

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
***CAMPUS* GOVERNADOR VALADARES**
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA VIDA
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

Josimar Leonardo da Silva

Caracterização molecular e predição de resistência antimicrobiana em isolados Gram-negativos de pacientes hospitalizados em Governador Valadares, Brasil.

Governador Valadares

2025

Josimar Leonardo da Silva

Caracterização molecular e predição de resistência antimicrobiana em isolados Gram-negativos de pacientes hospitalizados em Governador Valadares, Brasil.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao departamento de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora - *Campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Nagem Valério de Oliveira

Coorientador: Prof.^a Dr.^a Livia Tavares Colombo

Governador Valadares

2025

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Leonardo da Silva, Josimar.

Caracterização molecular e predição de resistência antimicrobiana em isolados Gram-negativos de pacientes hospitalizados em Governador Valadares, Brasil / Josimar Leonardo da Silva. -- 2025. 39 f. : il.

Orientador: Marcelo Nagem Valério de Oliveira

Coorientadora: Lívia Tavares Colombo

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV, 2025.

1. Gene de Resistência Bacteriana. 2. Bactérias Gram-negativas. 3. Beta-lactamase. 4. Aprendizado de Máquina. 5. Hospital. I. Nagem Valério de Oliveira, Marcelo, orient. II. Tavares Colombo, Lívia, coorient. III. Título.

Josimar Leonardo da Silva

Caracterização molecular e predição de resistência antimicrobiana em isolados Gram-negativos de pacientes hospitalizados em Governador Valadares, Brasil.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao departamento de farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora - *Campus* Governador Valadares, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em farmácia.

Aprovado em 04 de julho de 2025

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcelo Nagem Valério de Oliveira
Orientador / UFJF-GV

Prof. Dr. Michel Rodrigues Moreira
Docente / UFJF-GV

Prof^a. Polyana Soares Homaidan
Farmacêutica bioquímica / UNIMED-GV

SUMÁRIO

1 ARTIGO	4
1.1 RESUMO.....	5
1.2 ABSTRACT.....	6
1.3 INTRODUÇÃO	7
1.4 METODOLOGIA	9
1.4.1 Coleta.....	9
1.4.2 Extração de DNA.....	10
1.4.3 PCR.....	10
1.4.4 Sequenciamento e análise filogenética.....	11
1.4.5 Análises estatísticas e aprendizado de máquina.....	11
1.5 RESULTADOS	13
1.5.1 Caracterização das bactérias e sítio de isolamento	13
1.5.2 Identificação dos genes de beta-lactamases	15
1.5.3 Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana por sítio de coleta	18
1.5.4 Distribuição dos genes de resistência por patógenos.....	18
1.5.5 Análise filogenética dos genes.....	18
1.5.6 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados.....	19
1.5.7 Análises estatísticas e aprendizado de máquina	21
1.6 DISCUSSÃO	23
1.7 CONCLUSÃO	29'
REFERÊNCIAS	30

1 ARTIGO

Este trabalho de conclusão de curso foi estruturado em formato de artigo científico, utilizando-se as normas preconizadas para publicação na revista BMC Microbiology (<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/>).

SILVA, J. L. *et al.* (2025)

Caracterização molecular e predição de resistência antimicrobiana em isolados Gram-negativos de pacientes hospitalizados em Governador Valadares, Brasil.

Josimar Leonardo Da Silva¹, Clara Rodrigues Guida¹, Livia Tavares Colombo², Márcio Luís Moreira De Souza¹, Duílio Geber De Melo¹, Polyana Soares Homaidan³, Michel Peçanha³, Claudia Oliveira Fontes¹, Fábio Alessandro Pieri¹, Marcelo Nagem Valério de Oliveira^{1*}

1.1 RESUMO

Contexto: Em ambientes hospitalares, cepas bacterianas resistentes a antibióticos representam uma grave ameaça à saúde de pacientes e visitantes, aumentando as taxas de readmissão hospitalar, utilização de antibióticos de amplo espectro e o risco de óbito. Os principais mecanismos encontrados nas linhagens resistentes envolvem a expressão de β -lactamases, modulação da permeabilidade da membrana e produção de bombas de efluxo. Destes, as β -lactamases têm sido cada vez mais detectadas em pacientes hospitalizados e na comunidade desde a década de 1980, sendo de grande importância clínica. Este trabalho coletou isolados bacterianos Gram-negativos no período de um ano e investigou a presença de genes codificantes de beta-lactamases com o objetivo de criar um modelo de predição de resistência a antibióticos.

Resultados: Foram coletados e estocados 330 isolados bacterianos Gram-negativos de pacientes internados, com predomínio de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Destes, 176 apresentaram resistência a cefalosporina de 3° ou 4° geração, ou carbapenêmicos, ou monobactâmicos ou Amoxicilina com Ácido Clavulânico. Os principais antibióticos contra os quais houve resistência foram Ceftazidima (84%), Ceftriaxona (81%), Amoxicilina/Ácido Clavulânico (80%), Cefepima (73%) e Aztreonam (72%). Os genes encontrados com maior frequência foram *blaCTX* e *blaTEM*. *K. pneumoniae* foi a principal espécie ligada aos genes, representando 40,6% para *blaKPC*, 53,8% para *blaCTX*, 68,4% para *blaSHV* e 45,4% para *blaTEM*. A análise filogenética indicou alta similaridade entre as sequências de um mesmo gene, mesmo quando isoladas em diferentes datas ou locais, indicando transferência gênica. A presença do gene *blaKPC* apresentou associação estatisticamente significativa com resistência a Cefepima, Ceftazidima, Ertapenem, Imipenem e Meropenem. O gene *blaCTX* foi relacionado ao Aztreonam e Ceftriaxona e o gene *blaSHV* foi relacionado a sensibilidade à Amoxicilina/Ácido Clavulânico. Somente o gene *blaTEM* não apresentou alguma relação estatística. Os testes feitos com os cinco algoritmos de aprendizagem de máquina, mostraram que o modelo Random Forest (RF) apresentou os melhores resultados e permitiu construir um modelo para predição de resistência baseado na presença/ausência dos genes estudados.

Conclusão: *K. pneumoniae* foi a principal espécie relacionada a resistência no cenário analisado, sendo o gene de maior impacto clínico *blaKPC*, além disso, foi identificado indícios de persistência clonal e de transmissão genética horizontal. O modelo de *Aprendizado de máquina* aplicado foi capaz de prever satisfatoriamente o fenótipo de resistência aos antibióticos estudados, indicando que o aprofundamento dos estudos pode aprimorar o modelo e impactar positivamente a predição de resistência a antibióticos em isolados bacterianos Gram-negativos de ambiente hospitalar.

Palavras-chave: Resistência bacteriana, Gene de resistência, Beta-lactamase, Hospital, Aprendizado de máquina, Gram-negativo.

1.2 ABSTRACT

Context: In hospital settings, antibiotic-resistant bacterial strains pose a serious threat to patients and visitors, increasing hospital readmission rates, broad-spectrum antibiotic use, and mortality. The main mechanisms of resistance involve the expression of β -lactamases, changes in membrane permeability, and efflux pumps. Among these, β -lactamases have been increasingly detected since the 1980s and remain of great clinical importance. This study collected Gram-negative bacterial isolates over one year and investigated the presence of β -lactamase-encoding genes to build a predictive model of antibiotic resistance.

Results: We collected 330 Gram-negative isolates, predominantly *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, and *A. baumannii*. Among them, 176 showed resistance to third- or fourth-generation cephalosporins, carbapenems, monobactams, or amoxicillin/clavulanic acid. The most common resistant profiles were to ceftazidime (84%), ceftriaxone (81%), amoxicillin/clavulanic acid (80%), cefepime (73%), and aztreonam (72%). The most frequently detected genes were *blaCTX* and *blaTEM*. *K. pneumoniae* was most often associated with these genes, representing 40.6% of *blaKPC*, 53.8% of *blaCTX*, 68.4% of *blaSHV*, and 45.4% of *blaTEM*. Phylogenetic analysis revealed high sequence similarity among isolates carrying the same gene, suggesting horizontal gene transfer. *blaKPC* was significantly associated with resistance to cefepime, ceftazidime, ertapenem, imipenem, and meropenem; *blaCTX* with aztreonam and ceftriaxone; and *blaSHV* with amoxicillin/clavulanic acid sensitivity. *blaTEM* showed no significant association. Tests with five machine learning algorithms indicated that Random Forest yielded the best performance, allowing the creation of a predictive model of resistance based on the presence or absence of these genes.

Conclusion: *K. pneumoniae* was the primary species linked to resistance, with *blaKPC* being the most clinically impactful gene. Evidence of clonal persistence and horizontal gene transfer was observed. The machine learning model successfully predicted the resistance phenotype, suggesting that further refinement may enhance its utility for predicting antibiotic resistance in Gram-negative hospital isolates.

Keywords: Bacterial resistance, Resistance gene, Beta-lactamase, Hospital, Learn machine, Gram-negative.

*Autor correspondente:

Marcelo Nagem Valerio de Oliveira

marcelo.nagem@ufjf.br

¹ Universidade Federal De Juiz De Fora – *campus* Governador Valadares, MG, Brasil

² Instituto Federal De Minas Gerais - *campus* São João Evangelista, MG, Brasil

³ Unimed Governador Valadares, MG, Brasil

1.3 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) identificou, em 2022, as espécies bacterianas mais preocupantes no contexto da resistência aos antimicrobianos, de acordo com os resultados, bactérias associadas a infecções hospitalares, como *Acinetobacter spp.* e *Klebsiella pneumoniae*, apresentaram taxas de resistência superiores a 50%. Além disso, 8% das infecções causadas por *K. pneumoniae* demonstraram resistência aos carbapenêmicos, uma classe de antibióticos de última linha [1]. Outros patógenos de relevância clínica, como *Escherichia coli* e *Neisseria gonorrhoeae*, responsáveis por infecções do trato geniturinário, também exibiram um perfil de resistência aumentado em comparação com dados de 2017 [2, 3].

Em ambientes hospitalares, cepas bacterianas resistentes representam uma grave ameaça à saúde de pacientes, uma vez que estão associadas a infecções relacionadas a assistência à saúde (IRAS). Tais infecções resultam em prolongamento de tempo de internação, aumento das taxas de readmissão hospitalar, maior utilização de antibióticos de amplo espectro e elevação do risco de óbito [3, 4]. Em estudos realizados no Brasil, bactérias com fenótipo de resistência prioritário, definidos pela OMS [5], elevaram o risco de morte e tempo de permanência hospitalar, sendo encontrados mais de um mecanismo para a resistência [6, 7]. Nesse contexto, a seleção de antimicrobianos eficazes tem se tornado progressivamente mais complexa, devido à perda de eficácia tanto dos agentes terapêuticos tradicionalmente utilizados quanto dos antimicrobianos de amplo espectro [3, 8].

Os principais mecanismos encontrados nas linhagens resistentes envolvem a expressão de β -lactamases, modulação da permeabilidade da membrana e produção de bombas de efluxo [9]. Destes, as β -lactamases, em especial as de espectro estendido (ESBLs), têm sido cada vez mais detectadas em pacientes hospitalizados e na comunidade desde a década de 1980, sendo de grande importância clínica [10].

Tais enzimas conseguem hidrolisar antibióticos como penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas de 3ª geração. As ESBLs pertencem às classes A, B, C e D de Ambler, algumas famílias de ESBLs, dos tipos TEM e SHV, possuem variantes de genes que diferem apenas em algumas substituições de aminoácidos. Outras famílias, como as ESBLs do tipo CTX-M, são muito mais diversificadas. Cada uma das famílias ESBL possui características únicas que conferem diferentes perfis de susceptibilidade a drogas [11, 12].

A resistência a cefalosporinas, carbapenêmicos e penicilinas é rapidamente disseminada em comunidades bacterianas através da transferência de genes codificadores de ESBLs. Deste modo, linhagens resistentes podem vir a expressar genes para todas as classes de β -lactamases [13]. Por outro lado, CTX, de ação preferencial sobre cefotaxima e ceftriaxona, e KPC, relacionada a degradação de carbapenêmicos, hoje são comumente encontradas em *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e na família Enterobacteriaceae [8, 14, 15]. Mais de 50% das linhagens de *K. pneumoniae* possuem genes que codificam ESBL ao redor do mundo, enquanto *P. aeruginosa* e *A. baumannii* são responsáveis pela maioria das infecções resistentes a carbapenêmicos [16, 17, 18].

Estudos epidemiológicos realizados na América Latina revelaram que 96% dos isolados clínicos provenientes de pacientes infectados por *K. pneumoniae* e resistentes ao tratamento por carbapenêmicos apresentavam o gene *blaKPC* [8]. As enzimas codificadas por esse gene também foram as carbapenemases mais prevalentes entre os isolados clínicos de Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos (CRE) na China, sendo mais prevalentes entre *K. pneumoniae* isolada de pacientes adultos [19]. Outro estudo revelou uma elevada resistência a antibióticos em Enterobacteriaceae na região de Oltenia, na Romênia, a enzima CTXM-15 predominou especialmente em *E. coli*. SHV estava presente em todas as cepas de *K. pneumoniae*, e a enzima TEM era mais frequente em *E. coli* do que em *K. pneumoniae* [20].

A identificação de genes de resistência em isolados clínicos através da biologia molecular fornece informações sobre a transferência horizontal de genes associada à disseminação de fatores que tornam espécies bacterianas resistentes a antimicrobianos [8], tornando possível orientar a conduta da equipe e a escolha do melhor tratamento.

Porém, o sucesso dessa abordagem depende de ferramentas capazes de traduzir os perfis genéticos das bactérias em perfis de susceptibilidade a antimicrobianos, o que pode ser feito por meio do uso de ferramentas estatísticas. Outras abordagens, como o uso de técnicas de *screening* genético e de *learn machine*, em conjunto, podem permitir estabelecer relações entre a presença dos genes, a espécie, os locais de isolamento, a data de coleta, dentre outros, e a probabilidade de resistência. Essas relações permitem a identificação mais célere dos antimicrobianos com maior chance de sucesso para cada tratamento, valendo-se da construção de diretrizes baseadas na análise do histórico de dados disponíveis sobre a epidemiologia da resistência microbiana na região [21, 22, 23, 24].

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi a caracterização de isolados clínicos Gram-negativos, isolados de pacientes hospitalizadas, quanto à presença de genes codificantes de beta-lactamases e a busca por modelos estatísticos visando analisar a relação entre a presença dos genes e a resistência aos antibióticos selecionados.

1.4 METODOLOGIA

1.4.1 Coleta

Os isolados foram obtidos de um hospital particular em Governador Valadares–MG, sendo coletadas todas as culturas provenientes de pacientes internados neste hospital no período compreendido entre outubro de 2022 e outubro de 2023. Este trabalho foi submetido ao comitê de ética e aprovado (CAAE: 15101219.8.1001.5147). Nenhum dado que identificasse o paciente foi coletado. Os isolados selecionados foram investigados quanto à presença dos genes *blaCTX*, *blaKPC*, *blaSHV* e *blaTEM*, pela técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A identificação das espécies e determinação do perfil de susceptibilidade a antimicrobianos foram realizados de maneira automatizada utilizando o equipamento Vitek-2® (Biomérieux, USA). Para cada isolado foram tabulados os seguintes dados: data de coleta, sítio de isolamento (Aspirado Orotraqueal, Swab de Ferida, Hemocultura, Ponta de cateter e outros), agente etiológico e o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos testados.

Os pontos de corte utilizados para determinação da resistência/sensibilidade a drogas antimicrobianas foram aqueles descritos no BRCast (www.brcast.org.br). Os dados foram compilados e os gráficos gerados no programa SigmaPlot®.

1.4.2 Extração de DNA

A presença de genes de resistência foi investigada nos isolados de bactérias Gram-negativas e classificados como resistentes a pelo menos um dos seguintes antibióticos: cefalosporina de 3º ou 4º geração, carbapenêmicos, monobactâmicos ou Amoxicilina/ Ácido clavulânico. Ao incluir isolados resistentes a essas classes, aumenta-se a probabilidade de identificar genes de resistência relevantes, uma vez que tais antibióticos são alvos frequentes de enzimas inativadoras, permitindo uma análise mais direcionada e eficiente dos determinantes genéticos envolvidos.

Os isolados foram reativados em caldo BHI e as culturas crescidas overnight foram utilizadas para extração de DNA genômico com o kit Wizard Genomic DNA Purification® e quantificado em equipamento Nanovue (GE HealthCare, UK).

1.4.3 PCR

Para a amplificação gênica, foram padronizadas reações contendo 25 µL de volume total nas seguintes condições: Tampão 1X, 200 µM DNTp, 1 µM de cada primer (Forward and Reverse) (Table 1), 2.25mM MgCl₂ e 1U Taq DNA polymerase (Promega, USA) e 80 ng de DNA. Foram usados os seguintes parâmetros para *blaKPC*, *blaTEM* e *blaSHV*: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 minuto, 1 minuto na temperatura de anelamento específica de cada primer (Tabela 1) e alongamento a 72 °C por 1 minuto, e alongação final por 10 minutos a 72 °C. para *blaCTX*, utilizou-se desnaturação inicial a 94°C por 7 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 50 segundos, anelamento a 50°C por 40 segundos e alongamento a 72°C por 1 minuto, seguidos de alongamento final a 72°C por 5 minutos.

Posteriormente, as amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose na concentração de 1,2%, sob tensão constante de 120 volts, com tampão 1X e visualizadas com SYBR Safe® (ThermoFischer Scientific, USA). Em todas as reações foram utilizados controles positivos identificados e sequenciados neste trabalho.

Tabela 1. Sequência dos primers, tamanho do produto e temperatura de anelamento para cada par de primers usados neste trabalho.

Gene	Sequência (5'-3')	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento	Referência
<i>blaCTX</i>	MU1: ATGTGCAGYACCAGTAARGT MU2: TGGGTRAARTARGTSACCAGA	~600pb	50°	Pagani, 2003
<i>blaSHV</i>	F: GGGTTATTCTTATTTGTCGC R: AGCGCGAGAAGCATCCTG	~1000pb	62°	Cabral et. al, 2012
<i>blaKPC</i>	1A: TGTCAGTGTATCGCCGTC 1B: CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	~1000pb	63°	Cabral et. al, 2012
<i>blaTEM</i>	F: ATAAAATTCTTGAAGACGAAA R: GACAGTTACCAATGCTTAATCA	~1000pb	57°	Cabral et. al, 2012

1.4.4 Sequenciamento e análise filogenética

A confirmação da identidade dos genes amplificados foi realizada por meio do sequenciamento dos produtos de PCR, para algumas bactérias. As sequências geradas foram comparadas com as disponíveis nos bancos de dados e depositadas no GENBANK (Números de acesso: PV522041-PV522062). As sequências geradas neste trabalho foram alinhadas no Programa MEGA 1.1 [25], e o alinhamento utilizado para construção de árvore filogenética pelo método de Máxima Parcimônia.

1.4.5 Análises estatísticas e aprendizado de máquina

As análises estatísticas dos resultados foram feitas com o software estatístico R [26], a ferramenta foi utilizada para encontrar padrões e relações entre a presença dos genes e resistência aos antibióticos selecionados.

Para isso, a presença e ausência de genes de resistência, para cada isolado, foi representada por variáveis dicotômicas, presença ou ausência. De maneira similar, os resultados de antibiograma foram representados por variáveis dicotômicas (sensível ou resistente). O termo “NA” (*not applicable*) foi usado para indicar que o antibiótico não foi testado. Os testes qui-quadrado e Exato de Fisher foram realizados para determinar significância estatística em valor de P menor que 0.05. Foram utilizadas técnicas de aprendizado de máquina para construir um modelo preditivo que fosse capaz de atrelar a presença dos genes, isolados e aos pares, à resistência aos antimicrobianos avaliados, sendo a taxa de sucesso obtida expressa percentualmente. Para maior confiabilidade os dados foram rodados em cinco programas distintos: RL (Regressão logística); RF (Floresta aleatória); SVM (Máquina de vetores de suporte); KNN (K-vizinho mais próximo) e NB (Naive Bayes).

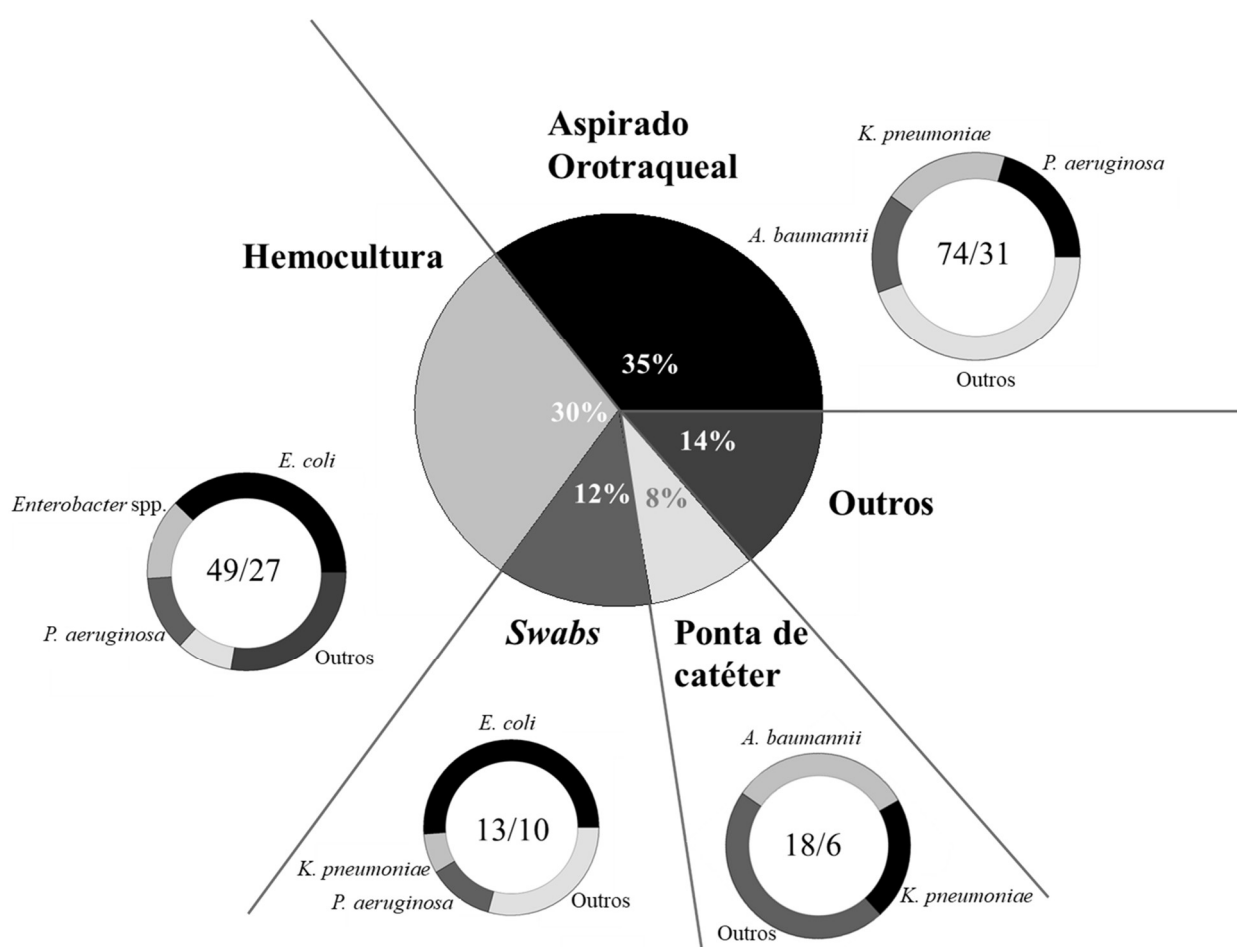
1.5 RESULTADOS

1.5.1 Caracterização das bactérias e sítio de isolamento

Durante o período entre outubro de 2022 e outubro de 2023, foram coletados e estocados 330 isolados bacterianos Gram-negativos, com predomínio de *E. coli* (22%), *K. pneumoniae* (15%), *P. aeruginosa* (14%) e *Acinetobacter baumannii* (11%), oriundos de pacientes internados no hospital em estudo, localizado no município de Governador Valadares, Minas Gerais, Brasil. As amostras foram obtidas, principalmente, de secreções orotraqueais, hemoculturas, swabs (ferida, nasal e retal) e ponta de cateteres (Figura 1). Destas, 176 atenderam ao critério de seleção (bactéria resistente a pelo menos um dos seguintes antibióticos: cefalosporina de 3º ou 4º geração, carbapenêmicos, monobactâmicos ou Amoxicilina com Ácido Clavulânico) e foram investigadas quanto à presença dos genes que codificam beta-lactamases. Das bactérias testadas, 86 apresentaram pelo menos um dos genes pesquisados.

Do total de isolados coletados, 154 foram oriundos da Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Considerando-se apenas os isolados que se enquadram no critério de inclusão estabelecido, o número de isolados da UTI é de 89, o que representa aproximadamente 50% dos isolados que atenderam aos critérios de inclusão.

Figura 1 - Representação gráfica dos principais sítios de coleta de amostras de pacientes internados e as espécies identificadas em cada sítio, considerando todos os isolados coletados no período de outubro de 2022 a outubro de 2023. Os gráficos menores representam a prevalência de espécies bacterianas dentro de cada sítio amostrado. Os números no interior dos círculos representam o número de isolados, daquele sítio, que atenderam ao critério de inclusão e foram submetidos à investigação / número de isolados positivos para algum dos genes de resistência.



Fonte: elaborado pelo autor (2025).

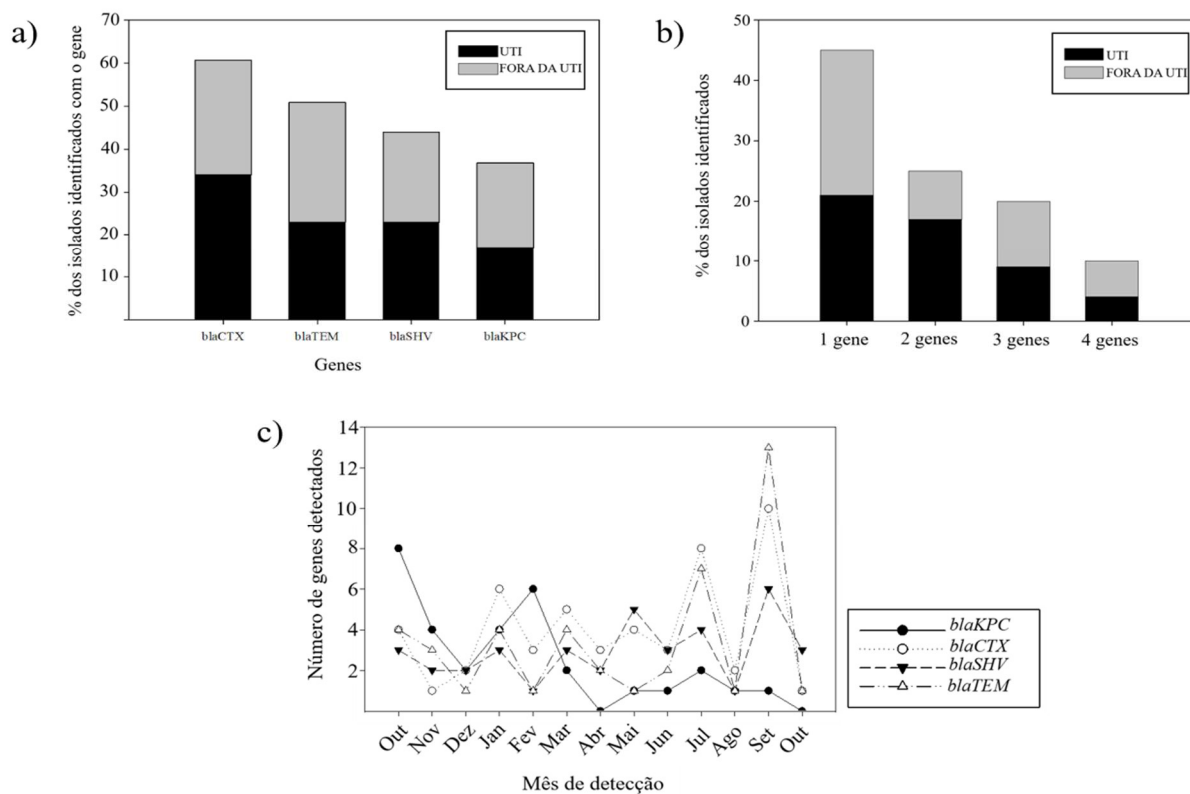
As análises revelaram que a maior parte dos microrganismos que atenderam ao critério de inclusão foi isolada em secreções orotraqueais. Nesse recorte, a maioria 74,32% (55/74) foi proveniente de pacientes internados na UTI e as espécies predominantes foram *K. pneumoniae* 28,37% (21/74) e *P. aeruginosa* 28,37% (21/74). Por outro lado, nas hemoculturas, segundo sítio com maior número de amostras, a maioria 73,46% (36/49) foi obtida de pacientes fora da UTI, sendo que *E. coli* 26,53% (13/49), *Enterobacter sp.* 22,44% (11/49) e *K. pneumoniae* 22,44% (11/49) foram as espécies predominantes.

1.5.2 Identificação dos genes de beta-lactamases

A investigação da presença dos quatro genes que codificam enzimas beta-lactamases foi realizada nos 176 isolados que se enquadraram no critério de inclusão citado anteriormente, sendo que 86 isolados foram positivos para pelo menos um dos genes (Figuras 1 e 2). Destes, 44 foram obtidos de amostras da UTI, com 52,27% (23/44) das amostras provenientes de secreções orotraqueais, enquanto que os isolados de enfermaria foram provenientes, principalmente, de Hemoculturas com 50% (21/42). Entre todos os isolados positivos as espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* predominaram.

Os genes encontrados com maior frequência (Figura 2a) foram *blaCTX* com 60,46% (52/86 dos isolados testados) e *blaTEM* com 51,16% (44/86). Quando considerados apenas os isolados que apresentaram um único gene, a distribuição foi a seguinte: *blaCTX* em 16,27% (14/86) dos isolados, *blaKPC* em 12,79% (11/86), *blaTEM* em 10,46% (9/86) e *blaSHV* em 5,81% (5/86), somando 45,34% (39/86) dos isolados. A presença de múltiplos genes foi comum, tendo maior prevalência nos casos com dois ou mais genes, representando cerca de 25,58% (22/86) dos isolados positivos, com 68,18% (15/22) destes provenientes da UTI (Figura 2b).

Figura 2: Gráficos mostrando (a) prevalência dos genes investigados de acordo com o sítio de coleta (UTI e FORA DA UTI) e (b) percentual de isolados identificados com um, dois, três ou quatro genes; e c) Número de genes identificados conforme o mês de isolamento da bactéria, de outubro de 2022 a outubro de 2023.



Fonte: elaborado pelo autor (2025).

blaKPC

Dentre os 32 isolados analisados positivos para o gene *blaKPC*, observou-se que 46,87% (15/32) provinham de pacientes internados em UTI. A distribuição dos isolados conforme o número de genes de resistência associados revelou que 34,37% (11/32) possuíam apenas um gene, dos quais 45,45% (5/11) estavam na UTI. Isolados com dois genes de resistência corresponderam a 18,75% (6/32), sendo que 50% (3/6) deles foram identificados na UTI. Já aqueles com três genes representaram 21,87% (7/32), com 57,14% (4/7) provenientes da UTI.

blaCTX

Dos 52 isolados positivos para o gene *blaCTX*, 55,8% (29/52) foram detectados em pacientes internados na UTI. A análise revelou que somente um gene estava presente em 27% (14/52) dos isolados, dos quais 50% (7/14) estavam na UTI. Isolados com dois genes de resistência corresponderam a 25% (13/52), sendo 84,6% (11/13) deles provenientes da UTI. Além disso, 34,6% (18/52) dos isolados apresentaram três genes de resistência, com 50% (9/18) localizados na UTI. Dentre os isolados com dois genes (25% 13/52), a combinação *blaCTX/blaSHV* foi a mais frequente, representando 53,8% (7/13) dos casos, sendo todos identificados em pacientes da UTI.

blaSHV

Dentre os 38 isolados bacterianos positivos para o gene *blaSHV*, observou-se que 52,6% (20/38) eram provenientes de pacientes internados na UTI. A análise do perfil dos genes de resistência demonstrou que 13,1% (5/38) dos isolados apresentavam apenas o gene *blaSHV*, sendo que 60% (3/5) destes casos foram identificados na UTI. Isolados com dois genes de resistência corresponderam a 34,2% (13/38) do total, com 69,2% (9/13) localizados na UTI. Além disso, 31,6% (12/38) dos isolados possuíam três genes de resistência, dos quais 41,6% (5/12) estavam na UTI.

blaTEM

Entre os 44 isolados bacterianos positivos para o gene *blaTEM*, 45,4% (20/44) eram provenientes da UTI. A análise revelou que 20,4% (9/44) dos isolados apresentavam apenas o gene *blaTEM*, sendo que 33,3% (3/9) desses casos foram detectados na UTI. Além disso, 27,3% (12/44) dos isolados carregavam dois genes de resistência, com 58,3% (7/12) localizados na UTI, enquanto 34,1% (15/44) possuíam três genes de resistência, dos quais 46,6% (7/15) estavam na UTI.

1.5.3 Distribuição dos genes de resistência antimicrobiana por sítio de coleta

Dentre os tipos de amostras, 40,6% (13/32), 38,5% (20/52) e 42,1% (16/38) dos isolados positivos para *blaKPC*, *blaCTX* e *blaSHV*, respectivamente, foram coletados em aspirado orotraqueal, sendo nestes casos o principal sítio e sempre seguido por hemocultura com 31,2% (10/32), 25% (13/52) e 23,7% (9/38) dos isolados positivos para os mesmos genes respectivamente. Para isolados positivos para o gene *blaTEM*, o principal sítio foi hemocultura (41%; 18/44), seguida de aspirado orotraqueal (29,5%; 13/44). Tais dados sugerem grande importância a infecções ocorridas no trato respiratório e bacteremias em casos de microrganismos resistentes.

1.5.4 Distribuição dos genes de resistência por patógenos

Entre as espécies bacterianas que mais se associaram aos genes de resistência, *K. pneumoniae* foi a principal, expressando 40,6% (13/32) para *blaKPC*, 53,8% (28/52) para *blaCTX*, 68,4% (26/38) para *blaSHV* e 45,4% (20/44) para *blaTEM*. Além disso, *P. aeruginosa* correspondeu a 34,4% (11/32) dos isolados positivos para *blaKPC*, enquanto *E. coli* representou 25% (11/44) dos isolados positivos para *blaTEM*.

De todos os isolados analisados e que foram positivos para algum gene, oito possuíam os quatro genes de beta-lactamases. Destes, 75% (6/8) eram *K. pneumoniae* e 25% (2/8) *P. aeruginosa*. Importante ressaltar que 37,5% (3/8) estavam na UTI, número menor do que aqueles encontrados para bactérias com dois ou três genes. Os isolados foram oriundos de secreções orotraqueais 37,5% (3/8), hemoculturas 37,5% (3/8) e pontas de cateteres 25% (2/8).

1.5.5 Análise filogenética dos genes

A confirmação da identidade dos genes amplificados durante este trabalho foi realizada por meio do sequenciamento de *amplicons* de todos os genes estudados. A comparação das sequências com aquelas disponíveis no banco de dados do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) confirmou que o produto amplificado, em cada situação, correspondia aos respectivos genes investigados (*blaKPC*, *blaCTX*, *blaSHV* e *blaTEM*).

A análise filogenética (Figura 2) confirmou que as sequências de cada gene de resistência (*blaKPC*, *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCTX*) agruparam-se em clados monofiléticos, indicando alta similaridade entre as sequências de um mesmo gene, mesmo quando isoladas em

diferentes datas ou locais. Por exemplo, sequências de *blaTEM* de *K. pneumoniae* (ID 304, 388) e *P. aeruginosa* (ID 163, 179), coletadas em diferentes pavilhões e meses, apresentaram grande proximidade filogenética. Além disso, alguns isolados (como ID 304 e 388, ambos *K. pneumoniae*) carregavam múltiplos genes (*blaKPC*, *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCTX*) e apareceram agrupados na árvore, indicando que podem representar linhagens clonais persistentes no ambiente hospitalar.

1.5.6 Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados

Os antibióticos testados para cada isolado foram determinados a partir do protocolo interno do laboratório do hospital em estudo, sendo que as drogas mais testadas foram Meropenem (testado em 172 dos 176 isolados selecionados), Cefepima (146 isolados), Ceftazidima (139 isolados) e Ceftriaxona (100 isolados). Dentre todos os antibióticos testados, as maiores taxas de resistência foram encontradas para Amoxicilina/Ácido Clavulânico (84% dos isolados selecionados), Ceftazidima (80% dos isolados), Imipenem (78% dos isolados) e Ceftriaxona (73% isolados).

Considerando as bactérias que apresentaram algum dos genes pesquisados, os principais antibióticos contra os quais houve resistência foram Ceftazidima (84%), Ceftriaxona (81%), Amoxicilina/Ácido Clavulânico (80%), Cefepima (73%) e Aztreonam (72%). A distribuição percentual de resistência e sensibilidade entre os 86 isolados, com base nos resultados dos antibiogramas (Tabela 2), revela que apenas Meropenem e Ertapenem exibiram maior proporção de isolados sensíveis em comparação aos resistentes.

Tabela 2 - Análise estatística da associação entre perfil de resistência aos antimicrobianos cefalosporinas de 3º e 4º geração, carbapenêmicos, monobactâmicos ou Amoxicilina/ Ácido clavulânico, conforme dados dos testes realizados pelo hospital de acordo com protocolo interno e presença dos genes de beta-lactamases nos isolados.

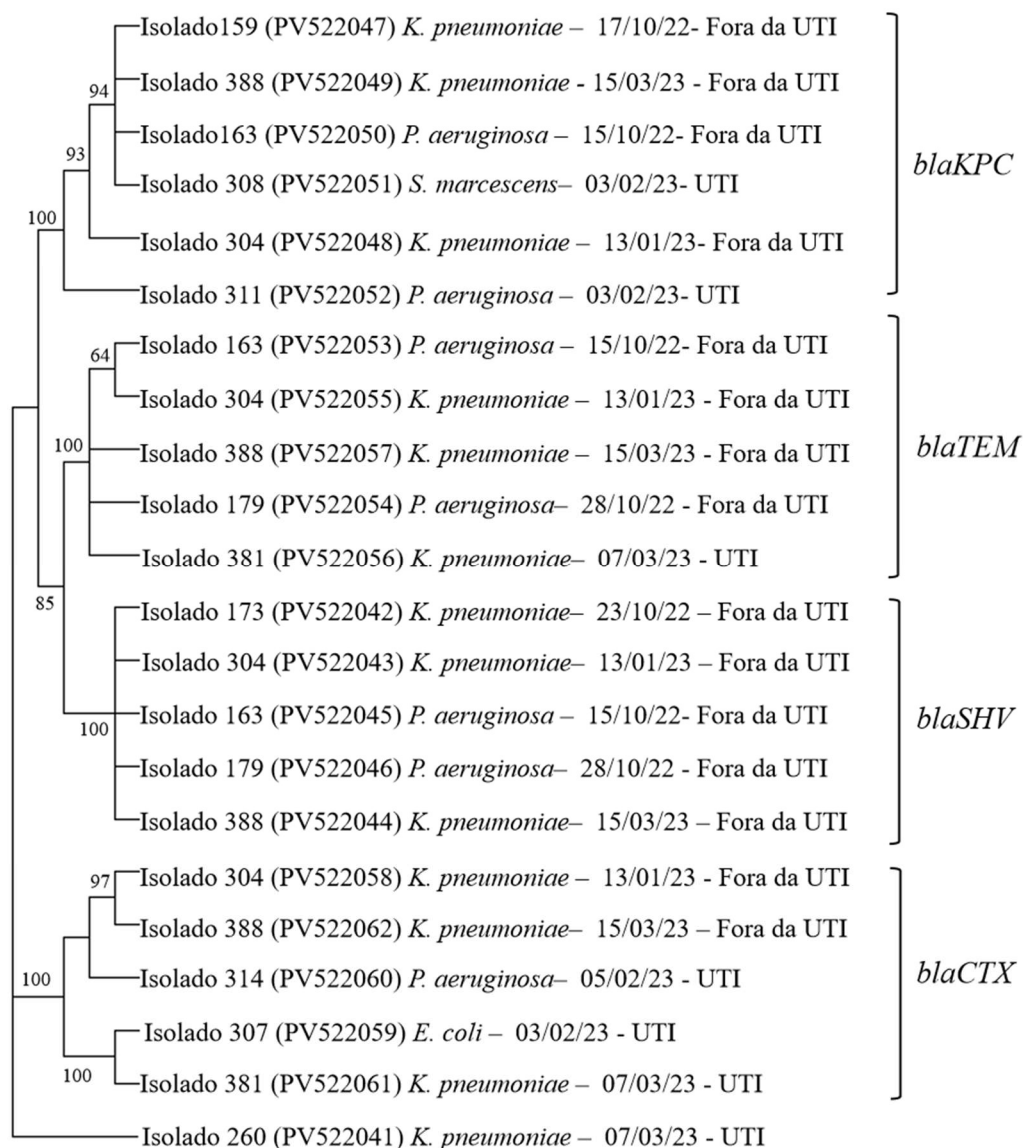
ANTIBIÓTICO***	SENSIBILIDADE	<i>blaCTX</i>		<i>blaTEM</i>		<i>blaSHV</i>		<i>blaKPC</i>	
		Presente (%)	Ausente (%)	Presente (%)	Ausente (%)	Presente (%)	Ausente (%)	Presente (%)	Ausente (%)
AZTREONAM	RESISTENTE	38*	28	3	36	29	36	7	59
	SENSÍVEL	3	31	11	24	7	27	0	34
CEFEPIMA	RESISTENTE	26	43	21	47	16	53	19*	50
	SENSÍVEL	9	22	9	23	9	22	2	29
CEFTAZIDIMA	RESISTENTE	28	52	22	59	23	58	19*	62
	SENSÍVEL	4	16	4	15	2	17	0	19
CEFTRIAXONA	RESISTENTE	41*	32	31	42	29	44	19	54
	SENSÍVEL	4	23	8	19	5	22	1	26
ERTAPENEM	RESISTENTE	12	8	8	11	8	11	7*	12
	SENSÍVEL	34	47	28	53	27	54	4	77
IMIPENEM	RESISTENTE	15	64	10	69	8	71	25*	54
	SENSÍVEL	16	5	10	11	8	13	3	18
MEROPENEM	RESISTENTE	12	32	11	33	8	35	13*	30
	SENSÍVEL	18	38	14	43	12	45	5	52
AMOXICILINA CLAVULANATO	RESISTENTE	38	46	37	48	26	59	14	71
	SENSÍVEL	8	8	4	11	12**	3	0	15

* Estatisticamente significativo, $P < 0.05$, segundo os testes qui-quadrado e Exato de Fisher, para associação entre presença do gene investigado e resistência ao referido antimicrobiano.

** Estatisticamente significativo, $P < 0.05$, segundo os testes qui-quadrado e Exato de Fisher, para associação entre presença do gene investigado e sensibilidade ao referido antimicrobiano.

*** Os antibióticos listados nesta tabela são aqueles utilizados no critério de inclusão de isolados neste estudo (resistência a algum desses). Os antibióticos testados foram selecionados conforme protocolo interno do hospital. Por esse motivo, nem todos os isolados foram testados com todos os antibióticos, resultando em quantidade de testes diferentes para cada fármaco.

Figura 3 - Reconstrução Filogenética dos genes *blaKPC*, *blaTEM*, *blaSHV* e *blaCTX*, sequenciados de isolados deste trabalho, pelo método de máxima parcimônia. O gene *blaNDM* foi utilizado como grupo externo. Os valores dos nós representam bootstrap com 1000 repetições.



Fonte: elaborado pelo autor (2025).

1.5.7 Análises estatísticas e aprendizado de máquina

A análise estatística realizada para investigar a associação entre presença dos genes e o perfil de resistência aos antibióticos testados (Tabela 2) revelou que o gene *blaKPC* teve relação significativa com resistência à Cefepima, Ceftazidima, Ertapenem, Imipenem e Meropenem.

O gene *blaCTX* foi relacionado a resistência ao Aztreonam e Ceftriaxona, já os genes *blaSHV* e *blaTEM* não foram relacionados a resistência a algum dos antibióticos, entre os antimicrobianos, Amoxicilina/Ácido Clavulânico foi o único que não teve relação estatística com algum gene.

Os testes feitos com os cinco algoritmos de aprendizagem de máquina, utilizados para relacionar a presença dos genes pesquisados a resistência, mostraram que o modelo Random Forest (RF) apresentou os melhores resultados nos quesitos, acurácia, sensibilidade, especificidade e ROC_AUC (Área sob a curva ROC, que mede a capacidade do modelo em distinguir entre as classes positivas e negativas) (Tabela 3), obtendo avaliação máxima para análise de resistência à Amoxicilina/Ácido clavulânico. Embora todos os algoritmos testados tenham apresentado resultados válidos, o RF foi selecionado como modelo final devido a um equilíbrio entre: capacidade explicativa, robustez, praticidade clínica e desempenho sem overfitting, que mostrou que o RF manteve alta sensibilidade (detecção de verdadeiros resistentes) sem comprometer a especificidade, crucial para evitar falsos negativos em cenários de risco. KNN, por exemplo, mostrou-se instável com tamanhos pequenos de amostra.

Tabela 3: Desempenho preditivo do algoritmo Random forest utilizado para relacionar a presença dos genes pesquisados a resistência para cada antibiótico.

	ROC_AUC	Accuracy	Sensitivity	Specificity
AMOXICILINA CLAVULANATO	1.000	1.000	1.000	1.000
MEROPENEM	0.858	0.812	0.667	0.900
IMIPENEM	0.875	0.667	1.000	0.000
ERTAPENEM	0.656	0.900	0.500	1.000
CEFTRIAXONA	0.568	0.769	0.818	0.500
CEFTAZIDIMA	0.646	0.786	0.917	0.000
CEFEPIMA	0.482	0.750	1.000	0.200
AZTREONAM	0.800	0.714	0.600	1.000

1.6 DISCUSSÃO

Este trabalho coletou amostras e dados de isolados clínicos oriundos de pacientes internados em um hospital de Governador Valadares com o objetivo de compreender os perfis de susceptibilidade e resistência a antibióticos e relacioná-los com a presença de genes de resistência a beta-lactamases. A biblioteca, construída a partir de isolados coletados durante o período de doze meses, permitiu realizar os estudos e realizar inferências sobre essas relações.

Os critérios de inclusão neste trabalho foram estabelecidos diante da disponibilidade procedimental do hospital em estudo e visou todos os isolados de pacientes hospitalizados, independente da origem da infecção, como estratégia para compreender a dinâmica do fluxo gênico no hospital e no período em estudo. Esta abordagem justifica-se pelo fato de que bactérias comensais e adquiridas na comunidade podem ser consideradas reservatórios de genes de resistência [27]. e a interação entre essas bactérias pode resultar no surgimento de linhagens bacterianas resistentes e virulentas [28]. Portanto, o estudo realizado independentemente da origem da infecção permite mapear a diversidade genética local e contribuir para a vigilância de mecanismos de resistência.

Secreção orotraqueal foi o principal sítio de coleta dentre os isolados portadores dos genes pesquisados, tendo *K. pneumoniae* como a principal espécie identificada, reforçando a característica de múltipla resistência a diversas classes de drogas deste patógeno, capaz de resultar em infecções graves e persistentes no ambiente hospitalar [29].

O estudo identificou que secreção orotraqueal foi o principal sítio de coleta na UTI, o que pode estar relacionado com o uso frequente da ventilação mecânica em pacientes em terapia intensiva. As amostras foram dominadas por *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, patógenos frequentemente associados a infecções respiratórias [30]. Nessas espécies, o gene *blaCTX* foi o mais prevalente, muitas vezes coexistindo com outros genes de resistência um padrão atribuído à disseminação horizontal de plasmídeos. Essa multirresistência, comum em ambientes hospitalares, amplia a diversidade genotípica e desafia o controle terapêutico [31, 32, 33]. Outros sítios de coleta com grande relevância entre pacientes da UTI são trato urinário e corrente sanguínea, isso se deve às intervenções médicas prolongadas nesses locais, que aumentam a chance de contaminação bacteriana [34].

Considerando-se todos os isolados testados, *K. pneumoniae* foi a principal espécie em número e quantidade de genes de resistência pesquisados, possuindo com frequência mais de um gene. Essa tendência de carregar mais de um gene é observada para todas as espécies bacterianas em diversos trabalhos, porém de forma mais pronunciada em algumas, como em *Klebsiella* spp. [35, 36, 37]. Fora da UTI, este estudo encontrou que *K. pneumoniae* também

foi a principal espécie entre todos os sítios coletados, portando principalmente *blaCTX* e *blaTEM*.

A alta capacidade de aquisição genética desse gênero é reforçada neste estudo pela elevada prevalência dos genes *blaCTX* e *blaSHV*, codificadores de ESBLs, comumente encontrados em plasmídeos e abrigados em transposons em isolados de *K. pneumoniae* [11, 33]. A combinação de genes *blaCTX/blaSHV* foi encontrada somente em isolados provenientes da UTI e, assim como neste trabalho, a presença simultânea desses genes – associados ou não a outros mecanismos de resistência – tem sido frequentemente relatada, conferindo aos microrganismos resistência não apenas a beta-lactâmicos, mas também a outras classes de antibióticos, como quinolonas, sulfonamidas e tetraciclínas [20]. Outro ponto relevante foi a elevada diversidade de espécies bacterianas em amostras da unidade intensiva, indicando propagação dos genes associados a resistência entre elas, fato reforçado pela ausência de espécie predominantemente quanto a presença do gene mais detectado (*blaCTX*), corroborando a hipótese de difusão genética e suas variantes dentre patógenos encontrados em pacientes internados em UTIs [30, 38, 39].

Quando considerado apenas as amostras de hemocultura, que foi o sítio mais coletado fora da UTI, a espécie *E. coli* predominou. Esta bactéria também representou parcela significativa dos isolados portadores de *blaTEM*, especialmente devido à elevada detecção no mês de setembro de 2023 (Figura 2c), quando houve aumento expressivo no isolamento dessa bactéria. *blaTEM* é muito relatado em cepas de *E. coli*, nas quais se suspeita que promova resistência a Piperacilina Tazobactam, podendo haver envolvimento de mecanismos como a redução do plasmídeo, que resulta no aumento do número de cópias [20, 40]. Esse modo de ação promove a resistência bacteriana na espécie e favorece sua disseminação para além das conhecidas infecções no trato geniturinário, provavelmente, favorecida pela manipulação dos pacientes, através de contaminação cruzada durante os procedimentos de cuidado, elevando assim, o risco de bacteremias e levando a piora no prognóstico [41, 42, 43].

Uma vez instalado o quadro de bacteremia, os patógenos Gram-negativos, como os analisados neste estudo, ganham destaque pela sua importância clínica, especialmente devido à produção de ESBLs por muitas espécies. Esse fenômeno é particularmente observado em enterobactérias submetidas à pressão seletiva causada pelo uso frequente de antibióticos ao longo da vida dos pacientes, o que compromete a eficácia dos tratamentos disponíveis. [32, 44]. Tais achados reforçam a preocupação com infecções da corrente sanguínea em ambiente hospitalar devido ao elevado risco associado, especialmente quando os microrganismos causadores carregam genes de resistência a antimicrobianos de ampla disseminação. Além

disso, a coexistência de múltiplos genes de resistência em um único patógeno, bem como possíveis interações sinérgicas entre eles, pode potencializar a resistência [39, 45].

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a relação entre a presença dos genes investigados e o perfil de resistência aos antimicrobianos utilizados no critério de inclusão, neste contexto, foi possível observar uma relação estatística significativa entre resistência a pelo menos um dos antibióticos e a presença dos genes *blaKPC* e *blaCTX*. O gene *blaKPC*, embora tenha sido o menos detectado, foi estatisticamente relacionado à resistência a cinco dos antibióticos testados (Tabela 2), contemplando todos os carbapenêmicos e duas cefalosporinas, de 3º e 4º geração - corroborando estudos feitos na América Latina e China [8, 19].

A ocorrência simultânea desses genes em isolados multirresistentes é frequente e pode conferir resistência a antibióticos carbapenêmicos e cefalosporinas pela produção de ESBLs, capazes de elevar várias vezes as concentrações inibitórias mínimas [46, 47, 48]. O gene *blaKPC*, em especial, é conhecido e frequentemente associado a falhas terapêuticas com a classe dos carbapenêmicos, elevando a dose eficaz destes antimicrobianos, podendo até inviabilizar seu uso [49, 50, 51].

O cenário envolvendo o gene *blaKPC* tem se tornado cada vez mais preocupante, especialmente diante das dificuldades em combater bactérias que o carregam. Mutações nesse gene têm ampliado o espectro de ação da enzima KPC, conferindo resistência a outros antimicrobianos, como a ceftazidima. Neste estudo, foi detectada associação estatística entre a presença do gene e a resistência a esse antibiótico. Além disso, observou-se também uma associação significativa entre a presença do *blaKPC* e o perfil de resistência à cefepima, uma cefalosporina de quarta geração, o que reduz de forma relevante a probabilidade de sucesso terapêutico [52, 53, 54].

Este estudo também detectou uma associação estatisticamente significativa entre os genes *blaCTX*, com o antibiótico Ceftriaxona, uma cefalosporina de terceira geração, e com o monobactâmico Aztreonam. Outros trabalhos indicam que *blaCTX* costuma conferir resistência ampla às cefalosporinas, estendendo-se a outros fármacos desta classe e também ao aztreonam sendo, em outros estudos, frequentemente encontrado em conjunto com *blaSHV* e/ou *blaTEM*, caracterizando isolados multirresistentes a diversas subclasses de β -lactâmicos. Esses achados corroboram nossos resultados e destacam o papel desses genes na disseminação da multirresistência [45, 55, 56].

No entanto, ao contrário do que foi observado em estudos realizados na Romênia, em nosso trabalho, o gene *blaCTX* não predominou em *E. coli*, embora tenha sido o mais disseminado entre todos os isolados, especialmente em *K. pneumoniae*. Em relação ao gene

blaTEM, este estudo também apresentou resultado diferente, pois *E. coli* não foi a principal espécie em que o gene foi detectado, mas, entre os isolados de *E. coli* que apresentavam apenas um dos genes pesquisados, *blaTEM* foi o mais frequente [20].

O cenário epidemiológico de presença de um ou múltiplos genes, especialmente *blaKPC*, associados a perfis de resistência a antimicrobianos descritos neste trabalho, reforçam a necessidade de vigilância e controle microbiológico rigorosos. Soma-se a isso a predominância de bactérias normalmente associadas a perfis de resistência em amostras do trato respiratório e hemoculturas, em especial *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*, sugerindo que infecções associadas a intervenções invasivas estão entre as principais ligadas a piora clínica, reforçando a necessidade de ações de controle microbiológico [57, 58].

Os genes *blaTEM* e *blaSHV* foram muito identificados nos isolados testados (Figura 2a), mas não foram relacionados estatisticamente à resistência aos antibióticos utilizados. No entanto, suas presenças vêm sendo relacionadas com isolados multirresistentes, afetando não somente os antibióticos avaliados neste trabalho, mas também outras classes [59]. Outro ponto importante foi que todos os isolados portadores da combinação de genes *blaCTX* e *blaSHV* foram detectados na UTI, sugerindo um maior potencial de agravamento clínico para esta combinação, como ocorre para a coexistência entre *blaCTX* e *blaTEM* em cepas multirresistentes, resultando em amplo fenótipo de resistência [59, 60, 61].

Destaca-se também que amoxicilina com clavulanato de potássio obteve associação estatística com o gene *blaSHV* para a ocorrência de sensibilidade, sugerindo que o fenótipo resistente identificado nos isolados do trabalho não é devido a ação de beta-lactamases, mas possivelmente devido a outros mecanismos como bombas de efluxo [60, 61].

Diante do exposto, a identificação de genes de resistência em isolados clínicos através de métodos confiáveis representa um método que pode contribuir para o monitoramento e interpretação dos perfis de resistência a antibióticos entre os isolados. Muitos desses genes são codificados em plasmídeos, que em muitos casos se relacionam a fenótipos de virulência e resistência, podendo ser transmitidos célula a célula pelo mecanismo de conjugação entre espécies diversas, resultando numa grande variedade de patógenos multirresistentes [62, 63].

Culminando na persistência de cepas patogênicas em ambientes hospitalares, causando assim extensão na permanência dos pacientes e maior tempo de infecção ativa, permitindo aumento nas chances de transmissão para outros pacientes e setores dos hospitais [57, 64], deste modo, clones de diversas espécies podem permanecer por longos períodos nos ambientes causando surtos e promovendo a disseminação horizontal de genes para outros organismos, tornando a higiene dos locais e aspectos de biossegurança pontos chave no enfrentamento a este

problema [65, 66].

A transmissão dos fatores genéticos é evidenciada neste trabalho pelo aparecimento de sequências idênticas ou muito similares em UTIs e enfermarias, ao longo de meses distintos, reforçando a hipótese de transmissão contínua desses determinantes de resistência (Figura 3), indicando também que os patógenos portadores foram carregados entre os ambientes, os colonizando e criando uma dinâmica interna própria [58]. Neste ambiente, por meio da transmissão horizontal, os genes podem ser transmitidos entre as espécies por intermédio de plasmídeos, que conseguem permanecer no ambiente à medida que chegam a patógenos mais adaptados, que atuam como reservatório local, podendo permitir a permanência da sequência no ambiente por longos períodos [67, 68].

Levando em consideração a complexidade do cenário, este estudo utilizou alguns modelos de *machine learning*, uma subárea da inteligência artificial, para analisar os dados referentes a resistência, foi encontrado que o modelo RF (Random Forest) foi o mais eficiente para prever a resistência em função da presença dos genes procurados (Tabela 3) [69].

Sua capacidade explicativa, diferentemente de "caixas pretas" como SVM (que depende de transformações complexas via kernels) ou KNN (baseado em proximidade não parametrizada), permite visualizar a importância das variáveis (genes) na resistência a cada antibiótico. Essa transparência é crítica para decisões clínicas, onde entender quais genes mais contribuem para a resistência pode orientar terapias [70].

A robustez a desafios dos dados, ao contrário da Regressão Logística que sofre com relações não lineares entre genes e resistência, e do Naive Bayes, que falha ao assumir independência irreal entre features, naturalmente lida com interações complexas entre genes (ex: efeitos sinérgicos de *blaKPC* + *blaCTX*); 2) e é menos sensível a desequilíbrio de classes (comum em dados de resistência), devido ao class weighting implementado [71].

O modelo também demonstrou praticidade clínica ao permitir a geração árvores de decisões passíveis de simplificação para regras binárias ("Se *blaKPC* = presente → alta probabilidade de resistência a carbapenêmicos"), facilitando sua integração em fluxos hospitalares. Já modelos como SVM exigem cálculos de vetores de suporte pouco intuitivos para não especialistas [72].

Dentre as principais vantagens do modelo, estão a praticidade e a transparência para criar uma aplicação/software, a exemplo do "BactoShield" (disponível no link: <https://bactoshield.flutterflow.app>), desenvolvido pelo estudo, em que é possível calcular a probabilidade de a bactéria ser resistente aos antibióticos testados (Tabela 2) baseado na presença ou ausência dos quatro genes codificadores de beta-lactamases, esforços como este

são importantes à medida que buscam alternativas para os métodos convencionais, mais demorados, porém ainda são de custo elevado em sua maioria, tais estudos utilizam dados clínicos, epidemiológicos locais, antibiogramas, sequenciamento genômico, dentre outros, obtendo resultados promissores quanto a eficiência e aceitabilidade dos modelos nos últimos anos [70, 71].

Ainda sobre o desempenho do Random Forest, dentre os antibióticos testados, o modelo se destacou na análise de Amoxicilina com clavulanato, Meropenem e Aztreonam, muitos autores enaltecem a robustez e assertividade oferecidas por este modelo, porém, dentre as principais dificuldades, são relatadas distorções nos dados utilizados, que precisam ser minimizadas pelo uso de técnicas de correções para os erros [73].

Os modelos de Random Forest desenvolvidos podem ser integrados a sistemas digitais de hospitalais para alertas precoces de resistência, como exemplo na Automatização de Laudos ao se detectar os genes *blaKPC* ou *blaCTX* em um isolado bacteriano, o sistema poderia emitir um alerta automático no prontuário eletrônico, sugerindo evitar carbapenêmicos ou cefalosporinas de 3ª geração. Em Painéis de Controle dados agregados poderiam gerar mapas de calor em tempo real, mostrando a prevalência de genes resistentes por ala hospitalar (ex: UTIs com surtos de *K. pneumoniae* produtora de KPC). Também é possível o uso em Protocolos Personalizados, combinando os resultados com dados clínicos (por exemplo: comorbidades do paciente), o modelo auxiliaria na escolha de esquemas antimicrobianos mais assertivos, reduzindo o uso empírico [74].

Este trabalho restringiu-se a patógenos Gram-negativos e a resistência mediada por produção de beta-lactamases, relacionada a antibióticos de maior interesse clínico. Desta maneira, não tratou o impacto da resistência em Gram-positivos, outros mecanismos mediadores de resistência como bombas de efluxo e modificação de permeabilidade da membrana, além de antibióticos de outras classes, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Outra limitação deste trabalho é a ausência de isolados de urocultura, devido ao fluxo de obtenção dos isolados junto ao laboratório. Assim, novos estudos são necessários para continuar a mapear os mecanismos de resistência bacteriana e seu impacto no manejo clínico dos pacientes, por meio da ampliação dos grupos microbianos estudados, incluindo bactérias Gram-positivas e isolados de urocultura. Dessa forma, o modelo aqui proposto pode ser melhorado e obter maior precisão do fenótipo de resistência ou susceptibilidade. Entretanto, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a construção de modelos preditivos a partir da presença de genes de resistência é possível.

1.7 CONCLUSÃO

A investigação epidemiológica permitiu identificar os principais sítios de coletas de amostras para isolamento bacteriano de pacientes internados e as bactérias predominantes, bem como seu perfil de resistência e genótipo. O principal sítio coletado no período foi aspirado orotraqueal e, no geral, houve predomínio de *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Quando considerados somente os isolados resistentes aos antibióticos considerados neste trabalho, a principal espécie bacteriana foi *K. pneumoniae*, portadora da maioria dos genes codificantes de beta-lactamase identificados, seguida por outras espécies, relevantes no contexto estudado, a saber, *E. coli* e *P. aeruginosa*. A investigação molecular mostrou que o gene *blaKPC* é o que possui o maior impacto clínico, pois foi associado estatisticamente à resistência a cinco dos oito antibióticos de interesse. Além disso, foi identificado indícios de persistência clonal ao longo do tempo no ambiente e de transmissão genética horizontal.

Com os dados obtidos, o modelo de *aprendizado de máquina* escolhido foi capaz de prever com razoável precisão o fenótipo de resistência aos antibióticos de interesse por meio da presença ou ausência dos genes. Os resultados obtidos são promissores e indicam a possibilidade de predição da resistência baseada em vigilância molecular. Porém, mais estudos são necessários para investigar melhor a dinâmica genética e de espécies com relação aos mecanismos de resistência e antibióticos não avaliados neste estudo, fornecendo uma base de dados mais robusta e completa para ampliar a confiabilidade do modelo de predição testado.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (WHO). Relatório do sistema global de vigilância de resistência e uso de antimicrobianos (GLASS). <https://www.who.int/publications/i/item/9789240062702>. (2022). Acessado em 26 de maio de 2025.
2. Uc-Cachón AH, Molina-Salinas GM, Dzúl-Beh AJ, Rosado-Manzano R.F, Dzib-Baak HE. Bacterias Gram-negativas de prioridad crítica en pacientes de las UCI de un hospital de tercer nivel [Gram-negative bacteria of critical priority in ICU patients from a tertiary care hospital]. Revista medica del Instituto Mexicano del Seguro Social. 2023; <https://doi.org/10.5281/zenodo.8316413>.
3. Lerminiaux NA, Cameron Ad. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes in clinical environments. Canadian Journal Of Microbiology. 2019; <https://doi.org/10.1139/cjm-2018-0275>.
4. Mello Ms, Oliveira Ac. Overview of the actions to combat bacterial resistance in large hospitals. Revista Latino-Americana de Enfermagem. 2021;29:3407.
5. World Health Organization (WHO). WHO Bacterial Priority Pathogens List, 2024: bacterial pathogens of public health importance to guide research, development and strategies to prevent and control antimicrobial resistance. <https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/376776/9789240093461-eng.pdf?sequence=1> (2024). Acessado em 19 de junho de 2025.
6. Antochévis LC, Wilhelm CM, Arns B, Sganzerla D, Sudbrack LO, Nogueira TC, et al. World Health Organization priority antimicrobial resistance in Enterobacterales, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecium* healthcare-associated bloodstream infections in Brazil (ASCENSION): a prospective, multicentre, observational study. Lancet regional health. Americas. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.lana.2025.101004> .

7. Wilhelm CM, Antochévis LC, Magagnin CM, Arns B, Viecele T, Pereira DC, et al. Avaliação da suscetibilidade de novas combinações de beta-lactâmicos/inibidores de beta-lactamase contra *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos em infecções da corrente sanguínea em pacientes hospitalizados no Brasil. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.06.007>.
8. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clinical Infectious Diseases*. 2019; <https://doi.org/10.1093/cid/ciz824>.
9. Mancuso G, Midiri A, Gerace E, Biondo C. Bacterial Antibiotic Resistance: the most critical pathogens. *Pathogens*. 2021; <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>.
10. Karakostas S, Rousaki M, Kritsotakis EI. Cefiderocol: Revisão Sistemática dos Mecanismos de Resistência, Heterorresistência e Emergência In Vivo de Resistência. *Antibióticos* (Basileia, Suíça). 2022; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11060723>.
11. Castanheira M, Simner PJ, Bradford PA. Extended-spectrum β -lactamases: an update on their characteristics, epidemiology and detection. *JAC Antimicrob Resist*. 2021; <https://doi.org/10.1093/jacamr/dlab092>.
12. Noster J, Thelen P, Hamprecht A. Detection of Multidrug-Resistant Enterobacterales-From ESBLs to Carbapenemases. *Antibiotics* (Basel). 2021; <https://doi.org/10.3390/antibiotics10091140>.
13. Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules*. 2020; <https://doi.org/10.3390/molecules25061340>.
14. González-Espinosa F, Pilato VD, Magariños F, Conza JD, Rossolini GM, Gutkind G, et al. Genomic characterization of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* ST307 revealed multiple introductions in Buenos Aires, Argentina. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.03.017>.

15. Idrees EK, Aldriwesh MG, Alkhulaifi MM, Alghoribi MF. Systematic review of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Arabian Peninsula: molecular epidemiology and resistance patterns. *Frontiers in microbiology*. 2025; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2025.1489317>.
16. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The Characteristic of Virulence, Biofilm and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae*. *International Journal Of Environmental Research And Public Health*. 2020; <https://doi.org/10.3390/ijerph17176278>.
17. Pavlović DB, Pospišil M, Nađ M, Mijatović VV, Luxner J, Zarfel G, et al. Multidrug-Resistant Bacteria in Surgical Intensive Care Units: Antibiotic Susceptibility and β -Lactamase Characterization. *Pathogens*. 2024; <https://doi.org/10.3390/pathogens13050411>.
18. Khachab Y, Hodroj M, Sokhn ES. Understanding and addressing β -lactam resistance mechanisms in gram-negative bacteria in Lebanon: A scoping review. *Heliyon*. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2025.e42419>.
19. Han R, Shi Q, Wu S, Yin D, Peng M, Dong D, et al. China Antimicrobial Surveillance Network (CHINET) Study Group. Dissemination of Carbapenemases (KPC, NDM, OXA-48, IMP, and VIM) Among Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae Isolated From Adult and Children Patients in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020; <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00314>.
20. Ghenea AE, Zlatian OM, Cristea OM, Ungureanu A, Mititelu RR, Balasoiu AT, et al. TEM, CTX-M, SHV Genes in ESBL-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Clinical Samples in a County Clinical Emergency Hospital Romania- Predominance of CTX-M-15. *Antibiotics (Basel)*. 2022; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11040503>.
21. Uddin S, Khan A, Hossain ME, Moni MA. Comparing different supervised machine learning algorithms for disease prediction. *BMC medical informatics and decision making*. 2019; <https://doi.org/10.1186/s12911-019-1004-8>.

22. Silverio PSSN, Viana JO, Barbosa EG. 3D-QSARpy: Combinando estratégias de seleção de variáveis e técnicas de aprendizado de máquina para construir modelos QSAR. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2023;59:223-73.

23. Theodosiou AA, Read RC. Artificial intelligence, machine learning and deep learning: Potential resources for the infection clinician. *The Journal of infection*. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.07.006>.

24. Guo W, Liu J, Dong F, Song M, Li Z, Khan MKH, et al. Review of machine learning and deep learning models for toxicity prediction. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.). 2023; <https://doi.org/10.1177/15353702231209421>.

25. Tamura K, Stecher G, Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol Biol Evol*. 2021; <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.

26. R Core Team: *A Language and Environment for Statistical Computing*. <https://www.R-project.org/> (2024). Acessado em 26 de maio de 2025.

27. Despotovic M, Nies L, Busi SB, Wilmes P. Reservoirs of antimicrobial resistance in the context of One Health. *Current Opinion in Microbiology*. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.mib.2023.102291>.

28. Hal SJV, Willems RJL, Goulioris T, Ballard SA, Coque TM, Hammerum AM, et al. The interplay between community and hospital *Enterococcus faecium* clones within health-care settings: a genomic analysis. *Elsevier*. 2022; [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00236-6](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00236-6).

29. Dong N, Yang X, Chan Ew, Zhang R, Chen S. Klebsiella species: Taxonomy, hypervirulence and multidrug resistance. *EBioMedicine*. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.103998>.

30. Rathbun KP, Bourgault AM, Sole ML. Oral Microbes in Hospital-Acquired Pneumonia: Practice and Research Implications. *Critical care nurse*. 2022; <https://doi.org/10.4037/ccn2022672>.

31. Daam KC, Samuel DA, Nwokoro U, Waziri H, Onyedibe K, Okolo M, et al. Detection of CTX-M and SHV Genes in Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella Pneumoniae* and *Pseudomonas Aeruginosa* in a Tertiary Hospital in North-central Nigeria. *Nigerian medical journal : journal of the Nigeria Medical Association*. 2023;64:196–204.

32. Mehrotra T, Konar D, Pragasam AK, Kumar S, Jana P, Babel P, et al. Antimicrobial resistance heterogeneity among multidrug-resistant Gram-negative pathogens: Phenotypic, genotypic, and proteomic analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2023; <https://doi.org/10.1073/pnas.2305465120>.

33. Kuzina ES, Kislichkina AA, Sizova AA, Skryabin YP, Novikova Ts, Ershova On, et al. High-Molecular-Weight Plasmids Carrying Carbapenemase Genes *bla*_{NDM-1}, *bla*_{KPC-2}, and *bla*_{OXA-48} Coexisting in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains of ST39. *Microorganisms*. 2023; <https://doi.org/10.3390/microorganisms11020459>.

34. Araç E, Kaya Ş, Parlak E, Büyüktuna SA, Baran AI, Akgül F, et al. Yoğun Bakım Ünitelerindeki Enfeksiyonların Değerlendirilmesi: Çok Merkezli Nokta Prevalans Çalışması [Evaluation of Infections in Intensive Care Units: A Multicentre Point-Prevalence Study]. *Mikrobiyoloji bulteni*. 2019; <https://doi.org/10.5578/mb.68665>.

35. Shahid M, Saeed NK, Ahmad N, Shadab M, Joji RM, Al-Mahmeed A, et al. Molecular Screening of Carbapenem-Resistant *K. pneumoniae* (CRKP) Clinical Isolates for Concomitant Occurrence of Beta-Lactam Genes (CTX-M, TEM, and SHV) in the Kingdom of Bahrain. *Journal of clinical medicine*. 2023; <https://doi.org/10.3390/jcm12247522>.

36. Zhao H, He Z, Li Y, Sun B. Epidemiology of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 of producing KPC-2, SHV-106 and CTX-M-15 in Anhui, China. *BMC microbiology*. 2022; <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02672-1>.

37. Li S, Shen S, Ding L, Han R, Guo Y, Yin D, et al. First Report of *bla*_{CTX-M-167}, *bla*_{SHV-1}, and *bla*_{TEM-1B} Carrying *Klebsiella pneumoniae* Showing High-Level Resistance to Carbapenems. *Frontiers in microbiology*. 2022; <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.916304>.

38. Ali MZ, Srinivasan S, Akter S. CTX-M-127 with I176F mutations found in bacteria isolates from Bangladeshi circulating banknotes. Scientific reports. 2024; <https://doi.org/10.1038/s41598-024-56207-x>.
39. Yu K, Huang Z, Xiao Y, Gao H, Bai X, Wang D. Global spread characteristics of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases: A genomic epidemiology analysis. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.drug.2023.101036>.
40. Gálvez-Benítez L, De La Rosa JMO, Rodriguez-Villodres A, Casimiro-Soriguer CS, Molina-Panadero I, Alvarez-Marin R. et al. Role of *bla*TEM and OmpC in the piperacillin-tazobactam resistance evolution by *E. coli* in patients with complicated intra-abdominal infection. The Journal of infection. 2023; <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2023.07.005>.
41. Boyce JM. Hand and environmental hygiene: respective roles for MRSA, multi-resistant gram negatives, *Clostridioides difficile*, and *Candida* spp. Antimicrobial resistance and infection control. 2024; <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01461-x>.
42. Sevin T, Daniau C, Alfandari S, Piednoir E, Dumartin C, Blanchard H, et al. Patterns of antibiotic use in hospital-acquired infections. The Journal of hospital infection, 2021; <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2021.05.008>.
43. Zingg S, Kuster S, Rotz MV, Portmann A, Egli A, Seth-Smith HMB, et al. Outbreak with OXA-23-producing *Acinetobacter baumannii* in a COVID-19 ICU cohort: unraveling routes of transmission. Antimicrobial resistance and infection control. 2024; <https://doi.org/10.1186/s13756-024-01485-3>.
44. Amanati A, Sajedianfard S, Khajeh S, Ghasempour S, Mehrangiz S, Nematollahi S, et al. Bloodstream infections in adult patients with malignancy, epidemiology, microbiology, and risk factors associated with mortality and multi-drug resistance. BMC infectious diseases. 2021; <https://doi.org/10.1186/s12879-021-06243-z>.

45. Ibrahim ME, Algak TB, Abbas M, Elamin BK. Emergence of *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV and *bla*OXA genes in multidrug-resistant Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii* in Saudi Arabia. Experimental and therapeutic medicine. 2021; <https://doi.org/10.3892/etm.2021.10885>.
46. Carvalho I, Chenouf NS, Carvalho JA, Castro AP, Silva V, Capita R, et al. Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* harboring extended spectrum β -lactamase encoding genes isolated from human septicemias. PloS one. 2021; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0250525>.
47. Han Y, Huang L, Liu C, Huang X, Zheng R, Lu Y, et al. Characterization of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST15 Clone Coproducing KPC-2, CTX-M-15 and SHV-28 Spread in an Intensive Care Unit of a Tertiary Hospital. Infection and drug resistance. 2021; <https://doi.org/10.2147/IDR.S298515>.
48. Zhou J, Zhou J, Chen M, Lü P, Jiang C. Prevalence of β -lactam antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a neonatal intensive care unit. BMC pediatrics. 2025; <https://doi.org/10.1186/s12887-025-05389-y>.
49. Mehta SC, Furey IM, Pemberton OA, Boragine DM, Chen Y, Palzkill T. KPC-2 β -lactamase enables carbapenem antibiotic resistance through fast deacylation of the covalent intermediate. The Journal of biological chemistry. 2021; <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.015050>.
50. Shi Q, Shen S, Tang C, Ding L, Guo Y, Yang Y, et al. Molecular mechanisms responsible KPC-135-mediated resistance to ceftazidime-avibactam in ST11-K47 hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. Emerging microbes & infections. 2024; <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2361007>.
51. Tian D, Liu X, Chen W, Zhou Y, Hu D, Wang W, et al. Prevalence of hypervirulent and carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* under divergent evolutionary patterns. Emerging microbes & infections. 2022; <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2103454>.

52. Tooke CL, Hinchliffe P, Bonomo RA, Schofield CJ, Mulholland AJ, Spencer J. Natural variants modify *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) acyl-enzyme conformational dynamics to extend antibiotic resistance. *The Journal of biological chemistry*. 2021; <https://doi.org/10.1074/jbc.RA120.016461>.

53. Hobson CA, Pierrat G, Tenaillon O, Bonacorsi S, Bercot B, Jaouen E, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Variants Resistant to Ceftazidime-Avibactam: an Evolutionary Overview. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2022. <https://doi.org/10.1128/aac.00447-22>

54. Roach EJ, Uehara T, Daigle DM, Six DA, Khursigara CM. The Next-Generation β -Lactamase Inhibitor Taniborbactam Restores the Morphological Effects of Cefepime in KPC-Producing *Escherichia coli*. *Microbiology spectrum*. 2021; <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00918-21>.

55. Patil S, Chen H, Guo C, Zhang X, Ren PG, Francisco NM., et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST307 Co-Producing CTX-M with SHV and KPC from Paediatric Patients at Shenzhen Children's Hospital, China. *Infection and drug resistance*. 2021; <https://doi.org/10.2147/IDR.S324018>.

56. Mohammedkheir MIA, Gaafar EM, Abdalla EGE. Assessment of *BlaTEM*, *BlaSHV*, and *BlaCTX_M* genes of antibiotic resistance in Gram-negative bacilli causing urinary tract infections in Khartoum State: a cross-sectional study. *BMC infectious diseases*. 2024; <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09023-7>.

57. Zurita J, Sevillano G, Solís MB, Miño APY, Alves BR, Changuan J, et al. *Pseudomonas aeruginosa* epidemic high-risk clones and their association with multidrug-resistant. *Journal of global antimicrobial resistance*. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2024.07.003>.

58. Jia X, Zhu Y, Jia P, Li C, Chu X, Sun T, et al. The key role of iroBCDN-lacking pLVPK-like plasmid in the evolution of the most prevalent hypervirulent carbapenem-resistant ST11-KL64 *Klebsiella pneumoniae* in China. Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.drup.2024.101137>.
59. Dirar MH, Bilal NE, Ibrahim ME, Hamid ME. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase (ESBL) and molecular detection of *blaTEM*, *blaSHV* and *blaCTX-M* genotypes among Enterobacteriaceae isolates from patients in Khartoum, Sudan. The Pan African medical journal. 2020; <https://doi.org/10.11604/pamj.2020.37.213.24988>.
60. David EE, Igwenyi IO, Iroha IR, Emumwen EL, Offor CE, Orji OJ, et al. Yearly incidence of acute childhood gastroenteritis in Nigeria: Implicated pathogens predominantly harbor *blaCTXM* and *blaTEM* genes. Journal of infection in developing countries. 2025; <https://doi.org/10.3855/jidc.18716>.
61. Sunil A, Kumar K, Sridharan KS. Presence of the *blaTEM* Gene in Commensal *Neisseria* spp.: A Possible Cause for the Acquired Drug Resistance Among Pathogenic Respiratory Bacteria. Cureus. 2023; <https://doi.org/10.7759/cureus.49389>.
62. Fang Y, Jin J, Peng M, Xu L, Gu L, Bao D, et al. Genomic Characteristics of a Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Co-Carrying *bla_{NDM-5}* and *blaKPC₂* Capsular Type KL25 Recovered from a County Level Hospital in China. Infection and drug resistance. 2024; <https://doi.org/10.2147/IDR.S479560>.
63. Martínez-Álvarez S, Châtre P, François P, Zarazaga M, Madec JY, Haenni M, et al. Comparative phylogenomics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* revealed a wide diversity of clones and plasmids in Spanish chicken meat. International journal of food microbiology. 2025; <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2024.110900>.
64. Budia-Silva M, Kostyanev T, Ayala-Montaña S, Acosta JBF, Garcia-Castillo M, Cantón R, et al. International and regional spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe. Nature communications. 2024; <https://doi.org/10.1038/s41467-024-49349-z>.

65. Huang J, Alhejaili AY, Alkherd UH, Milner M, Zhou G, Alzahrani D, et al. The dissemination of multidrug-resistant and hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* clones across the Kingdom of Saudi Arabia. *Emerging microbes & infections*. 2024; <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2427793>.
66. Chen PY, Chen YC, Chiang CM, Chen CC, Lai CC, Tsai CH, et al. Emergence of multidrug-resistant *E. coli* ST8346 isolates carrying three distinct plasmids with NDM-5, KPC-2, and OXA-181. *Journal of infection and public health*. 2024; <https://doi.org/10.1016/j.jiph.2024.102596>.
67. Sastre-Dominguez J, DelaFuente J, Toribio-Celestino L, Herencias C, Herrador-Gómez P, Costas C, et al. Plasmid-encoded insertion sequences promote rapid adaptation in clinical enterobacteria. *Nature ecology & Evolution*. 2024; <https://doi.org/10.1038/s41559-024-02523-4>.
68. Nasser F, Gaudreau A, Lubega S, Zaker A, Xia X, Mer AS, et al. Characterization of the diversity of type IV secretion system-encoding plasmids in *Acinetobacter*. *Emerging microbes & infections*. 2024; <https://doi.org/10.1080/22221751.2024.2320929>.
69. Sakagianni A, Koufopoulou C, Feretzakis G, Kalles D, Verykios VS, Myrianthefs P, et al. Using Machine Learning to Predict Antimicrobial Resistance-A Literature Review. *Antibiotics* (Basel, Switzerland). 2023; <https://doi.org/10.3390/antibiotics12030452>.
70. Sharma A, Machado E, Lima KVB, Suffys PN, Conceição E C. Tuberculosis drug resistance profiling based on machine learning: A literature review. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*. 2022; <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2022.102332>.
71. Anahtar MN, Yang JH, Kanjilal S. Applications of Machine Learning to the Problem of Antimicrobial Resistance: an Emerging Model for Translational Research. *Journal of clinical microbiology*. 2021; <https://doi.org/10.1128/JCM.01260-20>.

72. Rusic D, Kumric M, Perisin AS, Leskur D, Bukic J, Modun D, et al. Tackling the Antimicrobial Resistance "Pandemic" with Machine Learning Tools: A Summary of Available Evidence. *Microorganisms*. 2024; <https://doi.org/10.3390/microorganisms12050842>.
73. Dixit A, Freschi L, Vargas R, Gröschel MI, Nakhoul M, Tahseen S, et al. Estimation of country-specific tuberculosis resistance antibiograms using pathogen genomics and machine learning. *BMJ global health*. 2024; <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2023-013532>.
74. Ardila CM, González-Arroyave D, Tobón S. Machine learning for predicting antimicrobial resistance in critical and high-priority pathogens: A systematic review considering antimicrobial susceptibility tests in real-world healthcare settings. *Plos One*. 2025; <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0319460>.