

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

JONAS DE MELO SILVESTRE DA SILVA

ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS
CLÍNICAS ORIUNDAS DE HOSPITAIS DE PERNAMBUCO

RECIFE, 2021

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

**ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS
CLÍNICAS ORIUNDAS DE HOSPITAIS DE PERNAMBUCO**

JONAS DE MELO SILVESTRE DA SILVA

Monografia apresentada à coordenação do curso de Bacharelado em Ciências Biológicas, sob orientação da professora Anna Carolina Soares Almeida, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de bacharel em Ciências Biológicas, de acordo com as exigências.

RECIFE, 2021

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

S586a Silva, Jonas de Melo Silvestre
ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS CLÍNICAS
ORIUNDAS DE
HOSPITAIS DE PERNAMBUCO / Jonas de Melo Silvestre da Silva. - 2021.
42 f. : il.

Orientadora: Anna Carolina Soares Almeida.
Coorientadora: Paula Mariana Salgueiro de Souza.
Inclui referências.

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

1. resistência multidrogas. 2. PCR. 3. perfil fenotípico. 4. relação clonal. I. Almeida, Anna Carolina Soares, orient. II. Souza, Paula Mariana Salgueiro de, coorient. III. Título

CDD 574

JONAS DE MELO SILVESTRE DA SILVA

ANÁLISE DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA EM BACTÉRIAS CLÍNICAS
ORIUNDAS DE HOSPITAIS DE PERNAMBUCO

Monografia apresentada à
coordenação do curso de Bacharelado em
Ciências Biológicas, sob orientação da
professora Anna Carolina Soares Almeida,
da Universidade Federal Rural de
Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de bacharel em
Ciências Biológicas, de acordo com as
exigências.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Anna Carolina Soares Almeida
(UFRPE)

B.A. Ingrid Aparecida Pereira da Silva
(UPE)

Ma. Ana Caroline Oliveira Alves Ribeiro
(UPE)

B.A. Michelly Maria pereira de Oliveira
(UFRPE)

RECIFE, 2021

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela oportunidade dada nessa parte importante da minha vida.

À minha orientada prof. Anna Carolina Soares Almeida, por ter me aceitado no grupo e acreditado em mim, além de todo o suporte durante esses 2 anos. Essa oportunidade mudou muito a minha vida e eu sou eternamente grato a isso.

À Paula Salgueiro, que teve a missão de me guiar durante todo esse tempo no laboratório. Sou muito grato por todo conhecimento compartilhado, e também por tornar essa jornada mais alegre e divertida.

Ao grupo de resistência Microbiana (LRM), por ter me acolhido, pelo aprendizado adquirido nos seminários, e por incentivar os estudos. Em especial a Caroline, Michelly, Ana Paula, Ingrid por toda ajuda e carinho.

A Universidade Federal Rural de Pernambuco e seus funcionários, simplesmente a melhor instituição de Pernambuco.

Ao Laboratório de Genética bioquímica e sequenciamento de DNA rural pela estrutura que foi essencial para o desenvolvimento desse trabalho

E por último, a todos os meus amigos e familiares que me apoiaram e ajudaram na graduação: Minha mãe e meu pai, Klebinho, Vinicius, Paulo José, Mr. Rostkowski.

RESUMO

A disseminação de bactérias resistentes ou superbactérias vem sendo considerada uma ameaça catastrófica para a saúde da população e representa um dos principais desafios na área da saúde em todo o mundo. O objetivo principal deste trabalho é a identificação dos determinantes genéticos, moleculares, mecanismos de resistência e a relação clonal entre vinte e dois isolados obtidos de dois hospitais de Pernambuco. Foram incluídos isolados de: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter spp*, onde todos apresentaram perfil fenotípico de resistência a multidrogas (MDR). Os isolados provenientes do Hospital Universitário da Universidade Federal do Vale do São Francisco apresentaram perfil de resistência mais alto em relação aos isolados do Hospital Universitário Oswaldo Cruz localizado em Recife, principalmente a aminoglicosídeos e cefalosporina 3^o e 4^o geração. Pela técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) foi possível detectar pelo menos um dos genes resistência β-lactâmico a testados em todos os isolados, com exceção de 2 isolados que não apresentaram nenhum dos genes avaliados. O gene *bla_{CTX-M}* foi o mais prevalente encontrado nesse estudo. E apesar de metade das amostras terem perfil de resistência a carbapenênicos, o gene *bla_{KPC}* foi o menos detectado. Além disso, pela análise de relação clonal através da técnica REP-PCR revelou uma possível endemicidade de um único tipo clonal na Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Universitário Oswaldo Cruz localizado em Recife. Já no Hospital Universitário da Universidade Federal do Vale do São Francisco foi identificado estabelecimento de dois grupos clonais que estão disseminados a pelo menos 3 meses. A presença de bactérias multirresistentes em unidades hospitalares reforça a necessidade de estratégias para contenção de infecções e da disseminação desses patógenos, principalmente nas UTIs.

Palavras-chaves: resistência multidrogas; PCR; perfil fenotípico; relação clonal

ABSTRACT

The spread of resistant bacteria or superbugs has been considered a catastrophic threat to the health of the population and represents one of the main challenges in the area of health worldwide. This work's main objective is to identify genetic and molecular determinants, resistance mechanisms, and the clonal relationship between twenty-two isolates obtained from two hospitals in Pernambuco. Isolates of: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae*, *Escherichia coli*, and *Enterobacter* spp were included, all of which showed a phenotypic profile of multidrug resistance (MDR). Isolates from the University Hospital of the Federal University of Vale do São Francisco had a higher resistance profile compared to isolates from the University Hospital Oswaldo Cruz located in Recife, mainly to aminoglycosides and 3rd and 4th generation cephalosporins. Using the polymerase chain reaction (PCR) technique, it was possible to detect at least one of the β -lactam resistance genes tested in all isolates, except for 2 isolates that did not present any of the genes evaluated. The *bla_{CTX-M}* gene was the most prevalent found in this study. And despite half of the samples having a resistance profile to carbapenems, the *bla_{KPC}* gene was the least detected. In addition, clonal relationship analysis using the REP-PCR technique revealed a possible endemicity of a single clonal type in the Intensive Care Unit at Hospital Universitário Oswaldo Cruz located in Recife. At the University Hospital of the Federal University of Vale do São Francisco, the establishment of two clonal groups that have been disseminated for at least 3 months was identified. The presence of multiresistant bacteria in hospital units reinforces the need for strategies to contain infections and spread these pathogens, especially in ICUs.

Keywords: multidrug resistance; PCR; phenotypic profile; clonal relationship

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Estrutura química das classes β -lactâmico	14
Figura 2 Estrutura químicas das quinolonas e suas gerações.	18
Figura 3 Principais mecanismos de Resistência em Bactérias Gram negativas.	20
Figura 4 Percentual de Resistência em <i>Klebsiella</i> spp. (Hospital Recife = 8; Hospital de Petrolina = 9)	30
Figura 5 Distribuição das β -lactamases entre os hospitais Pernambuco	31
Figura 6 Gel de agarose da PCR para identificação do gene <i>qnrB</i>	31
Figura 7 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do Hospital Universitário Oswaldo Cruz- Recife	32
Figura 8 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> do Hospital Universitário-UNIVASF- Petrolina	33
Figura 9 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de <i>E. coli</i> do Hospital Universitário-UNIVASF- Petrolina.....	33

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	10
2.	REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1.	ENTEROBACTERALES.....	12
2.2.	ANTIMICROBIANOS.....	13
2.2.1.	β -lactâmicos	13
2.2.1.1.	Penicilinas	14
2.2.1.2.	Cefalosporinas	14
2.2.1.3.	Monobactâmicos	15
2.2.1.4.	Carbapenêmicos	15
2.2.2.	Quinolonas	16
2.2.3.	Resistência a antimicrobianos.....	18
2.2.3.1.	β -lactamases	20
2.2.3.2.	β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).....	23
2.2.3.3.	Carbapenemases	24
2.2.4.	Resistência as Quinolonas	25
3.	OBJETIVOS.....	26
3.1.	OBJETIVO GERAL	26
2.	METODOLOGIA	26
2.1.	LINHAGENS BACTERIANAS	26
2.2.	OBTENÇÃO DO DNA	27
2.3.	IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA	27
2.3.1.	Condições das PCR	28
2.4.	DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLONAL	29
3.	RESULTADOS	29
3.1.	DETECÇÃO DOS GENES ESBLs e KPC.....	30
3.2.	DETECÇÃO DO GENE qnr.....	31
3.3.	RELAÇÃO CLONAL ENTRE OS ISOLADOS	32
4.	DISCUSSÃO.....	35
5.	CONCLUSÃO	38
6.	REFERÊNCIAS	38

1. INTRODUÇÃO

Com a descoberta dos antibióticos se pensava que a batalha contra doenças infecciosas tinha acabado. Porém, agora com o surgimento de tantas bactérias resistentes a vários agentes antimicrobianos demonstra que esta batalha está longe de acabar. As doenças infecciosas atualmente já são responsáveis por uma parte significativa de morbidade e mortalidade no mundo todo (1). A situação se torna ainda mais preocupante se considerar que a maioria dos mecanismos de resistência utilizados por elas podem ser facilmente transferidos entre linhagens e espécies bacterianas, facilitando a disseminação de patógenos resistentes não apenas a antibióticos de primeira escolha (como penicilinas, cefalosporinas e aminoglicosídeos), mas também a aqueles de última escolha como carbapenêmicos, polimixina, tigeciclina e quinolonas (1,2).

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são infecções adquiridas quando se está recebendo tratamento para uma outra condição em um hospital ou outra unidade prestadora de assistência à saúde, que não estavam presentes na admissão do paciente. Elas podem acontecer em qualquer centro de saúde e pode ser causado por qualquer patógeno. O grande problema dessas infecções ocorre quando elas são causadas por patógenos resistentes a antimicrobianos, que por sua vez são responsáveis por uma taxa significativa de morbidade e mortalidade no mundo (1).

Entre 12 a 17 microrganismos são responsáveis por 80%-87% das IRAS que são: *S. aureus*, *Enterococcus spp.* (*faecalis*, *faecium*), *Escherichia. coli*, *Staphylococci coagulase negativos*, *K. pneumoniae and Klebsiella oxytoca*, *P. aeruginosa*, *A. baumannii*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* (15). Na qual vários desses microrganismos estão presentes na lista de bactérias resistentes prioritárias publicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017. A lista contém 12 famílias de bactérias que representam a maior ameaça à saúde humana e é dividida em três grupos de prioridade. Destacam-se bactérias Gram-negativas que são resistentes a múltiplos antimicrobianos, e com a capacidade de transferir material genético e seus mecanismos de resistência para outras bactérias., portanto, são classificadas como grupo de prioridade 1 (crítico) que é composto por *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas*

aeruginosa e *Enterobacterales*, como por exemplo *Klebsiella spp.*, *E. coli*, *Enterobacter spp.* (16).

A modificação enzimática do antibiótico é um mecanismo de resistência que tem sido relevante desde a descoberta da primeira penicilinase em 1940. Posteriormente, milhares de enzimas com capacidade de modificar e degradar diferentes classes de antibióticos, como beta-lactâmicos, quinolonas, aminoglicosídeos, tem sido identificadas (2). Dentre elas, estão subclasses de enzimas com maior distribuição no mundo que são as beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs), as oxacilinasas (OXAs), e as carbapenemases, a importância delas está na facilidade de disseminação através de plasmídeos e também por conferir resistência de amplo espectro, ou seja, a mais de um antibiótico da mesma classe (2,3). As ESBLs são um grupo de enzimas que pertencem a classe A da classificação de Ambler com capacidade de hidrolisar todas as cefalosporinas, exceto as cefamicinas, e são inibidas por inibidores de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Mais de 300 enzimas ESBLs já foram descritas e a maioria delas são derivadas de mutações genéticas das beta-lactamases de espectro restrito do tipo *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* (3).

No entanto, existem outros mecanismos de resistência que também são utilizados pelas bactérias, como alteração da permeabilidade da membrana externa pela perda funcional das porinas, hiperexpressão de bombas de efluxo que pode expulsar o antimicrobiano para fora da célula e modificação do sítio alvo dos antimicrobianos (1).

As crescentes taxas de resistência aos antibióticos têm restringido cada vez mais as opções terapêuticas contra doenças infecciosas, aumentando o risco de morte, ameaçando a segurança dos pacientes usuários dos sistemas de saúde e da comunidade em geral, além de acarretar aumento do custo da assistência à saúde. Neste contexto, esse projeto tem como objetivo determinar os determinantes genéticos de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas de infecções em diferentes hospitais públicos do estado de Pernambuco e rastrear a disseminação dessas bactérias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ENTEROBACTERALES

A ordem *Enterobacterales* (que substituiu a antiga família *Enterobacteriaceae*) é um grande e diverso grupo de bactérias Gram-negativas, facultativamente anaeróbicas, não formadoras de esporos e em forma de bastonete pertencentes a classe *Gammaproteobacteria*. Os membros que compõem esse grupo estão distribuídos em vários nichos ecológicos diferentes, podendo ser encontrados no solo, na água e em associação com organismos vivos, incluindo plantas, insetos, animais e humanos (26).

A antiga família *Enterobacteriaceae* era um grande e complexo grupo, e o entendimento da filogenia era baseada principalmente no gene 16S rRNA. No entanto, o gene 16S rRNA tem baixo poder discriminatório, onde muitos outros gêneros dentro da família *Enterobacteriaceae* também eram altamente idênticos entre o 16S. Portanto, uma nova classificação taxonômica foi proposta, colocando *Enterobacteriaceae* na ordem *Enterobacterales*, dentro da classe *Gammaproteobacteria*, com base na análise filogenética das diversas espécies, que abrange sequências de rRNA 16S, análise de sequência de múltiplos locus e também bem marcadores moleculares independentes (26).

A ordem *Enterobacterales* abrange sete famílias e mais de 80 gêneros de bactérias Gram-negativas. Várias espécies desse grupo são importantes patógenos oportunistas, que podem causar tanto infecções de origem comunitária, quanto infecções relacionadas à assistência à saúde, podendo ser infecções respiratórias, urinárias e da corrente sanguínea. As principais espécies e gêneros associados a IRAS, de importância clínica, são *Klebsilla pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Citrobacterspp.*, *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis*, entre outras (27).

As espécies *E.coli* e *Klebsiella pneumoniae* também se destacam por frequentemente produzirem enzimas β -lactamases (ESBLs) que conferem resistência a antibióticos β -lactâmicos, incluindo cefalosporinas de terceira e quarta geração e monobactâmicos, além da sua prevalência em infecções hospitalares. Pacientes hospitalizados e colonizados por *Enterobacterales* produtoras de β -lactamases oferecem risco a outros pacientes, pois eles podem atuar como fontes de infecções para outros pacientes, destacando a

importância da detecção e rastreamento como medida de controle da disseminação desses microrganismos no ambiente hospitalar (27).

2.2. ANTIMICROBIANOS

Os antimicrobianos convencionais são drogas sintetizadas que agem contra outros microrganismos, podendo ser de origem natural ou sintética (Walsh 2016). Alguns antimicrobianos possuem a capacidade de causar a morte dos microrganismos, denominados de bactericidas, enquanto outros apenas impedem o seu crescimento, esses são classificados como bacteriostáticos (9).

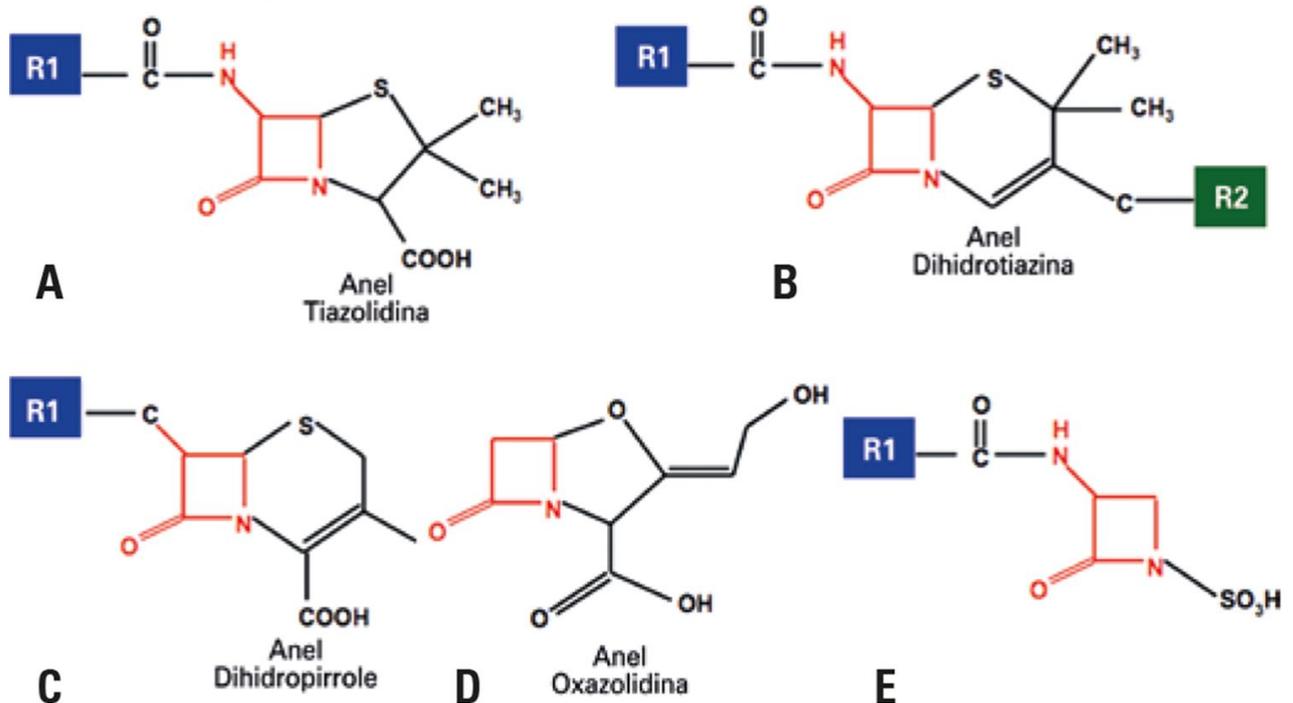
O tratamento com antimicrobianos passou a ser a principal forma de combate a infecções na medicina moderna, suportada pelo descobrimento e criação de vários tipos de antibióticos. No entanto, a sua utilização inadequada, junto com o aumento do uso desses antimicrobianos em humanos e animais, contribuíram para o surgimento de cepas resistentes. Situação que se agrava ainda mais pelo fato da dificuldade em desenvolver ou criar novos antimicrobianos (1,9).

2.2.1. β -lactâmicos

O grupo de drogas antimicrobianas mais utilizado no mundo é o dos β -lactâmicos. O grupo β -lactâmico se divide em quatro classes com compostos químicos distintos (penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), porém todos possuem anel β -lactâmico na sua estrutura química. A grande diversidade desse grupo se reflete na maneira de como são utilizados, onde as classes apresentam diferentes propriedades farmacológicas e são usadas para diferentes indicações clínicas (10) (Figura 1).

O alvo de ação dos β -lactâmicos são as proteínas de ligação à penicilina (PBPs), que são responsáveis pela formação do peptidoglicano da parede celular bacteriana. Nesse caso, a droga impede a síntese do peptidoglicano se ligando as essas proteínas, ocasionando camadas de peptidoglicano instáveis e conseqüentemente, lise da parede celular e morte do microrganismo (11).

Figura 1 Estrutura química das classes β -lactâmico



Fonte: Felix, Mara Morelo Rocha et al. 2021.

Nota: O anel β -lactâmico, destacado em vermelho, presente em todas as classes

2.2.1.1. Penicilinas

As penicilinas formam o grupo de antimicrobianos mais velho utilizado pelo homem. O primeiro antimicrobiano foi testado e purificado por Fleming no início de 1940 a partir do fungo do gênero *Penicillium*, o sucesso dessa nova droga no tratamento de infecções marcou um avanço na história da medicina. A penicilina contém um anel β -lactâmico fusionado a um anel de tiazolidina formando ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Esse grupo é subdividido em quatro subclasses: penicilinas naturais, penicilinase-resistentes penicilinas, aminopenicilinas e penicilinas de espectro estendido. A evolução da resistência bacteriana as penicilinas estimularam o desenvolvimento de novas penicilinas semissintéticas modificadas, usando o ácido 6-aminopenicilânico como molécula precursora. Apesar disso, a contínua evolução da resistência bacteriana forçou o desenvolvimento de β -lactâmicos alternativos (10,11).

2.2.1.2. Cefalosporinas

As cefalosporinas são um grupo de antimicrobianos derivados do fungo *Cephalosporium acremonium*. É composta por um anel β -lactâmico e um anel

dihidrotiocianídico, formando o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA). O seu desenvolvimento se deu pela sua capacidade de resistir a hidrólise das penicilinas e logo se tornou um antimicrobiano de amplo uso devido seu amplo espectro, baixa toxicidade, facilidade de administração e perfil farmacocinético favorável. No entanto, assim como a penicilina, em pouco tempo foi detectado isolados bacterianos resistentes a essa droga, estimulando o desenvolvimento de cefalosporinas mais potentes e resistentes a degradação enzimática. As cefalosporinas são classificadas em cinco gerações distintas com base em modificações nas cadeias laterais (10,12).

2.2.1.3. Monobactâmicos

Os monobactâmicos se distinguem dos outros grupos de β -lactâmicos por ser monocíclico, ou seja, o anel β -lactâmico não está ligado a outro grupamento cíclico. Ao invés disso, o anel β -lactâmico está ligado ao ácido sulfônico no nitrogênio na posição N-1. Apesar desse antimicrobiano ser resistente a degradação enzimática, ele não possui afinidade com PBPs de bactérias Gram-positivas e microrganismos anaeróbicos. Portanto, o seu espectro de ação se limita a infecções causadas por bacilos Gram-negativos aeróbicos. Possui apenas um representante no mercado disponível, que é o aztreonam (10,13).

2.2.1.4. Carbapenêmicos

As penicilinas foram amplamente utilizadas por quase 60 anos devido a sua grande eficácia, segurança e baixa toxicidade. Isso levou ao aumento da resistência bacteriana, devido ao surgimento de mecanismos de resistência, principalmente o aparecimento de novas beta-lactamases, e a necessidade de procurar um novo fármaco capaz de resistir as novas β -lactamases encontradas (28).

Em 1976, o primeiro inibidor de β -lactamases foi descoberto, o ácido olivânico. No entanto, a sua baixa estabilidade e baixa capacidade de penetrar na célula bacteriana manteve a necessidade de encontrar um composto melhor. Posteriormente, foram descobertos mais dois compostos: o ácido clavulânico e a tienamicina, sendo a tienamicina considerada o primeiro

carbapenêmico produzido, servindo como composto referência para o desenvolvimento dos próximos carbapenêmicos (28).

Este grupo de antimicrobianos possui um anel β -lactâmico fusionado com um anel pirrolidínico compartilhando uma molécula de nitrogênio e, diferentemente dos outros grupos como cefalosporinas e penicilinas, contém uma cadeia lateral de hidroxietil que é importante para resistir à hidrólise mediada pelas β -lactamases. Os carbapenêmicos, entre os β -lactâmicos, são os mais eficazes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Apresentando amplo espectro de atividade e resistência a maioria das β -lactamases (enzimas responsáveis por inativar os antimicrobianos β -lactâmicos), incluindo as β -lactamases de espectro estendido (ESBLs). (14).

É um dos principais antimicrobianos utilizados no mundo, devido ao aumento da resistência as cefalosporinas. E também pela sua eficiência que é resultado da sua capacidade de se ligar indiscriminadamente para múltiplas PBPs e inibir ou resistir hidrólise de muitas β -lactamases (10).

2.2.2. Quinolonas

As quinolonas são antimicrobianos sintéticos e é a classe de inibidores de topoisomerase de maior uso no mundo até o momento. Foi desenvolvida a partir de um composto inicial, ácido nalidíxico, descoberto como um subproduto da síntese de cloroquina em 1962. (30).

O ácido nalidíxico foi introduzido na clínica na década de 60 para tratamento de infecções do trato urinário de bactérias Gram-negativas (exceto *Pseudomonas aeruginosa*). E, devido a capacidade limitada da droga, utilizada apenas para infecções de trato urinário não complicadas, demonstrou-se ainda a necessidade de se desenvolver compostos análogos adicionais. Outros compostos análogos, como ácido oxolínico, foram introduzidos para uso clínico e junto com o ácido nalidíxico são considerados quinolonas da primeira geração. (31)

O contínuo desenvolvimento e otimização das quinolonas através de modificações nas cadeias laterais, como adição do anel piperazina no C-7, junto com Flúor no C-6, deram origem as quinolonas de segunda geração, que começaram a partir da criação da Norfloxacin. As mudanças tornaram as

quinolonas de segunda geração menos tóxicas e menos suscetíveis a mutações pontuais que afetavam as quinolonas da primeira geração, mas ainda estavam confinadas a infecções do trato urinário devido à baixa penetração tecidual, até o desenvolvimento da Ciprofloxacina (30). A ciprofloxacina foi a primeira quinolona a apresentar atividade significativa fora do trato urinário e continua sendo uma das drogas antibacterianas mais comumente prescritas até hoje, possuindo mais de 20 anos de uso (31).

O sucesso da Ciprofloxacina desencadeou o desenvolvimento de uma série de quinolonas de terceira e quarta geração que apresentam espectro de ação ainda mais amplo, especialmente contra bactérias Gram-positivas, além de maior eficácia e menor prevalência de resistência (31). (Figura 2).

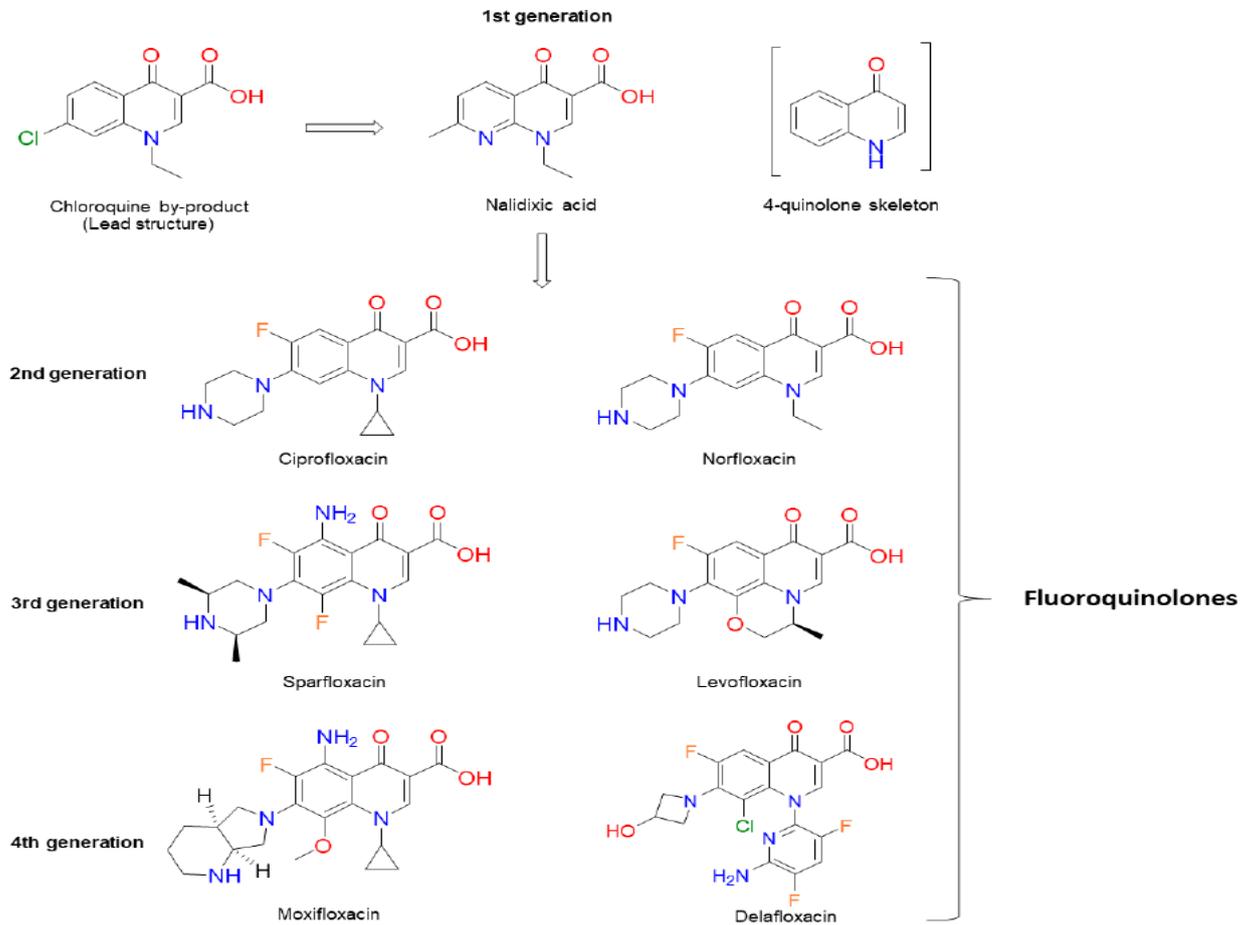
O mecanismo de ação das quinolonas envolve as enzimas que participam do processo de replicação do DNA, portanto, ela inibe a síntese do DNA bacteriano. O sítio alvo de ação das quinolonas são a topoisomerase II, girase e topoisomerase IV. Essas enzimas desempenham papéis essenciais nos ácidos nucléicos nos processos de transcrição e replicação, ajudando a controlar os níveis de enrolamento do DNA e removendo emaranhados do cromossomo bacteriano, possibilitando o acesso de outras proteínas a fita do DNA (30).

Todas as topoisomerases podem relaxar o DNA, mas apenas a girase promove a superhelicoidização negativa, tendo como principal função remover o estresse de torção que se acumula na frente de bifurcações de replicação e complexos de transcrição. Já a topoisomerase IV tem como principal função remover nós que se acumulam no cromossomo bacteriano devido aos processos celulares. A Girase e a topoisomerase IV são heterotetrameros, onde a Girase é composta por duas subunidades A (GyrA) e duas subunidades B (GyrB), no caso da Topoisomerase IV, é composta por duas subunidades C (ParC) e duas subunidades E (ParE) (30,31).

As quinolonas inibem o superenrolamento e relaxamento do DNA, ligando-se à topoisomerase-DNA e a interação entre a quinolona e o complexo topoisomerase-DNA aprisiona a topoisomerase no DNA, tornando a enzima incapaz de realizar a sua função, conseqüentemente bloqueando a maquinaria de replicação e transcrição. Este complexo topoisomerase-DNA-quinolona

também transforma a enzima em uma proteína tóxica para a célula, podendo causar quebras letais da fita dupla de DNA (31).

Figura 2 Estrutura químicas das quinolonas e suas gerações.



Fonte: Bush, N. G., et al. 2020

2.2.3. Resistência a antimicrobianos

As bactérias, como grupo ou espécie, não são necessariamente suscetíveis ou resistentes a qualquer agente antimicrobiano em particular. Os microrganismos foram submetidos à seleção Darwiniana para desenvolver alguns mecanismos a fim de escapar dos efeitos letais das substâncias antimicrobianas. Naturalmente, a maioria dos antibióticos é produzida por outros microrganismos como bactérias saprofíticas, ou fungos, outros antimicrobianos são sinteticamente modificados, enquanto outros são completamente sintéticos (32).

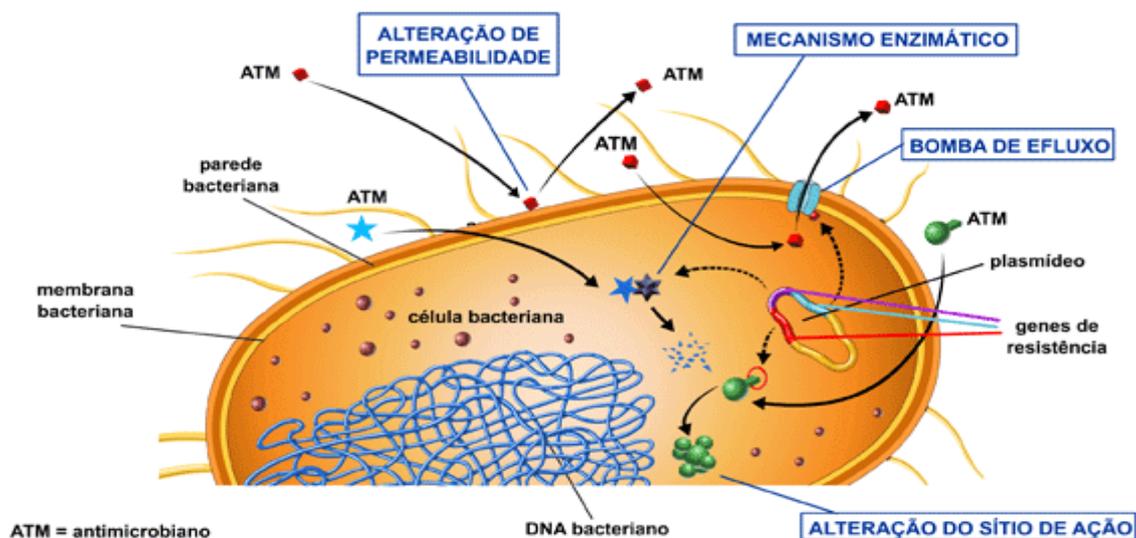
As causas da resistência a antimicrobianos em escala global são variadas, como superpopulação, migração global elevada, aumento do uso de antibióticos em clínicas e produção animal causando aumento da pressão seletiva, saneamento impróprio, além de sistema de esgoto precário (33).

Pode se definir resistência a antimicrobianos como a capacidade do microrganismo em sobreviver e se reproduzir na presença de dose de antimicrobianos que antes eram consideradas eficazes contra eles. E ao mesmo tempo que possuem vários tipos de antimicrobianos e mecanismos de ação para inibir o crescimento bacteriano ou causar a sua morte, também existem vários mecanismos de resistência que foram desenvolvidos pelos microrganismos durante a exposição a esses compostos (33).

A resistência aos antibióticos pode ser intrínseca (resistência natural sempre expressa na espécie) ou induzida (os genes ocorrem naturalmente na bactéria, mas só são expressos em níveis de resistência após exposição a um antibiótico). A resistência natural é compartilhada universalmente dentro de uma espécie bacteriana e não está relacionada à transferência horizontal de genes. As bactérias também podem adquirir genes de resistência de outros microrganismos relacionados, em um processo denominado de resistência adquirida. Esse processo é possível por meio de todas as principais vias pelas quais as bactérias adquirem qualquer material genético: transformação, transposição e conjugação. A aquisição pode ser temporária ou permanente, e a transmissão de genes de resistência mediada por plasmídeo é a via mais comum para aquisição de material genético externo (32).

Em alguns casos, um único mecanismo de resistências pode conferir resistência a diferentes classes de antimicrobianos, devido à similaridade do mecanismo de ação (23). Os principais mecanismos de resistência ao β -lactâmicos são: degradação enzimática, alteração do sítio alvo (PBPs), inativação do antimicrobiano e ação de bombas de efluxo (10) (Figura 3).

Figura 3 Principais mecanismos de Resistência em Bactérias Gram negativas.



Fonte: Anvisa

2.2.3.1. β -lactamases

O principal determinante de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas, são enzimas β -lactamases, enzimas antigas na qual suas origens podem ser rastreadas há milhões de anos. Essas enzimas bem estudadas, atualmente com quase 2.800 proteínas únicas, surgiram inicialmente de fontes ambientais naturais, provavelmente para proteger a bactéria produtora do ataque de β -lactâmicos de ocorrência natural. As β -lactamases são grupo de enzimas com grande diversidade, contendo uma gama limitada de estruturas moleculares presentes em diversas espécies de bactérias (29).

Apesar da resistência aos β -lactâmicos possa ser encontrada de forma natural, o uso extensivo desses β -lactâmicos, tanto na medicina quanto na indústria agrícola, colocou uma grande pressão seletiva sobre as bactérias, de modo que atualmente nenhum β -lactâmico está livre de resistência. A primeira enzima com atividade de β -lactamase foi descrita na literatura em 1940, de um *Bacillus coli* e até o momento diversas enzimas já foram descritas, presentes tanto no DNA cromossomal quanto em elementos genéticos móveis. Embora muitas bactérias entéricas produzam β -lactamases cromossômicas induzíveis específicas, são as β -lactamases associadas a elementos genéticos móveis em bactérias Gram-negativas que representam uma ameaça mais crítica aos β -lactâmicos na prática clínica (32).

As β -lactamases inativam os antimicrobianos β -lactâmicos por hidrólise do anel β -lactâmico. Esta hidrólise provoca abertura do anel β -lactâmico e a droga não é mais capaz de se ligar as proteínas PBPs, seu sítio alvo. A produção dessas enzimas é o mecanismo mais utilizado por bactérias Gram-negativas contra os β -lactâmicos (1)

As β -lactamases são classificadas em 4 classes distintas (A, B, C e D), baseada em sua estrutura molecular e características funcionais, conhecida como classificação de Ambler, Bush-Jacob (Quadro 1). Os dois grupos principais são classificados de acordo com o mecanismo de hidrólise, seja por meio da formação de uma acil enzima com uma serina de sítio ativo (Serino- β -lactamases), seja por meio de uma reação hidrolítica facilitada por um ou dois íons zinco essenciais nos sítios ativos (Metallo- β -lactamases) (1,10).

Quadro 1 Betalactamases de acordo com a classificação de Ambler e Bush-Jacoby-Medeiros

Classificação de Ambler	Classificação de Bush-Jacoby-Medeiros	Substrato preferencial	Enzimas representantes
A (Serino-betalactamases)	2a.	Penicilina (Inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam).	PC1 em <i>S. aureus</i> outras penicilinases de <i>Staphylococcus sp.</i>
	2b	Penicilinas, cefalosporinas de 1º geração (inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam)	TEM-1, TEM-2, TEM-90, SHV-11
	2be	Penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	ESBLs: CTX-M-15, CTXM-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26
	2br	Penicilinas e cefalosporinas de 1º geração (não são bem inibidas pelo ácido clavulânico).	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
	2ber	Penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos (pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam).	TEM-50, TEM-68, TEM-89
	2c	Penicilinas, Carbenicilina (inibidas por ácido clavulânico).	PSE-1, CARB-3
	2e	Cefalosporinas de espectro estendido (inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam).	FEC-1, CepA
	2f	Penicilinas, Cefalosporinas e Carbapenêmicos (são pouco ou não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam).	KPC2 a KPC17, SMEs, NMC-A, IMI-1, SME-1, GES-2, GES-5
B (Metalobetalactamases)	3a.	Todos os betalactâmicos, exceto o aztreonam (Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam).	IMPs, VImS, NDM-1, SPM
	3b	Todos os betalactâmicos, exceto os carbapenêmicos (não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam).	CphA, Sfh-1
C (Cefalosporinas)	1	Penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Penicilinas, cloxacilina (levemente inibidas por ácido clavulânico).	AmpC de <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1
	1e	Penicilinas, Cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Penicilinas, Cloxacilina (levemente inibidas por ácido clavulânico).	GC1, CMY-37
	2d		OXA-1 a OXA10
D (oxacilinas)	2de	Penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro (pouco inibidas por ácido clavulânico).	OXA-11 a OXA-15
	2df	Carbapenêmicos e cloxacilina (pouco inibidas pelo ácido clavulânico).	OXA-23 a OXA-48

Fonte: Adaptado de Bush, Palzkill & jacob, 2015

A grande variedade das β -lactamases se dá pelas mutações de enzimas já existentes, que resultam em enzimas de espectro de ação ampliado ou na melhora da sua capacidade de hidrólise contra as classes de antimicrobianos já descritas (10).

2.2.3.2. β -lactamases de espectro estendido (ESBLs)

O grupo de enzimas ESBLs pode hidrolisar uma variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima, ceftriaxona), monobactâmicos (aztreonam), além de penicilina, mas não hidrolisam cefamicinas como a cefoxitina. Além disso, a maioria das ESBLs também tem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de quarta geração como a cefepima, o que compromete a eficácia de todos os β -lactâmicos, porém são inibidos *in vitro* pelo ácido clavulânico e tazobactam e permanecem suscetíveis aos carbapenêmicos. Estas enzimas são amplamente encontradas mundialmente, com cada região contendo um tipo de enzima prevalente e estão associadas a infecções graves na saúde humana. (34).

As ESBLs estão espalhadas por todo o mundo, com mais de 1,5 bilhão de pessoas colonizadas por *Enterobacterales* produtoras de ESBL, segundo uma estimativa. A grande maioria desse problema recai sobre os países em desenvolvimento. As espécies que produzem ESBLs são principalmente espécies de *K. pneumoniae* *Escherichia coli* e podem ser amplamente detectadas em outras bactérias Gram-negativas como *Enterobacter*, *Salmonella*, *Citrobacter*, *Serratia marcescens*, espécies de *Proteus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, as bactérias pertencentes a ordem *Enterobacterales*, produtora de ESBL, são um grande problema de saúde e pode ser observada principalmente em pacientes internados em unidades de terapia intensiva e de alta dependência. (35)

As enzimas "clássicas", como SHV-1 e TEM-1, podem hidrolisar a ampicilina, mas não podem hidrolisar oxiimino-cefalosporinas, incluindo ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima, que foram projetadas especificamente para resistir à hidrólise por essas enzimas. No entanto, essas β -lactamases evoluíram para ESBLs na década de 1980, adquirindo substituições de

aminoácidos específicas, permitindo assim a hidrólise das oximiinocefalosporinas. Essas enzimas ESBLs do tipo TEM e SHV são tipicamente codificados em plasmídeos transferíveis e encontrados principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também podem ser encontradas em outras bactérias Gram-negativas (36).

Grupo de enzimas CTX-M- β -lactamases são um grupo de ESBLs que são distintos de TEM e SHV, pois as enzimas CTX-M hidrolisam preferencialmente a cefotaxima sobre ceftazidima, ao contrário das enzimas ESBLs TEM e SHV. Os genes que codificam essas enzimas muito provavelmente se originaram do cromossomo de várias espécies do gênero *Kluyvera*. Estudos sugerem que esses genes foram transferidos por elementos genéticos móveis dos genomas *Kluyvera* para plasmídeos em *E. coli* de forma acidental (36).

As β -lactamases CTX-M são o tipo predominante de ESBLs na Europa e América do Sul, incluindo o Brasil. No Brasil, as enzimas CTX-M são as ESBLs mais prevalentes, principalmente em *K. pneumoniae* e *E. coli*. CTX-M2 e CTX-M-15 são as variantes mais dominantes na família, seguidos por CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-59 (37).

2.2.3.3. Carbapenemases

Devido ao aumento de bactérias produtoras de genes ESBL, o uso clínico de carbapenêmicos aumentou na última década sendo esse, um dos principais fatores associados ao aumento do número de bactérias clínicas produtoras de β -lactamases com atividade de hidrólise aos carbapenêmicos (conhecido como carbapenemases) (2).

Os membros da classe das carbapenemases pertencem as classes A, B e D. A grande importância dessas enzimas está na capacidade de hidrolisar grande partes dos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e, portanto, limitando ainda mais as opções de tratamento para antimicrobianos mais antigos com efeito limitado e de alta toxicidade (24).

Muitas das carbapenemases geralmente são codificadas junto a elementos genéticos móveis, sendo descritas em Bacilos Gram negativos não fermentadores (BGNNF). O termo "KPC" surgiu de "*Klebsiella pneumoniae*

carbapenemase", já que foi identificada pela primeira vez neste microrganismo. Até o momento, pelo menos dezenove variantes de KPC foram relatadas, embora KPC-2 e KPC-3 pareçam ser mais prevalentes (2).

Ao contrário de outros produtores de β -lactamases da Classe A de Ambler, as KPCs não são inibidas pelos inibidores de β -lactamases baseados em beta-lactâmicos clavulanato, tazobactam e sulbactam. Além de que, geralmente os organismos produtores de KPC também são resistentes a outros antimicrobianos como aminoglicosídeos, quinolonas, trimetoprim, sulfonamidas e tetraciclina, pois frequentemente o gene *bla_{KPC}* está associado a grandes plasmídeos que também carregam outros determinantes de resistência (29).

Outro grupo de carbapenemases importantes são as carbapenemases pertencentes à classe B de Ambler, conhecidas como metalo β -lactamases. Diferentemente das outras carbapenemases, as enzimas pertencentes a esse grupo não são inibidas por inibidores de β -lactamases comercialmente disponíveis e conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam. Também são mediadas por plasmídeos e incluem IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo Metalo B-lactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase) e NDM-1 (New Delhi metalobetalactamase). As mais frequentemente identificadas no mundo são IMP, VIM e NDM (2,25).

O terceiro grupo de carbapenemases com relevância clínica são as carbapenemases do tipo OXA, pertencentes à da classe D de Ambler. Essas enzimas são altamente ativas contra as penicilinas, têm baixa atividade contra carbapenêmicos e atividade intermediária contra cefalosporinas de amplo espectro (38).

2.2.4. Resistência as Quinolonas

A resistência bacteriana às quinolonas surgiu após seu uso generalizado como medicamento em humanos e animais. Em particular, durante 2001-2006. Os mecanismos de resistência não são mutuamente exclusivos e podem se acumular, favorecendo o surgimento de cepas que exibem níveis muito altos de resistência às quinolonas (31).

A resistência às quinolonas está mais frequentemente associada a mutações específicas na girase e/ou topoisomerase IV. As mutações de resistência às quinolonas mais prevalentes são encontradas no GyrA e frequentemente encontradas na região denominada região determinante da resistência às quinolonas (QRDR) (30).

O primeiro gene encontrado para introduzir proteção bacteriana contra as quinolonas foi denominado *qnrA*, seguido pelo isolamento de vários genes relacionados, como *qnrB* e *qnrS*. Cada gene codifica uma proteína Qnr diferente e *qnrA* foi o primeiro a ser caracterizado. Os genes *qnr* parecem conferir resistência às quinolonas por dois mecanismos diferentes: elas diminuem a ligação da girase e da topoisomerase IV ao DNA, como também se ligam à girase e à topoisomerase IV e inibem as quinolonas de entrar nos complexos de clivagem formados pelas enzimas (30).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar mecanismos moleculares de resistências de isolados bacterianos oriundas de hospitais do estado de Pernambuco.

1.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os mecanismos moleculares de resistência antimicrobiana entre os isolados resistentes;
- Analisar a evolução da resistência aos antimicrobianos nos patógenos provenientes dos hospitais incluídos no estudo;
- Avaliar os perfis de resistência mais prevalentes entre os isolados estudados;

2. METODOLOGIA

2.1. LINHAGENS BACTERIANAS

Neste estudo foram incluídos isolados clínicos bacterianos obtidos a partir de um estudo multicêntrico (PPSUS) em hospitais terciários de grande porta da rede pública de saúde do estado de Pernambuco localizados no

Sertão (Petrolina) e região metropolitana do Recife, no período de 12 meses (2018-2019). Durante esse período foram coletadas 10 (dez) primeiras cepas bacterianas isoladas consecutivamente durante cada mês, provenientes de infecção primária de pacientes únicos, divididas entre sangue (4 (quatro) primeiras amostras bacterianas de hemocultura), trato (3 (três) primeiras amostras de infecção do trato respiratório) e urina (3 (três) primeiras amostras de infecção do trato urinário). Sendo que para este estudo foram utilizados isolados que apresentaram perfil de resistência a pelo menos 2 classes de antimicrobianos, ou seja, apresentam perfil de resistência a multidrogas (MDR). Os microrganismos foram previamente identificados e caracterizados pelo sistema automatizado Vitek2® (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Após o isolamento e identificação, as cepas foram transferidas para meio de conservação, em glicerol a 15% e caldo Mueller Hinton (HIMEDIA®; Mumbai - India), contendo diferentes antimicrobianos para manter a pressão seletiva, as cepas permaneceram em estoque congelado, a -80°C, até o dia de uso.

2.2. OBTENÇÃO DO DNA

O DNA utilizado nas análises moleculares foi obtido utilizando-se suspensões bacterianas constituídas de colônias frescas (crescidas por 16-18 horas em ágar Mueller Hinton) inoculadas em aproximadamente 300µL de água ultrapura livre de nuclease, homogeneizadas com o auxílio de um agitador de tubos vórtex (Vision Scientific)

2.3. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DOS GENES DE RESISTÊNCIA

A identificação molecular dos genes de resistência de β-lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, *bla*_{KPC}) foi realizada através da técnica de PCR (*Reação em cadeia da polimerase*) utilizando os *primers* da seguinte tabela:

Tabela 1 *Primers* utilizados para detecção de genes de resistência β-lactamase

Genes	Sequência 5'3'	Tamanho do Amplicon (pb)	Referência

CTX	F	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	550pb	(5)
	R	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG		
SHV	F	TTATCTCCCTGTTAGCCACC	790pb	(6)
	R	GATTTGCTGATTTGCTCGG		
TEM	F	TCG GGG AAA TGT GCG CG	929pb	(5)
	R	TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC		
KPC	F	TGTCACTGTATCGCCGTC	1011pb	(17)
	R	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
qnrA	F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580pb	(39)
	R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC		
qnrB	F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264pb	(39)
	R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA		
qnrS	F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428pb	(39)
	R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG		
qnrC	F	GGG TTG TAC ATT TAT TGA ATC	447pb	(40)
	R	TCC ACT TTA CGA GGT TCT		
qnrD	F	CGA GAT CAA TTT ACG GGG AAT A	582pb	(41)
	R	AAC AAG CTG AAG CGC CTG		

2.3.1. Condições das PCR

As reações para PCR foram preparadas para volume final de 25µL contendo tampão (*GoTaq® Colorless Flexi Reaction Buffer, PROMEGA*), Água, 200µM de dNTP, 2mM de MgCl₂ (PROMEGA) e *Primers* na concentração 10 µM.

Para o gene *bla*_{CTX} a seguinte ciclagem foi utilizada, 2 minutos a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de amplificação contendo: 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 56 °C, 1 minuto a 72 °C e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Para o gene *bla*_{TEM} a ciclagem utilizada foi 2 minutos a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 45 segundos a 55 °C, 1 minuto a 72 °C e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Já para o gene *bla*_{SHV} a ciclagem utilizada foi 2 minutos a 94 °C, seguidos por 30 ciclos de 45 segundos a 94 °C, 1 minuto a 55 °C, 1 minuto a 72 °C e 10 minutos a 72 °C para extensão final. Para o gene *bla*_{KPC} 5 minutos a 95 °C, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 95 °C, 30

segundos a 58 °C e 1 minuto e 30 a 72 °C e para a extensão final 10 minutos a 72 °C

Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% por 1 hora.

2.4. DETERMINAÇÃO DO PERFIL CLONAL

A relação clonal entre os isolados foi realizada a partir da investigação de sequências palindrômicas extragênicas repetidas (REP). A técnica de REP-PCR é baseada no uso de *primers* sintetizados a partir de sequências repetidas de DNA altamente conservadas. É um método capaz de gerar impressões digitais (fingerprints) do DNA estudado, possibilitando a diferenciação de bactérias entre gêneros e espécies a fim de confirmar e delinear comportamentos de transmissão de um ou mais clones epidêmicos, testar hipóteses sobre fontes e veículos de transmissão destes clones e monitorar seus reservatórios, contribuindo na vigilância epidemiológica dessas cepas (21). A reação foi realizada com os primers (5'- IIIGCGCCGICATCAGGC-3' e 5'-ACGTCTTATCAGGCCTAC-3') e condições descritas por Villa et al., 1996 (20).

3. RESULTADOS

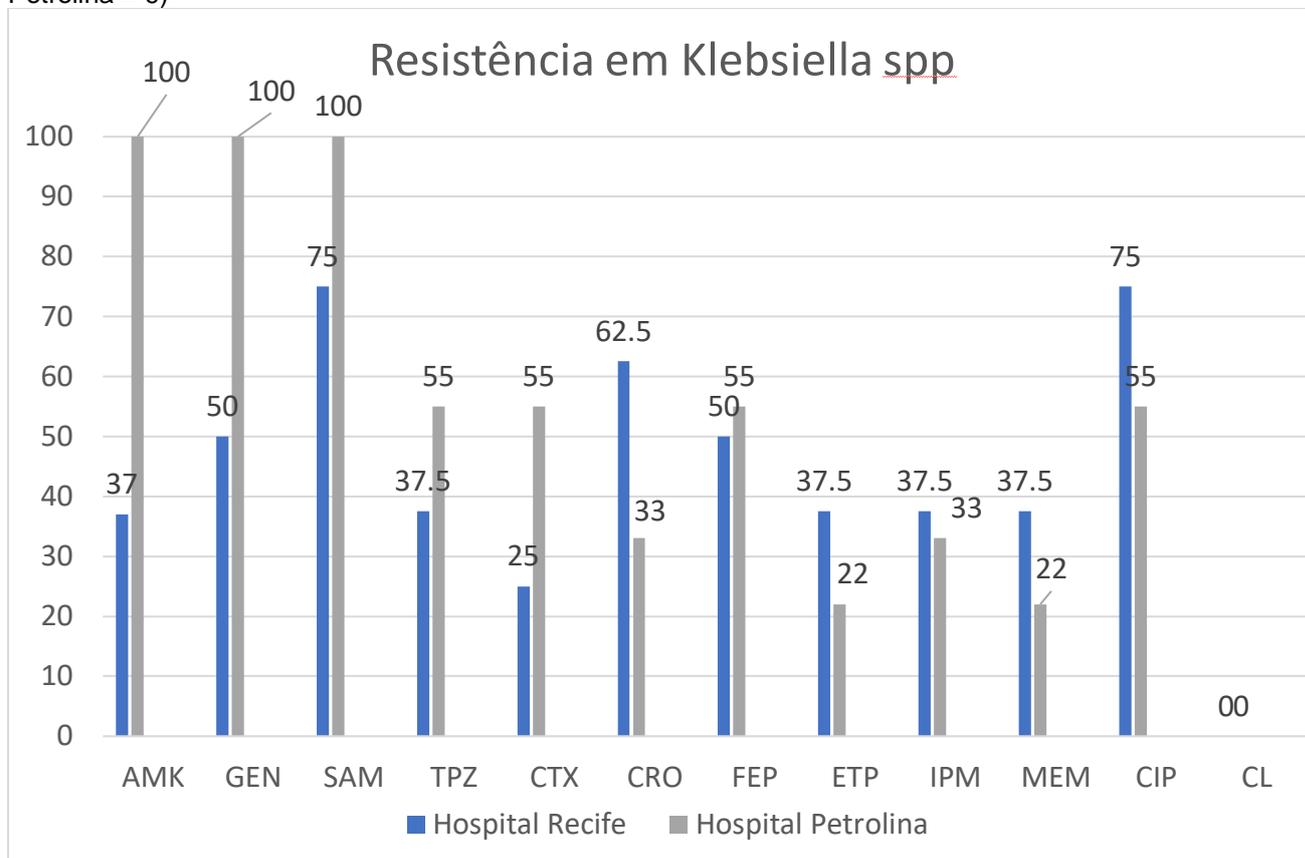
3.1. PERFIL FENOTÍPICO DE RESISTÊNCIA

Foram analisadas 22 amostras coletadas a partir de sangue e urina em 2 hospitais de Pernambuco, na qual 13 isolados pertencem ao Hospital Universitário Oswaldo Cruz- Recife e as outras 9 são do Hospital Universitário UNIVASF- Petrolina. Os isolados pertencem a ordem *Enterobacterales*, sendo composto por 16 amostras de *Klebsiella pneumoniae*, 1 amostra de *Klebsiella ozaenae*, 4 amostras de *Escherichia coli* e 1 amostra de *Enterobacter spp.* Todos os 22 isolados possuem fenótipo de MDR.

O perfil de resistência entre os isolados de *Klebsiella spp.* foram mais altos no Hospital UNIVASF- Petrolina, destacando se resistência a amicacina, gentamicina e ampicilina sulbactam (100% de isolados resistentes). Também apresentaram níveis acima de 50% de resistência para outras drogas como piperacilina tazobactam, Cefotaxima, cefepime e ciprofloxacina. Enquanto no

Hospital de Recife, apenas ampicilina sulbactam, ceftriaxona e ciprofloxacina apresentaram taxas de resistência acima de 50%. (Figura 4).

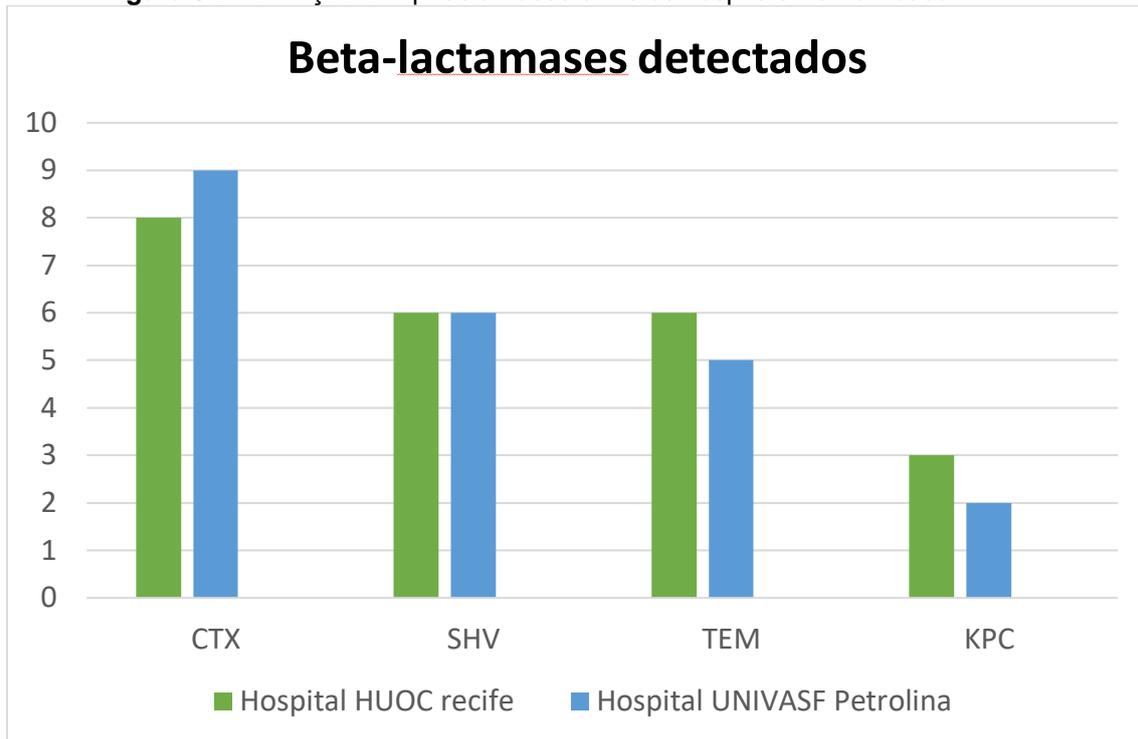
Figura 4 Percentual de Resistência em *Klebsiella* spp. (Hospital Recife = 8; Hospital de Petrolina = 9)



3.2. DETECÇÃO DOS GENES ESBLs e KPC

As análises dos genes de resistência de β -lactamases (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX}, *bla*_{KPC}) demonstraram que o gene de resistência mais detectado foi o *bla*_{CTX}, identificado em 18 isolados, seguido por *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} ambos em 12 isolados, e, por último o *bla*_{KPC} presente em 5 isolados (Figura 5). Apenas em dois isolados *Klebsiella pneumoniae* U40433 e *Klebsiella ozaenae* S4041, ambos do hospital de Recife, não se detectou nenhum dos genes testados.

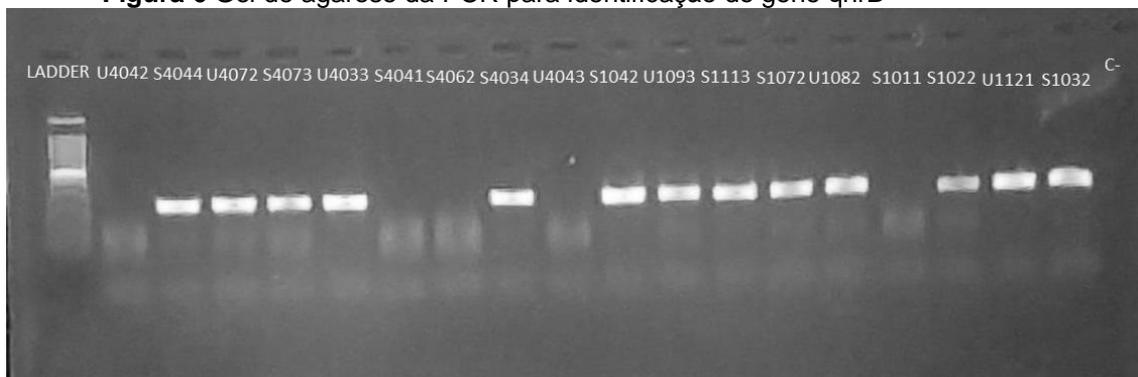
Figura 5 Distribuição das β -lactamases entre os hospitais Pernambuco



3.3. DETECÇÃO DO GENE *qnr*

Os genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* foram investigados através de PCRs. Apenas o gene *qnrB* foi identificado em 13 isolados, sendo eles *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* Portanto, não foi detectado nenhuma das *qnr* nas amostras de *E.coli* (Figura 6).

Figura 6 Gel de agarose da PCR para identificação do gene *qnrB*



Fonte: Elaborada pelo autor

Legenda: Linha 1- Marcador molecular de 100pb, seguido pelos isolados, e por último o controle negativo (C-).

3.4. RELAÇÃO CLONAL ENTRE OS ISOLADOS

A partir análise da relação clonal entre os isolados, utilizando a técnica de REP-PCR e seguindo os critérios interpretativos de Tenover, 1995, foi possível estabelecer um esquema de relação clonal preditiva entre os isolados desse estudo. O padrão de bandas exibidos por cada cepa foi comparado e os isolados foram considerados similares ou indistinguíveis entre si (Figuras 7, 8, 9).

Figura 7 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* do Hospital Universitário Oswaldo Cruz- Recife

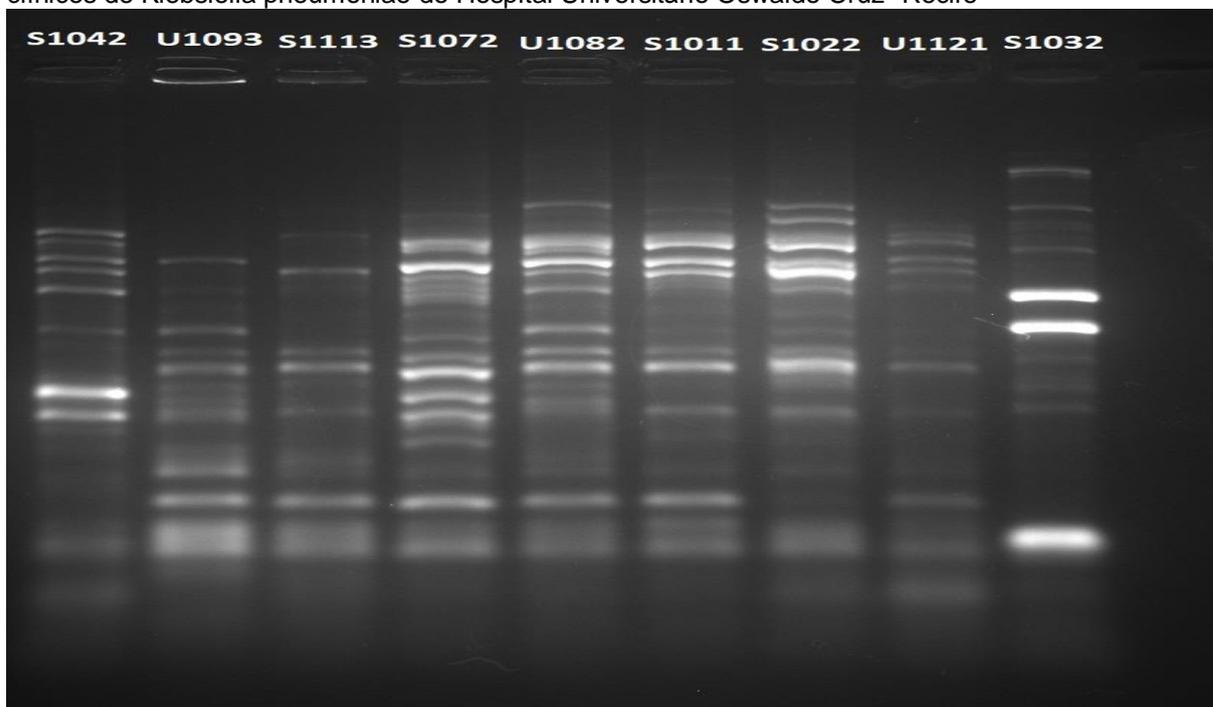


Figura 8 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* do Hospital Universitário-UNIVASF- Petrolina

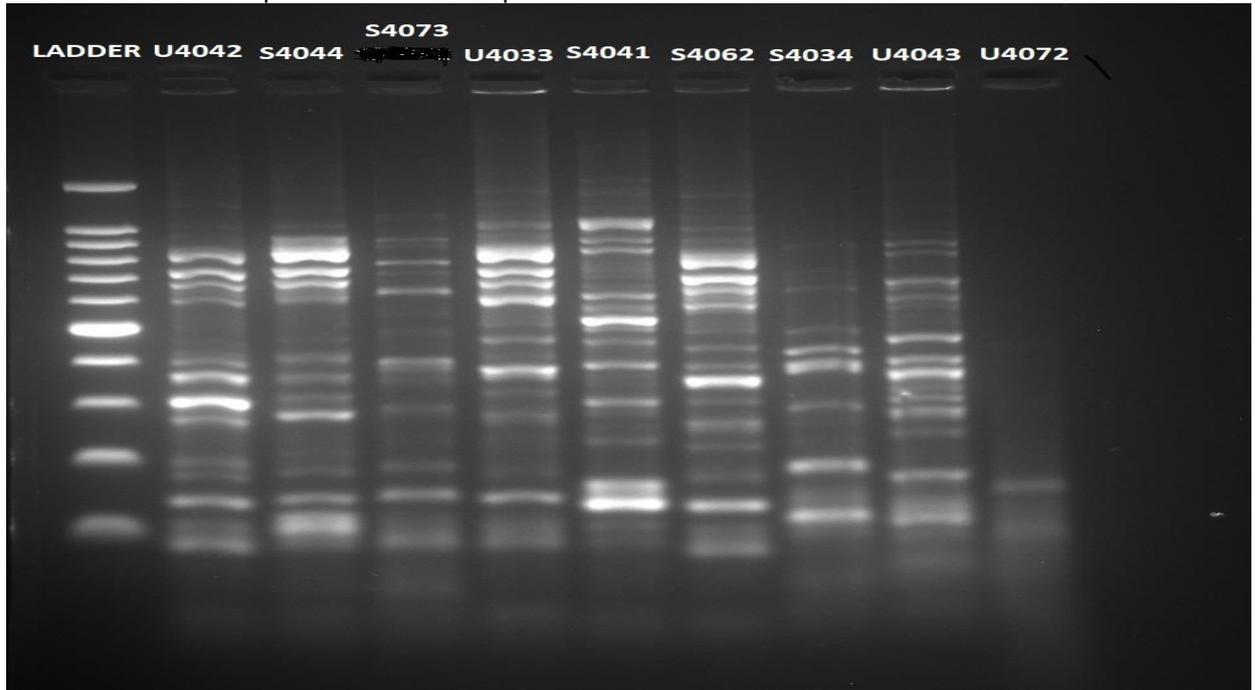
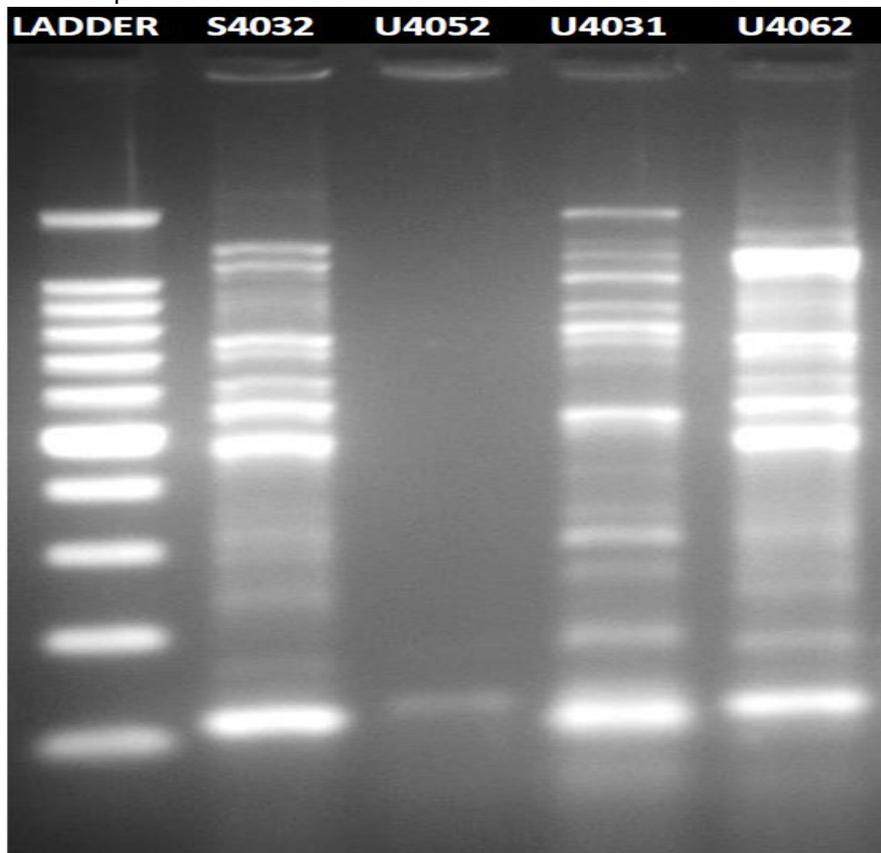


Figura 9 Gel de agarose a 2% referente a eletroforese de REP-PCR de isolados clínicos de *E. coli* do Hospital Universitário-UNIVASF- Petrolina



No geral, o padrão apresentado pelas cepas variou de 1 a 5 bandas não compartilhadas entre cada grupo da mesma espécie, o que indica um alto padrão de similaridade entre os isolados. Com esses resultados pode ser observado que, no Hospital Universitário Oswaldo Cruz- Recife, pode ter havido uma disseminação de um único clone entre os pacientes internados na UTI, o que é corroborado pelo perfil de resistência, data de coleta e compartilhamento de bandas similares na REP-PCR entre isolados S1072, U1082, U1093 demonstrados no quadro 2.

Quadro 2 Grupos clonais de *K. pneumoniae*

Hospital	Isolado	Data	Gene de resistência	Resistência ao β -lactâmicos	UTI	Grupo Clonal
Recife	S1022	03.04.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> TEM,	AMP/SAM/FEP/CAZ/CRO/CXM	Não	A
	S1072	11.09.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV,	ATM/CEF/FEP	Sim	
	U1082	08.10.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> KPC-2, <i>Bla</i> TEM, <i>Bla</i> SHV	AMP/SAM/FEP/CTX/FOX/AZ/CXM/TZP/ETP/IPM/MEM	Sim	
	U1093	14.11.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> KPC-2, <i>Bla</i> TEM,, <i>Bla</i> SHV	AMP/SAM/ FEP/ CTX/ FOX/ CAZ/ CXM/CRO/TZP/ETP/IPM/ME M	Sim	
	S1113	07.01.20	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV, <i>Bla</i> TEM	AMP/FEP/CAZ/CRO	Não	B
	U1121	03.02.20	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> KPC-2, <i>Bla</i> SHV	AMP/FEP/CAZ/CRO/ETP/IPM	Não	C
	S1042	06.06.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> KPC-2, <i>Bla</i> TEM	FEP/CAZ/CRO/CXM/TZP	Não	—
Petrolina	S4034	13.05.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> KPC-2, <i>Bla</i> TEM	AMP/SAM/FEP/FOX/CRO/TZP/IMP/MEM	Sim	D
	U4042	05.06.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV, <i>Bla</i> TEM	AMP/SAM/FEP/CTX/TZP	Não	E
	S4044	18.06.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV, <i>Bla</i> TEM	AMP/SAM/FEP/CRO/TZP	Não	
	U4033	20.05.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV	AMP/SAM/FEP/FOX/CRO/TZP/MEM	Não	F
	S4041	04.06.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV, <i>Bla</i> TEM	AMP/SAM/CTX	Não	
	U4072	20.09.19	<i>Bla</i> CTX-M, <i>Bla</i> SHV	AMP/SAM/CTX/FEP/TZP	Não	
	S4062	03.08.19	<i>Bla</i> SHV	AMP/SAM	Não	

Quadro 3 Grupo clonal de *E. coli*

Hospital	Isolado	Data	Gene de resistência	Resistência ao β -lactâmicos	UTI	Grupo Clonal
Petro lina	U4052	03.07.19	<i>Blactx-M</i>	AMP/SAM/FEP/CRO/TZP	Não	—
	U4031	06.05.19	<i>BlaCTX-M</i> , <i>BlaTEM</i> ,	AMP/SAM/FEP/CRO	Não	G
	U4062	03.08.19	<i>Blactx-M</i>	AMP/SAM/FEP/CTX/CRO/TZP	Não	
	S4032	03.05.19	<i>BlaTEM</i>	AMP/SAM/FEP/CTX/T ZP	Não	

4. DISCUSSÃO

Desde os primeiros estudos sobre ESBL no Brasil, tem sido detectado cada vez mais isolados produtores de ESBL em ambientes hospitalares e comunitários, se tornando um importante causa de infecção. O gene do tipo CTX-M é o mais prevalente no cenário brasileiro com a suas variantes (CTX-M2, M8, M9, M14, M15 e M16), sendo a variante M2 a mais detectada e também, a mais prevalente em diferentes espécies na ordem *Enterobacterales* (7,8). A investigação dos genes de β -lactamases nesse estudo, confirmou a alta prevalência do gene *bla_{CTX}* comparada aos outros genes, condizendo com o cenário brasileiro de produtores de ESBLs.

O mecanismo de resistência mais importante na ordem *Enterobacterales* é a produção de β -lactamases, mas frequentemente são acompanhados por outros genes que conferem resistência a diferentes famílias de antibióticos, como por exemplo, fluoroquinolonas, forçando o uso de antimicrobianos mais potentes como carbapenêmicos, que além de ter custo elevado, pode ser um fator no aparecimento de carbapenemases (3). No Brasil, nos últimos 5-6 anos, foi observado um aumento na taxa de resistência a carbapenêmicos, principalmente de infecções decorrentes de patógenos como *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, sendo o gene *bla_{KPC-2}* o mais prevalente em isolados de *K. pneumoniae* (8). No entanto, nesse estudo, apesar de todos os isolados apresentarem perfil de resistência MDR, incluindo 11 isolados com perfil de resistência a algum dos três carbapenêmicos (Meropenem,

Ertapenem, Imipenem), em apenas 5 deles foi detectado o gene *bla*_{KPC-2} nas análises por PCR. A resistência aos carbapenêmicos nem sempre é conferida pelo gene *bla*_{KPC-2}, podendo também ser causada pela associação de enzimas ESBLs com outra enzima como AmpC, ou até associação entre os mecanismos de resistência, como por exemplo diminuição da permeabilidade celular, junto com a produção de β -lactamases pode também conferir resistência aos carbapenêmicos (18).

As quinolonas são uma das classes mais prescritas de medicamentos para infecções do trato urinário. Na América Latina, o uso das quinolonas é bastante amplo e muitas vezes indiscriminado, no Brasil as quinolonas são a terceira classe de antimicrobianos mais prescrita, sendo frequentemente utilizada sem indicação racional, que é bastante preocupante pois essa classe de antibiótico é reconhecida por induzir alta resistência antimicrobiana. Embora o principal mecanismo que confere resistência de alto nível às quinolonas sejam as mutações cromossômicas, o gene de resistência às quinolonas mediado por plasmídeo é a principal via de disseminação da resistência às quinolonas em todo o mundo (46).

Os genes de qnrs são encontrados em uma variedade de *Enterobacteriales*, especialmente em *E.coli* e espécies de *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Salmonella*. Entre as qnrs, o *qnrB* parece ser mais prevalente do que os outros (42). Também existe uma forte relação entre Genes qnr e β -lactamases que são geralmente encontrados em plasmídeos de resistência múltipla, que pode significar que os genes qnr também podem ser transmitidos pelo mesmo plasmídeo (45).

Neste estudo foi detectado apenas o gene *qnrB*, apesar da maioria dos isolados apresentarem alta taxa de resistência as quinolonas. Isso indica possível envolvimento de outros mecanismos de resistência, como mutações cromossômicas no gene para a subunidade DNA-girase *gyrA*, *gyrB*, também mutações nos genes que codificam topoisomerase IV (*parC* e *parE*), também são conhecidos por causar resistência a quinolonas (45). experimentos devem ser investigados para confirmar a presença dessas mutações.

A avaliação do perfil clonal por REP-PCR revelou uma possível endemicidade de um único tipo clonal, resistente a maioria dos b-lactâmicos, na Unidade de terapia Intensiva do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-

Recife, disseminado em amostras de sangue e urina. Essa disseminação monoclonal pode indicar falhas nas práticas de controle de infecção durante o tratamento na Unidade de Terapia Intensiva. Também é possível observar uma evolução no perfil de resistência no grupo clonal A das *Klebsiella pneumoniae* no hospital de Recife, onde a primeira amostra coletada apresentou um perfil de resistência mais brando e nas amostras seguintes se observa um aumento no perfil de resistência aos β -lactâmicos, que por sua vez, condiz com os genes de resistência encontrados (quadro 2).

Além disso, também se destacam o grupo clonal F de *K. pneumoniae* e o grupo G de *E. coli*, ambos pertencentes ao Hospital de Petrolina, por terem sido coletados em meses consecutivos, que implica que esses grupos podem estar disseminados já há um tempo dentro desse Hospital (quadro 3).

As causas e fatores que contribuem para disseminação de bactérias MDR em unidades de terapia intensiva são várias, que incluem o uso exacerbado de antimicrobianos de amplo espectro, práticas precárias de controle de infecção ou má higienização do ambiente hospitalar (22). As mãos dos profissionais de saúde já foram identificadas como fonte de surtos de infecção em serviços de saúde causados por bactérias Gram-negativas multirresistentes (43,44).

A resistência antimicrobiana é um problema grave que afeta o mundo todo, dificultando tratamento em infecções causadas por patógenos bacterianos, sendo uma das principais causas do aumento da morbidade e mortalidade, além de aumentar os custos no serviço de saúde como já mencionado (3). Esse fato se agrava progressivamente pela própria natureza da evolução da resistência bacteriana, obrigando o uso de antimicrobianos mais potentes, que por sua vez é um fator no desenvolvimento de novos mecanismos de resistência (19). Para mitigar esse problema, diferentes estratégias devem ser adotadas para prevenir a rápida expansão da resistência bacteriana, com ênfase principalmente na vigilância epidemiológica dos principais mecanismos de resistência presentes no momento, a fim de maximizar o uso correto dos antibióticos. Outras medidas como isolamento dos infectados e diagnóstico rápido também são importantes. (3,1)

5. CONCLUSÃO

Os resultados revelaram alta taxa de resistência aos aminoglicosídeos, cefalosporina 3^o e 4^o geração no Hospital UNIVASF-Petrolina, que é bastante preocupante pois demonstra uma grande limitação nas opções de tratamento nesse hospital, destacando ainda mais a necessidade de se ter uma melhor estratégia em relação ao uso dos antibióticos.

Os genes mais prevalentes encontrados nesse estudo, condiz com outros estudos epidemiológico das enzimas β - lactamases.

As análises da relação clonal revelaram Possível disseminação de um único clone na UTI no Hospital HUOC-Recife, e evolução do perfil de resistência desse clone. E consolidação de grupos clonais de *K.p.* e *E.coli* no Hospital UNIVASF-Petrolina.

6. REFERÊNCIAS

1. Wanda C Reygaert. An overview of the antimicrobial resistance mechanisms of bacteria[J]. AIMS Microbiology, 2018, 4(3): 482-501.
2. Blair, J. M. A., Webber, M. A., Baylay, A. J., Ogbolu, D. O., & Piddock, L. J. V. (2014). Molecular mechanisms of antibiotic resistance. Nature Reviews Microbiology, 13(1), 42–51.
3. Arias-León, G. (2017). Resistance Mechanisms: A Problem and an Approach to the Solution. Sepsis, 73–93.
4. Saladin M, Cao VT, Lambert T, Donay JL, Herrmann JL, Ould-Hocine Z, et al. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from Enterobacteriaceae isolated in three Parisian hospitals. FEMS Microbiol Lett 2002;209:161–8.
5. Cao, V., Lambert, T., & Courvalin, P. (2002). ColE1-Like Plasmid pIP843 of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Extended-Spectrum - Lactamase CTX-M-17. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46(5), 1212–1217.
6. Arlet G, Rouveau M, Philippon A Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum beta-lactamase. FEMS Microbiol Lett 1997;152:163–7.

7. Flávia Rossi, The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 52, Issue 9, 1 May 2011, Pages 1138–1143.
8. Sampaio, J. L. M., & Gales, A. C. (2016). Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on β -lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47, 31–37.
9. E. Etebu, I. Arikekpar, Antibiotics: classification and mechanisms of action with emphasis on molecular perspectives, *Int. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. Res.* (2016).
10. King D.T., Sobhanifar S., Strynadka N.C.J. (2017) The Mechanisms of Resistance to β -Lactam Antibiotics. In: Gotte M., Berghuis A., Matlashewski G., Wainberg M., Sheppard D. (eds) *Handbook of Antimicrobial Resistance*. Springer, New York, NY.
11. KONG, K.-F., SCHNEPER, L. and MATHEE, K. (2010), Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS*, 118: 1-36
12. Farinha, S., Cardoso, B. K., Tomaz, E., & Inácio, F. Perfis de sensibilização às cefalosporinas na prática clínica.
13. BREWER, N. S., & HELLINGER, W. C. (1991). The Monobactams. *Mayo Clinic Proceedings*, 66(11), 1152–1157.
14. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*. February 2016:15-21.
15. Haque M, Sartelli M, McKimm J, Abu Bakar M. Health care-associated infections - an overview. *Infect Drug Resist.* 2018;11:2321-2333. Published 2018 Nov 15.
16. WHO. WHO PUBLISHES LIST OF BACTERIA FOR WHICH NEW ANTIBIOTICS ARE URGENTLY NEEDED. *Saudi Med J* [Internet]. 2017 [cited 2021 Jul 26];38(4):444–5. Available from: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
17. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae* [published correction appears in

- Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):809]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001;45(4):1151-1161.
18. PATERSON, D.; BOBOMO, R. Extended-spectrum betalactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev*, v. 18, p. 657-86, 2005.
 19. ASLAM, Bilal et al. Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. *Infection and drug resistance*, v. 11, p. 1645, 2018.
 20. Vila J, Marcos MA, Jimenez De Anta MT. A comparative study of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for typing of the *Acinetobacter calcoaceticus*-*A. baumannii* complex. *J Med Microbiol* [Internet]. 1996 Jun 1 [cited 2021 Jul 26];44(6):482–9. Available from: <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jmm/10.1099/00222615-44-6-482>.
 21. Versalovic J, Koeuth T, Lupski R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res.* 1991;19(24):6823–31.
 22. Al-Dorzi HM, Arabi YM. Outbreaks in the adult ICUs. *Curr Opin Infect Dis.* 2017 Aug;30(4):432-439. doi: 10.1097/QCO.0000000000000387. PMID: 28520621.
 23. Shukuri, Jiregna Dugassaand Nesrie. "REVIEW ON ANTIBIOTIC RESISTANCE AND ITS MECHANISM OF DEVELOPMENT.
 24. Mehrad, Borna, et al. "Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections." *Chest* 147.5 (2015): 1413-1421.
 25. Bonomo, R. A., Burd, E. M., Conly, J., Limbago, B. M., Poirel, L., Segre, J. A., & Westblade, L. F. (2017). Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clinical Infectious Diseases*, 66(8), 1290–1297.
 26. Adeolu M, Alnajar S, Naushad S, S Gupta R. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016 Dec;66(12):5575-5599

27. LIMA, Mariana Magaldi de Souza et al. Detecção de Enterobacterales produtoras de carbapenemases em pacientes colonizados, atendidos em um Hospital Universitário. *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, v. 13, n. 2, 10p, Fev. 2021.
28. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem*. 2017 May 5;131:185-195
29. Porreca AM, Sullivan KV, Gallagher JC. The Epidemiology, Evolution, and Treatment of KPC-Producing Organisms. *Curr Infect Dis Rep*. 2018 May 5;20(6):13
30. Bush NG, Diez-Santos I, Abbott LR, Maxwell A. Quinolones: Mechanism, Lethality and Their Contributions to Antibiotic Resistance. *Molecules*. 2020 Dec 1;25(23):5662
31. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry*. 2014 Mar 18;53(10):1565-74.
32. Bush K. Past and Present Perspectives on β -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Sep 24;62(10):e01076-18
33. Martinez JL. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov Today Technol*. 2014 Mar;11:33-9.
34. Saravanan M, Ramachandran B, Barabadi H. The prevalence and drug resistance pattern of extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing Enterobacteriaceae in Africa. *Microb Pathog*. 2018 Jan;114:180-192.
35. Villegas MV, Esparza G, Reyes J. Should ceftriaxone-resistant Enterobacterales be tested for ESBLs? A PRO/CON debate. *JAC Antimicrob Resist*. 2021 May 7;3(2):dlab035.
36. Doi Y, Iovleva A, Bonomo RA. The ecology of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the developed world. *J Travel Med*. 2017 Apr 1;24(suppl_1):S44-S51.
37. Rocha FR, Pinto VP, Barbosa FC. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. *Microb Drug Resist*. 2016 Jun;22(4):301-11.

38. Suay-García B, Pérez-Gracia MT. Present and Future of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) Infections. *Antibiotics (Basel)*. 2019 Aug 19;8(3):122.
39. CATTOIR, V. *et al.* Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, London, v. 60, n. 2, p. 394–397, Ago. 2007.
40. WANG, X. D. *et al.* Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. **Journal of medical microbiology**, Edinburgh, v. 58, n. 9, p. 1196-1202, Set 2009
41. CAVACO, L. M. *et al.* qnrD, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and Bovismorbificans strains of human origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 53, n. 2, p. 603–608, Fev. 2009.
42. Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31. doi:10.1111/nyas.12830
43. Lin NT. [Common antimicrobial-resistant bacteria in nosocomial infections in Taiwan and their prevention]. *Hu Li Za Zhi*. 2011 Aug;58(4):5-10
44. Russotto V, Cortegiani A, Raineri SM, Giarratano A. Bacterial contamination of inanimate surfaces and equipment in the intensive care unit. *J Intensive Care*. 2015 Dec 10;3:54.
45. Salah FD, Soubeiga ST, Ouattara AK, Sadji AY, Metuor-Dabire A, Obiri-Yeboah D, Banla-Kere A, Karou S, Simpore J. Distribution of quinolone resistance gene (qnr) in ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Lomé, Togo. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2019 Jun 18;8:104.
46. Vieira, D. C., Lima, W. G., & de Paiva, M. C. (2019). Plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) among Enterobacteriales in Latin America: a systematic review. *Molecular Biology Reports*.