Silva Santos

RECIFE
2022

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)

S586p

Silva, Larissa Almeida da

Perfis genômicos do transposon Tn4401 de isolados de *Proteus* sp., *Providencia* sp. e *Morganella* sp. / Larissa Almeida da Silva. - 2022.

54 f. : il.

Orientadora: Nara Suzy Aguiar de Freitas.

Coorientadora: Dayane da Silva Santos.

Inclui referências e apêndice(s).

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Bacharelado em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

1. Transferência horizontal de genes. 2. Pressão seletiva. 3. Tribo Proteeae. 4. Transposon Tn4401. I. Freitas, Nara Suzy Aguiar de, orient. II. Santos, Dayane da Silva, coorient. III. Título

CDD 574

LARISSA ALMEIDA DA SILVA

PERFIS GENÔMICOS DO *TRANSPOSON* TN4401 DE ISOLADOS DE *Proteus* sp.,
Providencia sp. E *Morganella* sp.

Monografia apresentada ao Curso de Bacharelado em Ciências Biológicas/UFRPE como requisito parcial para obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Nara Suzy Aguiar de Freitas

Co-orientadora: Msc. Dayane da Silva Santos

Aprovada em: 03/07/2022

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Nara Suzy Aguiar de Freitas
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Marcia Maria Camargo de Moraes
Universidade de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Anna Carolina Soares Almeida
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Yone Vila Nova Cavalcante
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Para a Larissa de 24 de abril de 2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à poderosa energia que rege o universo por todas as oportunidades ofertadas que agarrei com unhas e dentes e pelos obstáculos que me derrubaram momentaneamente mas que superei com esforço e empenho, sempre almejando a realização dos meus sonhos.

À mim, por meu empenho, esforço e dedicação, por não ter desistido e, mesmo com todas as dificuldades e nos piores momentos, conseguir me reerguer com o auxílio das pessoas mais importantes que sempre estiveram ao meu lado, me dando todo o suporte, me apoiando e torcendo, ao longo da minha caminhada educacional até aqui.

À minha querida mãe, Geane Almeida, pois sem ela eu não saberia a importância de ser uma mulher forte, amorosa e independente; ao meu querido pai, Carlos José, pois sem ele eu não saberia a importância de saber se levantar após uma queda, de correr atrás dos meus sonhos sempre respeitando o meio ambiente e as pessoas ao meu redor e de ter uma mente criativa e aberta a novidades; e ao meu querido irmão, Carlos Filho, companheiro de jogos e diversão, pois a vida não se resume apenas às responsabilidades e obrigações.

Ao meu amor e melhor amigo, Iago Silva, por todo amor e cuidado, todas as conversas e conselhos; por sempre me apoiar nas minhas decisões e me auxiliar nos assuntos acadêmicos; principalmente nessa reta final da monografia; por sempre estar ao meu lado, seja nos momentos ruins ou bons, ao longo de todos esses anos; e por me entender e me incentivar, até mais do que eu mesma. Em suma, por ser um autêntico companheiro.

Agradeço à minha família em geral, principalmente aos meus tios e avós, por todo amor, cuidado e por sempre acreditarem na minha capacidade e determinação; e por sempre me apoiarem nas minhas escolhas e me darem todo o suporte.

À Prof.^a Anna Carolina por me indicar a orientação da Prof.^a Nara Suzy e por me auxiliar na definição do tema desta monografia.

À minha orientadora, Prof.^a Nara Suzy, por estar nessa longa jornada ao meu lado, sempre me orientando e acreditando em mim, mesmo nas horas mais difíceis que nem eu mesmo acreditei.

À Me. Dayane Santos, co-orientadora, por todas as dicas interessantes durante a escrita do projeto desta monografia, um ano atrás; por toda ajuda com os resultados e achados valiosos contidos neste trabalho; e por todo auxílio e ensinamentos acerca da utilização dos programas biotecnológicos.

À UFRPE, por todo acolhimento e por ser, diferente de algumas outras, uma faculdade organizada e unida; me senti parte de uma grande família.

Ao curso de Bacharelado em Ciências Biológicas por, mesmo não sendo o curso que almejei, me fazer gostar dos assuntos estudados, me identificar e buscar sempre me aprimorar e seguir estudando nessa área.

À coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, por todo auxílio prestado, todas as dúvidas tiradas, todos emails respondidos em tão pouco tempo e por toda dedicação aos alunos e à Universidade.

E, por último, agradeço a todas as pessoas que em algum momento me auxiliaram (positivamente) na minha caminhada pessoal, social e profissional.

À todos esses, o meu MUITO OBRIGADA!

*“Talvez tivesse que ser assim.
Talvez sem os pontos baixos, os pontos
altos não pudessem ser alcançados.”
(Peregrina, em A Hospedeira)*

RESUMO

A resistência aos antibióticos é uma ameaça global crescente à saúde pública, causando alta mortalidade. Mutação, deriva genética, transferência horizontal de genes via transposons e seleção natural são os mecanismos básicos responsáveis pela disseminação de genes de resistência entre populações bacterianas. A tribo *Proteeae* é composta por três gêneros: *Proteus* spp., *Morganella* spp. e *Providencia* spp., bactérias patogênicas oportunistas e resistentes a β -lactâmicos. O transposon altamente móvel Tn4401 de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* é caracterizado por conter genes *blaKPC* que codificam β -lactamase, garantindo resistência aos β -lactâmicos. O objetivo foi analisar a história evolutiva dos genomas da tribo *Proteeae* e seus transposons Tn4401, mediante padrões, variações e sintenias das sequências dos genomas e de suas regiões vizinhas. Inicialmente, as sequências de Tn4401 de *K. pneumoniae* (Kp15, Kp512, Kp529-1) foram utilizadas como sequência *query* no BLASTn/NCBI para busca de cepas da tribo *Proteeae*. Em seguida, os arquivos GenBank selecionados foram utilizados no *software Islandviewer* 4.0 para análise de similaridade e sintenia e as sequências FASTAS foram incorporadas ao *ClustalW/MEGA* 11. Após o alinhamento, foi estabelecida a razão de substituições não-sinônimas por sinônimas. Diferentes isoformas de Tn4401 foram reveladas, entre elas, Tn4401a, Tn4401b e Tn4401d contendo *blaKPC*. Vários padrões de sítios gênicos do *transposon* foram detectados, envolvendo deleções, inversões, duplicações e mobilidade de grupos gênicos vizinhos, ora semelhantes, ora diferentes. A seleção purificadora foi uma força ativa nas β -lactamases das cepas analisadas. Foi detectado uma possível relação entre as isoformas do *transposon* e ilhas vizinhas de resistência a Mercúrio, Cromato e Sulfonamida. Esses achados enfatizam a ação contínua de diferentes processos evolutivos nos plasmídeos e no elemento Tn4401, bem como o possível potencial de disseminação de genes de resistência pela tribo *Proteeae*.

Palavras-chave: Transferência horizontal de genes; pressão seletiva; tribo *Proteeae*; *transposon* Tn4401.

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a growing global threat to public health, causing high mortality. Mutation, genetic drift, horizontal gene transfer via transposons, and natural selection are the basic mechanisms responsible for the spread of resistance genes among bacterial populations. The *Proteeae* tribe is composed of three genera: *Proteus* spp., *Morganella* spp. and *Providencia* spp., opportunistic pathogenic bacteria that are resistant to β -lactams. The highly mobile *transposon* Tn4401 from *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* is characterized by containing *blaKPC* genes encoding β -lactamase, ensuring resistance to β -lactams. The objective was to analyze the evolutionary history of the genomes of the *Proteeae* tribe and its Tn4401 transposons, through patterns, variations and syntenies of genome sequences and their neighboring regions. Initially, the sequences of *K. pneumoniae* Tn4401 (Kp15, Kp512, Kp529-1) were used as a *query* in BLASTn/NCBI to search for strains of the *Proteeae* tribe. Then the selected GenBank files were used in *Islandviewer* 4.0 software for similarity and synteny analysis and the FASTAS sequences were incorporated into *ClustalW/MEGA* 11. After alignment, the ratio non-synonymous for synonymous substitutions was established. Different isoforms of Tn4401 were revealed, between them Tn4401a, Tn4401b and Tn4401d containing *blaKPC*. Several patterns of gene sitenia of transposon were detected, involving deletions, inversions, duplications and mobility of neighboring gene groups, sometimes similar, sometimes different. Purifying selection was an active force in the β -lactamases of the analyzed strains. We also detected a possible relationship between the transposon isoforms and neighboring islands of resistance to Mercury, Chromate and Sulfonamide. These findings emphasize the continuous action of different evolutionary processes on plasmids and on the Tn4401 element, as well as the possible potential for dissemination of resistance genes by the *Proteeae* tribe.

Keywords: Horizontal gene transfer; selective pressure; *Proteeae* tribe; transposon Tn4401.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do <i>transposon</i> Tn4401	26
Figura 2 - Deleção da sequência de inserção IS <i>Kpn7</i> na isoforma Tn4401b, originando a isoforma Tn4401d	27
Figura 3 - Sintenia e regiões vizinhas do <i>transposon</i> Tn4401 nos cinco isolados de <i>M. morganii</i>	33
Figura 4 - Sintenia e regiões vizinhas do <i>transposon</i> Tn4401 nos cinco isolados de <i>P. mirabilis</i>	34
Figura 5 - Sintenia e regiões vizinhas do <i>transposon</i> Tn4401 nos isolados de <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> e <i>Providencia</i>	35
Figura 6 - Relação filogenética entre os gêneros <i>Klebsiella</i> , <i>Escherichia</i> e os gêneros da tribo <i>Proteeae</i>	36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Retorno do Blastn de <i>Klebsiella</i> e <i>Escherichia</i> nos genomas da tribo <i>Proteeae</i>	31
Tabela 2 - Características genéticas dos isolados selecionados	32
Tabela 3 - Valores de distância genética par-a-par ($\times 10^{-3}$), baseados no modelo de Nei-Gojobori, dentro dos isolados analisados	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

aa.	Aminoácidos
A β	Antimicrobianos β -lactâmicos
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<i>bla</i>	β -lactamase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EGM	Elementos Genéticos Móveis
FASTA	Formato de Arquivo para Sequências Biológicas
GC	Guanina-Citosina
HGT	Transferência Horizontal de Genes, do inglês, <i>Horizontal Genes Transfer</i>
ISs	Sequências de Inserção, do inglês, <i>Insertion Sequences</i>
IPCSL	Infecções Primárias de Corrente Sanguínea Laboratorial
IRs	Repetições Invertidas, do inglês, <i>Inverted Repetitions</i>
IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
ITU	Infecções de Trato Urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
LCBs	Blocos Colineares Locais, do inglês, <i>Local Collinear Blocks</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ORFs	Sequências em Quadro Aberto de Leitura, do inglês, <i>Open Reading Frame</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RB	Resistência Bacteriana
RNA	Ácido Ribonucleico
spp.	Espécies
TEs	Elementos Transponíveis, do inglês, <i>Transposable Elements</i>
Tn	<i>Transposon</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE SÍMBOLOS

dN	Substituições não sinônimas
dS	Substituições sinônimas
Hg	Mercúrio
\ln	Logarítmo neperiano
n	Número de sítios potencialmente não sinônimos
N	Número total de substituições não sinônimas
p_n	Proporção das diferenças não sinônimas
p_s	Proporção das diferenças sinônimas
s	Número de sítios potencialmente sinônimos
S	Número total de substituições sinônimas
ω	Razão de substituições não sinônimas por sinônimas, razão dN/dS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1	UM DESAFIO MUNDIAL EMERGENTE: BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES ALTAMENTE PATOGÊNICAS.....	14
2.1.1	Multirresistência bacteriana no Brasil e em Pernambuco: dados alarmantes	16
2.2	RESISTÊNCIA BACTERIANA TRANSPONÍVEL.....	17
2.3	FAMÍLIA <i>Enterobacteriaceae</i> : BACILOS GRAM-NEGATIVOS PATOGÊNICOS	19
2.3.1	Tribo <i>Proteeae</i>	20
2.3.1.1	<i>Morganella</i>	20
2.3.1.2	<i>Proteus</i>	21
2.3.1.3	<i>Providencia</i>	21
2.4	EVOLUÇÃO MOLECULAR: MUTAÇÃO, RECOMBINAÇÃO, SELEÇÃO E DERIVA.....	22
2.4.1	Relógio Molecular	23
2.5	GENOMA EM MOVIMENTO: ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS.....	24
2.5.1	Breve Histórico e Características Moleculares	24
2.6	ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS NO GENOMA BACTERIANO: <i>TRANSPOSON</i> TN4401 E SUAS ISOFORMAS.....	26
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	SELEÇÃO DE GENOMAS E ILHAS.....	28
4.2	IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE SIMILARIDADE E SINTENIAS.....	29
4.3	RELAÇÃO FILOGENÉTICA E ASSINATURA SELETIVA.....	29
5	RESULTADOS	30

5.1	<i>TRANSPOSON</i> TN4401 EM <i>Klebsiella</i> , <i>Escherichia</i> E NA TRIBO <i>Proteeae</i>	30
5.2	PADRÕES E VARIAÇÕES NO GENOMA E SINTENIAS.....	31
5.3	RELAÇÃO FILOGENÉTICA E ASSINATURA SELETIVA.....	36
6	DISCUSSÃO	37
7	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43
	APÊNDICE A	50

1 INTRODUÇÃO

Bactérias Gram-negativas são atualmente uma ameaça mundial e a disseminação de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases é um problema de saúde pública crescente. Os genes de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (*blaKPC*) já se espalharam pelo mundo e são particularmente prevalentes na América do Norte e do Sul, China, Grécia e Israel (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). A disseminação de resistência aos carbapenêmicos só tende a aumentar, visto que, atualmente, a principal força impulsionadora de resistência tem sido a pressão seletiva imposta pelo uso indiscriminado de antimicrobianos aliada a transferência horizontal de genes (RODRÍGUEZ-ROJAS *et al.*, 2013; DIEKEMA *et al.*, 2019).

Em todos os genomas há sequências móveis de ácido desoxirribonucleico (DNA), os elementos transponíveis (TEs), capazes de causar impactos substanciais, mutações deletérias, ruptura gênica e rearranjos cromossômicos (CHÉNAIS *et al.*, 2012; BULLA *et al.*, 2014). Contudo, esses impactos podem ser positivos ao favorecer a diversidade genética dos organismos, principalmente as bactérias, desempenhando fundamental papel durante o processo de aquisição de resistência aos carbapenêmicos e no surgimento de linhagens multirresistentes (CARARETO; MONTEIRO-VITORELLO; VAN SLUYS, 2015; HARRIS *et al.*, 2018).

Por ser atribuída a alta expressão de carbapenemases e β -lactamases, as enzimas responsáveis pela multirresistência bacteriana aos carbapenêmicos são adquiridas através de TEs e codificadas por genes localizados em plasmídeos, como o altamente patogênico *blaKPC* (ANGELIS *et al.*, 2020). *Transposons*, plasmídeos de virulência, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos são exemplos de TEs, sendo o *transposon* altamente móvel Tn4401, de 10 kb e pertencente à família Tn3, frequentemente associado a genes *blaKPC* (TIJET, 2016; BONNIN *et al.*, 2020; REYES, 2020).

Detentor de sequências assessoras de capacidade de se mobilizar no genoma, o *transposon* Tn4401 é composto por duas transposases, uma resolvase, duas sequências de inserção, o gene *blaKPC* e os genes *istA* e *istB*. Nove isoformas do *transposon* (Tn4401a a Tn4401i) foram identificadas até a atualidade,

caracterizadas principalmente por deleções, sendo Tn4401a e Tn4401b as mais difundidas (YOON *et al.*, 2018).

Devido possuir resistência intrínseca a determinados carbapenêmicos, a tribo *Proteeae* representa um desafio emergente para os pesquisadores na atualidade. Composta por bacilos Gram-negativos oportunistas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, a tribo *Proteeae* é constituída por três gêneros: *Proteus* spp., *Morganella* spp. e *Providencia* spp., habitantes de águas contaminadas por estações de tratamento de esgoto, solo e águas residuais e trato gastrointestinal humano (BÁNKI *et al.*, 2022). Sabe-se que, com exceção de *Proteus myxofaciens*, são espécies ditas agentes de infecção humana, sendo algumas relacionadas com infecções nosocomiais. No contexto de resistência natural, segundo Rus *et al.* (2020), o gênero mais resistente seria *Providencia*, seguido de *Morganella* e *Proteus*.

Por serem expressos, ou mesmo ativados, em situações de estresse, como mudanças na disponibilidade de alimento, e serem influenciados diretamente pelo ambiente, estudos centrados na análise comparativa dos TEs podem revelar a evolução do genoma, tanto no aumento do número de pares de base total como nas modificações moleculares. Levando, assim, ao entendimento da influência da expressão dos genes funcionais e da especiação no surgimento de uma nova espécie; sendo o conhecimento da mobilidade genômica algo essencial para o estudo de bactérias patogênicas.

Assim, e devido haver poucos estudos relacionando às propriedades dos genomas completos, do uso de *códons* e da dinâmica evolutiva, da mecânica dos TEs e de seus grupos hospedeiros, o presente trabalho teve por objetivo analisar comparativamente o *transposon* Tn4401 de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* com isolados dos gêneros da tribo *Proteeae*, o localizando e catalogando nos genomas assim como suas sintonias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 UM DESAFIO MUNDIAL EMERGENTE: BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES ALTAMENTE PATOGÊNICAS

Dependendo da referência consultada, o conceito de multirresistência pode variar. Contudo, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2021), a definição mais utilizada é: “microrganismo resistente a três ou mais classes de antibióticos”, independente do mecanismo de aquisição de resistência. As infecções multirresistentes normalmente são causadas pela prescrição precoce de antimicrobianos embasada em dados epidemiológicos, e não no diagnóstico laboratorial, o que leva à aceleração da resistência de células bacterianas (SILVA, 2021). Já no contexto hospitalar, essa aceleração se verifica no consumo desordenado desses fármacos, dificultando o tratamento das infecções.

Na atualidade, uma grande parte das bactérias, antes encontradas apenas em leitos de hospitais, são encontradas fora do ambiente hospitalar. Um exemplo é a *Klebsiella pneumoniae*, bactéria multirresistente, antes incidente apenas em hospitais, que, com o passar dos anos, disseminou-se para a comunidade, sendo recordista de infecções todos os anos (ALVIM, 2019). A prescrição ou automedicação está intrinsecamente relacionada com o consumo incorreto de antimicrobianos. O Brasil é o quinto país que mais se automedica: cerca de 80 milhões de cidadãos brasileiros (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020).

Logo, a disseminação de bactérias resistentes e multirresistentes ocorre tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, podendo disseminar-se entre humano-animal-vegetal, seja por contato direto, fômites ou alimentos contaminados. Portanto, diante do ciclo de contágio, a resistência bacteriana (RB) torna-se potencialmente mais perigosa (ASSUNÇÃO *et al.*, 2020). Considerada uma das principais ameaças à saúde mundial, a RB vem se tornando um desafio emergente para a comunidade científica. Por ano, segundo estudo realizado em 2017 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), com apoio do governo britânico, cerca de 700 mil pessoas morrem no mundo por causa das bactérias multirresistentes. No Brasil, estima-se que esse número alcance 20 mil brasileiros.

Apesar desses dados já serem considerados alarmantes, a previsão para 2050 é da RB poder se tornar a principal causa de mortes no mundo, resultando em 10 milhões de vidas perdidas por ano (OMS, 2017). Diante desse cenário, no Brasil, dados divulgados pelo Sistema Nacional de Vigilância Epidemiológica das infecções

relacionadas à assistência à saúde (IRAS), coordenado pela ANVISA, refletem o aumento nos últimos anos de taxas de resistência de *Enterobacteriaceae* identificadas em infecções primárias de corrente sanguínea laboratorial (IPCSL) (ANVISA, 2019).

A família *Enterobacteriaceae*, tendo *K. pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii* e *Providencia stuartii* como alguns representantes, enquadra a prioridade máxima da OMS por terem se tornado resistentes a um grande número de antimicrobianos - incluindo carbapenêmicos e cefalosporinas de terceira e quarta geração, representando, assim, uma ameaça específica em hospitais, lares de idosos e entre pacientes imunossuprimidos. Logo, em 2021, a OMS dispôs uma realidade alarmante: existia apenas um único fármaco - colistina - capaz de tratar infecções potencialmente fatais causadas por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos.

K. pneumoniae, pertencente à família *Enterobacteriaceae*, se sobressai pela maestria em otimizar instrumentos de resistência enzimáticos, sendo conhecida grande responsável por diversas doenças infecciosas (KOLPA *et al.*, 2018). Ainda de acordo com a OMS (2021), em determinados países, os antimicrobianos carbapenêmicos não são mais úteis para mais da metade dos pacientes tratados com infecções por *K. pneumoniae* devido à resistência.

A resistência ao tratamento de carbapenêmicos, evidenciado principalmente em *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), se alastrou para todos os continentes do planeta. Entendida espécie altamente patogênica, é um dos principais motores de infecções adquiridas em contexto hospitalar, como pneumonia, infecções da corrente sanguínea e infecções em recém-nascidos e pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI).

2.1.1 Multirresistência bacteriana no Brasil e em Pernambuco: dados alarmantes

Devido ao aumento de RB, a ANVISA passou a disponibilizar no país, em 2011, o Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde. No mais recente boletim, divulgado em 2019, constam taxas de RB no Brasil a

cefalosporina de terceira e quarta geração, a carbapenêmicos e a colistina em infecções de trato urinário (ITU) e IPCSL atribuídas à pacientes adultos de UTIs em hospitais públicos e privados.

Em relação aos carbapenêmicos, *K. pneumoniae* apresentou as maiores porcentagens de isolados resistentes em relação aos sensíveis no país, 51,8% e 42,7%, e *E. coli* as terceiras maiores 8,8% e 11,1%, para IPCSL e ITU, respectivamente. Quanto à cefalosporina de terceira e quarta geração, a quantidade de dados ausentes foi expressiva. Contudo, os dados divulgados corroboram a supremacia de *K. pneumoniae*: dos 3032 isolados testados, apenas 967 foram sensíveis. No que se refere à colistina (Polimixina B e E), isolados de ITU de *K. pneumoniae* testados apresentaram a maior porcentagem de resistência no país, seguido de *Proteus* e *E. coli*.

Já a RB em Pernambuco merece maior destaque, pois é significativamente mais alarmante do que as médias brasileiras. Neste estado, encontram-se isolados bacterianos com 100% e 97% de resistência a cefalosporinas de terceira e quarta geração e carbapenêmicos, respectivamente.

Ainda de acordo com dados do boletim, para Pernambuco, *K. pneumoniae* e *E. coli* apresentaram as maiores taxas no estado de resistência à cefalosporina: 82,1% e 75% para IPCSL e 75,7% e 100% para ITU. Em relação aos carbapenêmicos, ficaram entre as três espécies de maior destaque. Assim como a média brasileira, no que se refere à colistina, *K. pneumoniae* apresentou a maior porcentagem de resistência no estado.

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA TRANSPONÍVEL

Como citado por Paula (2018), a transferência horizontal de genes (HGT), sejam estes responsáveis pela RB ou não, inclui mecanismos de transformação, transdução, conjugação e transposição. Contudo, ao se transferir, o material genético sofre modificações inevitavelmente.

A transferência de DNA de uma célula para outra configura a transformação. No ambiente, bactérias podem captar DNA de outras células bacterianas em processo de morte. Já no laboratório, como mencionado por Levinson (2016), o

pesquisador pode introduzir em bactérias DNA de outra geneticamente distinta. A transdução igualmente consiste na transferência de DNA de uma bactéria para outra, contudo por meio de bacteriófagos, que captam o material genético bacteriano para seu processo de multiplicação, podendo, assim, incorporar genes de resistência (MACEDO; FALCÃO, 2011; RIBEIRO; CORTINA, 2016).

Conjugação, de modo análogo, configura o processo de “acasalamento” de duas bactérias (LEVINSON, 2016). Seja por contato físico ou por uma organela denominada fímbria sexual, uma célula bacteriana transfere seu material genético para outra num processo comumente observado entre Gram-negativos. Já entre bacilos Gram-positivos, o contato célula a célula é mais observado (MACEDO; FALCÃO, 2011; RIBEIRO; CORTINA, 2016). Já a transferência de genes de um plasmídeo para outro, para um bacteriófago ou cromossomo, bem como do cromossomo para plasmídeos, denomina-se transposição (COURA, 2013).

Como já mencionado, as populações bacterianas apresentam como fator acelerador das transferências gênicas, a exposição aos antimicrobianos. Logo, a resistência a estes fármacos - consequência da seleção natural e da adaptação das bactérias -, no decorrer do tempo, se torna irreversível.

Neste contexto, entram os antimicrobianos β -lactâmicos ($A\beta$), tendo como principal característica a presença, em sua estrutura química, do anel β -lactâmico. Estes fármacos não são homogêneos, ou seja, diferem entre si pela ligação com outros anéis e por apresentar diferentes tipos de cadeias lineares, resultando, assim, em distintos padrões de resistência às β -lactamases (SANTOS, 2018). Catalisando a reação de transpeptidação, apresentam, como mecanismo de ação, a inibição irreversível da enzima transpeptidase, durante a síntese da parede celular bacteriana (ANTUNES, 2019). Essa enzima é responsável pelas ligações cruzadas entre as estruturas protéicas, conferindo rigidez à parede celular, desta forma, atua como um importante mecanismo de proteção para a bactéria contra possíveis variações do meio, em especial as osmóticas (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010).

Os carbapenêmicos, de uso restrito hospitalar, são os $A\beta$ de maior espectro de ação e potência utilizados no tratamento de infecções mais severas ou em casos de resistência bacteriana. Contudo, recentemente, associações com ácido

clavulânico, sulbactam e outros inibidores da β -lactamase se tornam cada vez mais necessários para o enfrentamento de infecções devido à multirresistência bacteriana (MATARACI-KARA; YILMAZ; ÖZBEK-ÇELIK, 2020).

2.3 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*: BACILOS GRAM-NEGATIVOS PATOGÊNICOS

Atualmente, de acordo com o *Catalogue of Life* de abril de 2022, as bactérias pertencentes à família *Enterobacteriaceae* são classificadas em 50 gêneros, 227 espécies e 39 subespécies (BÁNKI *et al.*, 2022).

As células bacterianas diferem entre si pela composição química, estrutura e espessura da parede celular, sendo divididas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MACEDO JÚNIOR, 2019). Proposta inicialmente por Rahn em 1937, a família *Enterobacteriaceae* é composta por um grande grupo de bacilos Gram-negativos, oxidase negativa, não formadores de esporos, considerados os maiores causadores de infecções em humanos. Crescem em diferentes meios de cultura, desde meios básicos a meios ricos e seletivos. São anaeróbios facultativos, fermentam glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivo e reduzem nitrato a nitrito.

Podem ser encontradas na natureza ou no trato gastrointestinal de seres humanos e animais, como membros da microbiota residente ou como agentes causadores de doenças infecciosas, e são o principal grupo de bactérias isoladas de amostras clínicas, como por exemplo: amostras de urina de ITU, fezes de enterocolites, sangue de septicemias e licor de meningites (JUNIOR, 2014).

Enterobacteriaceae produtoras de carbapenemases são de particular preocupação e relevância epidemiológica porque os genes das carbapenemases estão frequentemente localizados em elementos genéticos móveis (EGM), como *transposons*, integrons e plasmídeos, e podem ser transferidos horizontalmente entre as células (ANSARI; MUNIR; SAAD, 2018). Dentro de *Enterobacteriaceae*, membros da tribo *Proteeae* são conhecidos por serem intrinsecamente resistentes à certos β -lactâmicos (MMATLI *et al.*, 2020).

2.3.1 Tribo *Proteeae*

É uma tribo composta por bacilos Gram-negativos oportunistas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, constituída por três gêneros: *Proteus*, *Morganella* e *Providencia*. A classificação mais recente do *Catalogue of Life* (2022), confere ao gênero *Proteus*, quatro espécies; ao gênero *Providencia*, oito espécies; e ao gênero *Morganella*, duas espécies.

No entanto, sabe-se que, com exceção de *Proteus myxofaciens*, são espécies ditas agentes de infecção humana, sendo algumas relacionadas com infecções nosocomiais. Devido possuir resistência intrínseca a determinados A β , a tribo *Proteeae* representa um desafio emergente para os pesquisadores na atualidade, e, neste contexto de resistência natural, segundo Rus *et al.* (2020), o gênero mais resistente seria *Providencia*, seguido de *Morganella* e *Proteus*.

Assim como *K. pneumoniae* e *E. coli*, estas espécies possuem genes codificantes da enzima KPC, considerada um preocupante obstáculo epidemiológico e clínico e uma das enzimas responsáveis por conferir resistência aos carbapenêmicos à tribo.

2.3.1.1 *Morganella*

De acordo com o *Catalogue of Life* (2022), o gênero *Morganella* consiste em duas espécies e duas subespécies, sendo *M. morganii* a espécie mais estudada na atualidade. Essa espécie é um bastonete Gram-negativo, entérico e anaeróbio facultativo, isolado pela primeira vez de uma cultura fecal pediátrica por Morgan, em 1906, sendo considerado um patógeno oportunista. Estudos sobre bactérias Gram-negativas, demonstram que essa espécie se encontra entre as dez causas de infecções clínicas, estando envolvida em doenças como sepse, peritonite e endocardite (CHEN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2017; VAN BENTUM *et al.*, 2019).

M. morganii, encontrada no solo e em águas residuais, coloniza rapidamente o trato intestinal do hospedeiro durante as primeiras horas de vida, onde atua como comensal, sem causar danos aos organismos saudáveis. Contudo, pode prosperar de forma incontrolável e se tornar altamente patogênico ao entrar em contato com

feridas abertas e indivíduos que passaram por extrações dentárias, cirurgias ou pacientes imunocomprometidos.

Devido conter genes de resistência intrínsecos, como o altamente patogênico *blaKPC*, *M. morganii* é resistente à maioria dos Aβs (KOHLMANN; BÄHR; GATERMANN, 2018). Por ser propensa a obter fatores de virulência e genes de resistência mediante EGM, como plasmídeos, ilhas de patogenicidade e *transposons*, sua multirresistência só tende a aumentar (XIANG *et al.*, 2021).

2.3.1.2 *Proteus*

As bactérias Gram-negativas pertencentes ao gênero *Proteus* foram primeiramente descritas pelo microbiologista alemão Gustav Hauser, em 1885. O nome do gênero veio do personagem Proteu de “Odisseia”, de Homero; personagem esse que podia mudar sua forma e se transformar infinitamente. *Proteus* são comensais comuns da microbiota gastrointestinal humana, comumente reconhecidos clinicamente como causa de ITU.

Composto por seis espécies produtoras de urease, esse gênero é beneficiado pelo pH alcalino, é altamente móvel e apresenta um odor desagradável característico (BÁNKI *et al.*, 2022). Estes microorganismos não fermentam a lactose e participam da decomposição de matéria animal. Com exceção de *P. cibarius* e *P. terrae*, foram isolados de espécimes clínicos e, com relação à homologia de seu DNA, apresentam somente uma discreta relação com *E. coli* (YU *et al.*, 2017).

Apesar do intestino humano ser colonizado por várias combinações de *P. vulgaris*, *P. mirabilis* e *P. penneri*, apenas 0,05% da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis é composta por essas espécies (YATSUNENKO *et al.*, 2012). Estes microorganismos têm como fator de virulência a produção de endotoxinas, da própria urease e de hemolisina, assim como a capacidade de mobilidade e de fixação celular e sua disseminação é normalmente endógena.

2.3.1.3 *Providencia*

Providencia é um gênero pertencente à família *Enterobacteriaceae*, constituído, de acordo com o *Catalogue of Life* (2022), por oito espécies de bactérias Gram-negativas móveis, produtoras de urease. Comumente associadas a ITU, são bacilos resistentes, habitantes de águas contaminadas por estações de tratamento de esgoto, solo e águas residuais, capazes de causar infecções agudas como diarreia, pneumonia e septicemia (CHOI *et al.*, 2017). As espécies desse gênero são encontradas em uma ampla gama de organismos vivos sendo consideradas patógenos oportunistas nos seres humanos (SHIMA *et al.*, 2016).

Uma das principais causas de patogenicidade desse gênero é possuir resistência intrínseca a vários antimicrobianos, incluindo alguns Aβs utilizados contra a resistência aos carbapenêmicos (MAGIORAKOS *et al.*, 2012). Além de sua resistência intrínseca, *Providencia* pode adquirir genes que codificam diferentes enzimas, como o altamente patogênico *blaKPC* (TAVARES *et al.*, 2015).

2.4 EVOLUÇÃO MOLECULAR: MUTAÇÃO, RECOMBINAÇÃO, SELEÇÃO E DERIVA

Charles Darwin contribuiu enormemente para a Biologia, disso não há dúvidas. Assim, nesse sentido, propor um mecanismo de evolução no qual espécies se modificam e se diversificam através de eventos populacionais, sendo uma de suas maiores contribuições. A esse fato, Darwin nomeou de seleção natural, no qual vantagens adaptativas diversas, conferidas por ambientes determinados, tendem a propagar-se nas populações através de herança genética. O resultado cumulativo dessas variações origina a diversidade biológica.

Se sabe que a diversidade genética incide nos ácidos nucleicos e sua origem é a mutação. Mutações, de acordo com Friedberg *et al.* (2006), são mudanças permanentes que ocorrem nos genes, alterando a sequência das bases nitrogenadas dos mesmos, podendo ser induzidas, produzidas por agentes mutagênicos, ou espontâneas.

Nesse contexto, no geral, segundo Matioli e Fernandes (2012), uma mutação necessita de dois processos para ocorrer: primeiro, a incorporação errônea de nucleotídeos durante a replicação do DNA; e, segundo, um ou mais nucleotídeos

lesionados que, após a replicação, não foram reparados. Assim, através de mutação - responsável pela variabilidade genética -, novos alelos podem aumentar em número em uma população num evento denominado deriva genética. Apesar de mutações em regiões codificadoras do genoma não sinônimas poderem ser consideradas as mais prejudiciais, paralelamente são importantes na sobrevivência de espécies à mercê da seleção natural.

A recombinação do DNA, assim como a seleção natural, a mutação e a deriva genética, tem seu papel importante na variabilidade genética. Seja através do processo denominado *crossing-over* ou da segregação de cromossomos homólogos, formando quiasmas, no qual novos rearranjos são gerados, contribuindo, assim, com a diversidade biológica (MATIOLI; FERNANDES, 2012).

2.4.1 Relógio molecular

A maior parte de Eukarya possui uma quantidade de DNA muito superior àquela que se entende necessária à regulação e à produção de proteínas. Desse modo, o genoma pode ser dividido em regiões codificadoras, que contêm genes e suas sequências regulatórias, e regiões aparentemente sem função, não codificadoras.

Nesse contexto, como demonstrado por Yi *et al.* (2021), a taxa de mutação se mostra bastante variável, a depender da região do genoma a ser analisada, por apresentar probabilidades distintas de alterar os aminoácidos (aa.) conforme as posições do *códon* onde ocorrer. Em regiões codificadoras, são ditas sinônimas ou não sinônimas. Essa classificação está relacionada ao efeito que a mudança provocará na proteína.

Quando um nucleotídeo é alterado por outro causando mudança no aminoácido resultante, diz-se mutação não sinônima. Quando não há alteração no aminoácido, é dita, sinônima. Ainda, a mutação pode ser classificada, também, como mutação sem sentido, quando a alteração codifica um *códon* de parada.

Em resumo, a evolução molecular se baseia em três conceitos base: a hereditariedade, variabilidade genética e os processos de especiação. O tempo e o espaço são fatores determinantes para a hereditariedade, que tem como princípios

as Leis de Mendel e a teoria cromossômica. A variabilidade genética está pautada na mutação, migração, seleção e deriva, tendo como ferramentas, a recombinação e os EGM, como os *transposons*, por exemplo. Já os processos de especiação se baseiam na sistemática universal a partir da razão entre sinônimas (dS) por não sinônimas (dN), qualquer genoma, seja vírus, bactérias, vertebrados ou não, vegetais ou fungos (YI *et al.*, 2021).

A razão de substituições não sinônimas por sinônimas, dN/dS (ω), é uma ferramenta chave, frequentemente utilizada para inferência da seleção natural. Normalmente, assume-se que as mutações sinônimas são seletivamente neutras e espera-se que ω seja igual a 1, se não houver seleção em substituições não sinônimas. Agora, quando a razão apresenta valores menores que 1, reflete restrição seletiva (ou seja, seleção purificadora) e valores maiores que 1, uma superabundância de substituições não sinônimas (ou seja, seleção positiva) (RAHMAN *et al.*, 2021).

2.5 GENOMA EM MOVIMENTO: ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS

2.5.1 Breve histórico e características moleculares

Os TEs foram primeiramente identificados molecularmente em plasmídeos bacterianos, como elementos móveis capazes de carregar genes que conferem resistência aos antimicrobianos. O uso da palavra *transposon* (Tn), que corresponde a uma das classes desses TEs em bactérias, estendeu-se muito, passando a incluir quaisquer elementos móveis presentes tanto em procariotos quanto eucariotos, que se movem por meio de moléculas de DNA.

Previamente à era do sequenciamento genético, conhecia-se o genoma dos organismos celulares que compõem os três âmbitos da vida (Eukarya, *Bacteria* e *Archaea*) como integrados por mais que somente genes de cópias únicas (CARARETO; MONTEIRO-VITORELLO; VAN SLUYS, 2015). Uma parte considerável desses genomas são constituídos de sequências repetidas, entre elas os TEs, com característica intrínseca de se transpor de um local para o outro, tornando o genoma dinâmico e, mais importante, adaptável (BULLA *et al.*, 2014).

A caracterização dos TEs e a ideia do genoma ser instável foi pensada primeiro por Barbara McClintock, citogeneticista descobridora da existência de EGM. Assim sendo, sua principal conclusão foi que os TEs, também chamados de elementos controladores de genes, são parte do desenvolvimento e evolução dos organismos. Identificou-se, então, esses elementos como os maiores constituintes dos genomas, sendo encontrados nos organismos e microorganismos pertencentes a todos os reinos biológicos e em praticamente todas as espécies já estudadas, desde os mais simples, como fungos e bactérias, a plantas, invertebrados e vertebrados, como o homem. Em Eukarya, constituem 70% do genoma de algumas plantas e anfíbios (ZAHA *et al.*, 2014).

Em *Bacteria* em específico, os TEs podem desempenhar fundamental papel durante processo de aquisição de resistência aos antimicrobianos e no surgimento de linhagens multirresistentes; podem ser responsáveis também por tornar um isolado bacteriano inócuo para determinado hospedeiro, patogênico (CARARETO; MONTEIRO-VITORELLO; VAN SLUYS, 2015).

Os TEs podem ser *transposons*, plasmídeos de virulência, ilhas de patogenicidade e bacteriófagos. O que define e difere um *transposon* dos demais supracitados é justamente sua capacidade de mobilização - através da atividade de transposases auto-codificadas no genoma dos organismos, estimulando mutações instáveis, geralmente recessivas, pois propiciam inativação total ou parcial do gene alvo da inserção (REYES *et al.*, 2020).

A mobilidade dos *transposons* podem induzir mutações deletérias, ruptura gênica e rearranjos cromossômicos. Entretanto, sua capacidade de se movimentar e causar mutações, também gera impactos positivos, como afetar a regulação gênica, que é um evento extremamente importante do ponto de vista evolutivo, com a formação de novos genes e/ou inativação de outros, podendo resultar em novos fenótipos selecionáveis pela seleção natural, favorecendo, assim, a diversidade genética dos organismos (CHÉNAIS *et al.*, 2012). Ainda, do ponto de vista evolutivo, deve-se destacar a possibilidade de HGT, como observado por Sugita (2021), entre espécies diferentes.

Elementos genéticos móveis, como já mencionado, TEs incluídos, são provavelmente os principais motores da disseminação de genes de

carbapenemases entre diferentes espécies bacterianas (REYES *et al.*, 2020). O primeiro sistema de classificação dos TEs foi apresentado em 1989. Desde então, consoante novos TEs são identificados e suas organizações moleculares desvendadas, esse sistema de classificação vem sendo constantemente aperfeiçoado.

Atualmente existem diferentes tipos de TEs, e esses possuem níveis de classificação, bem como, classe, subclasse, ordem, superfamília, família e subfamília, de acordo com suas características estruturais e mecanismos de transposição comuns.

2.6 ELEMENTOS GENÉTICOS MÓVEIS NO GENOMA BACTERIANO: TRANSPOSON TN4401 E SUAS ISOFORMAS

O *transposon* altamente móvel Tn4401, de 10 kb e pertencente à família Tn3, é frequentemente associado a genes *blaKPC* (DAVID *et al.*, 2020). Detentor de sequências assessoras de capacidade de se mobilizar no genoma, o *transposon* (Figura 1) é composto por duas *tnpA* (transposase), uma *tnpR* (resolvase), sequências de inserção, *ISKpn6* e *ISKpn7* - delimitadas por duas repetições invertidas (IRs) imperfeitas de 39 pb -, o gene *blaKPC* e os genes *istA* e *istB*.

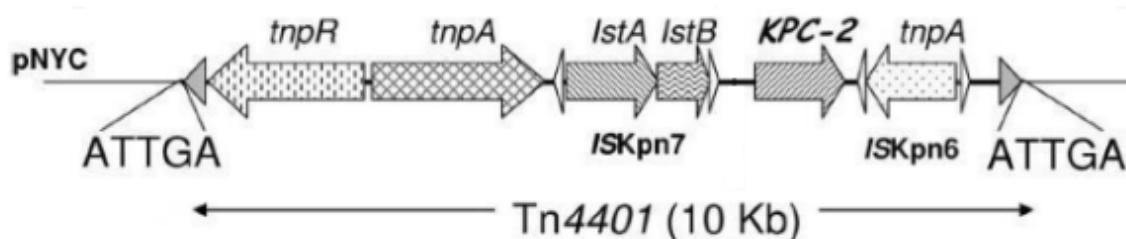


Figura 1 - Representação esquemática do *transposon* Tn4401. Os genes e suas orientações de transcrição correspondentes estão indicados por setas horizontais. Representação esquemática do *transposon* Tn4401 inserido no plasmídeo pOX38-Gen de *E. coli*.

Fonte: AIRES, 2017.

Nove isoformas do Tn4401 (Tn4401a a Tn4401i) foram identificadas até a atualidade, caracterizadas principalmente por deleções, sendo Tn4401a e Tn4401b as mais difundidas (YOON *et al.*, 2018). A variante Tn4401a é identificada na literatura por uma deleção de 99 pb entre a sequência de inserção *ISKpn7* e o gene

blaKPC; a isoforma “b” não apresenta deleção; a “c”, por uma mutação nucleotídica no promotor e deleção de 215 pb; “d”, deleção de 68 pb; “f”, por um truncamento no gene *tnpA* e ausência de *tnpR*; a “g” não apresenta *tnpA* nem *tnpR*, e possui uma deleção de 215 pb na região não codificante; já a “h”, é caracterizada por ser uma versão truncada da isoforma Tn4401e (deleção de 255 pb no gene *blaKPC*) e por não possuir os genes *tnpA* e *tnpR* (NAAS *et al.*, 2008; CHEN *et al.*, 2012; BRYANT *et al.*, 2013; MARTINEZ *et al.*, 2016; CHERUVANKY *et al.*, 2017).

É importante dar destaque, entretanto, à deleção da sequência de inserção *ISKpn7* na isoforma Tn4401i, pois, como demonstrado por Beltrão (2017), pode fazer o *transposon* perder sua capacidade de se transpor, visto que as sequências de inserção são essenciais para a sua mobilidade. A Figura 2 ilustra a deleção dos genes *istA* e *istB* (*ISKpn7*) da isoforma Tn4401b originando o *transposon* Tn4401d.

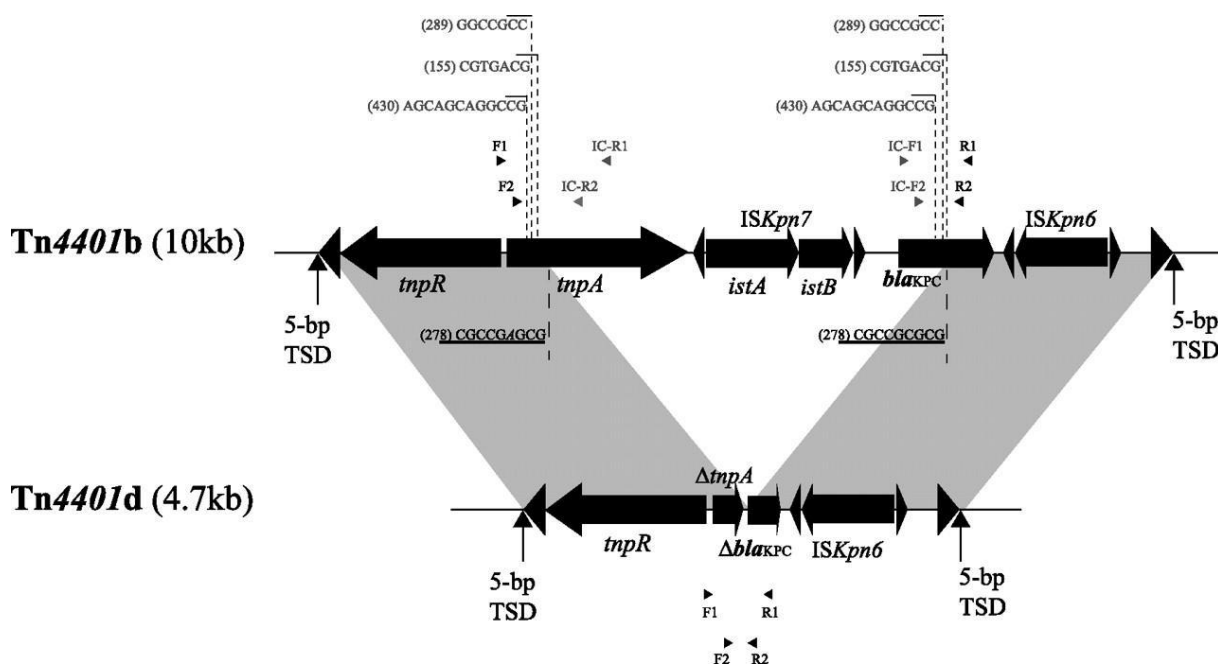


Figura 2 - Deleção da sequência de inserção *ISKpn7* na isoforma Tn4401b, originando a isoforma Tn4401d. Estrutura da isoforma Tn4401d truncada encontrada em *K. pneumoniae* ST258. O sombreado cinza denota regiões de homologia compartilhadas por Tn4401b e Tn4401d. Os genes e suas orientações de transcrição correspondentes estão indicados por setas horizontais pretas e os pontos de excisão estão indicados por linhas pontilhadas abaixo de Tn4401b.

Fonte: CHEN *et al.*, 2012.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Analisar a história evolutiva dos genomas da tribo *Proteeae* (gêneros *Morganella*, *Providencia* e *Proteus*) e seus elementos genéticos móveis mediante padrões e variações na organização das sequências dos genomas e de suas regiões vizinhas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Localizar sequências do *transposon* Tn4401 de *K. pneumoniae* e *E. coli* nos genomas de *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*;
- Construir um banco de dados local com as sequências do elemento genético móvel nos genomas de interesse;
- Verificar padrões e variações nas sequências de DNA das regiões de interesse e suas sintenias;
- Determinar a assinatura seletiva do gene *blaKPC* nos genomas de interesse.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE GENOMAS E ILHAS

Para a seleção dos genomas, foi utilizada a base de dados *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), no qual Tn4401, *Klebsiella* e *Escherichia* foram utilizados como *query* e cujo critérios de inclusão consistiram em genomas que apresentaram uma das nove isoformas do *transposon* Tn4401, eram da espécie *K. pneumoniae* ou *E. coli* e continham genoma plasmidial completo no NCBI.

Após seleção, os genomas dos três gêneros constituintes da tribo *Proteeae*: *Morganella* (*taxid:581*), *Proteus* (*taxid:583*) e *Providencia* (*taxid:586*), foram obtidos fazendo-se uma busca com o BLASTn (megablast) (ALTSCHUL *et al.*, 1997) contra o genoma completo de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Por fim, os links e os arquivos no formato *GenBank* de todos os genomas foram compilados em um banco de dados local.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES DE SIMILARIDADE E SINTENIAS

Após seleção dos genomas de interesse, as sequências incluídas no banco de dados local passaram por análise criteriosa. Para isso, foi realizado *upload* dos arquivos no formato *GenBank* no *software Islandviewer 4.0* (BERTELLI *et al.*, 2017) e cada plasmídeo passou por análise e seleção, sendo excluídos os que não apresentavam genes denominados e/ou organizações genômicas descritas e genoma plasmidial incompleto ou duplicado.

Posteriormente, os genes da ilha patogênica Tn4401 dos genomas de *K. pneumoniae* e *E. coli* e de suas regiões vizinhas foram localizados, categorizados e alinhados manualmente aos genes dos genomas da tribo *Proteeae*. Por fim, esses alinhamentos foram compilados em uma tabela, onde cada gene denominado foi destacado com uma cor distinta para facilitar a análise de similaridade, organização e sintenia das sequências em quadro aberto de leitura (ORFs), tendo o gene *blaKPC* do *transposon* como ponto central do alinhamento.

4.3 RELAÇÃO FILOGENÉTICA E ASSINATURA SELETIVA

As sequências FASTAS dos genes *blaKPC* dos genomas selecionados foram alinhados no *software* MEGA *version* 11 com o algoritmo de *ClustalW* (TAMURA; STECHER; KUMAR, 2021). A relação filogenética foi obtida utilizando o RNA ribossomal 16S dos isolados em questão. Os alinhamentos também foram checados visualmente. Em seguida, as mutações pontuais dos nucleotídeos e dos *códons* foram contabilizadas, analisadas e categorizadas em sinônimas ou não sinônimas, levando em conta as 12 classes de substituições de bases (YI *et al.*, 2021). A título de comparação das distâncias genéticas entre as populações, foi efetuado o cálculo da distância par-a-par Nei-Gojobori (NEI; GOJOBORI, 1986) entre as sequências FASTAS dos genes *blaKPC* dos *transposons*, utilizando-se, ainda, o *software* MEGA *version* 11.

Nessa abordagem é determinada a razão dN/dS ao longo das sequências, que são comparadas par-a-par em um alinhamento composto por *x* sequências de DNA de mesmo comprimento. Nesse método, dN e dS são estimados pela

contagem do número total de substituições sinônimas (S) e não-sinônimas (N) e pelo número de sítios potencialmente sinônimos (s) e potencialmente não-sinônimos (n). Estes valores são computados para cada *códon* sob a premissa de que as mudanças de nucleotídeos têm a mesma probabilidade (NEI; KUMAR, 2000). Assim, o número de substituições sinônimas foi calculado utilizando-se expressão:

$$dS = - (3/4 \cdot \ln[1 - (4/3) \cdot p_s])$$

E o número de substituições não sinônimas:

$$dN = - (3/4 \cdot \ln[1 - (4/3) \cdot p_n])$$

Onde p_s e p_n são as proporções das diferenças sinônimas e não sinônimas, respectivamente. Com isso, o valor de ω é obtido a partir das médias dos valores de dN e dS .

5 RESULTADOS

5.1 *TRANSPOSON* TN4401 EM *Klebsiella*, *Escherichia* E NA TRIBO *Proteeae*

Na literatura são descritas nove isoformas do *transposon* Tn4401. Contudo, dos 55 genomas resultantes de *E. coli* e dos 920 de *K. pneumoniae* após busca no NCBI, apenas sequências das isoformas Tn4401a, Tn4401b e Tn4401d foram encontradas. Foram elas, respectivamente: *K. pneumoniae*, isolado Kp512 (ID *GenBank* KT378596), de 9.919 pb; *K. pneumoniae*, Kp15 (KT378597), de 10.017 pb; e *K. pneumoniae*, Kp529-1 (JN974188), de 4.875 pb. Já para *E. coli* foi selecionado apenas o genoma plasmidial completo do isolado ESC53083 (CP070587), de 88.947 pb, pois a base de dados não fez distinção das isoformas do *transposon* em nenhum isolado do gênero.

A Tabela 1 demonstra, em números, a quantidade de espécies e genomas distintos resultantes, após Blastn, destacando os genomas incompletos que foram excluídos para cada isoforma encontrada. Ao todo, 28 isolados de *Morganella*, 50 de *Proteus* e 12 de *Providencia* retornaram do Blastn.

Tabela 1 - Retorno do Blastn de *Klebsiella* e *Escherichia* nos genomas da tribo *Proteeae*.

	Espécies Encontradas	Genomas Encontrados	Genomas Incompletos	Genomas Seleccionados
Tn4401a				
<i>Morganella</i>	1	8	0	8
<i>Proteus</i>	1	11	2	9
<i>Providencia</i>	2	2	1	1
Tn4401b				
<i>Morganella</i>	1	8	0	8
<i>Proteus</i>	1	11	2	9
<i>Providencia</i>	2	2	1	1
Tn4401d				
<i>Morganella</i>	1	12	0	12
<i>Proteus</i>	4	34	2	32
<i>Providencia</i>	2	11	1	10

Retorno do Blastn de *K. pneumoniae* e *E. coli* contra os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

Contudo, após passarem por análise criteriosa, foi visto que os isolados retornados do Blastn de Tn4401a e Tn4401b foram exatamente os mesmos para *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*. Além disso, estes mesmos genomas se encontravam repetidos após Blastn de Tn4401d. Devido a isso, e para incidir nos critérios de inclusão, e visando atender os objetivos do presente trabalho, dos genomas retornados, apenas 12 de *Morganella*, 32 de *Proteus* e 10 de *Providencia* foram escolhidos.

5.2 PADRÕES E VARIAÇÕES NO GENOMA E SINTENIAS

Os 54 genomas escolhidos, após *upload* no *software Islandviewer 4.0* e coleta dos respectivos links (Apêndice A), passaram por uma segunda etapa de análise criteriosa, seleção e exclusão. Além disso, conforme o recomendado, foram utilizados 5 isolados de cada um dos gêneros constituintes da tribo *Proteeae* para análise de regiões de similaridade e sintenias. Contudo, para o gênero *Providencia*, após *upload*, os genes de β -lactamase dos isolados R7K, N15-01091 e 30905 foram

descartados das análises pois o alinhamento das sequências apresentava muitas falhas e muitas regiões não homólogas, possivelmente porque haviam disponíveis isoformas diferentes do gene para os isolados em questão, resultando apenas em duas espécies que se adequaram aos critérios de inclusão.

A Tabela 2 mostra as características genéticas de cada isolado selecionado nos três gêneros da tribo. Com relação aos genomas de *K. pneumoniae* (KP15) e *E. coli* (ESC53083), apresentaram 10.017 e 88.947 pares de base, tendo o *transposon* entre as bases 59 e 9.658 e 3.650 e 13.150, com tamanho de 9,6 kb e 9,5 kb, respectivamente.

Tabela 2 - Características genéticas dos isolados selecionados.

Isolado	Pares de Base Total	Tn4401 localização	Tn4401 tamanho
		<i>M. morganii</i>	
Mmo-37590cz	30.051	5.086 - 14.586	9,5 kb
MM46903	54.351	17.281 - 26.781	9,5 kb
MM48659	62.326	17.281 - 26.263	8,98 kb
GN28	46.123	9.216 - 17.178	7,96 kb
AR_0133	71.304	49.121 - 51.577 e 54.181 - 56.631	2,45 kb
<i>P. mirabilis</i>			
PM52808	88.945	63.341 - 72.841	9,5 kb
PM52260	88.945	2.875 - 12.375	9,5 kb
GN2	46.320	9.216 - 17.178	7,96 kb
AR_0155	214.441	184.321 - 186.681	2,36 kb
AR_0156	180.262	72.174 - 74.624	2,45 kb
<i>P. stuartii</i>			
2021EL-01138	28.470	18.762 - 28.293	9,82 kb

Já em relação aos padrões, variações e sintenias, todos os 11 isolados da tribo *Proteeae* partilhavam plasmídeos de estrutura semelhante transportando o *transposon* Tn4401. Esses EGM demonstraram 98,11% a 100% de similaridade entre si (Apêndice A). Nas figuras a seguir estão dispostas parte da estrutura dos plasmídeos dos isolados de *M. morganii* (Figura 3), *P. mirabilis* (Figura 4), *K. pneumoniae*, *E. coli* e *P. stuartii* (Figura 5), destacando a sintenia do *transposon* Tn4401 e suas regiões vizinhas.

Em um dos isolados de *M. morganii* (AR_0133), se encontrava duas cópias de Tn4401, invertidas, contendo cada uma o gene *blaKPC*, sendo um deles mais relacionado geneticamente com *Providencia*, e o outro, com *K. pneumoniae* (Figura 3). Dois isolados de *P. mirabilis* (AR_0155 e AR_0156) abrigavam, como demonstrado na Figura 4, genes da ilha de resistência ao Mercúrio (Hg) a uma distância de 4.537 pb da ilha de patogenicidade Tn4401 e, nos três gêneros, genes relacionados à resistência a Sulfonamida e Cromato se encontravam adjacentes ao *transposon* (Figuras 3 a 5).

ParA		Tn3 transposase	RepA	IS6100
ParB	Tn3 transposase	recombinase	endonuclease	Tn3 transposase
ParC	recombinase	AAC(6')-Ib	ParA	resolvase
ParA	AAC(6')-Ib	transferase	RepB	Tn5403
RepA	IS26	IS26	KlcA	Tn3 transposase
tnpA	ISK _{pn6}	ISK _{pn6}	KorC	ISK _{pn6}
<i>blaKPC-2</i>	<i>blaKPC-2</i>	<i>blaKPC-2</i>	<i>blaKPC-2</i>	<i>blaKPC-2</i>
istA	<u>istB</u>	<u>istB</u>	tnpA	IS21
<u>istB</u>	istA	istA	tnpR	ATPase
tnpA	tnpA	tnpA	tnpA	<i>blaKPC-2</i>
tnpR	tnpR	tnpR	tnpR	ISK _{pn6}
MphA	IS26	IS26	pex2	Tn3 transposase
Mrx	MphA	MphA	hns	Tn5403
MphR	MFS transporter	MFS transporter	GN28	resolvase
tnpA	TetR/AcrR	TetR/AcrR		IS6100
chrA		AR_0133
sul1	chrA	chrA		
...	sul1	sul1		
tnpA	MM46903	MM46903		

MMO-37590CZ

Figura 3 - Sintenia e regiões vizinhas do *transposon* Tn4401 nos cinco isolados de *M. morganii*. Em cinza se encontra o gene representante da resistência a Sulfonamida (sul1) e Cromato (chrA).

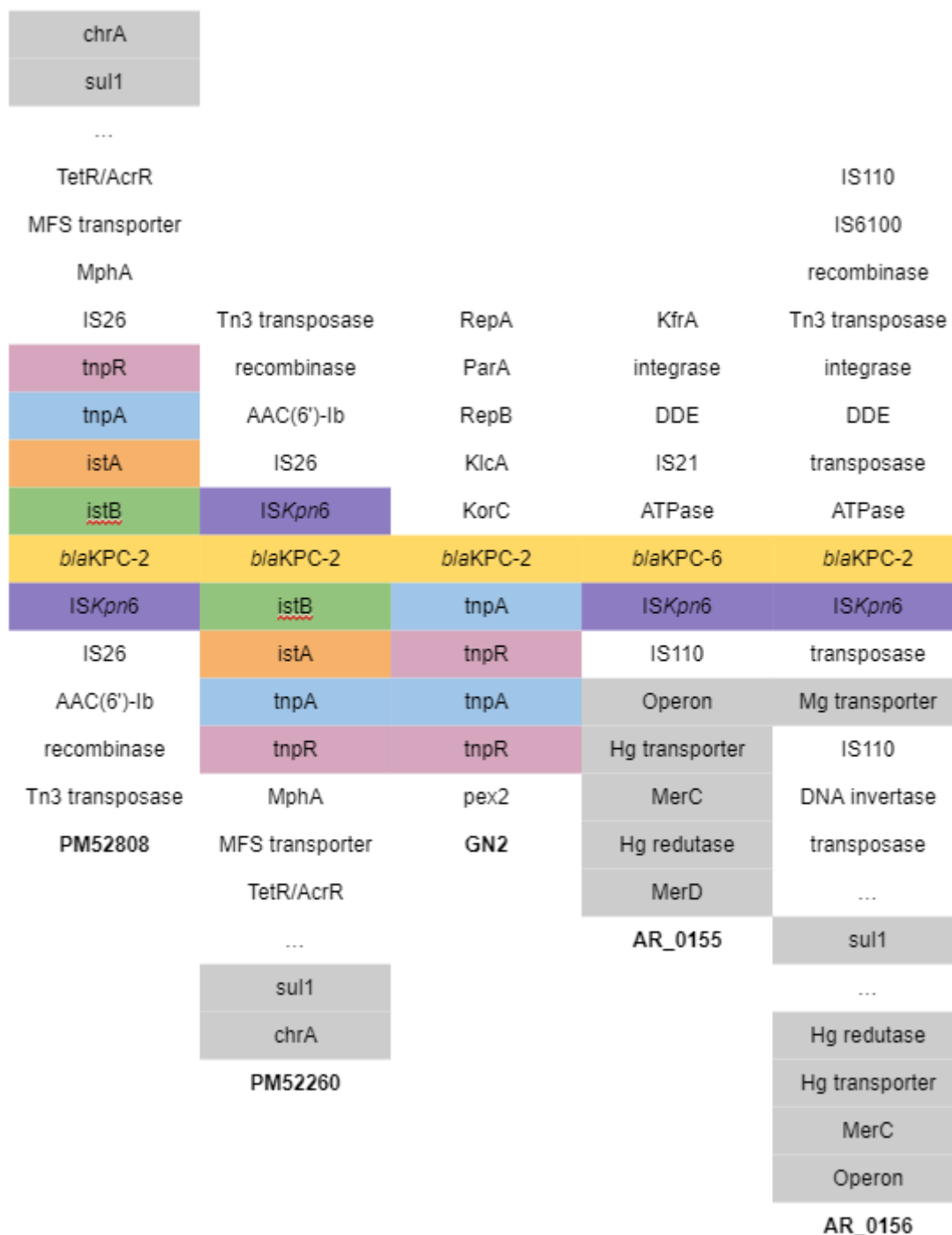


Figura 4 - Sintenia e regiões vizinhas do *transposon* Tn4401 nos cinco isolados de *P. mirabilis*. Em cinza se encontra o gene representante da resistência a Mercúrio, Sulfonamida (sul1) e Cromato (chrA).

Em conformidade com a organização genômica do Tn4401, transportado pelo plasmídeo de *K. pneumoniae* (Kp512) e *E. coli* (ESC53083), os plasmídeos da tribo não apresentaram estruturas idênticas aos transportados pelos dois gêneros, estando invertido em um isolado de *Morganella* (MMO-37590CZ), e apresentando

deleções nas demais espécies da tribo. Além disso, contudo, o *transposon* de *M. morgani* (GN28) apresentou organização genômica idêntica - incluindo local de ancoragem e ausência das sequências de inserção ISKpn6 e ISKpn7 - ao *transposon* de *P. mirabilis* (GN2), como estruturado na Figura 4.

Especificamente em relação à sua composição, os elementos comuns a todos os isolados analisados foram o próprio gene codificante da β -lactamase - apesar de ter sido observada diferentes isoformas -, a transposase tnpA, a resolvase tnpR e ISKpn7. Os menos comuns, foram os genes istA e istB, tendo a isoforma do gene *blaKPC-6* exclusivo de *P. mirabilis* (AR_0155). Em geral, as estruturas dos plasmídeos que transportavam uma das três isoformas do *transposon*, apresentaram deleções, inversões, duplicações e mobilidade de grupos gênicos vizinhos, ora semelhantes, ora diferentes.

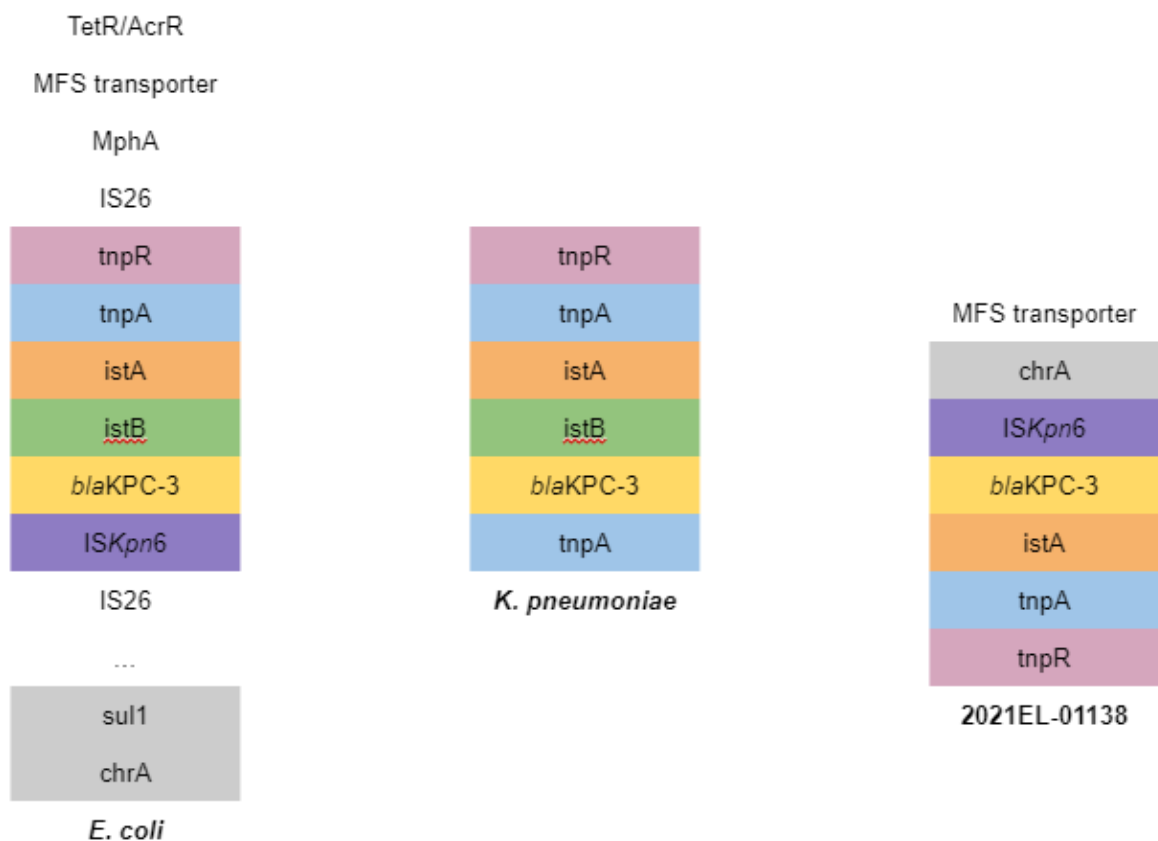


Figura 5 - Sintonia e regiões vizinhas do *transposon* Tn4401 nos isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Providencia*. Em cinza se encontra o gene representante da resistência a Sulfonamida (sul1) e Cromato (chrA).

Com relação especificamente ao gene *blaKPC*, foi encontrado as isoformas *blaKPC-2*, *blaKPC-3* e *blaKPC-6* integrando os EGM numa proporção de 10:3:1.

Esse gene apresentou o padrão de 882 pb (293 aa.) nos isolados analisados. Em relação ao conteúdo guanina-citosina (GC), *Proteus* foi o único gênero no qual as proporções de guanina nos isolados variaram (G = 30,5 e 30,6), mas a de citosina permaneceu inalterada, assim como nos demais gêneros, no qual a proporção de citosina se manteve em 30,8 e a de guanina em 30,5.

5.5 RELAÇÃO FILOGENÉTICA E ASSINATURA SELETIVA

A Figura 6 destaca a relação filogenética entre os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia* e os gêneros da tribo *Proteeae*. *Proteus* e *Morganella* são mais relacionados entre si, assim como *Klebsiella* e *Escherichia*; e, esses quatro gêneros, são mais relacionados entre si do que com *Providencia*.

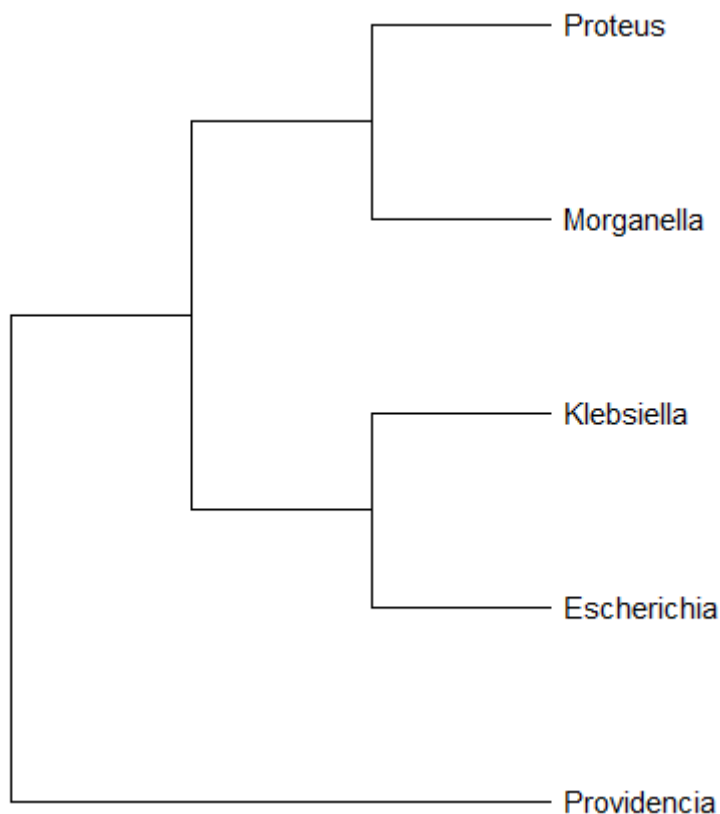


Figura 6 - Relação filogenética entre os gêneros *Klebsiella*, *Escherichia* e os gêneros da tribo *Proteeae*.

Das 12 classes de substituições de bases, a transição T→C foi dominante no catálogo de mutações (84,6%). Curiosamente, foi visto assimetria substancial nas

mudanças de base. Por exemplo, a taxa de transição T→C foi muito maior do que a de sua substituição reversa C→T (84,6% vs. 7,7%, respectivamente). Contudo, a taxa de transição T→G foi 7,7% mas a de substituição G→T não foi detectada.

Com relação às mutações nas trincas de nucleotídeos, 92,30% foram substituições não sinônimas, havendo troca de tirosina por histidina e de valina por glicina numa taxa de 11:1. A distância genética par-a-par média de todos os isolados analisados não chegou a 0,001, com valor mínimo de 0 e máximo de 0,002. A Tabela 3 demonstra os valores dessas distâncias.

Tabela 3 - Valores de distância genética par-a-par ($\times 10^{-3}$), baseado no modelo de Nei-Gojobori, dentro dos isolados analisados.

$\times 10^{-3}$	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
2	0											
3	0	0										
4	1,13	1,13	1,13									
5	0	0	0	1,13								
6	0	0	0	1,13	0							
7	0	0	0	1,13	0	0						
8	0	0	0	1,13	0	0	0					
9	0	0	0	1,13	0	0	0	0				
10	0	0	0	1,13	0	0	0	0	0			
11	1,13	1,13	1,13	2,27	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13		
12	1,13	1,13	1,13	2,27	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	0	
13	1,13	1,13	1,13	2,27	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	1,13	0	0

Os isolados analisados foram denominados por números, sendo, em ordem crescente, do 1 ao 13: 1 - *P. mirabilis* (PM52808), 2 - *P. mirabilis* (PM52260), 3 - *P. mirabilis* (GN2), 4 - *P. mirabilis* (AR_0155), 5 - *P. mirabilis* (AR_0156), 6 - *M. morgani* (Mmo-37590cz), 7 - *M. morgani* (MM46903), 8 - *M. morgani* (MM48659), 9 - *M. morgani* (GN28), 10 - *M. morgani* (AR_0133), 11 - *P. stuartii* (2021EL-01138), 12 - *K. pneumoniae* (Kp15) e 13 - *E. coli* (ESC53083).

6 DISCUSSÃO

A instabilidade do genoma poderia não ser deletéria? De acordo com T.H. Morgan, um dos fundadores da genética moderna, seria impossível. A priori, a

instabilidade genômica geraria uma maior taxa de mutações, gerando organismos mutantes que, conseqüentemente, os de maior valor adaptativo passaram pelo crivo da seleção natural. O genoma possui diferentes mecanismos de proteção contra processos que o torne vulnerável a mudanças, garantindo sua hereditariedade. Contudo, parte dele é instável, conferindo às populações numerosas a capacidade de se adaptarem mais rapidamente a situações críticas.

Há um profundo consenso na comunidade científica que, apesar de sua natureza instável, os TEs geram inovações que propiciam a plasticidade necessária para evolução estrutural e funcional dos genomas. Nesse contexto, embora alguns isolados bacterianos bem-sucedidos possam disseminar a resistência verticalmente (por exemplo, *K. pneumoniae* pertencente a CC258, carregando Tn4401/*blaKPC*), a HGT, para as bactérias em específico, mais especificamente dos genes de β -lactamase, através de EGM, como *transposons*, desempenha fundamental papel durante processo de aquisição de resistência aos carbapenêmicos e no surgimento de isolados multirresistentes (DUIN; DOI, 2017; ANGELIS *et al.*, 2020).

Por ser atribuída a alta expressão de carbapenemases e β -lactamases, enzimas responsáveis por conferir resistência *K. pneumoniae* e *E. coli*, adquiridas através de TEs, são codificadas por genes *blaKPC* de plasmídeos (ADLER *et al.*, 2016; TIJET *et al.*, 2016; BONNIN *et al.*, 2020; REYES, 2020; DAVID *et al.*, 2020). Assim, independente de uma composição com maior número de unidades gênicas nos diferentes *transposon* Tn4401 observados (Tabela 2), a unidade para codificar β -lactamase encontrava-se presente nos diferentes isolados estudados (Figura 4 a 6).

Como as *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC são vistas em números crescentes em todo o mundo, entender a expressão do gene codificante de β -lactamase e seu efeito sobre o grau de resistência aos carbapenêmicos associados, pode ter conseqüências clínicas significativas. Dentro da família *Enterobacteriaceae*, a tribo *Proteeae* possui resistência intrínseca a determinados carbapenêmicos. Entretanto, ainda são raros os estudos de análise genômica comparativa com *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Na literatura são descritas nove isoformas do *transposon* Tn4401, caracterizadas principalmente por deleções. *Transposon*, este, como mostrado na

Figura 1, composto por duas *tnpA*, uma *tnpR*, duas sequências de inserção, *ISKpn6* e *ISKpn7* - delimitadas por duas IRs imperfeitas de 39 pb -, o gene *blaKPC* e os genes *istA* e *istB* (AIRES, 2017). Contudo, foi observado que as isoformas Tn4401a e Tn4401b são as mais difundidas (YOON *et al.*, 2018). Algo corroborado pelos resultados deste trabalho, demonstrado na Tabela 2, nos quais a maioria dos isolados analisados continham uma das duas isoformas acima mencionadas, além do Tn4401d (Figura 2).

Dos 54 genomas selecionados (Apêndice A), apenas cinco de *M. morganii*, cinco de *P. mirabilis* e um de *P. stuartii* foram os representantes de cada gênero (Tabela 2). Foi verificado que em nenhum dos genomas plasmidiais estudados o *transposon* Tn4401 apresentou todas as unidades gênicas das sequências correspondentes de *K. pneumoniae* (Kp15, Kp512, Kp529-1). A ordem foi a detecção de deleções de sequências assessoras, como *ISKpn7*, ausente em 57,14% dos genomas analisados, e a transposase (*tnpA*) e os genes *istA* e *istB*, ausentes em 20% das espécies de *Morganella*, 40% de *Proteus* e 50% de *Providencia*.

Duplicações e inversões também foram vistas e, em *M. morganii*, isolado AR_0133, o gene *blaKPC-2* se encontrava duplicado e invertido, numa distância de 2.604 pb um do outro (Figura 3), o que pode alterar a expressividade de β -lactamase no isolado em questão.

Em relação à composição do *transposon*, os elementos constituintes comuns a todos os isolados analisados foram o próprio gene codificante da β -lactamase - no qual três isoformas foram vistas, sendo elas *blaKPC-2*, *blaKPC-3* e *blaKPC-6* -, transposase *tnpA*, resolvase *tnpR* e *ISKpn7*. Os menos comuns, foram os genes *istA* e *istB*, tendo o gene *blaKPC-6* exclusivo de *P. mirabilis* (AR_0155).

Foi detectada a possível relação entre a ilha patogênica Tn4401 e a ilha de resistência a Hg no gênero *Proteus* (Figura 4). As duas ilhas se encontravam à distância de 4.537 pb na espécie *P. mirabilis*, isolados AR_0156 e AR_0155. Além disso, há uma possível relação com a ilha de resistência a Sulfonamida e Cromato, localizada adjacente ao *transposon* nos três gêneros da tribo.

Na literatura, até a atualidade, apenas um trabalho relaciona o gênero *Morganella* com o *transposon* Tn4401. Este estudo, no qual revelou novos plasmídeos transportando Tn4401a (IncN+R e ColRNAI), concluiu que a

transposição interplasmídica e a mobilização de plasmídeos portadores de Tn4401a contribuíram para a aquisição de *blaKPC-2* em isolados de *M. morganii*. Além disso, foi visto que o local de inserção do *transposon* variou (SUGITA *et al.*, 2021). Essa mobilidade pode ser também parte da história evolutiva dos isolados de *Proteus* (GN2, AR_0155, AR_0156), *Providencia* (2021EL-01138) e *Morganella* (GN28, AR_0133, Mmo-37590cz) estudados.

Com relação ao gênero *Proteus*, nenhum artigo foi publicado até o momento analisando a relação entre a patogenicidade do gênero e a HGT através do *transposon* Tn4401. Já ao gênero *Providencia*, há dois artigos; um de 2020, demonstrando a presença da isoforma “b” e “d” em *P. stuartii* (REYES, 2020); e um de 2015, demonstrando claramente a disseminação de *blaKPC-2* para espécies da tribo *Proteeae* nos Estados brasileiros, como *P. stuartii*, através do *transposon* Tn4401 (TAVARES *et al.*, 2015).

A detecção de padrões moleculares da evolução pela deriva genética e seleção natural é comumente observado pelas substituições de nucleotídeos no genoma e de aminoácidos nas proteínas (YANG, 2014). O termo substituição é constantemente utilizado para referenciar uma modificação evolutiva. Substituições evolutivas são estudadas pela comparação intra e inter populações de espécies. No caso deste trabalho, foram comparadas as substituições nucleotídicas dos genes codificantes de β -lactamase nos gêneros da tribo *Proteeae* em relação ao de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

De acordo com os resultados dos genomas estudados, a seleção purificadora foi absoluta (Tabela 3), atuante na redução da frequência ou mesmo eliminação de mutações deletérias das populações. Isso indica que, mesmo com toda a variação típica de uma área de alta mobilidade, mutações e inversões podendo facilitar um maior número de substituições não sinônimas, as trocas sinônimas foram neutras, não havendo evidência de que a seleção natural possa estar guiando a troca de aminoácidos. Mesmo que tenham sido observadas trocas nucleotídicas pontuais não sinônimas, evidenciou-se o valor adaptativo, a seleção natural e a deriva na manutenção dos genes codificantes de β -lactamase nos gêneros da tribo.

Sistematizando o vírus *Sars-cov-2*, um estudo recente de análise evolutiva utilizou o cálculo da razão ω : uma maneira simples de avaliar a pressão evolutiva

nas sequências de codificação de proteínas, pois, em princípio, pode revelar tanto a magnitude quanto a direção da seleção em variantes não sinônimas (Yi *et al.*, 2021). Este estudo demonstrou que esse cálculo é um importante, até a atualidade, modelo matemático de aferição da seleção natural para qualquer organismo, seja vírus, bactérias, vertebrados ou não, vegetais ou fungos.

Por outro lado, os testes baseados em ω necessitam de múltiplas substituições para que ω possa ser significativamente maior que 1: esse critério é bastante rigoroso. Partindo da premissa de que a maior parte das mutações não sinônimas são deletérias, como mencionado por Bitarello (2011), esse “critério não é atendido muitas vezes, quando genes inteiros são analisados”. Isso ocorre porque geralmente alguns *códons* estão sob seleção positiva, enquanto a maior parte das mutações não sinônimas são deletérias e, portanto, estão sob seleção purificadora.

Um fato relevante para estas análises é que muitos isolados apresentaram mais de uma isoforma do gene no banco de dados. Embora foi adotado uma abordagem conservadora onde a isoforma com o padrão mais semelhante à de *K. pneumoniae* (Kp15) e *E. coli* (ESC53083) foi utilizada nas análises, nem sempre as isoformas estavam descritas ou eram semelhantes e, quando isso ocorria, o isolado com a isoforma muito diferente das demais não era considerada. Isso também levou as análises a terem um número de isolados ainda menor, como no caso do gênero *Providencia*. Ainda que tenha sido utilizado o número mínimo recomendado, a pequena quantidade de isolados analisados pode ter sido um fator limitante.

Em resumo, uma considerável parte das enzimas responsáveis pela RB são adquiridas, codificadas por genes contidos em EGM, localizados em plasmídeos. Estudos de caracterização molecular comprovam o *transposon* altamente móvel Tn4401 como o EGM responsável pela dispersão de *blaKPC*. Foi estudado que o *transposon* da tribo *Proteeae* possui estruturas, em sua maioria, distintas, apresentando deleções, inversões, duplicações e mobilidades de grupos gênicos vizinhos, ora semelhantes, ora diferentes. Além disso, estudou-se uma possível relação entre essa ilha patogênica e a ilha de resistência a Hg, a Sulfonamida e Cromato. Relação, essa, não mencionada na literatura até a conclusão da escrita deste estudo, confirmando o quão importante é aprofundar e seguir estudos com esses genes e ilhas genômicas.

Diante do exposto, e como mencionado por Angelis *et al.* (2020), verifica-se que a HGT de β -lactamase através de EGM, como o *transposon* Tn4401, desempenha um papel importante na disseminação de genes de resistência a β -lactâmicos dentro de *Enterobacteriaceae*. Apesar de configurar uma das principais ameaças à saúde mundial e um desafio emergente para a comunidade científica, para estes microrganismos, a disseminação desses genes é imprescindível, pois, como mencionado por Pontes *et al.* (2018), a resistência aos antimicrobianos permite a bactéria sobreviver e replicar na presença de medicamentos que atuam para inibir ou matá-las.

7 CONCLUSÃO

Diferentes isoformas de Tn4401 foram reveladas nos isolados da tribo *Proteeae*, contendo o altamente patogênico *blaKPC*. As isoformas contidas nos plasmídeos dos gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia* se encontravam incompletas, tendo os genes e as sequências de inserção internos com distintos padrões de similaridade na sintonia gênica, resultado de deleções, inversões, duplicações e mobilidade de grupos gênicos vizinhos.

Em relação à composição do *transposon* e suas unidades gênicas comuns, o gene codificante da β -lactamase apareceu como regra nas três isoformas: *blaKPC-2*, *blaKPC-3* e *blaKPC-6*. Já a transposase *tnpA*, resolvase *tnpR* e *ISKpn7* geralmente estavam presentes. Enquanto os genes *istA* e *istB* foram mais raros, o gene *blaKPC-6* foi exclusivo de *P. mirabilis* (AR_0155).

A seleção purificadora predominou na região codificadora do gene *blaKPC* nos três gêneros analisados. Indicando uma redução da frequência ou mesmo eliminação de mutações deletérias nas sequências de aminoácidos da β -lactamase.

Foi detectada uma tendência, até então desconhecida, dos genomas da tribo *Proteeae* ter como vizinhos dos variantes do elemento Tn4401 as ilhas de resistência a Mercúrio, Sulfonamida e Cromato.

REFERÊNCIAS

ADLER, A. *et al.* Dissemination of the blaKPC gene by clonal spread and horizontal gene transfer: comparative study of incidence and molecular mechanisms. **The Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 8, p. 2143-2146, 2016.

AIRES, C. A. M. **Caracterização fenotípica e molecular de isolados de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes oriundos de swab retal de vigilância de hospitais de diferentes estados brasileiros**. 2017. 138 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 17, p. 3389-3402, 1997. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.

ALVIM, M. Campeã de infecções, bactéria multirresistente é detectada agora fora de hospitais no Brasil. **BBC News**, São Paulo, 25 ago. 2019. Disponível em: <https://www.bbc.com/portuguese/geral-49429481>. Acesso em: 04 mai. 2022.

ANGELIS, G. *et al.* Molecular mechanisms, epidemiology, and clinical importance of β -lactam resistance in enterobacteriaceae. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 14, p. 5090, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21145090>.

ANSARI, M.; MUNIR, T.; SAAD, N. Phenotypic identification, frequency distribution and antibiogram of carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in clinical isolates. **J Coll Physicians Surg Pak**, v. 28, n. 4, p. 274-278, 2018.

ANTUNES, L. L. **Detecção de genes para carbapenemase em isolados de *Aeromonas spp.* recuperados de amostras de esgoto no Distrito Federal**. 2019. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Farmácia) - Universidade de Brasília, Brasília.

ASSUNÇÃO, L. K. L. *et al.* Aspectos que contribuem para disseminação e transmissão da multirresistência bacteriana. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**. v. 4, n. 11, p. 21-32, nov. 2020. ISSN: 2448-0959. Disponível em: <https://www.nucleodoconhecimento.com.br/saude/disseminacao-e-transmissao>. Acesso em: 05 mai. 2022.

BÁNKI, O. *et al.* Catalogue of Life Checklist Version: 2022-04-26. **Catalogue of Life**, 26 abr. 2022. DOI: <https://doi.org/10.48580/dfpk>. Disponível em: <https://www.catalogueoflife.org/>. Acesso em: 04 mai. 2022.

BELTRÃO, E. M. B. **Caracterização de grupos de incompatibilidade plasmidial e ambiente genético de blaKPC-2, blaSCO-1, sul2 e aph (3')-Vli em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes***. 2017. 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

BERTELLI, C. *et al.* IslandViewer 4: expanded prediction of genomic islands for larger-scale datasets. **Nucleic acids research**, v. 45, n. W1, p. W30-W35, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkx343>.

BITARELLO, B. D. **Seleção natural em genes HLA: uma investigação da localização molecular e temporal dos eventos de seleção**. 2011. 43 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo.

BONNIN, R. A. *et al.* Emergence of new non-clonal group 258 high-risk clones among *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates, France. **Emerging infectious diseases**, v. 26, n. 6, p. 1212, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2606.191517>.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº 22: avaliação nacional dos indicadores de IRAS e RM - 2019**. Singapura: IRAS, 2019. Disponível em: <https://app.powerbi.com/view?r=eyJrljoiZjQ5ZDhjZmEtNDdhOC00MDk3LWFiNDEtNzg0MmE4MmE2MjhlIiwidCI6ImI2N2FmMjNmLWZjZjMtNGQzNS04MGM3LWI3MDg1ZjVIZGQ4MSJ9&pageName=ReportSectionac5c0437dbe709793b4b>. Acesso em: 19 out 2021.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Prevenção de infecções por microrganismos multirresistentes em serviços de saúde - Série Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Brasília: Anvisa, 2021. 103p. Disponível em: <https://pncq.org.br/wp-content/uploads/2021/03/manual-prevencao-de-multirresistentes7.pdf>. Acesso em: 03 mai 2022.

BRYANT, K. A. *et al.* KPC-4 is encoded within a truncated Tn4401 in an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 37-41, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01062-12>.

BULLA, L. M. C., POLONIO, J. C., BREDOW, C., SACCO, *et al.* (2014). ELEMENTOS TRANSPONÍVEIS MICROBIANOS E A ETIQUETAGEM GÊNICA. *Uningá Review Journal*, 18(2).

BULLA, L. M. C. *et al.* Elementos transponíveis microbianos e a etiquetagem gênica. **Uningá Review Journal**, v. 18, n. 2, mai. 2014. Disponível em: <http://revista.uninga.br/index.php/uningareviews/article/view/1507>. Acesso em: 04 mai. 2022.

CARARETO, C. M. A.; MONTEIRO-VITORELLO, C. B.; VAN SLUYS, M. (Ed.). **Elementos de transposição: diversidade, evolução, aplicações e impacto nos genomas dos seres vivos**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2015. 196 p. ISBN: 978-85-7541-567-2.

CHEN, L. *et al.* Partial excision of blaKPC from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 1635-1638, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.06182-11>.

CHÉNAIS, B. *et al.* The impact of transposable elements on eukaryotic genomes: From genome size increase to genetic adaptation to stressful environments. **Gene**, v. 509, n. 1, p. 7-15, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gene.2012.07.042>.

CHERUVANKY, A. *et al.* Enhanced *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase expression from a novel Tn4401 deletion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 61, n. 6, p. e00025-17, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00025-17>.

CHOI, W.; JI, Y. S.; YOON, K. C. A case of bilateral keratitis caused by *Providencia alcalifaciens*: a rarely encountered ocular pathogen. **International Ophthalmology**, v. 38, n. 3, p. 1325-1328, 2018.

COURA, J. R. **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. 2. ed. Guanabara: Guanabara Koogan, 2013. 2080 p.

DAVID, S. *et al.* Integrated chromosomal and plasmid sequence analyses reveal diverse modes of carbapenemase gene spread among *Klebsiella pneumoniae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 40, p. 25043-25054, sep. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2003407117>.

DIEKEMA, D. J. *et al.* The microbiology of bloodstream infection: 20-year trends from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 7, p. e00355-19, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.00355-19>.

DUIN, V. D.; DOI, Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Virulence**, v. 8, n. 4, p. 460-469, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1222343>.

FRIEDBERG, E. C. *et al.* (Ed.). **DNA repair and mutagenesis**. 2. ed. Washington: American Society for Microbiology Press, 2006. 1118 p.

GUIMARÃES, D. O. MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300035>.

HARRIS, P. N. A. *et al.* Effect of piperacillin-tazobactam vs meropenem on 30-day mortality for patients with *E. coli* or *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection and ceftriaxone resistance: a randomized clinical trial. **Jama**, v. 320, n. 10, p. 984-994, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.12163>.

JUNIOR, C. F. **Caracterização de cepas de Enterobacteriaceae resistentes a carbapenens isoladas no Distrito Federal**. 2014. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Microbiana) - Universidade de Brasília, Brasília.

KOHLMANN, R.; BÄHR, T.; GATERMANN, S. G. Species-specific mutation rates for ampC derepression in *Enterobacteriales* with chromosomally encoded inducible AmpC β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, n. 6, p. 1530-1536, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dky084>.

KOLPA, M. *et al.* Incidence, microbiological profile and risk factors of healthcare-associated infections in intensive care units: a 10 year observation in a provincial hospital in Southern Poland. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 15, n. 1, p. 112, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijerph15010112>.

LEVINSON, W. **Microbiologia médica e imunologia**. 13. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2016. 800 p.

LOGAN, L. K.; WEINSTEIN, R. A. The epidemiology of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: the impact and evolution of a global menace. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 215, n. suppl_1, p. S28-S36, fev. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw282>.

MACEDO, G. L.; FALCÃO, L. F. R. **Farmacologia aplicada em medicina intensiva**. 1. ed. São Paulo: Editora Roca, 2011. 560 p.

MACEDO JÚNIOR, A. M. Multirresistência bacteriana e a consequência do uso irracional dos antibióticos. **Scire Salutis**, v. 9, n. 2, p. 1-8, 2019. DOI: <https://doi.org/10.6008/CBPC2236-9600.2019.002.0001>.

MAGIORAKOS, A. P. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

MARTINEZ, T. *et al.* Genetic environment of the KPC gene in *Acinetobacter baumannii* ST2 clone from Puerto Rico and genomic insights into its drug resistance. **Journal of medical microbiology**, v. 65, n. 8, p. 784, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000289>.

MATARACI-KARA, E.; YILMAZ, M.; ÖZBEK-ÇELİK, B. In vitro synergistic effect and mutant prevention concentrations of cefepime alone or in combination with sulbactam against OXA-48-positive *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Current Microbiology**, v. 77, n. 9, p. 2137-2142, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02094-0>.

MATIOLI, S. R.; FERNANDES, F. M. C. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. 2. ed. São Paulo: Holos, 2012. 256 p.

MCCLINTOCK, B. Controlling elements and the gene. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 21, p. 197-216, 1956.

MMATLI, M. *et al.* Emerging transcriptional and genomic mechanisms mediating carbapenem and polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*: a systematic review of current reports. **MSystems**, v. 5, n. 6, p. e00783-20, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSystems.00783-20>.

MORGAN, H. R. Report XCV. Upon the bacteriology of the summer diarrhoea of infants. **British Medical Journal**, v. 1, n. 2364, p. 908, 1906. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.1.2364.908>.

NAAS, T. *et al.* Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla KPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01451-07>.

NEI, M.; GOJOBORI, T. Simple methods for estimating the numbers of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. **Mol Biol Evol**, v. 3, p. 418-426, 1986.

NEI, M; KUMAR, S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. New York: Oxford University Press, 2000. 350 p.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Antimicrobial resistance**. Genebra: World Health Organization, 2021. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>. Acesso em: 19 out 2021.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Genebra: World Health Organization, 2017. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/global-prioritylist-antibiotic-resistant-bacteria/en/>. Acesso em: 19 out 2021.

PAULA, A. C. L. **Estrutura da comunidade bacteriana, resistoma clínico e ocorrência de integrons no metagenoma obtido de queijos Minas Frescal industrializados**. 2018. 101 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora.

PONTES, D. S. *et al.* Genetic Mechanisms of Antibiotic Resistance and the Role of Antibiotic Adjuvants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 18, p. 42-74, 2018.

RAHMAN, S. *et al.* Weak selection on synonymous codons substantially inflates dN/dS estimates in bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 118, n. 20, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2023575118>.

RAHN, O. T. T. O. New principles for the classification of bacteria. **Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg**, v. 96, n. 273, p. 86, 1937.

REYES, J. A. *et al.* Mobile genetic elements associated with carbapenemase genes in South American *Enterobacterales*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 24, n. 3, p. 231-238, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2020.03.002>.

RIBEIRO, M.; CORTINA, M. Clinical importance bacteria and resistance mechanisms in of Healthcare Associated Infections (HAIs). **Rev Científica UMC**, v. 1, n. 1, p. 1-12, 2016.

RODRÍGUEZ-ROJAS, A. *et al.* Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 303, n. 6-7, p. 293-297, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.004>.

RUS, M. *et al.* Distribution of NDM1 carbapenemase-producing proteeae strains on high-risk hospital wards. **Infection and Drug Resistance**, v. 13, p. 4751, 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/IDR.S280977>.

SANTOS, A. L. **Perfil fenotípico e genotípico de enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos**. 2018. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

SHIMA, A. *et al.* Prevalence of Providencia strains among patients with diarrhea and retail meats in Thailand. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 69, p. 323-325, 2015. DOI: <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2015.224>.

SILVA, M. D. D. **Uso racional de antibióticos integrado à educação em saúde: divulgando o uso racional de antimicrobianos**. 2021. 34 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Farmácia) - Universidade de Uberaba, Uberaba.

SUGITA, K. *et al.* Molecular analysis of blaKPC-2-harboring plasmids: Tn4401a interplasmid transposition and Tn4401a-carrying ColRNAI plasmid mobilization from *Klebsiella pneumoniae* to *Citrobacter europaeus* and *Morganella morganii* in a single patient. **Msphere**, v. 6, n. 6, p. e00850-21, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00850-21>.

TAMURA, K.; STECHER, G.; KUMAR, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**, v. 38, n. 7, p. 3022-3027, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

TAVARES, C. P. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 82, n. 4, p. 326-330, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2015.04.002>.

TIJET, N. *et al.* Lateral dissemination and inter-patient transmission of blaKPC-3: role of a conjugative plasmid in spreading carbapenem resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 2, p. 344-347, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkv356>.

VAN BENTUM, R. *et al.* Native aortic valve endocarditis with *Morganella morganii* in a patient with multiple myeloma and valvular amyloidosis: a case report. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 957, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4511-4>.

XIANG, G. *et al.* Clinical Molecular and Genomic Epidemiology of *Morganella morganii* in China. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 744291, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.744291>.

YANG, Z. **Evolução molecular: uma abordagem estatística**. Oxford: Oxford University Press, 2014.

YATSUNENKO, T. *et al.* Human gut microbiome viewed across age and geography. **Nature**, v. 486, n. 7402, p. 222-227, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature11053>.

YI, K. *et al.* Mutational spectrum of SARS-CoV-2 during the global pandemic. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 53, n. 8, p. 1229-1237, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s12276-021-00658-z>.

YOON, E. *et al.* *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers in South Korea between 2013 and 2015. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 56, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00056>.

YU, X. *et al.* Genetic diversity of the O antigens of *Proteus* species and the development of a suspension array for molecular serotyping. **PloS One**, v. 12, n. 8, p. e0183267, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0183267>.

ZAHA, A. *et al.* **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: ARTMED, 2014.

ZHANG, B.; PAN, F.; ZHU, K. Bilateral *Morganella morganii* keratitis in a patient with facial topical corticosteroid-induced rosacea-like dermatitis: a case report. **BMC ophthalmology**, v. 17, n. 1, p. 106, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12886-017-0504-5>.

**APÊNDICE A - BLASTN DAS ISOFORMAS DO TN4401 CONTIDA NO
PLASMÍDEO DE *K. pneumoniae* KP512 CONTRA OS GÊNEROS *Morganella*,
Proteus E *Providencia***

Nas tabelas a seguir constam os isolados retornados, e seus respectivos *links* no NCBI e no *Islandviewer 4.0*, do Megablast das isoformas Tn4401a, Tn4401b e Tn4401d contidas no plasmídeo de *K. pneumoniae* (Kp512, Kp15 e Kp529-1, respectivamente) contra os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

Tabela 1 - Megablast da isoforma Tn4401a em *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

ID <i>GenBank</i>	Tn4401a			
	Isolado	Plasmídeo	Pares de base	Similaridade (%)
<i>Morganella</i>				
MF497782.1	MMO-37590cz	pMMO-37590cz	30.051	99,98
CP070521.1	MM46903	p46903-KPC	54.351	99,98
CP070535.1	MM48659	p48659-KPC	62.326	99,98
CP070550.1	MM50821	p50821-KPC	54.347	99,98
CP028958.1	AR-0133	unnamed2	71.304	99,90
MF156712.1	GN28	pGN28-KPC	46.123	99,95
MN310368.1	1712229813	p229813-KPC	50.842	99,92
MN310367.1	170516602	p516602-KPC	52.180	99,92
<i>Proteus</i>				
CP070575.1	PM52808	p52808-KPC	88.945	99,98
CP070571.1	PM52260	p52260-KPC	88.945	99,98
CP021853.1	AR-0156	unitig-1	180.262	100
CP021695.1	AR-0155	tig00000123	214.441	100
CP045256.1	L90-1	pL901	24.983	99,95
CP017086.1	T18	pT18	59.035	99,95
CP017083.1	T21	pT211	24.225	99,95
MF156710.1	GN2	pGN2-KPC	46.320	99,95
<i>Providencia</i>				
MN371230.1	8686	<i>bla</i> KPC	557	99,82

Megablast da isoforma Tn4401a contida no plasmídeo de *K. pneumoniae* Kp512 contra os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

Tabela 2 - Megablast da isoforma Tn4401b em *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

ID GenBank	Tn4401b			
	Isolado	Plasmídeo	Pares de base	Similaridade (%)
<i>Morganella</i>				
<u>MF497782.1</u>	<u>MMO-37590cz</u>	pMMO-37590cz	30.051	100
<u>CP070521.1</u>	<u>MM46903</u>	p46903-KPC	54.351	100
<u>CP070535.1</u>	<u>MM48659</u>	p48659-KPC	62.326	100
<u>CP070550.1</u>	<u>MM50821</u>	p50821-KPC	54.347	100
<u>CP028958.1</u>	<u>AR-0133</u>	unnamed2	71.304	99,94
<u>MF156712.1</u>	<u>GN28</u>	pGN28-KPC	46.123	99,95
<u>MN310368.1</u>	<u>1712229813</u>	p229813-KPC	50.842	99,92
<u>MN310367.1</u>	<u>170516602</u>	p516602-KPC	52.180	99,92
<i>Proteus</i>				
<u>CP021853.1</u>	<u>AR-0156</u>	unitig-1	180.262	99,97
<u>CP070575.1</u>	<u>PM52808</u>	p52808-KPC	88.945	100
<u>CP070571.1</u>	<u>PM52260</u>	p52260-KPC	88.945	100
<u>CP021695.1</u>	<u>AR-0155</u>	tig00000123	214.441	100
<u>CP045256.1</u>	<u>L90-1</u>	pL901	24.983	99,95
<u>CP017086.1</u>	<u>T18</u>	pT18	59.035	99,95
<u>CP017083.1</u>	<u>T21</u>	pT211	24.225	99,95
<u>MF156710.1</u>	<u>GN2</u>	pGN2-KPC	46.320	99,95
<i>Providencia</i>				
<u>MN371230.1</u>	<u>8686</u>	blaKPC	557	99,82

Megablast da isoforma Tn4401b contida no plasmídeo de *K. pneumoniae* Kp15 com os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

Tabela 3 - Megablast da isoforma Tn4401d em *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*.

Tn4401d				
ID GenBank	Isolado	Plasmídeo	Pares de base	Similaridade (%)
<i>Morganella</i>				
MF497782.1	MMO-37590cz	pMMO-37590cz	30.051	100
CP070521.1	MM46903	p46903_KPC	54.351	100
CP070535.1	MM48659	p48659_KPC	62.326	100
CP070550.1	MM50821	p50821_KPC	54.347	100
CP028958.1	AR-0133	unnamed2	71.304	99,75
MF156712.1	GN28	pGN28-KPC	46.123	99,59
MN310368.1	1712229813	p229813-KPC	50.842	99,11
MN310367.1	170516602	p516602-KPC	52.180	99,11
AP018565.2	MH16-367M*	pMH16-367M_1	73.129	100
MK372385.1	ABC140	pABC140-NDM-1	52.591	100
<i>Proteus</i>				
CP021853.1	AR-0156	unitig-1	180.262	100
CP021695.1	AR-0155	tig00000123	214.441	100
CP070575.1	PM52808	p52808_KPC	88.945	100
CP070571.1	PM52260	p52260_KPC	88.945	100
CP045256.1	L90-1	pL901	24.983	99,59
CP017086.1	T18	pT18	59.035	99,59
CP017083.1	T21	pT211	24.225	99,59
MF156710.1	GN2	pGN2-KPC	46.320	99,59
AP018566.2	MH13-009N*	pMH13-009N_1	72.564	100
MF490433.1	PmPHI	ilha genômica	58.088	100
MF150118.1	A64421	pPM64421a	176.346	100
KJ439039.1	PmCHE*	ilha genômica	86.128	100
KJ411925.1	PmCHA*	ilha genômica	88.202	100
MT585156.1	HN2p	ilha genômica	198.567	100
CP059057.1	CriePir89	-	71.448	100
MK941846.1	PM1157	pOXA-23	60.018	100
CP021551.1	AR-0159	tig00000137	161.830	100
CP070574.1	PM52808	p52808_2	40.918	100
CP070570.1	PM52260	p52260_1	40.918	100
MN148427.1	PV835	pPV835TEM24	174.086	100
<i>Providencia</i>				
OL547373.1	pre001	blaKPC	918	98,19
KX832926.1	16pre36*	p16Pre36-1	43.191	100
KX774387.1	30905	pC131	118.501	100
CP012903.1	N15-01091	pNDM15-1091	117.812	100
AM901564.1	R7K	R7K	39.792	100
CP071069.1	3347685	p3347685_1	188.750	100

Megablast da isoforma Tn4401d contida no plasmídeo de *K. pneumoniae* Kp529-1 contra os gêneros *Morganella*, *Proteus* e *Providencia*. * determina os isolados dos quais não foi possível realizar *upload* no software *Islandviewer 4.0* pois gerou erros no mesmo.