



UNIVERSIDADE CEUMA - UNICEUMA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

**Caracterização molecular de linhagens clínicas de *Providencia rettgeri*  
transportando os genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>***

Wallace Ribeiro Nunes Neto

São Luís-MA

2017



UNIVERSIDADE CEUMA - UNICEUMA  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO, PESQUISA E EXTENSÃO  
MESTRADO EM MEIO AMBIENTE

**Caracterização molecular de linhagens clínicas de *Providencia rettgeri*  
transportando os genes *bla<sub>NDM</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>***

Wallace Ribeiro Nunes Neto

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Meio Ambiente da Universidade CEUMA, para obtenção do grau de Mestre em Meio Ambiente.

**Orientador:** Profa. Dra. Andrea de Souza Monteiro

São Luís-MA

2017

# 1 **Caracterização molecular de linhagens clínicas de *Providencia rettgeri*** 2 **transportando os genes *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>**

## 3 **Resumo**

4 *Providencia rettgeri* é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído no meio  
5 ambiente e atualmente é considerado um patógeno emergente, associado a infecções  
6 nosocomiais. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil de susceptibilidade  
7 antimicrobiana de linhagens de *P. rettgeri* isoladas de amostras clínicas e realizar uma  
8 caracterização genômica das linhagens *P. rettgeri* PR01 e *P. rettgeri* PR02. Neste  
9 estudo foram isoladas oito (08) linhagens de *P. rettgeri* a partir de amostras clínicas de  
10 pacientes atendidos em unidades de terapia intensiva. A presença do gene *bla*<sub>NDM</sub> foi  
11 determinada pela reação de PCR. Além disso, as concentrações mínimas inibitórias  
12 (CIM) dos antimicrobianos foram determinadas usando o sistema automatizado  
13 VITEK-02. Os genomas das linhagens PR01 e PR02, caracterizadas como  
14 transportadora dos genes *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> foram sequenciados utilizando a plataforma  
15 Illumina - MiSeq. Após o sequenciamento, as sequências de DNA genômico pré-  
16 montadas foram anotadas usando o software Prokka. Uma análise complementar do  
17 genoma foi realizada utilizando a tecnologia de subsistema de anotação rápida  
18 (RAST). Todas as oito (08) linhagens de *P. rettgeri*, as 08 estavam albergando o  
19 gene *bla*<sub>NDM</sub> e apresentaram resistência ao meropenem. Os valores de CIM, realizados  
20 pelo teste de crescimento em placa variaram de 8-128 µg/mL para o antimicrobiano  
21 meropenem. Uma caracterização genômica parcial para as linhagens *P. rettgeri* PR01  
22 e *P. rettgeri* PR02 utilizando o RAST indicou uma ampla gama de genes relacionados  
23 a bombas de efluxo de drogas antimicrobianas. Os sistemas genéticos foram  
24 caracterizados, como a extrusão de múltiplas drogas (MATE), a divisão de família  
25 (RND), e a grande superfamília do facilitador (MFS). Nestas análises foram detectados  
26 em média 91 genes que estavam relacionados ao subsistema de virulência, doença e  
27 defesa. A análise genômica parcial de *P. rettgeri* PR01 e *P. rettgeri* PR02 confirmou a  
28 presença do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> e outros genes para a resistência à β-lactâmicos,  
29 como *bla*<sub>TEM</sub>. Além disso, foram identificados vários sistemas genéticos para a  
30 produção e liberação de sideróforos, que estão associados à absorção de ferro, e  
31 outros genes, como para receptores e transportadores do anel heme e de hemina.  
32 Cerca de 43 genes foram identificados e expressaram proteínas para absorção e  
33 metabolismo de ferro. A análise do genoma das linhagens PR01 e PR02 mostrou uma  
34 alta concentração de sequências de inserção, elementos móveis e pro-fagos,  
35 sugerindo que a espécie apresenta uma plasticidade genética considerável. Ademais,  
36 ainda foi verificado a presença de diversas ilhas genômicas, associadas a marcadores  
37 de persistência frente a ao estresse químico e nutricional, como o sistema-toxina e  
38 antitoxina, contendo os genes *PasI* e *PasT*. A diversidade de elementos genéticos  
39 em *P. rettgeri* relacionados aos mecanismos de resistência a antimicrobianos, pode  
40 levar a curto prazo uma ineficiência das terapias antimicrobianas no combate a  
41 infecções causadas por este micro-organismo, e sua rápida acessão como patógeno é  
42 resultado de sua plasticidade genética.

43 **Palavras-chave:** *Providencia rettgeri*, gene *bla*<sub>NDM</sub>, gene *bla*<sub>TEM</sub> resistência  
44 antimicrobiana.

1

## 2 **Abstract**

3 *Providencia rettgeri* is a Gram-negative bacillus widely distributed in the environment  
4 and is currently considered an emerging pathogen, mainly associated with nosocomial  
5 infections. The objective of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility  
6 profile of *P. rettgeri* strains isolated from clinical samples and to perform a genomic  
7 characterization of the *P. rettgeri* PR01 and *P. rettgeri* PR02 strains. In this study eight  
8 (08) strains of *P. rettgeri* were isolated from clinical samples of patients seen in  
9 intensive care units. The presence of the  $bla_{NDM}$  gene was determined by the PCR  
10 reaction. In addition, the minimum inhibitory concentrations (MIC) of antimicrobials  
11 were determined using the VITEK-02 automated system. The genomes of the PR01  
12 and PR02 strains, characterized as carrier of the  $bla_{NDM-1}$  and  $bla_{TEM}$  genes were  
13 sequenced using the Illumina-MiSeq platform. After sequencing, the pre-assembled  
14 genomic DNA sequences were annotated using the Prokka software. A complementary  
15 genome analysis was performed using the Fast Annotation Subsystem  
16 technology (RAST). All eight (08) of *P. rettgeri* isolates, 08 (eight) were harboring the  
17  $bla_{NDM}$  gene and showed resistance to meropenem. The MIC values, performed by the  
18 plaque growth test ranged from 8-128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for the antimicrobial meropenem. A partial  
19 genomic characterization for the strains *P. rettgeri* PR01 and *P. rettgeri* PR02 using  
20 RAST serve indicated a wide range of genes related to efflux pumps of antimicrobial  
21 drugs, as genetic systems were characterized, such as multiple drug extrusion (MATE),  
22 the and the large family of the facilitator (MFS), in which a total of 91 genes were  
23 identified that were related to the virulence, disease and defense subsystem. The partial  
24 genomic analysis of *P. rettgeri* PR01 and *P. rettgeri* PR02 confirmed the presence of  
25 the  $bla_{NDM-1}$  gene and other genes for  $\beta$ -lactam resistance, such as  $bla_{TEM}$ . In addition,  
26 several genetic systems were identified for the production and release of siderophores,  
27 which are associated with iron absorption, and other genes, as well as for heme ring  
28 and hemine receptor and transporters. About 43 genes were identified and expressed  
29 proteins for uptake and metabolism of iron. Genome analysis of the PR01 and PR02  
30 strains showed a high concentration of insertion sequences, motile elements and  
31 prophages, suggesting that the species presents a considerable genetic plasticity. It  
32 was also verified the presence of several genomic islands, associated to persistence  
33 markers in relation to chemical and nutritional stress, such as the toxin and antitoxin  
34 system, containing the *Pasl* and *Past* genes. The diversity of genetic elements in *P.*  
35 *rettgeri* related to mechanisms of antimicrobial resistance can lead in the short term to  
36 an inefficiency of antimicrobial therapies in the fight against infections caused by this  
37 microorganism and its rise rapid as pathogen is a result of genetic plasticity.

38 **Key words:** *Providencia rettgeri*,  $bla_{NDM}$  gene,  $bla_{TEM}$  gene, antimicrobial  
39 resistance

40

1  
2 **Caracterização molecular de linhagens clínicas de *Providencia rettgeri***  
3 **transportando os genes *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>TEM</sub>**

4 **Resumo**

5 *Providencia rettgeri* é um bacilo Gram-negativo amplamente distribuído no  
6 meio ambiente e atualmente é considerado um patógeno emergente,  
7 associado a infecções nosocomiais. O objetivo deste estudo foi analisar o perfil  
8 de susceptibilidade antimicrobiana de linhagens de *P. rettgeri* isoladas de  
9 amostras clínicas e realizar uma caracterização genômica das linhagens *P.*  
10 *rettgeri* PR01 e *P. rettgeri* PR02. Neste estudo foram isoladas oito (08)  
11 linhagens de *P. rettgeri* a partir de amostras clínicas de pacientes atendidos em  
12 unidades de terapia intensiva. A presença do gene *bla*<sub>NDM</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> foi  
13 determinada por Multiplex PCR. Os genomas das linhagens PR01 e PR02,  
14 caracterizadas como transportadora dos genes *bla*<sub>NDM-1</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> foram  
15 sequenciados utilizando a plataforma Illumina - MiSeq. Após o  
16 sequenciamento, as sequências de DNA genômico pré-montadas foram  
17 anotadas usando o software Prokka. Uma análise complementar do genoma foi  
18 realizada utilizando a tecnologia de subsistema de anotação rápida (RAST).  
19 Esta caracterização indicou uma ampla gama de genes relacionados a bombas  
20 de efluxo de drogas antimicrobianas. Os sistemas genéticos foram  
21 caracterizados, como a extrusão de múltiplas drogas (MATE), a divisão de  
22 família (RND), e a grande superfamília do facilitador (MFS). Nestas análises  
23 foram detectados em média 91 genes que estavam relacionados ao  
24 subsistema de virulência, doença e defesa. Além disso, foram identificados  
25 vários sistemas genéticos para a produção e liberação de sideróforos, que  
26 estão associados à absorção de ferro, e outros genes, como para receptores e  
27 transportadores do anel heme e de hemina. Cerca de 43 genes foram  
28 identificados e expressaram proteínas para absorção e metabolismo de ferro. A  
29 análise do genoma das linhagens PR01 e PR02 mostrou uma alta  
30 concentração de sequências de inserção, elementos móveis e pro-fagos,  
31 sugerindo que apresenta uma plasticidade genética considerável. Ademais,  
32 ainda foi verificado a presença de diversas ilhas genômicas, associadas a  
33 marcadores de persistência frente a ao estresse químico e nutricional, como o  
34 sistema-toxina e antitoxina, contendo os genes *PasI* e *PasT*. A diversidade de  
35 elementos genéticos em *P. rettgeri* relacionados aos mecanismos de  
36 resistência a antimicrobianos, pode levar a curto prazo uma ineficiência das  
37 terapias antimicrobianas no combate a infecções causadas por este micro-  
38 organismo, e sua rápida *ascensã* como patógeno é resultado de sua  
39 plasticidade genética.

40  
41 **Palavras-chave:** *Providencia rettgeri*, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> resistência  
42 antimicrobiana.

43

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32

**Artigo 1**

**2017**

## 1. INTRODUÇÃO

As bactérias são micro-organismos que se caracterizam por apresentar constantes mudanças bioquímicas e fisiológicas devido a uma grande plasticidade do seu material genético (PILLAI et al., 2011). Esta plasticidade genética associada a evolução dinâmica do genoma proporciona uma resposta adaptativa celular rápida frente a pressão seletiva do meio circundante, ampliando de uma maneira significativa o repertório de espécies bacterianas que possuem amplos mecanismos para a resistência a antimicrobianos, além de um amplo espectro de fatores de virulência(PILLAI et al., 2011). Por sua vez, os efeitos das drogas antimicrobianas utilizadas para combater estes patógenos se tornam ineficazes, gerando a uma classe bacteriana conhecida como os *superbugs* (PILLAI et al., 2011).

A partir do surgimento dos “*superbugs*”, foram criados dois novos conceitos com relação a características da resistência a drogas antimicrobianas. Estes conceitos se denominam como *Extensive Drug Resistance* (XDR), que se refere a isolados de bactérias que permanecem como suscetíveis a uma ou duas categorias de drogas antimicrobianas; e o termo *Pandrug Resistance* (PDR), que se refere a isolados bacterianos não sensíveis a todas as categorias de drogas antimicrobianas conhecidas (ARMBRUSTER et al., 2014).

A circulação de bactérias em ambientes nosocomiais com perfis de resistência a drogas antimicrobianas e que se enquadram tanto no padrão XDR quanto no padrão PDR tem causado uma apreensão na comunidade médica, uma vez que drogas de última escolha estão sendo ineficazes para o tratamento de pacientes com infecções graves (ARMBRUSTER. 2014).

Dentre as drogas antimicrobianas de última escolha, os carbapenêmicos são uma classe bem distinta de fármacos, principalmente introduzidos na antibioticoterapia de uso restrito em hospitais (OLAITAN. 2015).

Os carbapenêmicos são utilizados principalmente para o tratamento de infecções causadas por linhagens de bactérias da família Enterobacteriaceae multirresistentes a drogas e produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

(ESBL, do inglês *Extended spectrum beta-lactamase*) (OLAITAN., 2015).Entretanto, o surgimento de resistência bacteriana aos carbapenêmicos tem sido cada vez mais relatado entre as espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae,sendo uma questão de grande preocupação na clínica médica (OLAITAN., 2015).

A resistência bacteriana aos carbapenêmicos e cefalosporinas de uso clínico observada em espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae está relacionada principalmente com a expressão das enzimas serino- $\beta$ -lactamases, das quais a uma das mais importantes, é a enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) (CORDOVA., 2015) A enzima KPC foi detectada pela primeira vez no ano 2000 uma estirpe de *Klebsiella* na Carolina do Norte, nos Estados Unidos (CORDOVA 2015).Até o presente momento o gene blaKPC-2, e suas variantes foram detectado em todos os países, se tornando endêmico em praticamente todas as regiões (POIREL., 2010).

As enzimas do tipo KPC são classificadas no grupo funcional 2f de Bush e conferem resistência a todos os tipos de penicilinas, diversas cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (NORDMAM 2009). As enzimas carbapenemases do tipo KPC constituem um dos mecanismos de resistência a carbapenêmicos mais relevantes em espécies de bactérias da família Enterobacteriaceae. Sendo, que atualmente, os genes codificantes para enzimas KPC, são classificados em 21 variantes, todas estas variantes foram detectados em linhagens *K. pneumoniae* e é um dos mais distribuídos em todo o mundo (NAAS., 2008)..

Na América do Sul, a ocorrência do gene bla<sub>KPC</sub> em linhagens bacterianas obtidas de amostras clínicas é atualmente considerada endêmica, e sua distribuição ocorre em quase todas as regiões (ROSSI et al., 2012). Ademais, na América do Sul existe uma alta prevalência para o gene bla<sub>KPC-2</sub>, em países como Colômbia, Argentina e Brasil, quando se analisa espécies de bactérias com perfil de resistência a multidrogas (MDR) obtidas de surtos hospitalares, sendo que as espécies mais frequentemente detectadas são *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aureuginosa* (RIBEIRO., 2016). Entre as espécies transportadoras do gene bla<sub>KPC</sub> menos



frequente são *Serratia marcescense* e *Enterobacter cloacae* (RIBEIRO., 2016).

Além da enzima KPC, várias espécies de bactérias Gram-negativas expressam metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS). As M $\beta$ LS são enzimas que apresentam um largo espectro de atividade de hidrólise de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas (SAVARD. 2014), tendo a necessidade de cátions divalentes (Zn<sup>++</sup>) como co-fatores enzimáticos, sendo inibidas pela ação de agentes quelantes ou por componentes derivados de tiois como o ácido tiolático ou ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MENDES et al., 2006).

As M $\beta$ LS estão classificadas no grupo funcional 3 de Busch e apresentam-se subdivididas em 3 subgrupos (A, B e C). Dentre os tipos de M $\beta$ LS adquiridas, as de maior importância para a disseminação epidemiológica e relevância clínica são as enzimas IMP (imipenemase metallo- $\beta$ -lactamase), VIM (Verona integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase), SPM (São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase), e NDM (Nova Delhi metallo- $\beta$ -lactamase) (MOOSAVIAN; RAHIMZADEH, 2015). Dentre as M $\beta$ LS, a enzima NDM-1 constitui atualmente uma preocupação nos ambientes hospitalares devido à sua tendência à disseminação intercontinental (CUZON et al., 2013).

As M $\beta$ LS conferem resistência a diferentes carbapenêmicos, como imipenem, meropenem e ertapenem, os quais se constituem em um suporte fundamental no tratamento de infecções bacterianas resistentes aos demais antibióticos de primeira escolha. As M $\beta$ LS são enzimas produzidas intrinsecamente por algumas bactérias como *Bacillus cereus*, *Chryseobacterium meningosepticum* e *Stenotrophomonas maltophilia* (WOODFORD et al., 2005; CHEN et al., 20015). Entretanto, desde o início da década de 1990, genes que codificam M $\beta$ LS têm sido descritos com grande frequência em bactérias isoladas de amostras clínicas e implicadas em infecções hospitalares, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp (CAMPOS. 2015).

A enzima NDM-1 e suas variantes são carbapenemases do tipo M $\beta$ L capaz de inativar todos os antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos, sendo amplamente distribuída entre as bactérias Gram-negativas ( FOMDA. 2014). O

alelo do gene NDM possui atualmente 17 variantes distribuídas entre várias famílias de bactérias Gram-negativas, e são responsáveis por desencadear um maior nível de resistência bacteriana aos  $\beta$ -lactamâmicos (DORTET, 2014). Estepadrão se deve a capacidade destas enzimas em inativar praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, pois a existência do gene confere um padrão de resistência a multidrogas (MDR) (DORTET., 2014). A enzima NDM codificada pelo gene *bla*<sub>NDM-1</sub>, foi primeiramente detectada em uma linhagem de *Klebsiella pneumoniae* isolada a partir de amostras clínicas de um paciente sueco que tinha sido anteriormente hospitalizado na Índia em 2009 (YONG., 2009).

Até o momento no Brasil, foram identificadas três linhagens de bactérias de espécies distintas que transportam o gene *bla*<sub>NDM-1</sub>. Todos esses isolados são pertencentes às espécies *Enterobacter hormaechei*, *Providencia rettgeri* e *Acinetobacter baumannii* (CARVALHO-ASSEF., 2013, CARVALHO., 2014). Todas as linhagens bacterianas foram isoladas na cidade de Londrina, no sul do Brasil. Em qualquer caso, o modo de aquisição de isolados portadores do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> por pacientes nestes estudos não está claro.

*P. rettgeri* é uma espécie de bactéria patogênica considerada emergente, no mundo e algumas estirpes isoladas de algumas amostras clínicas tem apresentado o gene *bla*<sub>NDM-1</sub>. Os primeiros relatos de isolados de *P. rettgeri* de origem clínicaportadores do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> ocorreram em 2008 em hospitais em Israel (ROLAIN., 2010). A partir de 2012, observa-se um aumento da detecção do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> em *P. rettgeri* principalmente em linhagens isoladas de pacientes de hospitais do Nepal (TADA. 2013), e em 2013 na Colômbia foi notificada a presença do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> em uma estirpe de *P. rettgeri* nomeada de RB151, isolada da amostra de urina de uma paciente de 53 anos (MARQUEZ-ORTRIZ. 2017). Com relação aos isolados de *P. rettgeri* de Israel, foi observado uma divergência filogenética entre as linhagens, demonstrando que existe uma ampliação de clones não relacionados aos portadores do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> (GEFEN 2013).

No Brasil recentemente foram detectadas linhagens de *P. rettgeri* portadoras do gene *bla*<sub>NDM-1</sub> em dois indivíduos no estado do Rio Grande do

Sul, sendo um paciente colonizado e outro infectado. Sendo que a análise molecular foi conduzida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz/RJ) (BRASIL, 2013). Considera-se então, que a *detecção de estipes bacterianas portadoras do gene NDM no Brasil são esporádicas até o momento. Diferentemente da presença do gene bla<sub>KPC</sub>, que se tornou endêmica* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013, RIBEIRO et al., 2016).

## 2. Gênero *Providencia*

O gênero *Providencia* é constituído de bactérias Gram-negativas pertencentes à família Enterobacteriaceae. Sendo bacilos residentes no solo, águas poluídas presentes em estações de tratamento de esgotos e em águas residuais (CLIFORD et al, 2012). As espécies que compõem o gênero *Providencia* podem ser isolados a partir de uma ampla gama de organismos vivos, sendo considerado para seres humanos microrganismos patógenos oportunistas (SHIMA et al., 2016). Dentre as espécies do gênero, *Providencia alcalifaciens* é responsável por causar infecções agudas no trato gastrointestinal e urinário, mais frequentemente em crianças e em pacientes com imunodeficiências ou que estejam sobre tratamento com imunossupressores após cirurgias (CHOI et al., 2017).

As primeiras espécies do gênero *Providencia* foram primeiramente descritas em 1920 por Ornstein, que as classificou como *Bacillus inconstans*. Em 1943-1946, Stuart isolou culturas bacterianas puras a partir de amostras de fezes de pacientes com infecções do trato gastrointestinal. Estes microrganismos foram nomeados de "paracolon 29911". Em 1944, Gomes descreveu a espécie *Eberthella alcalifaciens*. Em 1952, Kauffmann e Edwards reclassificou este grupo como gênero *Providencia* a partir da observação das características bioquímicas específicas e sorológicas. Durante a década seguinte, a posição de bactérias do gênero *Providencia* na classificação taxonômica e suas relações com outros gêneros estreitamente relacionados como *Proteus* e *Morganella* foram revistas várias vezes culminando com a transferência de espécies de bactérias destes gêneros para gênero *Providencia* (O'HARA et al., 2000).

No ano de 1962, o gênero *Providencia* foi aceito como um gênero independente, e incluiu em conjunto com o gênero *Proteus*, à tribo Proteae; depois, o gênero *Morganella* foi anexado à tribo. Dois bio-grupos de *Providencia* foram descritos por Ewing e reconhecidas como as espécies *Providencia alcalifaciens* e *Providencia stuartii* (O'HARA et al., 1999).

As mais recentes mudanças na taxonomia em *Providencia* ocorreu após a introdução de hibridação DNA-DNA para a classificação de espécies bacterianas. Com base nas semelhanças no genoma, *Proteus rettgeri* foi reclassificado como *Providencia rettgeri* e *Providencia alcalifaciens* (FARMER et al., 1977), o biogrupo 3 tornou-se uma espécie separada nomeada de *Providencia rustigianii* (HICKMAN-BRENNER et al., 1983). Em 1986, Muller, enquanto estudava bactérias isoladas de fezes dos pinguins, descreveram uma nova espécie, *Providencia heimbachae*; mais tarde, uma estirpe desta espécie foi também encontrada em um paciente com diarreia idiopática (O'HARA et al., 1999). Em 2006, uma nova espécie, *Providencia vermicola*, foi proposto para as estirpes que infectam formas juvenis de um nematóide entomopatogênico (SOMVANSI et al., 2006). Já, em 2009, representantes de duas novas espécies, *Providencia sneebia* e *Providencia burhodogranariea*, foram isoladas de hemolinfa de moscas de fruta (JUNEJA et al., 2009). Em 2013, uma nova espécie denominada de *Providencia thailandensis*, foi descoberta após a obtenção de amostras de água em um sistema de tratamento de efluentes de uma fábrica de frutos do mar na província de Songkhla, na Tailândia (KHUNTHONGPAN et al., 2013). Deste modo, o número de espécies do gênero *Providencia* aumentaram para nove espécies reconhecidas pela taxonomia clássica.

O gênero *Providencia* é formado por bacilos Gram-negativos produtores de urease e pertencentes a família *Enterobacteriaceae*. Algumas espécies do gênero contribuem para uma série de infecções humanas, destacando, entre elas as espécies *Providencia stuartii* e *Providencia rettgeri* (PILLAI. 2011). A espécie *P. rettgeri* pode ser encontrada em diversos ambientes como água, solo e ainda habitando tecidos de plantas (PILLAI. 2011). *P. rettgeri* também faz parte da microbiota normal do intestino de humanos. Frequentemente tem sido relatado a associação de *P. rettgeri* com infecções das vias urinárias, e em alguns casos estas infecções estão associadas a quadros de gastroenterite e bacteremia (OLAITAN. 2015).

*P. rettgeri* é considerada uma bactéria patogênica emergente que pode apresentar uma elevada taxa de resistência a agentes antimicrobianos comumente empregados na clínica médica (OLAITAN 2015). *P. rettgeri* apresenta resistência intrínseca aos antibióticos polimixinas B e E, que são drogas antimicrobianas de última escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (OLAITAN. 2015), essa resistência no ambiente hospitalar vem se tornando um evento de grande preocupação, principalmente pois tais genes relacionados a resistência se encontram em plasmídeos moveis.

Dentre as espécies clínicas do gênero *Providencia*, a espécie *P. rettgeri* tem emergido nas duas últimas décadas como bactéria patogênica nosocomial, que frequentemente causa infecções do trato urinário em pacientes hospitalizados e recentemente foi relacionada a disseminação de genes de resistência por transferência plasmidial (LAHLAOUI.2014).

*P. rettgeri* é uma bactéria com motilidade, capaz de crescer em agar MacConkey, e catalisar a dissociação da ureia em amônia e dióxido de carbono, além de desaminar a fenilalanina e de produzir gás a partir da fermentação de glicose. No entanto, a maioria das linhagens são não fermentadoras de lactose, *uma característica importante utilizada para classificar micro-organismos no gênero Providencia* (FARMER et al., 1977).

Os primeiros membros da espécie *P. rettgeri* foram isolados por Leo F. Rettger do *Sheffield Laboratory* da Universidade de Yale. Esses isolamentos bacterianos foram realizados como parte de uma investigação epidemiológica sobre uma epidemia de cólera de aves em 1904 (O'HARA et al., 2000). Entretanto, os micro-organismos *não foram caracterizados até o ano de 1918 quando Phillip Hadley realizou uma avaliação superficial do gênero e propôs o nome de Bacterium rettgeri* para se referir a uma nova estirpe produtoras de uréase (O'HARA et al., 2000). Em 1943, Rustigian e Stuart recomendaram a inclusão de *Bacterium rettgeri* no gênero *Proteus*, sendo denominada de *Proteus rettgeri*, com base em características bioquímicas comuns (STUART. 1945).

A primeira descrição de uma infecção humana provocada por *P. rettgeri* foi publicado em 1951 (Goldfarb e Bakey, 1951). Este relatório, de Goldfarb e De Bakey, descreve um caso de empiema (pleurite purulenta) associada a *P. rettgeri*. Entretanto, as primeiras descrições de linhagens de *P. rettgeri* resistentes a drogas antimicrobianas só foram relatadas já em 1971 (TRAUB. et al., 1971), e a notificação de surtos hospitalares relacionados à *P. rettgeri* resistente a antibióticos em 1974, com a identificação da espécie entre os pacientes de uma enfermaria cirúrgica (TRAUB.1974).

O segundo grande surto de *P. rettgeri* foi relacionada a infecções do trato urinário relatada por Edwards e colaboradores, em 1974 (EDWARDS et al., 1974). Mesmo com a *P. rettgeri* implicada na etiologia em infecções do trato gastrointestinal em 1986, diarreia em um viajante em 2004, e em casos de infecção ocular em 2006 (YOH et al., 2005; KOREISHI et al., 2006).

Com relação à susceptibilidade antimicrobiana, *P. rettgeri* é uma bactéria tipicamente resistente à gentamicina, a colistina e a tobramicina, mas susceptível à amicacina. Estirpes de *P. rettgeri*, produtoras de enzimas beta-lactamase de espectro estendido (ESBL) foram relatadas com muita frequência na Europa Oriental (MARCHANDIN et al., 1999). A detecção de estirpes de *P. rettgeri* portadoras da enzima NDM-1 foram relatados na América do Sul a partir de 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013)

O primeiro relato de uma estirpe de *P. rettgeri* transportando o gene *bla<sub>NDM</sub>* foi notificado a partir de 2013 em Porto Alegre/RS, região Sul do Brasil. Esta estirpe foi obtida de uma amostra de ferida do dedo de paciente diabético com doença vascular periférica (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). O segundo relato de uma linhagem *P. rettgeri* NDM-positiva também foi obtida de um paciente hipertenso de 55 anos internado em um hospital público com cuidado terciário (Hospital Heliópolis) na cidade de São Paulo, para sofrer amputação do 4º dedo devido à complicação da osteomielite (CARMO. 2015).

### **3. Carreamento do gene *bla<sub>NDM</sub>***

Alguns plasmídeos carreadores do gene *bla<sub>NDM</sub>* e de suas variantes genéticas têm sido extensivamente caracterizados em espécies da família

*Enterobacteriaceae* (YONG 2009). O histórico de descrições para o carreamento do gene *bla*<sub>NDM</sub> mostra uma ampla variação no contexto genético para o gene *bla*<sub>NDM</sub> que estão alocados em plasmídeos (YONG 2009). Os genes das variantes da enzima NDM são translocados por vários tipos de plasmídeos em espécies de *Enterobacteriaceae*, como *Inc* (WAILAN 2014), *IncF* (HISHINUMA 2013), *IncL/M* (HO 2011), *IncH* (VILLA 2012), *IncN* (SCHULTZ 2017), e *IncX* (WANG 2014). Entretanto, observa-se que existe uma variação sobre os mecanismos de replicação nestes plasmídeos e também uma elevada diversidade de sequências de inserção nestes segmentos genéticos. Para os plasmídeos encontrados nas espécies de *Enterobacteriaceae* que carregam o gene *bla*<sub>NDM</sub>, existe duas características predominantes. Em primeiro lugar, o gene *bla*<sub>NDM</sub> é frequentemente associado ao transposon Tn125 de 10.099 pb, este possui dois elementos flanqueadores denominados de *ISAb<sub>125</sub>*, que são sequências de inserção (PARTRIDGE. 2012).

A estrutura do transposon Tn125 contendo o gene *bla*<sub>NDM</sub> em *Enterobacteriaceae* é frequentemente truncada em vários comprimentos (SCHULTZ. 2017). Em segundo lugar, a sequência flanqueando a estrutura Tn125 envolve vários mecanismos de aquisição de genes, incluindo diferentes elementos de transposição, como integrons de classe 1, sequências de inserção flanqueadoras (IS), elementos de transposição de repetição inversa em miniatura (MITES) (WAILAN 2016). Estas características do ambiente genético do gene *bla*<sub>NDM</sub> têm contribuído para os diferentes contextos genéticos do gene *bla*<sub>NDM</sub> relatados até o presente momento, mesmo considerando o mesmo tipo de plasmídeo transportador (WAILAN. 2015).

O transporte do gene *bla*<sub>NDM</sub> por plasmídeos em *P. rettgeri* foi recentemente caracterizado em algumas linhagens bacterianas de origem clínica. Contudo, ainda existem poucos estudos que enfocam o contexto genético de genes de metalo- $\beta$ -lactamases em *P. rettgeri*. Em um estudo utilizando como modelo a linhagem H1736 foi possível verificar a existência de 5 plasmídeos simultaneamente na bactéria, sendo que o plasmídeo transportador do gene *bla*<sub>NDM</sub> apresentava um tamanho de 48.5-kb e foi relacionado ao plasmídeo pPrY2001 (*GenBank* número de acesso: KF295828.1) (OLAITAN. 2015). Por sua vez, outra linhagem de origem clínica denominada de *P. rettgeri* RB151 isolada de amostra clínica de um paciente da



Colômbia em 2013, teve o seu genoma sequenciado e caracterizado recentemente, nesta linhagem o transporte do gene *bla*<sub>N<sub>DM</sub></sub> foi relacionado com o plasmídeo pRB151 com tamanho de 1.08 Kb (MARQUEZ ORTIS 2017). Além disso, estes estudos evidenciaram a presença de outros elementos genéticos móveis, como genes de bacteriófagos associados ao genoma de linhagens de *P. rettgeri*. Estes genes associados às sequências de inserção estão ligados a uma extensa transferência de genes por eventos de transferências horizontais. Estas inserções no genoma de *P. rettgeri* tem contribuído para as alterações genéticas e a evolução da patogenicidade desta espécie bacteriana (OLAITAN 2015).

## Referencias Bibliográfica

ARMBRUSTER, Chelsie E. et al. Increased incidence of urolithiasis and bacteremia during *Proteus mirabilis* and *Providencia stuartii* coinfection due to synergistic induction of urease activity. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 10, p. 1524-1532, 2014.

BASAK, Silpi; SINGH, Priyanka; RAJURKAR, Monali. Multidrug resistant and extensively drug resistant bacteria: A study. **Journal of pathogens**, v. 2016, 2016.

BUSH, Karen Eliopoulos, George. New  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085-1089, 2001.

CAMPOS, Juliana Coutinho et al. Characterization of Tn3000, a transposon responsible for blaNDM-1 dissemination among Enterobacteriaceae in Brazil, Nepal, Morocco, and India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 12, p. 7387-7395, 2015.

CARMO JUNIOR, Nelson Vieira do et al. First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of São Paulo. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 675-676, 2015.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D.'Alincourt et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475-2476, 2014.

CHEN, Zhenhong et al. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

CHOI, Won; JI, Yong Sok; YOON, Kyung Chul. A case of bilateral keratitis caused by *Providencia alcalifaciens*: a rarely encountered ocular pathogen. **International Ophthalmology**, p. 1-4, 2017.

CLIFFORD, Robert J. et al. Complete genome sequence of *Providencia stuartii* clinical isolate MRSN 2154. **Journal of bacteriology**, v. 194, n. 14, p. 3736-3737, 2012.

CÓRDOVA, Ezequiel et al. Descripción clínica y epidemiológica de un brote nosocomial por *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC en Buenos Aires, Argentina. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 7, p. 376-379, 2012.

CUZON, Gaele; BONNIN, Remy A.; NORDMANN, Patrice. First identification of novel NDM carbapenemase, NDM-7, in *Escherichia coli* in France. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e61322, 2013.

DORTET, Laurent; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed research international**, v. 2014, 2014.

EDWARDS, L. D. et al. Outbreak of a nosocomial infection with a strain of *Proteus rettgeri* resistant to many antimicrobials. **American journal of clinical pathology**, v. 61, n. 1, p. 41-46, 1974.

FARMER, J. J. et al. Unusual Enterobacteriaceae." *Proteus rettgeri*" that" change" into *Providencia stuartii*. **Journal of clinical microbiology**, v. 6, n. 4, p. 373-378, 1977.

FOMDA, Bashir Ahmad; KHAN, Asiya; ZAHOOR, Danish. NDM-1 (New Delhi metallo beta lactamase-1) producing gram-negative bacilli: Emergence & clinical implications. **The Indian journal of medical research**, v. 140, n. 5, p. 672, 2014.

GEFEN-HALEVI, Shiraz et al. Isolation of genetically unrelated blaNDM-1-positive *Providencia rettgeri* strains in Israel. **Journal of clinical microbiology**, v. 51, n. 5, p. 1642-1643, 2013.

GOLDFARB, P. M.; DE BAKEY, E. Empyema due to *Proteus rettgeri* report of a case with recovery. **Journal of the Medical Association of the State of Alabama**, v. 21, n. 2, p. 33-37, 1951.

HICKMAN-BRENNER, F. W. et al. *Providencia rustigianii*: a new species in the family Enterobacteriaceae formerly known as *Providencia alcalifaciens* biogroup 3. **Journal of clinical microbiology**, v. 17, n. 6, p. 1057-1060, 1983.

HISHINUMA, Akira et al. Complete sequencing of an IncFII NDM-1 plasmid in *Klebsiella pneumoniae* shows structural features shared with other multidrug resistance plasmids. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 10, p. 2415-2417, 2013.

HO, Pak Leung et al. Complete sequencing of pNDM-HK encoding NDM-1 carbapenemase from a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Hong Kong. **PloS one**, v. 6, n. 3, p. e17989, 2011.

JUNEJA, Punita; LAZZARO, Brian P. *Providencia sneebia* sp. nov. and *Providencia burhodogranariae* sp. nov., isolated from wild *Drosophila melanogaster*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 59, n. 5, p. 1108-1111, 2009.

KHUNTHONGPAN, Suwanee; SUMPAPAPOL, Punnanee; TANASUPAWAT, Somboon. *Providencia thailandensis* sp. nov., isolated from seafood processing wastewater. **The Journal of general and applied microbiology**, v. 59, n. 3, p. 185-190, 2013.

KOREISHI, Aaleya F.; SCHECHTER, Barry A.; KARP, Carol L. Ocular infections caused by *Providencia rettgeri*. **Ophthalmology**, v. 113, n. 8, p. 1463-1466, 2006.

LAHLAOUI, H.; BEN, Moussa M. Detection of PER 1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase among nosocomial *Providencia stuartii* isolates in Tunisia. **La Tunisie medicale**, v. 92, n. 4, p. 258-261, 2014.

LEE, Ji-Yong et al. Clinical features and risk factors for development of breakthrough Gram-negative bacteremia during carbapenem therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6673-6678, 2016.

MARCHANDIN, Helene et al. TEM-24 Produced by Four Different Species of Enterobacteriaceae, Including *Providencia rettgeri*, in a Single Patient. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 8, p. 2069-2073, 1999.

MARQUEZ-ORTIZ, R. Alejandro et al. First complete *Providencia rettgeri* genome sequence, the NDM-1-producing clinical strain RB151. **Genome announcements**, v. 5, n. 3, p. e01472-16, 2017.

MENDES, Rodrigo Elisandro et al. Metallo-beta-lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 2, p. 103-113, 2006.

MOOSAVIAN, Mojtaba; RAHIMZADEH, Mohammad. Molecular detection of metallo- $\beta$ -lactamase genes, blaIMP-1, blaVIM-2 and blaSPM-1 in imipenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from clinical specimens in teaching hospitals of Ahvaz, Iran. **Iranian journal of microbiology**, v. 7, n. 1, p. 2, 2015.

NAAS, Thierry et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NORDMANN, Patrice; CUZON, Gaelle; NAAS, Thierry. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

O'HARA, Caroline Mohr et al. Isolation of *Providencia heimbachae* from human feces. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 9, p. 3048-3050, 1999.

O'HARA, Caroline Mohr; BRENNER, Frances W.; MILLER, J. Michael. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. **Clinical microbiology reviews**, v. 13, n. 4, p. 534-546, 2000.

OLAITAN, Abiola Olumuyiwa et al. Genomic plasticity of multidrug-resistant NDM-1 positive clinical isolate of *Providencia rettgeri*. **Genome biology and evolution**, v. 8, n. 3, p. 723-728, 2015.

PARTRIDGE, Sally R.; IREDELL, Jonathan R. Genetic contexts of bla<sub>NDM-1</sub>. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 11, p. 6065-6067, 2012.

PILLAI, Dylan R.; MCGEER, Allison; LOW, Donald E. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 in Enterobacteriaceae: emerging resistance. **Canadian Medical Association Journal**, v. 183, n. 1, p. 59-64, 2011.

POIREL, Laurent et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3072-3072, 2010.

RIBEIRO, Patricia Cristina Saldanha et al. Phenotypic and molecular detection of the bla KPC gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in Sao Luis, MA, Brazil. **BMC infectious diseases**, v. 16, n. 1, p. 737, 2016.

ROLAIN, J. M.; PAROLA, P.; CORNAGLIA, G. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): towards a new pandemic?. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 12, p. 1699-1701, 2010.

ROSSI, F., Cury, Ana Paula et al. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Clinics**, v. 67, n. 12, p. 1427-1431, 2012.

ROUTSI, Christina et al. Risk factors for carbapenem-resistant Gram-negative bacteremia in intensive care unit patients. **Intensive care medicine**, v. 39, n. 7, p. 1253-1261, 2013.

SAVARD, P.; PERL, T. M. Combating the spread of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a battle that infection prevention should not lose. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 854-861, 2014.

SCHULTZ, Eliette et al. Multidrug Resistance Salmonella Genomic Island 1 in a *Morganella morganii* subsp. *morganii* Human Clinical Isolate from France. **mSphere**, v. 2, n. 2, p. e00118-17, 2017.

SHIMA, Ayaka et al. Prevalence of *Providencia* Strains among Patients with Diarrhea and in Retail Meats in Thailand. **Japanese journal of infectious diseases**, v. 69, n. 4, p. 323-325, 2016.

SOMVANSHI, Vishal S. et al. *Providencia vermicola* sp. nov., isolated from infective juveniles of the entomopathogenic nematode *Steinernema thermophilum*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 56, n. 3, p. 629-633, 2006.

STUART, C. A.; VAN STRATUM, Elizabeth; RUSTIGIAN, Robert. Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. **Journal of bacteriology**, v. 49, n. 5, p. 437, 1945.

TADA, Tatsuya et al. NDM-8 metallo- $\beta$ -lactamase in a multidrug-resistant *Escherichia coli* strain isolated in Nepal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 2394-2396, 2013.

TRAUB, W. H. et al. Characterization of an unusual strain of *Proteus rettgeri* associated with an outbreak of nosocomial urinary-tract infection. **Applied microbiology**, v. 22, n. 3, p. 278-283, 1971.

TRAUB, W. H.; KLEBER, I. Induction of bacteriocins (phage tails) of *Proteus rettgeri* with trimethoprim. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 30, n. 5, p. 494-495, 1974.

VILLA, Laura et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the bla NDM-1, bla CTX-M-15 and qnrB1 genes. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1645-1650, 2012.

WAILAN, Alexander M. et al. Genomic characteristics of NDM-producing Enterobacteriaceae isolates in Australia and their blaNDM genetic contexts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 136-141, 2016.

WAILAN, Alexander M.; PATERSON, David L. The spread and acquisition of NDM-1: a multifactorial problem. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 12, n. 1, p. 91-115, 2014.

WANG, Xiaojuan et al. An outbreak of a nosocomial NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST147 at a teaching hospital in mainland China. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 2, p. 144-149, 2014.

WOODFORD, Neil; FAGAN, Elizabeth J.; ELLINGTON, Matthew J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 1, p. 154-155, 2005.

XU, Yanling et al. Epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae (CRE) during 2000-2012 in Asia. **Journal of thoracic disease**, v. 7, n. 3, p. 376, 2015.

YOH, Myonsun et al. Importance of *Providencia* species as a major cause of travellers' diarrhoea. **Journal of medical microbiology**, v. 54, n. 11, p. 1077-1082, 2005.

YONG, Dongeun et al. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.