

**MARIA FERNANDA CAMPAGNARI BUENO**

**Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético em *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas de hospitais do Estado de São Paulo**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciência.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública (PLSP)

Orientadora: Profa. Dra. Doroti de Oliveira Garcia

Co-orientador: Dr. Yohei Doi

**SÃO PAULO**

**2017**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Bueno, Maria Fernanda Campagnari.

Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético em *Klebsiella spp.* produtoras de KPC isoladas de hospitais do Estado de São Paulo. / Maria Fernanda Campagnari Bueno. – 2017.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2017.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Doroti de Oliveira Garcia.

1. *Klebsiella*. 2. Plasmídeos. 3. Carbapenêmicos. 4. beta-Lactamases. 5. Aminoglicosídeos.

SES/CCD/CD-348/2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço aos meus pais, Marisa e Adalberto, e minha irmã, Maria Paula, por terem me apoiado e incentivado todas minhas escolhas e por terem ficado ao meu lado desde o começo da minha carreira.

Agradeço a toda minha família, em especial meus padrinhos, Jório e Magali, por todo apoio e amor recebidos.

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Doroti de Oliveira Garcia por toda sua dedicação, conhecimento e pelas oportunidades que ela me proporcionou durante esse período.

Agradeço ao Dr. Yohei Doi pelos seus conhecimentos, ensinamentos e parceria no projeto.

Agradeço às chefias e colegas do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, em especial Sônia, Fábio e Sueli, pela amizade e auxílio prestados.

Agradeço aos colegas e amigos do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz pelas por fazerem o ambiente de trabalho mais alegre.

Agradeço às amigas que fiz no Instituto Adolfo Lutz, Ana Paula, Juliana Pinhata, Juliana Failde, Natália, Laís e Nathamy por estarem todos os dias ao meu lado, e por serem mais do que colegas, são amigas e companheiras para toda a minha vida.

Agradeço às minhas amigas de infância: Luiza, Débora, Carol Ribas, Muriel, Maira, Thais e Marília; minhas amigas de faculdade: Gabriela, Pammela, Tamires, Bárbara e Sabrina e ao meu amigo Lucas, pelo apoio e

por entenderem todas as vezes que me ausentei para ficar em casa escrevendo minha tese.

Agradeço ao meu namorado Leonardo Martins por toda admiração que ele sente por mim e por sempre me apoiar, me incentivar e estar ao meu lado em todos os momentos.

Agradeço, em especial, a Gabriela Rodrigues Francisco, por ser essa parceira de pesquisa e na vida, por sempre me ajudar, por sempre torcer por mim e por, nesses 8 anos de amizade, ter se tornado minha melhor amiga e ter estado ao meu lado nos momentos alegres e também nos momentos difíceis.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/06827-1 (bolsa de Mestrado), processo 2014/23715-8 (bolsa de Doutorado Direto) processo PPSUS/FAPESP 2009/53229-0.

A ida ao laboratório do Dr. Yohei Doi, na Universidade de Pittsburgh, Pittsburgh, Estados Unidos teve o apoio financeiro do Fogarty International Center Global Infectious Diseases Research Training Program Grant, National Institutes of Health (D43TW006592; principal investigador, Lee H. Harrison).

## RESUMO

*Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL estão frequentemente envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). ESBL são capazes de hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam, sendo os carbapenêmicos o fármaco de escolha para infecções por microrganismos produtores de ESBL. Porém, *Klebsiella* spp. produtoras de carbapenemases tem se tornado cada vez mais frequentes. Além disso, já foi descrita, no Brasil, *K. pneumoniae* produtoras da 16S RMTase, RmtD, uma enzima que confere resistência em nível elevado para todos os aminoglicosídeos, tornando as opções terapêuticas bastante limitadas. O objetivo desse trabalho foi caracterizar genes de resistência responsáveis pela produção de ESBL, carbapenemases e 16S RMTases e seu contexto genético em *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas de amostras clínicas provenientes de hospitais do Estado de São Paulo. Cem cepas de *Klebsiella* spp., isoladas de 2009 a 2011, previamente confirmadas como produtoras de KPC, foram submetidas a PCR para detecção de *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* e sequenciamento de DNA. Para as cepas negativas para os genes *bla*<sub>SHV</sub> foram realizadas a identificação de *Klebsiella* spp. a partir de provas bioquímicas, PCR Multiplex para detecção dos genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>LEN</sub> e *bla*<sub>OKP</sub> e sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. Experimentos de transformação e clonagem foram utilizados para a identificação de um novo gene de resistência aos aminoglicosídeos e plasmídeos carreadores de genes de 16S RMTases foram sequenciados. As cepas apresentaram resistência em nível elevado para a maioria dos antibióticos testados. Em relação aos genes de resistência, 80% das cepas foram positivas para os genes *bla*<sub>CTX-M</sub> (61 CTX-M-15, 7 CTX-M-2, 7 CTX-M-8 e 1 CTX-M-35). Duas cepas eram co-produtoras de CTX-M-2 e CTX-M-15 e 2 co-produtoras de CTX-M-59 e CTX-M-8. A presença do gene *bla*<sub>TEM-1</sub> ocorreu em 26%. Os genes *bla*<sub>SHV</sub> foram observados em 97% dos isolados (89 SHV-11, 1 SHV-1, 3 SHV-110 e 4 SHV-12). Todas as cepas foram caracterizadas como produtoras de KPC-2. Das 3 cepas negativas para o *bla*<sub>SHV</sub>, 2 foram confirmadas como *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e 1 como *K. variicola*. Em relação aos genes de 16S RMTases, 3 cepas apresentaram-se positivas para RmtD. Uma nova 16S RMTase, presente em 4 cepas, foi caracterizada e denominada RmtG. O sequenciamento dos plasmídeos contendo os genes de 16S RMTases mostrou associação com elementos móveis como ISCR2 e IS26. A identificação de mecanismos de resistência é uma ferramenta útil para determinar a epidemiologia dos genes de resistência produzidos por *Klebsiella* spp. resistentes a diversas classes de antimicrobianos, o que pode colaborar para a implantação de medidas efetivas no âmbito hospitalar para conter a disseminação desses microrganismos.

## ABSTRACT

*Klebsiella pneumoniae* producing ESBLs are frequently involved in hospital infections in intensive care unit (ICU). ESBLs are capable of hydrolyzing all penicillins, cephalosporins and aztreonam. Carbapenems are considered the agents of choice for treatment of infections caused by ESBL-producing microorganisms. However, *Klebsiella* spp. producing carbapenemases has become more frequent. Moreover, *K. pneumoniae* producing 16S RMTase, RmtD, which confers high level resistance to aminoglycosides, have been described in Brazil, limiting the therapeutical options. The aim of this study was to characterize resistance genes responsible to the production of ESBL, carbapenemases and 16S RMTases and their genetic context in *Klebsiella* spp. producing KPC from hospitals at Sao Paulo State. A hundred *K. pneumoniae* strains isolated in the period of 2009 and 2011 and previously confirmed as KPC producers were subjected to PCR for the detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub>, *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC* e *rmtD* and DNA sequencing. Identification of *Klebsiella* spp. by biochemical tests, detection of *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>LEN</sub> e *bla*<sub>OKP</sub> genes by Multiplex PCR and 16S rRNA gene and *rpoB* sequencing was performed on *bla*<sub>SHV</sub> negative isolates. Transformation and genomic cloning were performed for the identification of a new aminoglycosides resistance gene. Sequencing of plasmids carrying 16S RMTases genes was performed. All strains showed high resistance levels for most antibiotics tested. Our results showed a positivity of 80% for *bla*<sub>CTX-M</sub> (61 CTX-M-15, 7 CTX-M-2, 2, 7%7 CTX- M-8 and 1 CTX-M-35). Co-production of CTX-M-2 e CTX-M-15 was observed in two strains and CTX-M-8 and CTX-M-59 co-production were also found in two strains. The presence of *bla*<sub>TEM-1</sub> was observed in 26% of the strains. *bla*<sub>SHV</sub> were observed in 97% of the strains (89 SHV-11, 1 SHV-1, 3 SHV-110 and 4 SHV-12). All *Klebsiella* spp. were characterized as KPC-2 producers. Of the three *bla*<sub>SHV</sub> negative strains, 2 were confirmed as *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* and 1 was confirmed as *K. variicola*. Three isolates were positive for RmtD and a new 16S rRNA methylase, found in 4 strains, was characterized and denominated as RmtG. Sequencing of plasmids bearing 16S rRNA methyltransferases genes showed an association with genetic mobile elements such as ISCR2 and IS26. Identification of resistance mechanisms in multidrug-resistant *K. pneumoniae* isolates will contribute in the implementation of effective measures in the hospitals to contain the dissemination of these microorganisms.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>Δ</b>	Símbolo que indica que um gene está truncado
<b>4,5-DOS</b>	2-deoxiestreptamina 4,5-dissubstituído
<b>4,6-DOS</b>	2-deoxiestreptamina 4,6-dissubstituído
<b>AAC</b>	Aminoglicosídeos acetiltransferases
<b><i>aadA2</i></b>	Gene que codifica uma adeniltransferase
<b>ABK</b>	Arbecacina
<b>ACT</b>	"AmpC type"
<b>AFB</b>	Ácido fenilborônico
<b>AK</b>	Amicacina
<b>AmpC</b>	Betalactamase de classe C de Ambler
<b>ANT</b>	Aminoglicosídeos adeniltransferases
<b>ANVISA</b>	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
<b>Apal</b>	Primeira enzima de restrição isolada de <i>Acetobacter pasteurianus</i> sub. <i>pasteurianus</i> (ATCC9432)
<b>APH</b>	Aminoglicosídeos fosfotransferases
<b>APR</b>	Apramicina
<b>ArmA</b>	"Aminoglycosides Resistance Methylase"
<b>AT</b>	Aztreonam
<b>ATCC</b>	"American Type Culture Collection"
<b><i>attC</i></b>	Sítio de recombinação no cassette genético
<b><i>attI</i></b>	Sítio de recombinação no integron
<b>BamHI</b>	Primeira enzima de restrição isolada de <i>Bacillus amyloliquifaciens</i> cepa H
<b>BES</b>	Brazil Extended Spectrum
<b>BJM</b>	Bush-Jacoby-Medeiros
<b><i>bla</i></b>	Gene codificador de betalactamase
<b>BLAST</b>	"Basic Local Alignment Search Tool"
<b>CARB</b>	"Carbenicillin-hydrolyzing betalactamase"
<b><i>cat</i></b>	Gene que confere resistência ao cloranfenicol
<b>CAU</b>	Metalo betalactamase de <i>Caulobacter vibrioides</i>
<b>CC</b>	Complexo Clonal
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i>
<b>CepA</b>	Cefalosporinase endógena de <i>Bacteroides fragilis</i>
<b>CIM</b>	Concentração inibitória Mínima
<b>CIM<sub>50</sub></b>	Concentração mínima necessária para inibir 50% dos microrganismos estudados
<b>CIM<sub>90</sub></b>	Concentração mínima necessária para inibir 90% dos microrganismos estudados
<b>CLOXA</b>	Cloxacilina
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute
<b><i>cml</i></b>	Gene que confere resistência ao cloranfenicol

<b>CMT</b>	"Complex Mutant of TEM"
<b>CMY</b>	"Cephamycinase"
<b>CphA</b>	Metalo betalactamase da subclasse B2 de <i>Aeromonas hydrophila</i>
<b>CT</b>	Cefotaxima
<b>CT/CTL</b>	Cefotaxima/Cefotaxima com ácido clavulânico
<b>CTX-M</b>	Cefotaximase isolada em <u>M</u> unique
<b>DBK</b>	Dibercacina
<b>deoR</b>	Deoxyribose operon repressor gene
<b>dfr</b>	Gene que confere resistência ao trimetoprim
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>DR</b>	Sequência de repetição direta
<b>EcoRI</b>	Primeira enzima de restrição isolada da <i>E. coli</i> RY13
<b>EDTA</b>	Ácido etileno-diamino tetra-acético
<b>ERT</b>	Ertapenem
<b>ESBL</b>	"Extended Spectrum Betalactamase" (Betalactamase de espectro estendido)
<b>F</b>	<i>Forward</i>
<b>FEZ</b>	<i>Legionella (Fluoribacter) gormanii endogenous zinc betalactamase</i>
<b>FOX</b>	Cefoxitinase
<b>GES</b>	Guiana Extended Spectrum
<b>GM</b>	Gentamicina
<b>GOB</b>	Metalo betalactamase da subclasse B3 de <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
<b>HindIII</b>	Terceira enzima de restrição isolada de <i>Haemophilus influenzae</i> cepa d
<b>IAL</b>	Instituto Adolfo Lutz
<b>IMI</b>	"Imipenem-hydrolyzing betalactamase"
<b>IMP</b>	Imipenemase
<b>intl</b>	Gene que codifica uma integrase
<b>IPM</b>	Imipenem
<b>Inc</b>	"Incompatibility group"
<b>IND</b>	Metalo betalactamase de <i>Chryseobacterium indologenes</i>
<b>IP/IPI</b>	Imipenem/imipenem e ácido clavulânico
<b>IS</b>	Sequência de inserção
<b>ISCR</b>	<i>Insertion sequence common region</i>
<b>IR</b>	Repetições invertidas
<b>Kb</b>	1000 pares de bases
<b>KPC</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
<b>L1</b>	Metalo betalactamase da subclasse B3 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LEN</b>	Betalactamase descrita na cepa <i>K. pneumoniae</i> LEN-1
<b>MBL</b>	Metalo betalactamase
<b>mer</b>	Gene que confere resistência ao mercúrio
<b>MIR</b>	Enzima isolada em uma cepa no Miriam Hospital

<b>MLST</b>	Multi Locus Sequence Type
<b>MP</b>	Meropenem
<b>MPA</b>	Ácido mercaptopropiônico
<b>MSC</b>	Múltiplos sítios de clonagem
<b>NaCl</b>	Cloreto de Sódio
<b>NDM</b>	"New Delhi Metallo-beta-lactamase"
<b>NEO</b>	Neomicina
<b>NmcA</b>	"Not metallo-enzyme carbapenemase"
<b>NpmA</b>	rRNA adenine N-1-methyltransferase
<b>NTL</b>	Netilmicina
<b>OKP</b>	" <u>O</u> ther <u>K</u> . <u>p</u> neumoniae beta-lactamase"
<b>ORF</b>	"Open Reading Frame"
<b>OXA</b>	Oxacilinase
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	"Penicilin Binding Protein" (Proteínas ligadoras de penicilinas)
<b>PC1</b>	Betalactamase de <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>PCR</b>	"Polymerase Chain Reaction"
<b>PER</b>	<i>Pseudomonas</i> Extended Resistance
<b>PFGE</b>	"Pulsed Field Gel Electrophoresis" (eletroforese de campo pulsado)
<b>PM</b>	Cefepime
<b>PO</b>	Polimixina B
<b>PSE</b>	" <i>Pseudomonas</i> specific enzymes"
<b>PTc</b>	Piperaciclina/tazobactam
<b><i>qnr</i></b>	Gene que confere resistência a quinolona
<b>R</b>	<i>Reverse</i>
<b>RAST</b>	Rapid Annotation using Subsystem Technology
<b><i>rmt</i></b>	Gene codificador de metiltransferase 16S rRNA
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>Rpm</b>	Rotações por minute
<b><i>rpoB</i></b>	Gene que codifica a RNA polimerase, subunidade $\beta$
<b>rRNA</b>	RNA ribossômico
<b>RTG</b>	"Enzyme with RTG (arginine, threonine, glycine)"
<b>SDS</b>	Sodiumdodecyl sulfate solution
<b>SFC</b>	<i>Serratia fonticola</i> carbapenemase
<b>Sfh</b>	<i>Serratia fonticola carbapenem hydrolase</i>
<b>SHV</b>	"Sulfhydryl variable"
<b>SIS</b>	Sisomicina
<b>SM</b>	Estreptomicina
<b>SME</b>	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
<b>SOC</b>	SOB (Super Optimal Broth) acrescido de glicose
<b>SPM</b>	São Paulo Metallo-beta-lactamase
<b>ST</b>	"Sequence Type"
<b><i>sul</i></b>	Gene que confere resistência a sulfonamide
<b>TEM</b>	"Temoneira"

<b>TGC</b>	Tigeciclina
<b>TM</b>	Tobramicina
<b>Tn</b>	Transposon
<b>TSA</b>	Tryptic Soy Agar
<b>TSA</b>	Teste de Sensibilidade aos antimicrobianos
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>TZ</b>	Ceftazidima
<b>VEB</b>	Vietnam Extended Spectrum beta-lactamase
<b>VIM</b>	"Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase"
<b>XbaI</b>	Primeira enzima de restrição isolada de <i>Xanthomonas campestris</i>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características diferenciais aos filogrupos KpI ( <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> , <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> e <i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i> ), KpII ( <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i> e <i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i> ) e KpIII ( <i>K. variicola</i> ) .....	22
Tabela 2 - Classificação das betalactamases de acordo com Ambler (1989) e Bush-Jacoby (2010), no destaque em amarelo, encontram-se as principais betalactamases produzidas por bacilos Gram-negativos. (Bush & Jacoby, 2010; atualizada).....	25
Tabela 3 - Fenótipos de resistência detectados de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos. ....	39
Tabela 4 - Descrição dos primers utilizados na PCR para amplificação de genes de betalactamases. ....	59
Tabela 5 - Condições de corrida utilizadas para a amplificação de genes de resistência pela PCR.....	60
Tabela 6 – Descrição dos primers utilizados na PCR Multiplex para amplificação de genes de resistência para metiltransferases 16S rRNA .....	60
Tabela 7 – Descrição dos primers utilizados na PCR Multiplex para identificação de espécies de <i>Klebsiella</i> .....	66
Tabela 8- Descrição dos primers e das condições de corrida utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> pela PCR.....	66
Tabela 9 - Diferentes perfis de resistência, obtidos pela CIM das 100 cepas de <i>Klebsiella</i> spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo de 2009 a 2011. ....	77

Tabela 10 - CIM <sub>50</sub> e CIM <sub>90</sub> , pontos de corte e atividade dos antibióticos testados para as 100 cepas de <i>Klebsiella</i> spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo de 2009 a 2011. ....	80
Tabela 11 - Primers de extensão, clonagem e detecção desenhados para a caracterização da nova metiltransferase 16S rRNA.....	88
Tabela 12 - Valores da CIM dos aminoglicosídeos e betalactâmicos e co-produção de betalactamases das cepas de <i>Klebsiella</i> spp. e <i>E. coli</i> DH10B produtoras de RmtG.....	94

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Sítios de metilação no 16S rRNA, que levam a diferentes fenótipos de resistência. (A) Estrutura do ribossomo 70S da *E. coli* contendo 16S rRNA (laranja), 23S rRNA (cinza) e proteínas ribossômicas (verde e azul). A ligação da gentamicina com o 16S rRNA está sendo mostrada com um quadrado. (B) Região decodificadora do Sítio A no 16S rRNA. (C e D) Estruturas dos complexos entre aminoglicosídeos (Gentamicina C1a e Neomicina B) e nucleotídeos G1405 e A1408 no 16S rRNA. As linhas tracejadas indicam prováveis ligações de hidrogênio (Wachino & Arakawa, 2012)..... 41
- Figura 2 - Distribuição mundial das metiltransferases 16S rRNA (Wachino & Arakawa, 2012; modificada)..... 42
- Figura 3 - Vetor pBC SK(-) usado para a clonagem com destaque para a região de Múltiplos Sítios de Clonagens (MSC), disponível em <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pBCSK-.pdf> ..... 69
- Figura 4 - Perfil de sensibilidade dos antibióticos testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo. ... 78
- Figura 5 - Distribuição da CIM por ponto de corte das cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima, cefepime e do aztreonam testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo..... 79
- Figura 6 - Distribuição da CIM por ponto de corte dos carbapenêmicos ertapenem, imipenem e meropenem testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo. .... 79
- Figura 7- Porcentagem de betalactamases detectadas nas 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no Estado de São Paulo de 2009

a 2011..... 82

Figura 8 - Frequência dos diferentes perfis de co-produção de betalactamases das 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo no período de 2009 a 2011..... 83

Figura 9 - PCR Multiplex para identificação de espécies de *Klebsiella* (Fonseca et al., 2017). M: Marcador de 100pb (Sinapse); linha1: Kp259/09; linha 2: Kp492/11; linha 3: Kp672/11; linha 4: controle positivo *bla*<sub>OKP</sub>; linha 5: controle positivo *bla*<sub>SHV</sub>; linha 6: *K. pneumoniae* ATCC 700603; linha 7: controle negativo da reação..... 85

Figura 10 – Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências do gene 16S rRNA das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as cepas de referência para *K. variicola* (01A065), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (07A044T), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (01A030T), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC13883), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (ATCC11296T) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ATCC13884), construída usando o método de Neighbor-joining baseada na matrix de distância Jukes-Cantor..... 86

Figura 11 – Dendrograma baseado no alinhamento das sequências do gene 16S rRNA das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as cepas de referência para *K. variicola* (01A065), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (07A044T), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (01A030T), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC13883), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (ATCC11296T) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ATCC13884), construída usando o método de Neighbor-joining baseada na matrix de distância Jukes-Cantor..... 87

Figura 12 - Análise dos sítios de restrição da sequência do inserto de 1.9 kb gerada a partir do contig da sequência com T3 e T7 e os 2 pares de primers de extensão. A análise foi feita a partir da ferramenta NEB cutter v1.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)..... 89

Figura 13 - Sequência completa do inserto de 1.6 kb flanqueadas nas duas extremidades pela enzima HindIII. ....	89
Figura 14 – Análise pela ferramenta ORF finder ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html</a> ) da sequência completa do inserto contendo uma sequência de 252 aminoácidos de uma tRNA ribosiltransferase e uma sequência 264 aminoácidos referente a nova metiltransferase RmtG.....	91
Figura 15 - Alinhamento das sequências de aminoácido das metiltransferases ArmA (AAP50754), RmtA (BAD12551), RmtB1 (BAC81971), RmtB2 (JN968578), RmtC (BAE48305), RmtD1 (ABJ53409), RmtD2 (ADW66545), RmtE (ADA63498), RmtF (AFJ11385) e RmtH (AGH19769) com a nova metiltrasferase RmtG, feito com Clustal Omega ( <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/</a> ). ....	92
Figura 16 - Dendrograma das metiltransferases ArmA, RmtA, RmtB1, RmtB2, RmtC, RmtD1, RmtD2, RmtE, RmtF e RmtG, gerado a partir de ferramentas disponíveis em <a href="http://www.phylogeny.fr">http://www.phylogeny.fr</a> (Dereeper et al, 2008). ....	93
Figura 17 - Estrutura do plasmídeo IncL/M pKp64/11 que carrega o gene <i>rmtD1</i> . Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.....	98
Figura 18 - Estrutura do plasmídeo IncA/C pKp368/10 que carrega o gene <i>rmtD2</i> . Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.....	99
Figura 19 - Estrutura do plasmídeo IncHI1B pKp84/11 que carrega o gene <i>rmtG</i> . Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.....	100
Figura 20 - Alinhamento do ambiente genético dos genes <i>rmtD1</i> e <i>rmtD2</i> dos plasmídeos pKp64/11 e pKp368/10 com sequências depositadas no	

GenBank de Enterobacteriaceae isoladas na América do Sul. As áreas sombreadas em azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas azuis indicam genes envolvidos na virulência e vias bioquímicas. Genes acessórios de elementos móveis estão indicados por flechas amarelas e os genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo estão representados por flechas laranjas. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, e flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida. .... 101

Figura 21 - Alinhamento do ambiente genético do gene *rmtG* do plasmídeo pKp84/11 com as sequências de plasmídeos de *K. pneumoniae*, contendo *rmtG*, depositadas no GenBank. As áreas sombreadas em azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas azuis indicam genes envolvidos na virulência e vias bioquímicas. Genes acessórios de elementos móveis estão indicados por flechas amarelas e os genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo estão representados por flechas laranjas. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, e flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida..... 102

## Índice

1	INTRODUÇÃO .....	20
1.1	<i>Klebsiella</i> spp. ....	20
1.2	Resistência antimicrobiana a betalactâmicos .....	22
1.3	Classificação das betalactamases .....	23
1.3.1	ESBL .....	26
1.3.1.1	SHV.....	26
1.3.1.2	TEM.....	27
1.3.1.3	CTX-M.....	28
1.3.1.4	Outras ESBLs .....	30
1.3.2	Carbapenemases .....	31
1.3.2.1	KPC.....	32
1.3.2.2	Metalo betalactamases .....	33
1.3.2.3	OXA-48 .....	35
1.4	Detecção fenotípica das betalactamases.....	36
1.5	Aminoglicosídeos.....	37
1.5.1	Resistência aos aminoglicosídeos.....	38
1.6	Metiltransferases 16S rRNA.....	40
1.6.1	RmtD .....	43
1.6.2	Outras metiltransferases 16S rRNA.....	44
1.6.3	Detecção laboratorial das metiltransferases 16S rRNA.....	45
1.7	Elementos genéticos móveis envolvidos na disseminação de genes de resistência.....	46
1.7.1	Plasmídeos.....	47
1.7.2	Transposons, sequências de inserção (IS) e cassetes genético/integrans .....	48
1.7.3	Contexto genético dos genes de metiltransferases 16S rRNA... ..	50
2.	OBJETIVOS .....	51
2.1.	Objetivo geral.....	51
2.2.	Objetivos específicos .....	51

3	MATERIAIS E MÉTODOS .....	52
3.1	Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo .....	52
3.2	Seleção das amostras .....	53
3.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) .....	53
3.4	Detecção fenotípica da produção de betalactamases.....	54
3.4.1	Carbapenemases .....	54
3.4.2	ESBL .....	55
3.5	Detecção fenotípica da produção de metiltransferases 16S rRNA .	56
3.6	Detecção de genes de resistência .....	56
3.6.1	Extração do DNA .....	56
3.6.2	PCR dos genes de betalactamases.....	56
3.6.3	Detecção dos genes de metiltransferases 16S rRNA .....	57
3.7	Caracterização dos genes de resistência.....	61
3.7.1	Purificação do produto de PCR.....	61
3.7.2	Reação de sequenciamento com Big Dye®.....	61
3.7.3	Purificação do produto do sequenciamento .....	62
3.7.4	Sequenciamento e análise de dados .....	62
3.8	Identificação das cepas negativas para <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	63
3.8.1	Provas bioquímicas .....	63
3.8.2	Identificação de <i>K. pneumoniae</i> , <i>K. quasipneumoniae</i> e <i>K. variicola</i> através de PCR Multiplex .....	63
3.8.3	Sequenciamento dos genes 16S rRNA e <i>rpoB</i> para a confirmação da identificação de <i>Klebsiella</i> spp.....	64
3.9	Extração de plasmídeo .....	66
3.10	Extração do DNA genômico.....	67
3.11	Experimentos de clonagem.....	68
3.11.1	Digestão com enzima de restrição.....	69
3.11.2	Ligação do DNA genômico com o vetor.....	70
3.11.3	Transformação por eletroporação.....	70
3.12	Sequenciamento do plasmídeo recombinante .....	72
3.13	Sequenciamento completo e montagem dos plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11 .....	73

3.14	Análise das sequências completas dos plasmídeos pKp64/11 e pKp368/10 .....	74
4	RESULTADOS .....	76
4.1	Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.....	76
4.2	Testes fenotípicos para a produção de betalactamases .....	80
4.3	Detecção fenotípica de metiltransferases 16S rRNA .....	80
4.4	Detecção e caracterização de genes de resistência .....	81
4.5	Identificação de <i>Klebsiella</i> spp. para as cepas negativas para <i>bla</i> <sub>SHV</sub> .....	84
4.6	Caracterização de novo gene de metiltransferase 16S rRNA .....	87
4.7	Sequenciamento completo dos plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11 que carregam os genes <i>rmtD1</i> , <i>rmtD2</i> e <i>rmtG</i> , respectivamente.....	94
5	DISCUSSÃO .....	103
6	CONCLUSÃO .....	119
	REFERÊNCIAS.....	121
	ANEXOS .....	160

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 *Klebsiella* spp.

*Klebsiella* spp. são bacilos Gram-negativos, imóveis e pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, são microrganismos oportunistas que acometem indivíduos imunocomprometidos que estão hospitalizados e sofrem por doenças debilitantes, sendo responsável por altas taxas de mortalidade. As síndromes clínicas mais frequentes são pneumonia, infecções do trato urinário e de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse. Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) são causadas principalmente por *K. pneumoniae*, a espécie clinicamente mais importante do gênero *Klebsiella* (Podschun & Ullmann, 1998; Scarpate & Cossatis, 2009).

*K. pneumoniae* é a espécie em que se descreve produção de ESBL com maior frequência. *Klebsiella* é o gênero que produz a maior variedade de enzimas do tipo ESBL, provavelmente pelo fato de serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae* (Livermore, 1995). O amplo uso de cefalosporina de terceira geração é o maior fator de risco para a emergência de *K. pneumoniae* produtora de betalactamases (Corrêa & Correa, 2001). As altas taxas de *K. pneumoniae* produtora de ESBL fizeram com que os carbapenêmicos fossem o principal fármaco de escolha para o tratamento de infecções por este patógeno. Porém, desde meados de 2000, houve uma disseminação de *K. pneumoniae* multirresistentes, produtoras de carbapenemases KPC, codificadas por elementos móveis, limitando mais ainda o tratamento (Tzouveleki et al, 2012).

A análise filogenética de isolados identificados como *K. pneumoniae* demonstrou a existência de três grupos filogenéticos principais: KpI, KpII e KpIII baseados na análise das sequências dos genes *gyrA* e *parC* e, posteriormente, pela associação com genes de betalactamase de classe A

cromossomais *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub>, diretamente com cada um desses grupos, respectivamente. Taxonomicamente, *K. pneumoniae* compreende três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* inseridos no filogrupos KpI. Recentemente, foi proposto que os filogrupos KpII e KpIII fossem reclassificados como duas novas espécies: *K. quasipneumoniae* com as subespécies *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KpII-A) e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KpII-B) e *K. variicola* (KpIII). Dessa forma, *K. pneumoniae* deve apenas ser usado para as cepas que pertençam ao filogrupos KpI. (Brisse et al, 2014).

Testes fenotípicos não são capazes de diferenciar de maneira eficaz *K. pneumoniae* de *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*, levando a uma subestimação das infecções por *K. variicola* e *K. quasipneumoniae* por serem erroneamente identificadas como *K. pneumoniae*. Nem mesmo a espectrometria de massas é capaz de diferenciar essas espécies de *Klebsiella*, sendo os métodos genotípicos uma forma mais confiável de diferenciação entre essas três espécies (Brisse et al., 2004; Maatallah et al., 2014; Fonseca et al., 2017; Long et al., 2017). As características diferenciais entre *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae*, *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* e *K. variicola* estão listadas na tabela 1.

*K. quasipneumoniae* e *K. variicola* são frequentemente associadas a nichos agrícolas e colonizando o trato gastrointestinal de animais e humanos que consomem esses alimentos. Ambas as espécies são capazes de causar infecções em humanos, porém elas parecem ser menos patogênicas que as espécies do filogrupos KpI, sendo frequentemente associadas a colonização (Holt et al., 2015; Long et al., 2017). Porém, a presença de genes de resistência em *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* como KPC, NDM-1, SHV-12, CTX-M-9, CTX-M-14 e CTX-M-15, já foi descrita (Garza-Ramos et al, 2016; Zhang et al 2016; Aires et al., 2017; Long et al, 2017).

Tabela 1 - Características diferenciais aos filogrupos KpI (*K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*), KpII (*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*) e KpIII (*K. variicola*)

	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>quasipneumoniae</i>	<i>K. quasipneumoniae</i> subsp. <i>similipneumoniae</i>	<i>K. variicola</i>
Hidrólise da uréia	+	-	-	+	+	+
ONPG	+	+	-	+	+	+
Voges-Proskauer	+	-	-	+	+	+
Malonato	+	-	+	+	+	+
Descarboxilação da Lisina	+	d	-	+	+	+
<b>Produção de ácido a partir de:</b>						
Adonitol	+	+	+	d	+	-
L-Sorbose	-	-	-	d	-	+
<b>Utilização de:</b>						
3-fenilpropionato	-	-	-	d	-	-
5-keto-D-gluconato (48h)	-	-	-	-	-	+
Ácido tricarbálico	-	-	-	+	+	+

(-): menos que 20% das cepas positivas; (+): mais que 80% das cepas positivas; d: entre 20 e 80% das cepas positivas.

Fonte: Brisse et al, 2014

## 1.2 Resistência antimicrobiana a betalactâmicos

Antibióticos ou antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por microrganismos ou de forma sintética, com capacidade de inibir ou matar microrganismos. De acordo com a estrutura química e o mecanismo de ação os antimicrobianos são divididos em diversos grupos: betalactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamida, tetraciclina, fenicol, quinolonas, sulfas e polimixinas (Rossi & Andreazzi, 2005; Guimarães et al, 2010).

Os betalactâmicos possuem em comum a presença de um anel betalactâmico na sua estrutura e a inibição da síntese da parede celular como principal mecanismo de ação (Rossi & Andreazzi, 2005). Atuam inibindo irreversivelmente a enzima transpeptidase, responsável pela reação de transpeptidação entre as cadeias de peptideoglicano da parede celular bacteriana. A atividade desta enzima leva à formação de ligações cruzadas

entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana, que confere à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio (Guimarães et al, 2010). O grupo dos betalactâmicos possui amplo espectro de atividade antibacteriana e reúne alguns dos antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica para o tratamento de IRAS e infecções comunitárias, pertencendo a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Sanders & Sander, 1992).

Os microrganismos podem ter resistência intrínseca, a qual é uma resistência natural de determinadas espécies ou gêneros bacterianos, ou adquirida. A resistência adquirida pode ser cromossômica, resultado de uma mutação, ou transferida através de elementos móveis como os plasmídeos.

Em relação aos betalactâmicos, os microrganismos desenvolveram diversos mecanismos de resistência, tais como, perda ou expressão reduzida de porinas, alterações nas PBPs e super expressão de bombas de efluxo, e a resistência através da produção de betalactamases. Essas enzimas agem no anel betalactâmico, degradando-o e, conseqüentemente, inativando a ação do antibiótico sobre a parede celular. Quando codificadas por genes localizados em elementos móveis, as betalactamases podem facilmente se disseminar, carregando com eles genes de resistência à maioria das classes de antimicrobianos (Chroma et al, 2010; Bush et al, 2011).

### **1.3 Classificação das betalactamases**

A classificação das betalactamases pode ser baseada nas suas características funcionais ou na estrutura primária da enzima. A classificação proposta por Ambler (1980) separa as betalactamases em 4 classes (A, B, C e D) de acordo com a sequência de aminoácidos. As classes A, C e D incluem enzimas que hidrolisam o betalactâmico utilizando uma serina e, na classe B, estão as betalactamases que utilizam o íon zinco para facilitar a

hidrólise do substrato (Bush & Jacoby, 2010).

Uma nova classificação funcional foi proposta, inicialmente, por Bush (1989), expandida por Bush-Jacoby-Medeiros (1995) e, então, atualizada por Bush-Jacoby em 2010. Nessa classificação, as betalactamases são separadas de acordo com sua habilidade em hidrolisar classes de beta-lactâmicos específicos e no seu perfil de inibição pelos inibidores de betalactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam). O grupo 1 é composto pelas cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, denominadas AmpC e comumente encontradas no cromossomo de algumas *Enterobacteriaceae*. O grupo 2 é composto pelas betalactamases do tipo serina inibidas pelo ácido clavulânico e, inclui 12 subgrupos (2a, 2b, 2be, 2br, 2ber, 2c, 2ce, 2d, 2de, 2df, 2e, 2f). No grupo 3 estão inseridas as metalo betalactamases (MBL) que hidrolisam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e são inibidas pelo EDTA. O grupo 4 contém as penicilinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico (Bush & Jacoby, 2010) (Tabela 2).

Tabela 2 - Classificação das betalactamases de acordo com Ambler (1989) e Bush-Jacoby (2010), no destaque em amarelo, encontram-se as principais betalactamases produzidas por bacilos Gram-negativos. (Bush & Jacoby, 2010; atualizada)

Classificação Bush, Jacoby, Medeiros (2010)		Classificação Ambler (1980)	Substrato	Características	Representantes
Grupo funcional	Subgrupo	Classe Molecular			
1		C	Cefalosporinas	Resistência às cefalosporinas de 2ª e 3ª geração. Não são inibidas pelo ácido clavulânico	AmpC (ACT-1, FOX, MIR-1, CMY-2, etc)
2	Inibidas pelo Ácido Clavulânico				
	2ª	A	Penicilina	Penicilases produzidas por Staphylococcus spp. e Enterococcus spp. Confere altos níveis de resistência a penicilina	PC1
	2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de 1ª e 2ª geração	Betalactamases de espectro limitado de bactérias gram-negativas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Betalactamases de espectro estendido	ESBL (TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB, etc)
	2br	A	Penicilina	Betalactamase resistentes aos inibidores de betalactamases	TEM-30, SHV-10
	2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Betalactamase de espectro estendido com relativa resistência a inibição por ácido clavulânico	TEM-50 (CMT-1)
	2c	A	Carbenicilina	Enzimas que hidrolizam a carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	A	Carbenicilina e cefepime	Carbenicilase de amplo espectro com atividade contra cefepime e ceftirome	RTG-4
	2d	D	Oxacilina	Enzimas que hidrolizam a oxacilina, possuem pouco efeito contra carbenicilina e são levemente inibidas pelo ácido clavulânico	OXA-1, OXA-10
	2de	D	Oxacilina e cefalosporinas de amplo espectro	Oxacilinas com espectro estendido que hidrolisam oxamino- beta-lactâmicos, mas não carbapenêmicos	OXA-11, OXA-15
	2df	D	Oxacilina e carbapenêmicos	Oxacilinas que hidrolisam carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Cefalosporinas de espectro estendido que possuem pouca afinidade com aztreonam	CepA
	2f	A	Carbapenêmicos	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos	KPC, IMI-1, SME, GES-3, GES-4 GES-5
3	3ª	B	Carbapenêmicos	Hidrólise de amplo espectro incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas mas não monobactam	IMP, VIM, SPM, IND, NDM
	3b	B	Carbapenêmicos	Hidrolisa preferencialmente carbapenêmicos a cefalosporinas e penicilinas	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sfh-1
4	NI		Desconhecido	Desconhecido	

### 1.3.1 ESBL

As ESBLs (Extended Spectrum Beta-lactamases) pertencem à classe A de Ambler e ao grupo 2be na classificação de Bush-Jacoby (2010). Essas betalactamases conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e ao aztreonam e são inibidas pelo ácido clavulânico. Os genes que codificam as ESBLs são frequentemente encontrados em elementos genéticos móveis, como plasmídeos, transposons e integrons junto com genes que codificam resistência aos aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprim (Paterson et al, 2003; Silva & Lincopan, 2012). A maioria das ESBLs são derivadas das betalactamases de espectro limitado TEM-1, TEM-2 e SHV-1, através de mutações genéticas que alteram a sequência de aminoácidos que determinam o sítio ativo dessas enzimas (Paterson et al, 2003).

#### 1.3.1.1 SHV

O nome da enzima SHV refere-se a variação do sulfhydryl (Sykes & Bush, 1982; Jacoby, 1997). A primeira SHV de amplo espectro foi a SHV-2, descrita em 1983 na Alemanha em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *Serratia marcescens*. Essa nova variante se diferenciava da SHV-1 por apenas um aminoácido, alterando-se o espectro de ação dessa betalactamase e criando uma afinidade por cefotaxima e ceftazidima durante a hidrólise (Barthélémy et al, 1988).

As ESBLs do tipo SHV logo se disseminaram e outras enzimas derivadas foram descritas em *K. pneumoniae* e em outros membros da família *Enterobacteriaceae*. Os genes que codificam essas betalactamases são frequentemente encontrados em plasmídeos autotransferíveis (Heritage et al, 1999). Até o momento, foram descritos mais de 190 tipos de SHV de restrito e amplo espectro (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em

29/09/2017) e estão distribuídas por todo o mundo.

Na América do Sul, os primeiros relatos de organismos produtores de ESBL e de enzimas do tipo SHV são de cepas produtoras de SHV-2 na Argentina em 1988 e da primeira detecção de SHV-5 no Chile em 1989 (Gutmann et al, 1989; Paterson et al, 2003). Desde então, a SHV-5 está disseminada no mundo todo (Heritage et al, 1999). No Brasil, já foram identificadas SHV-2, SHV-4, SHV-5, SHV-12, SHV-27, SHV-28, SHV-31, SHV-38 e SHV-40, SHV-45, SHV-55, SHV-108, SHV-122 (Sampaio & Gales, 2016).

Variantes de SHV de espectro restrito codificadas no cromossomo de *Klebsiella pneumoniae* são consideradas betalactamases espécies-específicas podendo auxiliar na identificação de *Klebsiella* spp. (Hæggman et al, 2004; Fonseca et al, 2017).

#### 1.3.1.2 TEM

A primeira enzima do tipo TEM foi uma betalactamase de espectro restrito isolada de uma *E. coli*, em 1965, na Grécia, de uma paciente chamada Temoneira o que deu origem a sua nomenclatura, TEM-1 (Datta & Kontomichalou, 1965). A TEM-3 foi a primeira enzima do tipo TEM que apresentava um fenótipo de ESBL. Foi descrita na França, em 1987, em um isolado de *K. pneumoniae*, mediada por plasmídeo e, primeiramente denominada CTX-1, devido a sua atividade contra cefotaxima. Porém, o sequenciamento do gene que codifica essa enzima mostrou sua relação com a TEM-2, sendo denominada agora de TEM-3 (Sougakoff et al, 1988; Harada et al, 2008).

Betalactamases do tipo TEM são principalmente encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas já foram encontradas em muitas outras espécies (Bradford, 2001). Desde a primeira descrição de uma enzima do tipo TEM, mais de 220 tipos já foram descritas, sendo na sua maioria de amplo espectro de ação

(<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 29/09/2017). EBSL do tipo TEM não são comuns no Brasil e apenas as variantes TEM-116, TEM-15 e TEM-136 foram descritas no país (Dropa et al, 2010; Dropa et al, 2015; Nogueira et al, 2015).

### 1.3.1.3 CTX-M

A CTX-M é a ESBL mais encontrada na maior parte do mundo, sua taxa de disseminação entre bactérias tem crescido drasticamente causando surtos e infecções esporádicas (Bonnet, 2004; Carattoli, 2009). Em 1989, um isolado clínico de *E. coli* que produzia uma ESBL não-TEM e não-SHV foi relatado. Essa enzima foi designada CTX-M-1, indicando sua ação hidrolítica preferencialmente contra cefotaxima (Bauernfeind et al, 1990). Essas betalactamases são pouco relacionadas com as enzimas do tipo TEM e SHV, e diferentemente desses tipos, que foram originadas a partir de mutações na sequência de outras penicilinases, o gene que codifica a CTX-M foi adquirido por uma transferência horizontal de bactérias do gênero *Kluyvera* sp. (Bradford, 2001; Rossolini et al, 2008; Nasser & Sundsfjord, 2010). A associação de plasmídeos que carregam *bla*<sub>CTX-M</sub> pertencendo ao grupo de incompatibilidade IncF, IncN e IncK com algumas sequências de inserção (IS), como *ISEcp1* e *ISCR1* torna a captura e mobilização desses genes eficiente entre os membros da família *Enterobacteriaceae*. Essas ISs podem, ainda, agir como potentes promotores para uma super-expressão do *bla*<sub>CTX-M</sub> (Mathers et al, 2015).

As CTX-M podem ser subclassificadas em 5 grupos, a partir das similaridades na sequência de aminoácidos. No grupo CTX-M-1 fazem parte as enzimas CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28 e FEC-1. O grupo CTX-M-2 compreende as enzimas CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-20 e Toho-1. No grupo CTX-M-8 é encontrada apenas uma enzima, a CTX-M-8. O grupo CTX-M-9 é composto por CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-

16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-27, CTX-M-24 e CTX-M-45. E por fim, fazem parte do grupo CTX-M-25 apenas as enzimas CTX-M-25 e CTX-M-26 (Bonnet, 2004).

As enzimas do tipo CTX-M são predominantes na América do Sul, Espanha e Leste Europeu. Em 1989, houve um surto na Argentina de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium multi-resistente produtora de CTX-M-2, tornando essa variante a mais descrita na América do Sul, com relatos de cepas produtoras de CTX-M-2 no Paraguai, Uruguai e Brasil (Poupart et al, 1991; Radice et al, 2002). de Oliveira Garcia et al (2008) descreveram, em um hospital do Estado de São Paulo, um surto de *K. pneumoniae* multiclonal produtoras de CTX-M-2 e de uma nova variante, a CTX-M-59. No Brasil, já foram identificadas as CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-28, CTX-M-59, CTX-74, CTX-M-75 e CTX-M-131, sendo a CTX-M-2 a enzima mais predominante e também detectada em um maior número de espécies de *Enterobacteriaceae* (Sampaio & Gales, 2016).

A variante CTX-M-8 foi descrita no Brasil em cepas de *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *Citrobacter amalonaticus*. Essa variante não era diretamente relacionada com as outras CTX-M já descritas, compartilhando de 80 a 88% de identidade, originando um novo grupo dessa enzima, denominado CTX-M-8 (Bonnet et al, 2000)

A CTX-M-15 é a enzima mais prevalente no mundo, ela é codificada por um gene localizado no plasmídeo IncF que é fortemente adaptável às *Enterobacteriaceae*, e geralmente está associada a outros genes de resistência como *bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>OXA-1</sub> e *aac(6)-Ib-cr*. A causa da disseminação do gene *bla*<sub>CTX-M15</sub> pode ser devida a forte associação do plasmídeo IncF com *E. coli* ST131 que está globalmente disseminada (Carattoli, 2009; Livermore, 2012b). Plasmídeos IncF carregando o gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> não são exclusivos desse clone e já foram identificados em outros STs de *E. coli*, em *Shigella sonnei*, *S. enterica* e *K. pneumoniae* (Coque et al, 2008; Hrabak et al, 2008; Diestra et al, 2009). No Brasil, Tollentino et al (2011) descreveram a primeira detecção do gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> em cepas de *K. pneumoniae* isoladas

de 2005 a 2007.

#### 1.3.1.4 Outras ESBLs

*Pseudomonas* Extended Resistance (PER) foi primeiramente detectada na Turquia em uma cepa de *P. aeruginosa*. A PER-2 compartilha 86% de homologia com a PER-1 e foi descoberta em um isolado de *S. enterica* serovar Typhimurium em Buenos Aires (Bauernfeind et al, 1996; Paterson & Bonomo, 2005). A PER-1 é encontrada quase que exclusivamente na Turquia enquanto a PER-2 tem sido encontrada quase exclusivamente na América do Sul (Bradford, 2001).

A VEB (Vietnam Extended Spectrum Beta-lactamase) foi primeiramente encontrada em 1996 em um isolado de *E. coli* de uma criança do Vietnã que foi hospitalizada na França. O gene *bla*<sub>VEB-1</sub> é considerado “emergente” e tem sido identificado em várias espécies de *Enterobacteriaceae* e em não-fermentadores em diversos países (Girlich et al, 2001; Poirel et al, 2006; Adams et al, 2008; Aragon et al, 2008; Lahaoui et al, 2011).

BES (Brazil Extended Spectrum) é uma ESBL descrita pela primeira vez no Brasil, em *Serratia marcescens*, isolada em um hospital do Rio de Janeiro em 1996. Assim com as CTX-M, a BES-1 é uma ESBL com uma forte atividade hidrolítica sobre a cefotaxima induzindo a uma maior resistência a este fármaco que a ceftazidima (Bonnet et al, 2000).

Enzimas do tipo GES (Guiana Extended Espectrum) são codificadas por genes localizados em plasmídeos e, a primeira variante descrita dessa enzima, a GES-1, foi encontrada na França em 1998, em *K. pneumoniae*, isolada de um paciente hospitalizado previamente na Guiana Francesa (Poirel et al, 2000). A GES-2, identificada em *P. aeruginosa* na África do Sul, se diferencia da GES-1 por uma única substituição de aminoácido ganhando, assim, a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos (Poirel et al, 2001). Essa substituição de aminoácido foi identificada também na GES-

4, GES-5 e GES-6 que são consideradas carbapenemases. Assim como a GES-1, as variantes GES-3, GES-7, GES-8, GES-9, GES-11 e GES-13 são classificadas como ESBL (Bonnin et al, 2011; Frase, 2011). Betalactamases do tipo GES têm sido identificadas no mundo todo e, no Brasil, já foram descritos GES-1, GES-5 e GES-7 em *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* e *E. coli* (Pellegrino et al, 2006; Fonseca et al, 2007; Queenan & Bush, 2007; Dropa et al, 2009; Picão et al, 2009; Picão et al, 2010).

### 1.3.2 Carbapenemases

Os carbapenêmicos são os fármacos de escolha para o tratamento de infecções sérias causadas por enterobactérias produtoras de ESBL (Paterson, 2006). A resistência a esses antimicrobianos pode ser dada pela super expressão de AmpC ou ESBL associada a perda de porina, principalmente em *Enterobacter* e *Klebsiella* ou pela produção de carbapenemases, descritas principalmente em *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (Livermore et al, 2012a).

As carbapenemases são enzimas capazes de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e estão presentes em três das quatro classes de betalactamases de Ambler. As carbapenemases da Classe A de Ambler podem ser codificadas no cromossomo (NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1) ou no plasmídeo (KPC, IMI-2, GES). As carbapenemases da classe B são as metalo betalactamases e, estão inclusas nesse grupo, principalmente, as enzimas IMP (Imipenemase), VIM (Verona imipenemase), NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase) e a SPM (São Paulo Metallo-beta-lactmase). São membros das carbapenemases da Classe D de Ambler os quatro subtipos OXA-23, OXA-40, OXA-58 e OXA-143, praticamente restritas a *Acinetobacter* spp., e a enzima OXA-48 encontrada em *Enterobacteriaceae*, principalmente em *K. pneumoniae* (Nordmann et al, 2011).

### 1.3.2.1 KPC

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma serina betalactamase, pertencente à classe A de Ambler e ao grupo 2f de Bush. Essa enzima tem a capacidade de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos, principalmente os carbapenêmicos (Bush, 2010). Foi primeiramente isolada na Carolina do Norte em 1996 e, a princípio, estava confinada na região de Nova Iorque e Pensilvânia nos Estados Unidos e, em poucos anos se disseminou pelo país (Walther Rasmussen & Hoiby, 2007; Quale, 2008; Nordmann et al, 2011). Na Europa, diferentes variantes de KPCs (KPC-2, KPC-3 e KPC-4) têm sido descritas (Cantón et al, 2012). Na América do Sul, a disseminação foi primeiramente relatada na Colômbia em 2006 (Villegas et al, 2006), e então na Argentina (Pasteran et al, 2008).

No Brasil, *K. pneumoniae* produtora de KPC foi primeiramente detectada em 2005, na cidade de São Paulo, e outras cepas produtoras dessa betalactamase também foram isoladas no Recife em 2006 e no Rio de Janeiro em 2007 (Monteiro et al, 2009; Pavez et al, 2009; Peirano et al, 2009). Essa enzima também foi identificada em *P. aeruginosa*, na Colômbia, mostrando uma disseminação dessa enzima em não-enterobactérias (Villegas et al, 2007). Estão descritos 24 tipos de KPC, sendo que, no Brasil, as KPCs identificadas até o momento são do tipo KPC-2, considerada equivalente à KPC-1 (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 29/09/2017).

Abboud et al (2011) descreveram um surto, envolvendo um único clone de *K. pneumoniae* produtora de KPC, em 22 pacientes de um hospital público em São Paulo. Desde a sua detecção, em 2009, esse agente não foi erradicado. Garcia et al (2010) e Naves et al (2011) descreveram a disseminação de um mesmo clone em vários hospitais do Estado de São Paulo observado por eletroforese de campo pulsado. *K. pneumoniae* produtoras de KPC têm sido detectadas em diversos *sequence types* (STs), porém com uma alta predominância de isolados produtores dessa enzima no

mundo todo pertencendo ao clone ST 258 (Tzouvelekis et al, 2012). Os genes *bla<sub>KPC</sub>* estão localizados em um transposon do tipo Tn3, o Tn4401, que possui a capacidade de se inserir em diversos plasmídeos de bactérias Gram- negativas. Por essa razão, KPC constitui importante mecanismo de resistência mundial, sendo observada a sua rápida disseminação por vários países (Kitchel et al, 2009; Arnold et al, 2011).

### 1.3.2.2 Metallo betalactamases

Metallo betalactamases pertencem a classe B de Ambler e 3 de Bush-Jacoby (2010). Conferem resistência a todos os betalactâmicos exceto monobactam, e não são inibidos pelos inibidores de betalactamases, e sim por agentes quelantes como EDTA e ácido mercaptopropiônico. As MBLs possuem uma forte atividade de carbapenemase e sua atividade contra os outros betalactâmicos varia entre os diferentes tipos de enzimas (Cornaglia et al, 2011).

A carbapenemase IMP foi a primeira metalo betalactamase a ser descrita em 1988 em uma cepa de *P. aeruginosa* no Japão. Até o momento 58 variantes de *bla<sub>IMP</sub>* foram identificadas (<ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>, acesso em 21/08/2017) em diversos países (Cornaglia et al, 2011). No Brasil, Freire et al (2016) descreveram um surto prolongado, em transplantados renais, de *E. gergoviae* resistente aos carbapenêmicos produtoras de IMP-1, entre os anos de 2009 e 2014. Além da IMP-1, já foram descritas no Brasil, as variantes IMP-16 em uma cepa de *P. aeruginosa* e IMP-10 em isolados de *A. baumannii* e de *S. marcescens* co-produtoras de KPC-2 (Mendes et al, 2004; Cayô et al, 2015; Silva et al, 2015).

A São Paulo Metallo-beta-lactamase (SPM) foi primeiramente descrita em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada em 1997 de uma paciente em São Paulo, Brasil, se tornando endêmica em hospitais de todo o país (Toleman et al, 2002; Gales et al, 2003; Pellegrino et al, 2006; Martins et al,

2007). *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 podem exibir uma resistência adicional à maioria dos aminoglicosídeos mediado pela metiltransferase RmtD gerando fenótipos multirresistentes (Doi et al, 2007a; Fontes et al, 2011).

VIM-1 (Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase) foi primeiramente descrita em Verona, na Itália, em 1997 em *P. aeruginosa* (Lauretti et al, 1999). A enzima VIM-2 é a variante mais encontrada e está disseminada por diversos países nos cinco continentes e, no Brasil, a VIM-2 foi detectada em hospitais de São Paulo em cepas de *P. aeruginosa* e *P. fluorescens* (Sader et al, 2005a, Sader et al, 2005b; Maltezou, 2009; Franco et al, 2010).

New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM) foi primeiramente identificada em 2008, na Suécia, em um paciente previamente hospitalizado na Índia (Yong et al., 2009). Diferente dos genes que codificam outras carbapenemases, o *bla*<sub>NDM-1</sub> não está associado com um único clone, sendo identificado, na sua maioria, em *E. coli* e *K. pneumoniae* e, em menor escala, em outras espécies de enterobactérias.

Os plasmídeos que carregam esse gene são diversos e podem carrear outros genes de resistência como carbapenemases, cefalosporinases, ESBL, metiltransferases 16S RNA e genes de resistência à macrolídeos, rifampicina e sulfametoxtiazol, limitando muito as opções de tratamento. Muitos produtores de NDM-1 são sensíveis apenas à tigeciclina e colistina (Kumarasamy et al, 2010; Cornaglia et al, 2011; Nordmann et 2011).

NDM-1 foi descrita pela primeira vez na América do Sul em 2012, em uma cepa de *Providencia rettgeri* no Uruguai, seguido de um surto de *K. pneumoniae* produtora de NDM-1, na Colômbia, e de uma cepa de *A. baumannii* produtor desta MBL no Paraguai (PAHO/WHO, 2014; Escobar et al, 2013). No Brasil, o primeiro relato da NDM-1 ocorreu em 2013, em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, também em *P. rettgeri* (Carvalho-Assef et al, 2013). Um estudo retrospectivo, feito no mesmo hospital em Porto Alegre, mostrou a presença de uma cepa de *Enterobacter hormaechei* produtora de

NDM-1 isolada em setembro de 2012 (Carvalho-Assef et al, 2014). Um alerta foi enviado pela ANVISA, em dezembro de 2013, sobre a detecção de NDM-1 produzida por *Acinetobacter radioresistens* em amostra de swab retal de um paciente no hospital de Santo André. Desde a primeira descrição da NDM em Porto Alegre, a detecção dessa enzima no Brasil tem se tornado emergente, especialmente nas regiões Sul e Sudeste. Na cidade de São Paulo, a NDM foi primeiramente detectada em *P. rettgeri* mostrando a necessidade de medidas para a prevenção da disseminação de bactérias produtoras dessa enzima no Brasil (Carmo Junior et al, 2015).

### 1.3.2.3 OXA-48

Apesar das betalactamases do tipo OXA serem frequentemente encontradas em *Acinetobacter*, a OXA-48 é encontrada exclusivamente em *Enterobacteriaceae*. Essa enzima, que apresenta aproximadamente 50% de semelhança na sequência de aminoácidos em relação às outras OXAs, foi primeiramente relatada em 2001, em uma cepa de *K. pneumoniae*, resistente aos carbapenêmicos na Turquia (Poirel et al, 2004). A disseminação do gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, principalmente em *K. pneumoniae*, tem sido observada em países do Oriente Médio e Norte da África e em alguns países europeus (Poirel et al, 2012a). Uma característica dessa enzima é que ela hidrolisa fracamente os carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro, no entanto, muitas cepas produtoras de OXA-48 co-produzem ESBLs (principalmente CTX-M-15 ou SHV-12), tornando estes isolados resistentes a todos os betalactâmicos disponíveis (Nordmann et al, 2012; Poirel et al, 2012b). Sua atividade não é inibida por ácido clavulânico ou EDTA, podendo ser inibida *in vitro* pelo NaCl (Nordmann, 2013). No Brasil, uma variante da OXA-48, a OXA-370, foi descrita em uma cepa de *E. hormaechei* isolada, em 2013, de um paciente internado na UTI de um hospital de Porto Alegre (Sampaio et al, 2014). Pereira et al (2015) mostraram a presença da OXA-370 em diferentes espécies de

*Enterobacteriaceae* no Rio de Janeiro, sugerindo a necessidade de investigação dessa enzima.

O gene *bla*<sub>OXA-48</sub> parece ter origem no cromossomo da *Shewanella* sp., encontrada em sedimentos de rios e lagos e eventualmente isolada de amostras clínicas. Esse gene já foi identificado em diversos STs, tanto de *E. coli* como de *K. pneumoniae* e em outros gêneros, porém há uma associação desta carbapenemase com isolados de *K. pneumoniae* pertencentes ao ST395 (Patel & Bonomo, 2013).

#### 1.4 Detecção fenotípica das betalactamases

Um dos primeiros testes fenotípicos confirmatórios para a detecção de ESBL descritos foi o de disco aproximação. Este teste consiste em colocar um disco contendo uma cefalosporina e um contendo ácido clavulânico, 30 mm separados um do outro em uma placa de ágar Müller Hinton. O aumento ou distorção da zona de diâmetro ao redor do disco contendo a cefalosporina (chamada zona fantasma) indica a presença de uma ESBL (Jarlier et al, 1988).

Para a detecção de carbapenemases, existem diversos testes fenotípicos, porém, nenhum deles possui 100% de sensibilidade e especificidade. O Teste de Hodge Modificado funciona bem para a detecção de KPC e OXA-48, mas não é sensível para a detecção de NDM. No Brasil, esta técnica não é recomendada pela ANVISA, pois pode dar resultados falso-positivos em isolados produtores de ESBL associados com perda de porina ou super-expressão de AmpC (Carvalhães et al., 2010)

Para a detecção de OXA-48, nenhum dos testes citados é adequado e, resistência em nível elevado para temocilina (CIM  $\geq$  64 mg/L) e piperacilina- tazobactam, associado a sensibilidade reduzida ou resistência a pelo menos um carbapenêmico pode indicar a presença de um produtor de OXA-48 (Glupczynski et al, 2012). Recentemente, Ote et al (2015) desenvolveram um ensaio imunocromatográfico (OXA-48 K-SeT<sup>®</sup> Coris

BioConcept, Gembloux, Belgium) para a detecção rápida de OXA-48 e suas variantes, a partir de uma suspensão com colônias bacterianas, baseado em anticorpos monoclonais gerados por imunização em camundongos. A capacidade de detecção de cepas produtoras de OXA-48 diretamente de amostras de sangue e urina também foi destacada em alguns estudos (Wareham et al, 2016; Pasteran et al, 2016). O OKN K-SeT (Coris BioConcept) é uma variação multiplex deste ensaio imunocromatográfico para a detecção de OXA-48 e suas variantes, NDM e KPC em um só teste diretamente de culturas bacterianas (Glupczynski et al, 2017).

No Brasil, após a detecção dos primeiros casos de microrganismos produtores de NDM-1 em Porto Alegre, Rio Grande do Sul, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os critérios diagnósticos para detecção de carbapenemases a fim de que todos os laboratórios no Brasil utilizem os mesmos procedimentos e critérios interpretativos. O fluxograma para a detecção das carbapenemases está descrito na NOTA TÉCNICA Nº 01/2013, ANVISA. Para as cepas com resultado de halo de inibição com diâmetro  $\leq 22$  mm ou com CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  para imipenem e/ou meropenem, e com halo de inibição com diâmetros  $\leq 24$  mm, ou CIM  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  para ertapenem deverão ser feitos os testes de inibidores e potenciadores de betalactamases com discos de meropenem e imipenem com e sem adição de EDTA, cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB).

## 1.5 Aminoglicosídeos

Aminoglicosídeos são moléculas hidrofílicas, formadas por um grupo amino ligado a um ou mais açúcares através de ligações pseudoglicosídicas.

Os aminoglicosídeos são classificados de acordo com a posição do grupo amino nas classes estruturais: 2-deoxiestreptamina 4,6-dissubstituído (4,6-DOS), composta pela kanamicina e pelos aminoglicosídeos de maior importância clínica, gentamicina, tobramicina e amicacina; 2-

deoxiestreptamina 4,5-dissubstituído (4,5-DOS) que compreende a neomicina e paromomicina; 2-deoxiestreptamina 4-monossubstituído, composta pela apramicina e um último grupo composto pelo aminoglicosídeo estreptomicina que não se encaixam em nenhuma das outras classes. (Savic et al, 2009; Doi et al, 2016). Os aminoglicosídeos se ligam ao sítio A (sítio Aminoacil) do 16S rRNA na subunidade 30S do ribossomo, interferindo no processo de translocação e, conseqüentemente inibindo a síntese proteica (Magnet & Blanchard, 2005; Ramirez & Tolmaski, 2010).

A estreptomicina foi descoberta em 1943, isolada de *Streptomyces griseus*, sendo o primeiro antibiótico com efeito contra *Mycobacterium tuberculosis*. Desde então, muitos outros aminoglicosídeos produzidos por diversos actinomicetos foram descobertos. Os aminoglicosídeos são efetivos contra vários bacilos Gram-negativos, estafilococos, micobactérias e alguns estreptococos, sendo, na maioria das vezes, utilizados em combinação com um betalactâmico, aumentando o efeito bactericida. A família dos aminoglicosídeos inclui um grande número de compostos e com isso, aumentou também, o número de mecanismos de resistência desenvolvidos pelos microrganismos (Magnet & Blanchard, 2005; Ramirez & Tolmaski, 2010).

### **1.5.1 Resistência aos aminoglicosídeos**

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer através de diversos mecanismos como modificação/inativação enzimática dos aminoglicosídeos, modificação do sítio de ligação do fármaco, diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática e aumento do efluxo do fármaco (Wachino & Arakawa, 2012). O mecanismo de resistência mais comum em *Enterobacteriaceae* é a modificação estrutural do aminoglicosídeo por três tipos específicos de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (EMAs): aminoglicosídeo acetiltransferases (AAC), aminoglicosídeo fosfotransferases

(APH) e aminoglicosídeo nucleotidiltransferases ou adenililtransferases (ANT). Estas enzimas são principalmente codificadas por genes carregados em plasmídeos, integrons e, muitas vezes, transferidas por transposons e outros elementos móveis, geralmente junto com outros genes de resistência. A inativação nesse tipo de resistência é feita pela ligação ao aminoglicosídeo de um grupo adenilil, fosforil ou acetil, reduzindo a afinidade do antibiótico e impedindo sua ligação à subunidade 30S do ribossomo (Giedraitiene et al, 2011). É possível que mais de uma enzima esteja sendo expressa ao mesmo tempo, o que pode tornar os microrganismos resistentes a todos os aminoglicosídeos (Tabela 3). Recentemente, um novo mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos foi detectado em bactérias Gram-negativas, as metiltransferases 16S rRNA. Diferente das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos que variam nos seus substratos específicos e, geralmente, conferem uma resistência em nível mais baixo, as metiltransferases 16S rRNA conferem uma resistência em nível elevado para a maioria dos aminoglicosídeos de importância clínica, como a amicacina, tobramicina e gentamicina (Zhou et al, 2010; Garneau-Tsodikova & Labby, 2015).

Tabela 3 - Fenótipos de resistência detectados de acordo com a produção das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.

		GM	SIS	TM	AK	DBK	NTL	NEO	SM
Fosfo-transferases (APHs)	APH(3')-Ia	R	S	S	S	S	S	R	S
	APH(3')-VIa	S	S	S	S	S	S	R	S
Acetil-transferases (AACs)	AAC(3)-Ia	R	R	S	S	S	S	S	S
	AAC(3)-IIa	R	R	R	S	R	R	S	S
	AAC(6')-Ib	S	R	R	R	R	R	S	S
Nucleotidil- transferases (ANTs)	ANT(2'')-Ia	R	R	R	S	R	S	S	S
	ANT(3'')-Ia	S	S	S	S	S	S	S	R

GM: gentamicina; SIS: sisomicina; TM: tobramicina; AK: amicacina; DBK: dibecacina NTL: netilmicina; NEO: neomicina; SM: estreptomina. R: Resistente; S: Sensível

Fonte: Shaw et al, 1993

## 1.6 Metiltransferases 16S rRNA

Os antibióticos da classe dos aminoglicosídeos são produzidos naturalmente por *Actinomycetos* como *Streptomyces* spp. e *Micromonospora* spp. Esses microrganismos são intrinsecamente resistentes aos aminoglicosídeos que produzem, através da proteção, pela metilação, do 16S rRNA na subunidade 30S do ribossomo pela produção de metiltransferases 16S rRNA. Foram identificados dois sítios de metilação no 16S rRNA, que levam a diferentes fenótipos de resistência. Assim, as metiltransferases foram subclassificadas em dois grupos, as N7-G1405 16S-RMTases e as N1-A1408 16S-RMTases, dependendo da posição do nucleotídeo a ser modificado no sítio A do 16S rRNA (Figura 1). As N1-A1408 16S-RMTases são produzidas pelos microrganismos produtores de istamicina, *Streptomyces tenjimariensis* e atuam no nucleotídeo A1408, e geram uma resistência aos aminoglicosídeos 4,5-DOS, 4,6-DOS e apramicina, mas não a gentamicina. As N7-G1405 16S-RMTases são produzidas pelos microrganismos produtores de gentamicina, *Micromonospora purpurea*, esta enzima metila o nucleotídeo G1405, gerando resistência exclusivamente aos aminoglicosídeos 4,6-DOS como a amicacina e gentamicina, mas não aos aminoglicosídeos 4,5-DOS, apramicina e estreptomicina. A introdução de um grupo metil nos nucleotídeos A1408 e G1405 causa um distúrbio na ligação entre o nucleotídeo e o aminoglicosídeo, reduzindo a afinidade do fármaco pelo seu sítio alvo (Doi & Arakawa, 2007; Wachino & Arakawa, 2012). Genes que codificam metiltransferases 16S rRNA estavam restritos aos microrganismos produtores de aminoglicosídeos e, apenas recentemente, relatadas em bactérias Gram-negativas (Kang et al, 2008).

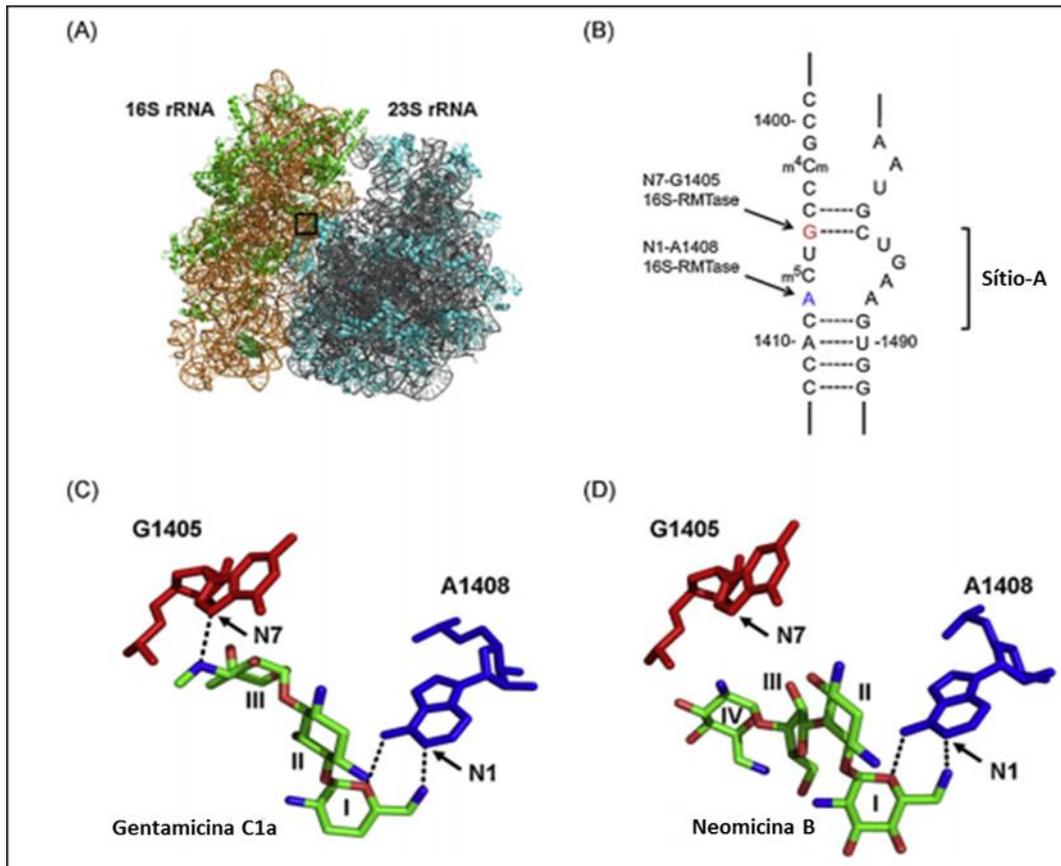


Figura 1 - Sítios de metilação no 16S rRNA, que levam a diferentes fenótipos de resistência. (A) Estrutura do ribossomo 70S da *E. coli* contendo 16S rRNA (laranja), 23S rRNA (cinza) e proteínas ribossômicas (verde e azul). A ligação da gentamicina com o 16S rRNA está sendo mostrada com um quadrado. (B) Região decodificadora do Sítio A no 16S rRNA. (C e D) Estruturas dos complexos entre aminoglicosídeos (Gentamicina C1a e Neomicina B) e nucleotídeos G1405 e A1408 no 16S rRNA. As linhas tracejadas indicam prováveis ligações de hidrogênio (Wachino & Arakawa, 2012).

Em 2002, a sequência de um gene codificador de uma metiltransferase 16S rRNA, a ArmA (Aminoglycosides Resistance Methylase), foi depositada no *European Molecular Biology Laboratory* e no “GenBank”, identificada em uma cepa de *C. freundii* na Polônia. Em seguida, em 2003, foi descrita uma *P. aeruginosa*, no Japão, produtora de uma

metiltransferase designada de RmtA (Galimand et al, 2003; Yokoyama et al, 2003). Desde então, várias metiltransferases 16S rRNA foram descritas, sendo todas classificadas como N7-G1405 16S-RMTases. Uma única N1-A1408 16S-RMTases foi descrita por Wachino et al (2007), a NpmA, isolada de *E. coli* no Japão, e mais recentemente na Arábia Saudita em *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., com um fenótipo de resistência mais amplo que das N7-G1405 16S-RMTases (Al Sheikh et al, 2014). A maioria dos genes codificadores dessas metiltransferases estão localizados em elementos móveis transferíveis, podendo facilmente se disseminar para outras espécies (Doi & Arakawa, 2007). A figura 2 mostra a distribuição mundial das metiltransferases 16S rRNA descritas até o momento.

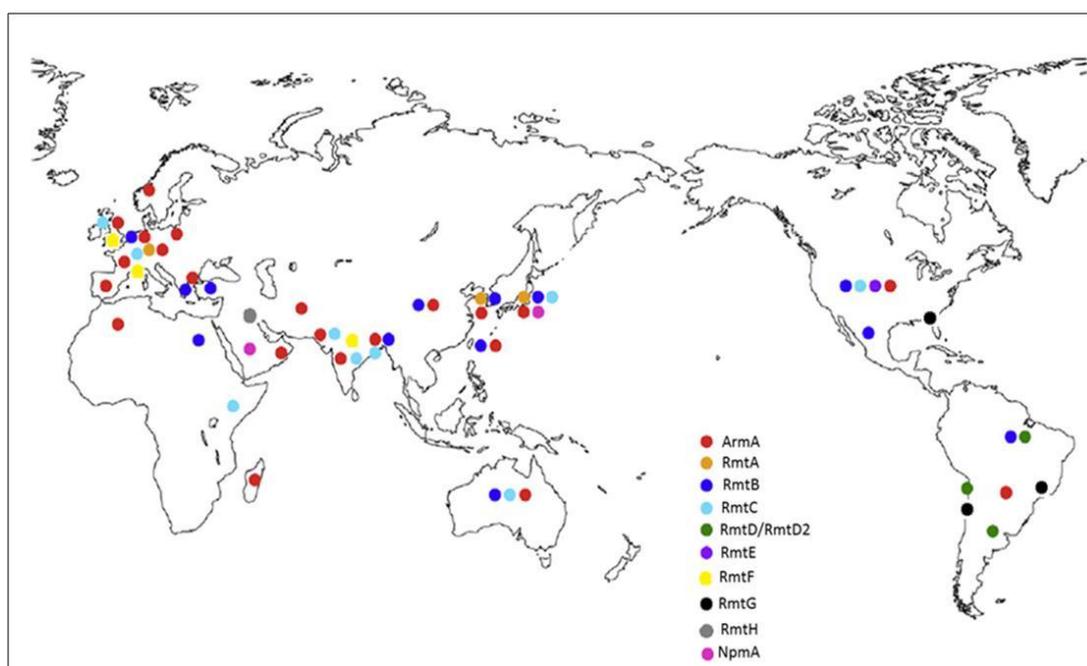


Figura 2 - Distribuição mundial das metiltransferases 16S rRNA (Wachino & Arakawa, 2012; modificada).

A nomenclatura das metiltransferases 16s rRNA foi proposta por Doi et al (2008a) para que haja uma padronização das novas metiltransferases descritas. Enzimas com uma similaridade na sequência de aminoácido maior que 95% com outra metiltransferase já descrita, será denominada como uma

variante numérica dessa metiltransferase (p. ex RmtD, RmtD2). As metiltransferases com 50 a 95% de similaridade deverão ser denominadas com uma nova letra, seguindo a ordem alfabética da última enzima descrita (p. ex. RmtA, RmtB, RmtC, etc). Enzimas que possuam uma similaridade menor de 50% com qualquer outra metiltransferase descrita ou que tenha ação em um outro nucleotídeo do 16S rRNA, deverá receber um novo nome (p.ex NpmA).

Uma grande preocupação das cepas produtoras de metiltransferases 16S rRNA é a emergência de cepas multi-resistentes através do acúmulo de vários outros genes de resistência antimicrobiana (Wachino & Arakawa 2012). Cepas co-produtoras de metiltransferase 16S rRNA e outra betalactamase são comuns e já foram descritas em muitas partes do mundo como *K. pneumoniae* produtora de RmtB e KPC-2 na China, *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1 e RmtD, no Brasil, entre outros (Wachino & Arakawa, 2012).

### 1.6.1 RmtD

A RmtD foi a quinta metiltransferase 16S rRNA descrita, identificada em uma cepa de *P. aeruginosa* isolada de um paciente hospitalizado em Sorocaba, Brasil, em 2005. Além dos aminoglicosídeos, essa cepa também apresentava resistência aos carbapenêmicos, devido a presença de uma metalo betalactamase, a SPM-1. Essa foi a primeira vez que uma cepa produtora de uma metiltransferase co-produzia uma metalo betalactamase e o primeiro relato de uma metiltransferase 16S rRNA nas Américas. Das metiltransferases descritas até então, a RmtD possuía uma maior similaridade com a RmtA, que também foi identificada em *P. aeruginosa* (Doi et al, 2007a). Em seguida, Doi et al (2007b) demonstraram que a co-produção de SPM-1 e RmtD foi comumente observada nos isolados de *P. aeruginosa* dos hospitais de São Paulo, estando presente na metade das cepas dessa espécie resistentes ao imipenem, na população de estudo.

Posteriormente, foi descrita a produção de RmtD por uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de um hospital de Salvador, Bahia (Yamane et al, 2008), o que demonstra a disseminação de RmtD no Brasil em mais de uma espécie bacteriana.

Uma variante da RmtD, a RmtD2, foi descrita na Argentina, em 2011. Diferente da RmtD descrita no Brasil, essa nova variante estava presente na Argentina desde os anos 90 em cepas de *E. cloacae* e *C. freundii* e não possuía associação com metalo betalactamases (Tijet et al, 2011). Em 2010, foi descrita uma cepa de *P. aeruginosa* co-produtora de RmtD e SPM- 1 isolada no Rio Tietê em São Paulo e clonalmente relacionada com a cepa de *P. aeruginosa* isolada em ambiente hospitalar, mostrando que cepas codificadoras de genes *rmtD* e *bla*<sub>SPM-1</sub> não estão restritas ao ambiente hospitalar (Fontes et al, 2011). A RmtD e sua variante RmtD2 estão localmente distribuídas apenas em países da América do Sul como Brasil, Chile e Argentina (Doi et al, 2007b; Fritsche et al, 2008; Yamane et al, 2008; Tijet et al, 2011).

### 1.6.2 Outras metiltransferases 16S rRNA

A ArmA foi a primeira metiltransferase descrita, em 2002. Sua disseminação é mundial em bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *E. coli*, *E. cloacae*, *S. enterica*, *Shigella flexneri* e *S. marcescens* e em *Acinetobacter baumannii* (Wachino & Arakawa, 2012). No Brasil, houve uma única descrição, em 2015, da produção da enzima ArmA por uma cepa de *E. cloacae* co-produtora de NDM-1, TEM-1 e CTX-M-15 (Quiles et al, 2015).

A metiltransferase RmtA foi esporadicamente detectada, com relatos de *P. aeruginosa* produtoras dessa enzima no Japão e Coréia e em uma cepa de *K. pneumoniae* na Suíça (Yamane et al, 2007; Jin et al, 2009; Poirel et al, 2011a).

A RmtB foi, primeiramente, descrita em 2002 em uma cepa de *S. marcescens* isolada no Japão. Dentre todas as metiltransferases 16S rRNA

já descritas, a RmtB, juntamente com a ArmA, são as mais predominantes, sendo detectadas principalmente em *Enterobacteriaceae* da Ásia, Europa, América do Norte e do Sul, Oriente Médio, África e Oceania (Doi et al, 2016). Os genes que codificam essas metiltransferases estão disseminados no mundo todo através de bactérias isoladas de humanos e também de animais de consumo (Garneau-Tsodikova & Labby, 2015). No Brasil, Tollentino et al (2015) descreveram pela primeira vez a RmtB em 2 cepas de *K. pneumoniae* co-produtoras de KPC-2 e CTX-M-14, isoladas de diferentes hospitais de São Paulo. Outro estudo relatou a disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de RmtB em diversos hospitais do Estado de São Paulo (dos Santos et al, 2017).

O gene *rmtC* foi descrito em 2006, em uma cepa de *Proteus mirabilis*, isolada em 2003, no Japão. Desde então a RmtC já foi detectada na Austrália, Reino Unido, Alemanha, Estados Unidos, Quênia, Índia, entre outros países em diversos gêneros de *Enterobacteriaceae* (Wachino & Arakawa, 2012).

A metiltransferase RmtE foi descrita em apenas duas cepas, uma cepa comensal de *E. coli*, isolada de gado em uma fazenda nos Estados Unidos e em uma cepa de *E. coli* isolada de um paciente nos Estados Unidos (Davis et al, 2010; Lee et al, 2014).

A RmtF foi relatada em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada em 2011 na França, e já foi identificada na Índia e no Reino Unido, sendo a maioria desses isolados co-produtores da metalo betalactamase NDM-1 (Galimand et al, 2012, Hidalgo et al, 2013).

### **1.6.3 Detecção laboratorial das metiltransferases 16S rRNA**

A característica principal das cepas produtoras de N7-G1405 16S-RMTases é a resistência em nível elevado para os aminoglicosídeos do grupo 4,6-DOS. Assim, o teste de disco difusão usando gentamicina, amicacina e tobramicina podem ser utilizados como *screening* da produção

de metiltransferases. A produção de uma metiltransferase 16S rRNA é suspeita quando nenhuma zona de inibição for observada em nenhum desses antibióticos. Quando disponível, a adição de um disco de arbecacina aumenta a sensibilidade de detecção para 90%, quando comparado com 60% de detecção usando apenas a amicacina (Lee et al, 2006; Doi & Arakawa, 2007; Wachino & Arakawa, 2012). A determinação das CIMs para esses antibióticos pode ser realizada como um teste fenotípico confirmatório, sendo que cepas produtoras de metiltransferases 16S rRNA possuem valores  $\geq 256$  mg/mL. O método de detecção confirmatório é a PCR, seguida pelo sequenciamento do gene amplificado para a caracterização da metiltransferase 16S rRNA (Doi & Arakawa, 2007).

A arbecacina é um aminoglicosídeo semi-sintético do grupo da kanamicina. Esse antibiótico não é inativado pelas enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, tendo sido usado no Japão há mais de 10 anos, o que poderia ter promovido a emergência e disseminação de bactérias Gram-negativas produtoras de metiltransferase 16S rRNA naquele país (Doi & Arakawa, 2007).

### **1.7 Elementos genéticos móveis envolvidos na disseminação de genes de resistência**

Embora a resistência adquirida através de mutação cromossômica seja um mecanismo importante, a eficiência da disseminação de genes de resistência está relacionada com a transmissão horizontal destes através de elementos genéticos móveis como bacteriófagos, plasmídeos e transposons (Toleman & Walsh, 2011). O DNA adquirido horizontalmente, geralmente, codifica funções que geram uma vantagem seletiva aos microrganismos como resistência a antimicrobianos, virulência e vias de biodegradação (Normark & Normark, 2002). Em geral, esse intercâmbio de material genético pode ser realizado através dos processos de transdução (via bacteriófagos), conjugação (via plasmídeos e transposons conjugativos) e

transformação (via incorporação no cromossomo de DNA cromossômico, plasmídeos e outros DNAs livres, decorrentes de lise celular) (Alekhshun & Levy, 2007).

Os elementos genéticos móveis podem ser divididos em dois grupos: aqueles que podem se mobilizar de uma célula bacteriana para outra como os bacteriófagos e os plasmídeos e, aqueles que podem se mobilizar de uma localização genética para outra, na mesma célula bacteriana, podendo ser transferidos para outra célula quando inseridos em um dos membros do primeiro grupo de elementos genéticos móveis, tendo como exemplo os transposons, sequências de inserção (IS), cassetes genéticos/integrans (Bennet, 2008; Siguier et al, 2014).

### **1.7.1 Plasmídeos**

Os plasmídeos são moléculas extra-cromosômicas de DNA dupla fita com capacidade autônoma de replicação. Estão relacionados com o aumento da diversidade genética bacteriana, desempenhando papéis fundamentais para a adaptação e evolução da bactéria que o possui, pois carregam genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados, fatores de virulência, de catabolismo de substratos não usuais, entre outros (Brock et al, 1994; Carattoli et al, 2005). A transmissão destes elementos móveis ocorre de forma horizontal através da conjugação. Plasmídeos que contêm genes essenciais para a iniciação e controle da sua replicação, passível de realizar sua conjugação, são chamados de conjugativos. Alguns plasmídeos são incapazes de iniciar sua conjugação e necessitam de outros plasmídeos conjugativos para serem transmitidos. Nestes casos, os plasmídeos são denominados mobilizáveis (Carattoli, 2005; Siefert, 2009).

Os plasmídeos são classificados em grupos de incompatibilidade baseado na sua estabilidade durante a conjugação. Plasmídeos com o mesmo controle de replicação são incompatíveis, enquanto plasmídeos com controle de replicação distintos são compatíveis. Assim, dois plasmídeos

pertencendo ao mesmo grupo de incompatibilidade não podem ser propagados na mesma linhagem celular. A organização dos plasmídeos em grupos de incompatibilidade é uma ferramenta importante para analisar a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes que carregam genes de resistência antimicrobiana (Caratolli et al, 2005).

A transferência horizontal de plasmídeos contendo genes de resistência é um mecanismo essencial para a dispersão da resistência antimicrobiana. Os plasmídeos que carregam genes de resistência podem ser divididos em dois grupos principais chamados plasmídeos *narrow-host-range*, que geralmente pertencem aos grupos de incompatibilidade IncF e, os plasmídeo *broad-host-range*, que pertencem aos IncA/C, IncL/M e IncN. Plasmídeos *broad-host-range* podem ser facilmente transferidos entre espécies diferentes, enquanto que plasmídeos *narrow-host-range* costumam ser restritos a uma espécie (Mathers et al, 2015). A disseminação de plasmídeos que carregam resistência antimicrobiana é muito bem estudada e mostra que, uma vez que os genes de resistência se estabelecem em plasmídeos de sucesso, eles rapidamente se disseminam entre diferentes cepas, espécies ou mesmo gêneros (von Wintersdorff et al., 2016).

### **1.7.2 Transposons, sequências de inserção (IS) e cassetes genético/integrans**

Transposons são elementos genéticos móveis que podem estar integrados em plasmídeo, outros transposons ou cromossomos. Esse fragmento de DNA contém regiões terminais que participam da recombinação e codificam proteínas chamadas transposases ou recombinases que facilitam a excisão de regiões genômicas e a incorporação para regiões genômicas específicas. Transposons conjugativos possuem a característica do plasmídeo podendo facilitar a transferência de um plasmídeo de um organismo para outro (Alekhun & Levy, 2007). Transposons podem causar rearranjos complexos de DNA e podem

acumular vários genes de resistência conferindo um fenótipo de multirresistência antimicrobiana (Feng et al, 2015).

IS são elementos móveis pequenos geralmente delimitados por duas repetições invertidas (IR) curtas, idênticas ou não. A região entre as IRs possui um ou dois genes que codificam transposases e o reconhecimento da IR pela transposase permite o movimento da IS para uma nova localização através de um processo de “corta e cola” e/ou “copia e cola”, dependendo da IS. A transposição da maioria das ISs gera uma sequência de repetição direta (DR) com um tamanho característico de geralmente 2-14 pb. Duas cópias de uma mesma IS ou de duas IS relacionadas podem se inserir em cada lado de um gene e capturá-lo como parte de um transposon podendo, então, mover-se como uma unidade. As ISs podem, ainda, fornecer promotores que levam a expressão dos genes capturados (Partridge et al, 2009). As ISCR se diferem das IS por um mecanismo de transposição chamado *rolling circle* (RC). Além disso, as ISCR não possuem as repetições invertidas e sim sequências terminais distintas designadas *oriIS* e *terIS* que indicam os locais de início e término do estágio de replicação da transposição RC (Bennett, 2008). ISCR são elementos que capturam e movimentam genes de resistência capazes de formar extensos *clusters* de genes de resistência em plasmídeos (Toleman et al, 2006).

Cassetes genéticos são os menores elementos móveis associados com resistência a antimicrobianos que consistem de um gene, geralmente precedido por um sítio de ligação ribossômica e um sítio de recombinação *attC*. Esses elementos podem existir transitoriamente como moléculas circulares, mas não codificam os mecanismos para seu próprio movimento estando, normalmente, inseridos em integrons. Os integrons são sistema de captura de genes que utiliza recombinação em sítios específicos ao invés de mecanismos de transposição. Eles são compostos por um gene *intl* e um sítio de recombinação *attI*. O gene *intl* codifica uma integrase que catalisa a recombinação sítio-específica entre o sítio *attI* do integron com o sítio *attC* do cassete genético para inserir ou soltar esses cassetes. Os integrons estão divididos em classes baseados nas suas sequências *IntI* e, podem

estar, frequentemente, inseridos em transposons (Normark & Normark, 2002; Bennett, 2008; Partridge, 2011).

### 1.7.3 Contexto dos genes de metiltransferases 16S rRNA

Os diversos elementos móveis que carregam genes de metiltransferases 16S rRNA, juntamente com outros genes de resistência antimicrobiana, tem sido associados com vários plasmídeos conjugativos pertencentes a diversos grupos de incompatibilidade como IncL/M, IncFII, IncA/C, IncN entre outros (Wachino & Arakawa, 2012).

O contexto genético do *rmtB* é frequentemente relacionado com o gene *bla*<sub>TEM-1b</sub> em associação com um transposon Tn2 (Martins e Gales, 2017). Sequências de inserção também tem sido relacionadas com a mobilização de genes de metiltransferases 16S rRNA, como a *ISEcp1* que está envolvida com a translocação do *rmtC*, além de fornecer a sequência promotora para a expressão desse gene, e a *IS26* que flanqueia o gene *npmA* sugerindo seu envolvimento na mobilização desse gene (Wachino et al, 2006; Wachino et al, 2007). O ambiente genético do *armA* é composto pelo elemento genético *ISCR1*, seguido de um integron de classe 1. Apesar dos grupos de incompatibilidade dos plasmídeos que carregam o *armA* e os cassettes genéticos compondo o integron de classe 1 serem variáveis, o contexto genético do *armA* parece ser bem conservado em *Enterobacteriaceae* e em *A. baumannii* (Doi et al, 2016). O gene *rmtF* tem sido relatado em integrons de classe 1 juntamente com o gene da carbapenemase *bla*<sub>NDM</sub> (Mataseje et al, 2014).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

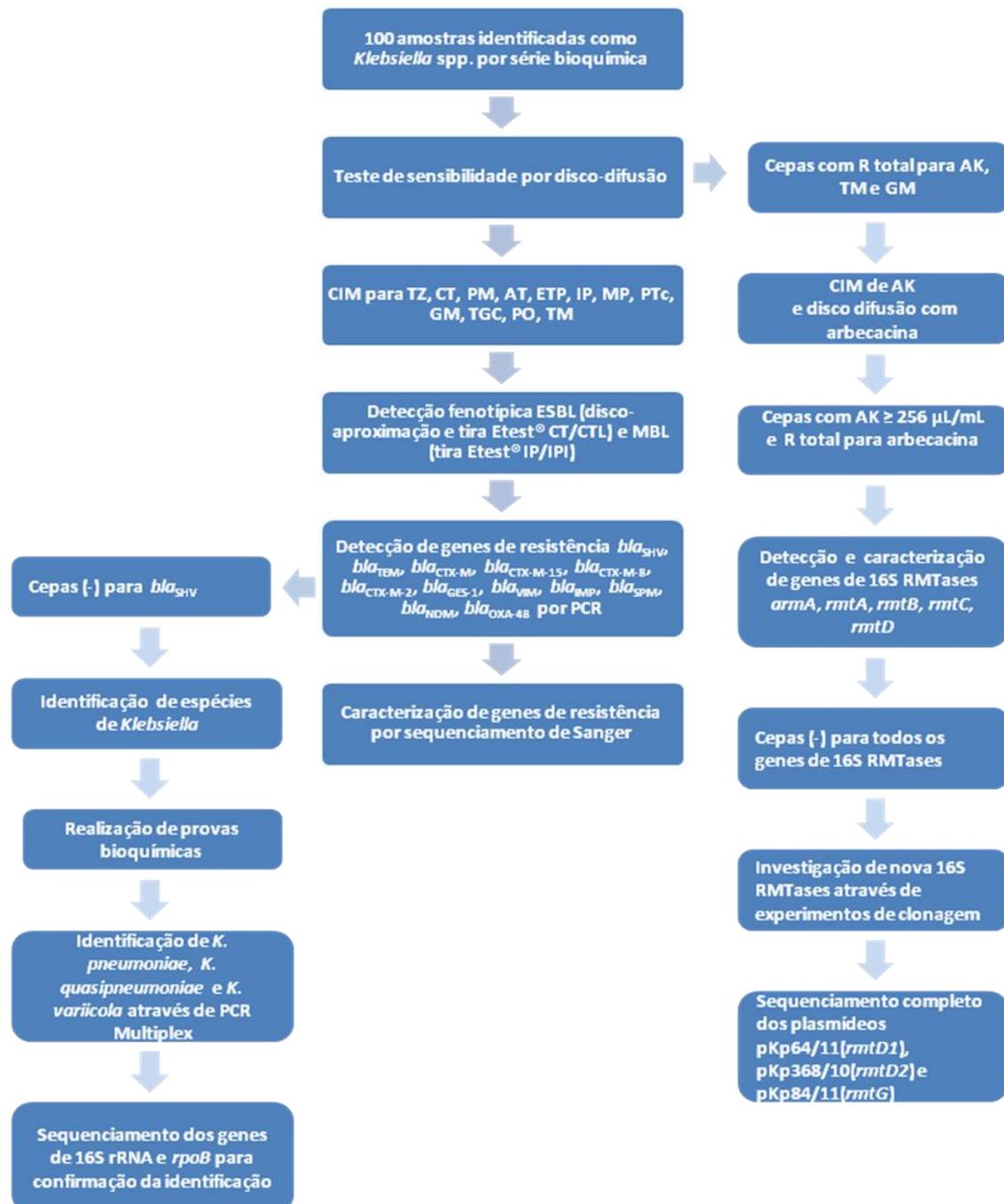
Caracterizar genes de resistência bacteriana, e seu contexto genético, responsáveis pela produção de betalactamases e metiltransferases 16S rRNA em amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC de origem hospitalar.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificação de espécies de *Klebsiella* por métodos fenotípicos e genotípicos.
- Determinar a sensibilidade aos antimicrobianos mais comumente utilizados na terapêutica antimicrobiana pelo método de disco-difusão e a concentração inibitória mínima pela técnica de gradiente de concentração (Etest®).
- Detectar fenótipos de resistência para ESBL, KPC, MBL, metiltransferases 16S rRNA.
- Caracterizar genes de resistência responsáveis pela produção de betalactamases (KPC, ESBL, MBL e OXA-48) e metiltransferases 16S rRNA por PCR, sequenciamento e técnicas de conjugação e transformação.
- Determinar a sequência completa de plasmídeos que carregam genes de resistência a aminoglicosídeos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Fluxograma da metodologia utilizada neste estudo



### 3.2 Seleção das amostras

O Instituto Adolfo Lutz é um Laboratório de Saúde Pública, que, na área de Infecção Hospitalar, atende rotineiramente diversas instituições de saúde do Estado de São Paulo para confirmação de identificação bacteriana, perfis de sensibilidade aos antimicrobianos, fenótipos de resistência, confirmação da presença de *bla*<sub>KPC</sub> e tipagem molecular. No período de 2009 a 2011, 704 cepas recebidas de 65 instituições de saúde do Estado de São Paulo foram confirmadas como *Klebsiella* spp multirresistentes e produtoras de KPC por PCR. Desse banco foram selecionadas 100 cepas, sendo uma cepa de cada uma das 65 instituições, e, de 22 instituições, mais de uma cepa foi selecionada, porém de pacientes diferentes (Anexo 3). Além disso, foi dada preferência para isolados de sangue e urina, apenas nos casos de cepas provenientes de instituições onde não havia cepas isoladas dessas fontes é que foram selecionadas cepas obtidas de secreções, ponta de cateter ou vigilância. A identificação de todas as cepas recebidas foi confirmada pelo método manual clássico através de série bioquímica. Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos de todas as amostras foram obtidos pelo método de disco-difusão pelo método de Kirby-Bauer e a leitura e interpretação foram feitas de acordo com o CLSI, 2013 e EUCAST para os fármacos ceftazidima, cefepime aztreonam, tigeciclina e polimixina B, de acordo com a NT 01/2013 da ANVISA.

### 3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Foi determinada a CIM para cefotaxima com e sem ácido clavulânico, ceftazidima, cefepime, aztreonam, ertapenem, meropenem, imipenem com e sem EDTA, piperaciclina-tazobactam, tigeciclina, polimixina B, gentamicina, tobramicina de todas as 100 cepas de *Klebsiella* spp. através de tiras contendo gradientes de concentração de drogas (Etest®, AB Biodisk, Suécia). Para o preparo do inóculo bacteriano, foi feita uma

suspensão de colônias isoladas em solução NaCl 0,85% com turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland obtida através do aparelho Densicheck Plus (Biomérieux). A suspensão bacteriana foi semeada em placas de ágar Müeller-Hinton com auxílio de um swab estéril em 3 direções diferentes e, após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, foram aplicadas as tiras de Etest® com auxílio de uma pinça, de acordo com as instruções do fabricante. Foram colocadas um número máximo de 6 tiras nas placas com 150 mm de diâmetro e 2 tiras na placa com diâmetro de 90 mm. As placas foram incubadas a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20 horas.

Após as 16-20 horas de incubação foi feita a leitura e interpretação dos testes realizados de acordo com o CLSI 2013 e EUCAST, segundo a recomendação da NT 01/2013 da Anvisa. A determinação da CIM foi dada a partir da intersecção da elipse com a escala da tira de Etest®. No caso de colônias isoladas dentro da elipse, essas foram incluídas dentro do valor da CIM. Como controle de qualidade, foram incluídas nos testes de sensibilidade cepas da “*American Type Culture Collection*” (ATCC) de *P. aeruginosa* ATCC 27853, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603.

### **3.4 Detecção fenotípica da produção de betalactamases**

#### **3.4.1 Carbapenemases**

Para a detecção fenotípica da produção de KPC foi usado o valor de CIM para os carbapenêmicos ertapenem, meropenem e imipenem. Cepas que apresentaram diminuição da sensibilidade de algum carbapenêmico, com valores de CIM  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  para imipenem ou meropenem ou  $\geq 1$   $\mu\text{g/mL}$  para ertapenem foram consideradas possíveis produtoras de KPC. A detecção fenotípica de metalo betalactamases foi realizada a partir de tiras

de Etest® de imipenem/imipenem + EDTA (IP/IPI), conforme descrito no item 3.2. Uma extremidade da tira de Etest® possui um gradiente de concentração de imipenem (4-256 µg/mL) e na outra extremidade um gradiente de concentração de imipenem (1-64 µg/mL) mais uma concentração constante de EDTA. Um resultado positivo é indicado quando a razão entre o valor do CIM do imipenem/imipenem com EDTA for  $\geq 8$ .

### **3.4.2 ESBL**

A confirmação da produção da enzima ESBL foi realizada pela técnica de disco-aproximação, baseada nas recomendações do Consenso em Detecção de Resistência Bacteriana aos Antimicrobianos da Sociedade Brasileira de Microbiologia (Sampaio, 2008). Foi feita uma suspensão bacteriana conforme descrito anteriormente, para a determinação da CIM. Após a semeadura e completa absorção da suspensão em placas de Agar Müeller- Hinton, foi posicionado na superfície do ágar um disco contendo amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg). Discos contendo ceftazidima (30 µg), cefotaxima (30 µg), cefepime (30 µg) e aztreonam (30 µg) foram posicionados a uma distância de 20-30 mm do disco central de amoxicilina/ácido clavulânico. As placas foram incubadas a  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16-20 horas. Um teste foi considerado positivo quando houve um aumento ou distorção da zona de diâmetro entre o disco de amoxicilina /ácido clavulânico e do disco contendo uma das cefalosporinas testadas, indicando a presença de uma ESBL. Foi realizado, também, o teste fenotípico a partir de tiras de Etest® de cefotaxima/cefotaxima + ácido clavulânico (CT/CTL) conforme descrito anteriormente (item 3.2). Este teste é similar a tira de gradiente para detecção de MBL, tendo em uma extremidade um gradiente de concentração de cefotaxima (0,5-32 µg/mL) e a outra extremidade contendo um gradiente de concentração de cefotaxima (0,0064-4 µg/mL) mais uma concentração constante de 4 µg/mL de ácido clavulânico. É indicativo de resultado positivo quando a razão entre o valor de CIM da cefalosporina e o

valor da cefalosporina + ácido clavulânico for  $\geq 8$ .

### **3.5 Detecção fenotípica da produção de metiltransferases 16S rRNA**

Para as cepas que, no teste de sensibilidade por disco-difusão, apresentaram resistência total aos aminoglicosídeos amicacina (30  $\mu\text{g}$ ), gentamicina (10  $\mu\text{g}$ ) e tobramicina (10  $\mu\text{g}$ ), foi realizada a determinação da CIM para amicacina através de tiras de Etest® (AB Biodisk) de acordo com as instruções do fabricante, como descrito anteriormente (item 3.2). No laboratório da Universidade de Pittsburgh, foi feito teste de disco difusão com o antibiótico arbecacina para confirmação fenotípica da produção de metiltransferases 16S rRNA. Esse antibiótico não é comercializado no Brasil e se trata de um marcador mais sensível para detecção da produção de metiltransferase 16S rRNA do que a amicacina.

### **3.6 Detecção de genes de resistência**

#### **3.6.1 Extração do DNA**

A extração do DNA de todas as cepas foi feita pelo método do choque térmico que consiste em uma suspensão de  $\frac{1}{4}$  da alça descartável de 10  $\mu\text{L}$  da massa bacteriana em 500  $\mu\text{L}$  de água ultrapura estéril em um microtubo estéril. Essa suspensão foi aquecida a 95°C por 15 minutos e, em seguida, centrifugada a 15.700xg, a 4°C por 15 minutos. Após a centrifugação, transferiu-se 300  $\mu\text{L}$  do sobrenadante para um novo microtubo estéril para estocagem a -20°C.

#### **3.6.2 PCR dos genes de betalactamases**

A amplificação dos genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>CTX-M-15</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8</sub>, *bla*<sub>GES-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> foi feita pela técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). Para cada amostra, em um microtubo, foi adicionado 12,5 µL do Mix 2 (Thermo Scientific), 1 µL do primer F (concentração inicial 10µM), 1 µL do primer R (concentração inicial 10µM), 9,5 µL de água ultrapura estéril e 1µL de DNA, com um volume final de 25 µL. Os primers utilizados para cada gene estão descritos na tabela 4. O *primer* específico para a detecção do gene *bla*<sub>CTX-M-8</sub> foi desenhado pela ferramenta online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos na tabela 5. Microtubo contendo uma reação sem amostra de DNA foi utilizado como controle negativo da reação. Para cada tipo de gene pesquisado, uma amostra de DNA que conhecidamente possuía o gene a ser detectado, foi utilizada como controle positivo. Os genes *bla*<sub>KPC</sub> foram novamente submetidos a técnica de PCR para posterior caracterização por sequenciamento.

Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5% e a eletroforese foi realizada a 120 volts, por 40 minutos, corados por brometo de etídio, e visualizados em fotodocumentador de géis.

### 3.6.3 Detecção dos genes de metiltransferases 16S rRNA

Para a amplificação de genes responsáveis pela produção de metiltransferases 16S rRNA foram realizados dois protocolos de PCR Multiplex descritos por Doi & Arakawa, 2007. O primeiro PCR Multiplex foi realizado para pesquisa dos genes *rmtB*, *rmtC* e *armA* e o outro PCR Multiplex foi realizado para a pesquisa dos genes *rmtA* e *rmtD*. Em ambos os protocolos, para cada reação, foi colocado em um microtubo 12,5 µL do Mix 2 (Thermo Scientific), 1 µL de cada um dos primers F (concentração inicial 10 µM), 1 µL de cada um dos primers R (concentração inicial 10 µM), água ultrapura estéril (q.s.p 24 µL) e 1µL de DNA, com um volume final de 25 µL.

As condições de corrida dos dois protocolos consistiam em uma desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, seguida de 30 ciclos de 96°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por cinco minutos. Os primers utilizados em ambos os protocolos estão descritos na tabela 6. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, a eletroforese foi realizada a 120 volts por 40 minutos, e os géis foram corados por brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador de géis.

Tabela 4 - Descrição dos primers utilizados na PCR para amplificação de genes de betalactamases.

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento	Referência
KPC F KPC R	TGT CAC TGT ATC GCC GTC CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC	1011 pb	Rasheed et al, 2008
TEM-1 TEM-4	ATG AGT ATT CAA CAT TTC CGT G TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA G	840 pb	Essack et al, 2001
CTX-M F CTX-M R	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A	544 pb	Eldestein et al, 2003
SHV F SHV R	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC TTT ATG GCG TTA CCT TTG ACC	1051 pb	Yagi et al, 2000
GES-1 A GES-1 B	ATG CGC TTC ATT CAC GCA C CTA TTT GTC CGT GCT CAG G	860 pb	Poirel et al, 2000
CTX-M-15 F CTX-M-15 R	CAC ACG TGG AAT TTA GGG ACT GCC GTC TAA GGC GAT AAA CA	1001 pb	Muzaheed et al, 2008
CTX-M-2 F CTX-M-2 R	AAA TGT GCT GCT CCT TTC GTG AGC AGG GTT CGT TGC AAG ACA AGA CTG	1122 pb	de Oliveira Garcia et al, 2008
CTX-M-8 F CTX-M-8 R	GCA AGC GCA TTT TTG TTT TT GAC GAC TTT CTG CCT TCT GC	908 pb	Este estudo
VIM F VIM R	ATT GGT CTA TTT GAC CGC GTC TGC TAC TCA ACG ACT GAG CG	840 pb	Jeon et al, 2005
SPM F SPM R	AAA ATC TGG GTA CGC AAA CG ACA TTA TCC GCT GGA ACA GG	271 pb	Poirel et al, 2011b
IMP F IMP R	GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCTC GGT TTA AYA AAA CAA CCA CC	232 pb	Poirel et al, 2011b
NDM F NDM R	GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC	621 pb	Poirel et al, 2011b
OXA-48 F OXA-48 R	TTG GTG GCA TCG ATT ATC GG GAG CACT TCT TTT GTG ATG GC	743 pb	Poirel et al, 2004

Tabela 5 - Condições de corrida utilizadas para a amplificação de genes de resistência pela PCR.

Gene	Denaturação Inicial	nº de ciclos	Denaturação/Anelamento/Extensão	Extensão final
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	94°C/2 min	30	94°C/ 15s, 55°C/ 15s, 72°C/ 1min	72°C/7 min
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	96°C/6 min	30	96°C/ 30s, 55°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	96°C/5 min	30	96°C/ 30s, 51°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	96°C/5 min	30	96°C/ 30s, 60°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>GES-1</sub>	96°C/15 min	35	94°C/ 1min, 54°C/ 1min, 72°C/ 1min	72°C/3 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-15</sub>	96°C/5 min	30	96°C/ 30s, 51°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	96°C/5 min	30	96°C/ 30s, 60°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>CTX-M-8</sub>	94°C/2 min	30	94°C/ 15s, 55°C/ 15s, 72°C/ 1min	72°C/7 min
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	94°C/2 min	30	94°C/ 15s, 55°C/ 15s, 72°C/ 1min	72°C/7 min
<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	94°C/10 min	36	94°C/ 30s, 48°C/ 40s, 72°C/ 50s	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	94°C/10 min	36	94°C/ 30s, 48°C/ 40s, 72°C/ 50s	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>NDM</sub>	96°C/10 min	36	96°C/ 30s, 54°C/ 40s, 72°C/ 50s	72°C/5 min
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	94°C/5 min	30	94°C/ 30s, 55°C/ 45s, 72°C/ 30s	72°C/5 min

Tabela 6 – Descrição dos primers\* utilizados na PCR Multiplex para amplificação de genes de resistência para metiltransferases 16S rRNA

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento
Multiplex 1		
rmtB F	GCT TTC TGC GGG CGA TGT AA	173 pb
rmtB R	ATG CAA TGC CGC GCT CGT AT	
rmtC F	CGA AGA AGT AAC AGC CAA AG	711 pb
rmtC R	ATC CCA ACA TCT CTC CCA CT	
armA F	ATT CTG CCT ATC CTA ATT GG	315 pb
armA R	ACC TAT ACT TTA TCG TCG TC	
Multiplex 2		
rmtA F	CTA GCG TCC ATC CTT TCC TC	635 pb
rmtA R	TTG CTT CCA TGC CCT TGC C	
rmtD F	CGG CAC GCG ATT GGG AAG C	401 pb
rmtD R	CGG AAA CGA TGC GAC GAT	

\* Fonte: Doi & Arakawa, 2007

### **3.7 Caracterização dos genes de resistência**

Para a caracterização dos genes positivos na PCR, os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, utilizando-se o Big Dye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems, USA), segundo recomendações do fabricante.

#### **3.7.1 Purificação do produto de PCR**

O produto amplificado pela PCR foi purificado pelo Kit ExoSAP-IT Microseq PCR CleanUp (Affymetrix USB Products). Para cada amostra a ser purificada, foi adicionado, em um microtubo de 200  $\mu$ L ou em placa com 96 poços, 2  $\mu$ L de ExoSAP-IT e 5  $\mu$ L do produto amplificado. A reação foi incubada em termociclador com uma ciclagem de 37°C por 15 minutos, seguida de 15 minutos a 80°C, e armazenado a 4°C até o momento do uso.

#### **3.7.2 Reação de sequenciamento com Big Dye®**

Uma nova reação de PCR foi feita a partir do produto amplificado purificado, utilizando-se o Big Dye®. Para cada amostra, 2 mix foram feitos, um para o primer F e outro para o primer R do gene a ser caracterizado. Foram utilizados os mesmos primers usados na amplificação por PCR, porém na concentração de 0,67  $\mu$ M. Para isso, uma diluição de 1:16 foi feita, colocando 1  $\mu$ L do primer a 10  $\mu$ M em 15  $\mu$ L de água ultrapura. O mix foi feito em um microtubo e, para cada amostra, foram adicionados 0,875  $\mu$ L de água ultrapura estéril, 0,875  $\mu$ L do tampão do Big Dye®, 0,25  $\mu$ L de Big Dye® e 2  $\mu$ L de primer F ou R (concentração inicial 0,67  $\mu$ M), totalizando 4  $\mu$ L. Esse volume foi, então, distribuído em uma placa de 96 poços e 1  $\mu$ L da amostra purificada foi adicionada a cada poço. A placa foi selada com um adesivo óptico e colocada no termociclador, submetida a seguinte ciclagem:

desnaturação inicial 96°C por 1 minuto seguida de 25 ciclos de 96°C/10s, 50°C/5s e 60°C/4min com variação de temperatura de 1°C/segundo em cada uma das etapas. As placas foram armazenadas a 4°C até a realização da próxima etapa.

### **3.7.3 Purificação do produto do sequenciamento**

Após a retirada da placa do termociclador, foram adicionados 80µL de solução de purificação pós-sequenciamento (Anexo 2) e, após incubação por 15 minutos em temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 2000 x g, a 4°C por 45 minutos. Após essa etapa, o excesso de sobrenadante foi retirado e a placa foi centrifugada rapidamente por 1 minuto a 4°C e 500xg, em posição invertida sobre um papel filtro, para completa remoção da solução. Em seguida, foram adicionados em cada poço, 150 µL de etanol 70% frio, centrifugando a 2000xg, a 4°C por 10 minutos. A etapa de completa remoção do sobrenadante foi repetida e, após a centrifugação invertida, a placa ficou aberta por 5 minutos em temperatura ambiente para a secagem completa do álcool. A placa foi selada com adesivo óptico novamente, coberta com papel alumínio e armazenada à -20°C até o momento do sequenciamento.

### **3.7.4 Sequenciamento e análise de dados**

As placas com o DNA precipitado foram enviadas ao Laboratório Multi-usuário do Centro de Virologia do IAL, onde o sequenciamento foi realizado pelo Analisador automático de DNA ABI PRISM modelo 3100.

As sequências obtidas foram pré-processadas pelo software Seqman versão 5.07 e os *contigs* das sequências *forward* e *reverse* foram comparadas com as sequências depositadas no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para confirmação e comparação dos

alelos encontrados no BLAST, foi feito alinhamento pelo Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

### **3.8 Identificação das cepas negativas para *bla*<sub>SHV</sub>**

#### **3.8.1 Provas bioquímicas**

Para as cepas que apresentaram-se negativas para a detecção do *bla*<sub>SHV</sub> pela PCR foi realizada a identificação bioquímica através das provas de produção de indol, vermelho de metila (VM), Voges-Proskauer (VP), Citrato de Simmons, hidrólise da uréia, descarboxilação da lisina (LDC), descarboxilação da ornitina (ODC), arginina de-hidrolase (ADH), motilidade, hidrólise da esculina, utilização do malonato, produção de DNase, produção de lipase, produção de gelatinase, redução de nitrato, Rugai modificado e produção de ácido a partir da lactose, sacarose, D-manitol, salicina, adonitol, inositol, sorbose, arabinose, rafinose, ramnose, maltose, xilose, trealose, celobiose, melibiose, glicerol e manose e utilização do ácido tricarbálico como única fonte de carbono a partir do crescimento em meio mínimo M70 (Anexo 2) com 0,1% do ácido tricarbálico sem adição de nenhum outro fator de crescimento (Veron, 1975). Dessa forma, foram utilizadas as *K. pneumoniae* Kp314/11 (NZ\_MAOP00000000) e a *K. quasipneumoniae* CCBH16302 como controle negativo e positivo da reação, respectivamente.

#### **3.8.2 Identificação de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* através de PCR Multiplex**

Para a identificação genética de *Klebsiella* spp. foi utilizado o protocolo de PCR Multiplex descrito por Fonseca et al. (2017) baseado na diferenciação de espécies de *Klebsiella* através da presença de genes de

betalactamases cromossomais. Os genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub> possuem o mesmo contexto genético nos genomas de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*, respectivamente, sendo flanqueados pelo gene cromossômico *deoR* e um gene codificador de uma ATPase. Dessa forma, os *primers forward* utilizados nessa PCR Multiplex se ligam ao gene de betalactamase específico (*bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub>) e, um único *primer reverse*, que se liga na porção 3' do *deoR*. Essa estratégia permite que apenas os genes *bla* espécie-específicos cromossomais sejam amplificados. Os primers utilizados estão descritos na tabela 7. Para cada reação, foi colocado em um microtubo 12,5 µL do Mix 2 (Thermo Scientific), 1 µL de cada dos primers SHV-F, OKP-F e LEN-F (concentração inicial 10 µM), 1 µL do primer DeoR-R (concentração inicial 10 µM), 7,5 µL de água ultrapura estéril e 1µL de DNA, com um volume final de 25 µL. Como controle positivo das reações foi utilizado o DNA da *K. quasipneumoniae* CCBH16302, positiva para *bla*<sub>OKP</sub>, gentilmente cedida pela Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), uma cepa confirmada como *K. pneumoniae*, positiva para *bla*<sub>SHV</sub> e da *K. pneumoniae* ATCC 700603. A condição de corrida consistia em uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por dez minutos. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, a eletroforese foi realizada a 120 volts por 40 minutos, e os géis foram corados por brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador de géis.

### **3.8.3 Sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB* para a confirmação da identificação de *Klebsiella* spp.**

Para a confirmação da identificação das cepas que se apresentaram negativas para a detecção do *bla*<sub>SHV</sub> pela PCR, também foi realizado o sequenciamento do gene 16S rRNA e do gene *rpoB*, segundo o protocolo de

Mahenthiralingam et al. (2000) e Mollet et al. (1997), respectivamente. Para cada reação, foi colocado em um microtubo 12,5 µL do Mix 2 (Thermo Scientific), 1 µL do primer F (concentração inicial 10 µM), 1 µL do primer R (concentração inicial 10 µM), 9,5 µL de água ultrapura estéril e 1µL de DNA, com um volume final de 25 µL. Os primers utilizados e as condições de corrida da PCR para cada gene estão descritos na tabela 8. Os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose a 1,5%, a eletroforese foi realizada a 120 volts por 40 minutos, e os géis foram corados por brometo de etídio e visualizados em fotodocumentador de géis. Os produtos amplificados foram submetidos ao sequenciamento de DNA pelo método de Sanger, utilizando-se o Big Dye Terminator Kit v3.1 (Applied Biosystems, USA), conforme descrito anteriormente (item 3.7.1 a 3.7.4). A análise das sequências para a identificação genotípica de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* foi feita através do alinhamento das sequências de 16S rRNA e *rpoB* pelo Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e construção de árvore filogenética e dendrograma a partir do software Geneious v.9.0.5 das cepas deste estudo contra as sequências de referência de 16S rRNA HG933294 (*K. variicola*), HG933295 (*K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*), HG933296 (*K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae*) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (AF130981) e contra as sequências de referência de *rpoB* *K. variicola* (CP001891), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (CBZR01000023), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (CCDF01000034) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (CP000647) (Brisse et al, 2014).

Tabela 7 – Descrição dos *primers*\* utilizados na PCR Multiplex para identificação de espécies de *Klebsiella*

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho do fragmento
SHV-F	GCT GGC GGT ACA CGC CAG CCC G	995 pb
LEN-F	CAC GCT GCG YAA ACT ACT GAC YGC GCA GCA	485 pb
OKP-F	GGC CGG YGA GCG GGG CTC A	348 pb
DeoR-R	AGA AGC ATC CTG CTG TGC G	

\*Fonte: Fonseca et al, 2017.

Tabela 8- Descrição dos primers e das condições de corrida utilizados para a amplificação dos genes 16S rRNA e *rpoB* pela PCR.

Gene	Primers	Sequência	Ciclagem da PCR	Tamanho do fragmento	Referência
16S rRNA	UNI2	5'-GACTCCTAC GGG AGG CAG GAG-3'	94°C/5 min, 30x (94°C/30s, 57°C/45s, 72°C/1 min), 72°C/10 min	1.020 pb	Mahenthalingam et al., 2000
	UNI5	5'-CTG ATC CGC GAT TAC TAG CGA TTC-3'			
<i>rpoB</i>	CM <sub>1</sub>	5'-AAC CAG TTC CGC GTT GGC CTG G-3'	94°C/90s, 40x (94°C/10s, 55°C/20s, 72°C/50s), 72°C/5 min	1.088 pb	Mollet et al., 1997
	CM <sub>21b</sub>	5'-CCT GAA CAA CAC GCT CGG A-3'			

### 3.9 Extração de plasmídeo

A extração de plasmídeo foi feita através do kit Wizard® Plus Minipreps DNA Purification System (Promega, USA). Inicialmente, 3 a 4 colônias foram inoculadas em 5mL de caldo TSB (Bacto™ Tryptic Soy Broth, Becton, Dickinson) em um tubo Falcom e incubadas no agitador a 37°C, com agitação de 110 rpm por 16-18 horas. No dia seguinte, 1,5 mL da suspensão foi transferida para um microtubo e centrifugada por 10 minutos a 15.700xg. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 250 µL da Solução de Suspensão Celular e submetido a uma agitação vigorosa. Foram adicionados 250 µL da Solução de Lise em cada amostra, misturando 4 vezes por inversão. A partir da lise celular, as amostras não foram mais submetidas a agitação vigorosa para que não houvesse rompimento do

DNA. Para cada amostra, foram adicionados 350  $\mu$ L da Solução de Neutralização que foi misturada por inversão e centrifugada, na velocidade máxima, por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a centrifugação, as colunas providas pelo kit foram inseridas no tubo coletor e o sobrenadante foi, então, transferido para a coluna. Uma nova centrifugação em velocidade máxima por 1 minuto a temperatura ambiente foi feita e o decantado foi descartado. A coluna foi novamente inserida ao tubo coletor e foi adicionado 750  $\mu$ L da Wash Solution (com adição de etanol) e, centrifugado novamente na velocidade máxima por 1 minuto. O decantado foi descartado e a coluna reinserida no tubo coletor. O passo anterior foi repetido, porém com 250  $\mu$ L da Wash Solution, e centrifugação na velocidade máxima por 2 minutos. A coluna foi transferida para um novo microtubo estéril e 50  $\mu$ L de Água Nuclease Free foi adicionado à coluna. Foi feita uma última centrifugação, na velocidade máxima, por 1 minuto. A coluna foi descartada e o microtubo contendo o plasmídeo extraído foi armazenado à  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **3.10 Extração do DNA genômico**

Para a extração do DNA genômico, uma pequena quantidade (3-4 colônias) da bactéria foi inoculada em 10 mL de caldo TSB em um tubo Falcom por 16-18 horas. No dia seguinte, 1mL do caldo foi transferido para um microtubo e foi centrifugado a 4500xg por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuscitado com 1 mL de água destilada estéril e centrifugado a 4500xg por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado ressuscitado com 500  $\mu$ L de tampão de lise TES (Anexo 2) e foram adicionados 50  $\mu$ L de SDS (Sodium dodecyl sulfate solution) 10%. Em seguida, foram adicionados 3  $\mu$ L de lisozima a 50 mg/mL, incubando-se a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora, em termobloco. Após esse período, adicionou-se 700  $\mu$ L de Isoamil álcool Clorofórmio e centrifugou-se a 9300xg por 10 minutos. Após a centrifugação, foram adicionados 220  $\mu$ L de NaCl 5M e, em seguida, retirou-

se, cuidadosamente, a fase superior formada transferindo para outro microtubo estéril. Foram adicionados 700  $\mu\text{L}$  de isopropanol ao novo microtubo, armazenando a  $-20^{\circ}\text{C}$  por uma hora. Após esse período, centrifugou-se a 9300xg por 10 minutos, descartando, em seguida, o isopropanol e adicionando 800  $\mu\text{L}$  de etanol 70%. Foi feita uma última centrifugação a 9300xg por 5 minutos e todo o etanol foi removido e o precipitado ressuspendido com 100  $\mu\text{L}$  de água ultrapura.

### **3.11 Experimentos de clonagem**

Foram construídas três bibliotecas genômicas em que o DNA genômico extraído e o vetor pBC-SK(-) (AgilentTechnologies) (Figura 3) foram digeridos com umas das enzimas de restrição HindIII, ApaI ou EcoRI (New England BioLabs) e, posteriormente, ligados pela enzima T4 DNA ligase.

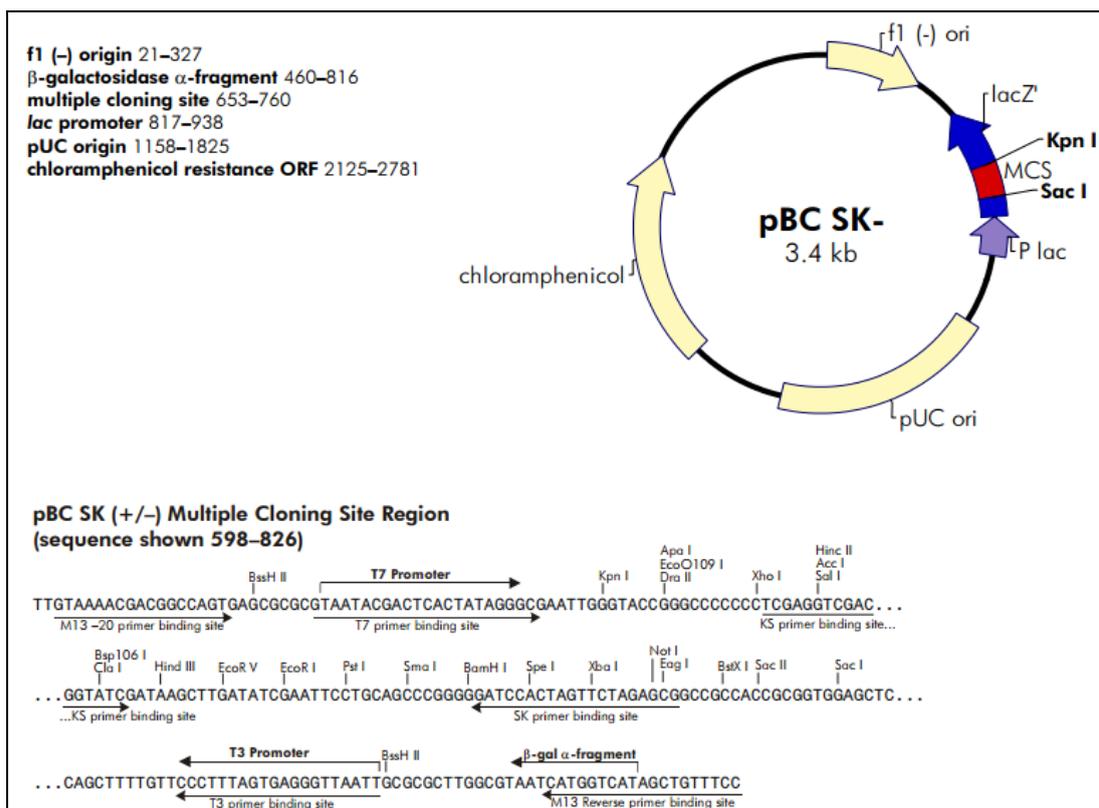


Figura 3 - Vetor pBC SK(-) usado para a clonagem com destaque para a região de Múltiplos Sítios de Clonagens (MSC), disponível em <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pBCSK-.pdf>

### 3.11.1 Digestão com enzima de restrição

A digestão para as três enzimas de restrição (HindIII, Apal e EcoRI) foi feita em 2 microtubos, um contendo 77  $\mu$ L do DNA genômico, 9  $\mu$ L do Buffer 2 e 4  $\mu$ L da enzima de restrição e o outro microtubo contendo 5  $\mu$ L do vetor, 20  $\mu$ L de água ultrapura, 2  $\mu$ L da enzima de restrição e 2  $\mu$ L do Buffer 2. Ambos os tubos foram centrifugados por 30 segundos e incubados em termobloco a 37°C por 1 hora. Após a digestão enzimática, foi feito um gel de agarose 1% para visualização do DNA digerido, com eletroforese do gel a 100 volts por 90 minutos.

### **3.11.2 Ligação do DNA genômico com o vetor**

Para a reação de ligação, primeiro foi preciso purificar e inativar a enzima de restrição. Para isso, 80  $\mu\text{L}$  do DNA genômico e 20  $\mu\text{L}$  do vetor foram misturados em um microtubo, acrescentando-se o mesmo volume (100  $\mu\text{L}$ ) de fenol-clorofórmio, misturados por agitação vigorosa e, em seguida, centrifugados na velocidade máxima por 10 minutos. Após a centrifugação, removeu-se cuidadosamente o sobrenadante, transferindo-o para outro microtubo, onde foi adicionado, primeiramente, 0,1x (10  $\mu\text{L}$ ) do volume de NaCl e, em seguida, 3x o volume (300  $\mu\text{L}$ ) de etanol 100% para que houvesse a precipitação do DNA. Armazenou-se a mistura a  $-20^{\circ}\text{C}$  e, após 1 hora, o microtubo foi centrifugado por 10 minutos e, em seguida, todo o sobrenadante foi descartado, ficando somente o DNA precipitado no tubo. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 70 % gelado para lavagem do DNA, com uma centrifugação a velocidade máxima por 2 minutos. Novamente o sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto na bancada de 5 a 10 minutos para completa secagem do álcool. Após secagem, foram adicionados ao DNA precipitado 17  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 2  $\mu\text{L}$  de Buffer e 1  $\mu\text{L}$  da enzima T4 DNA ligase, misturando para que o DNA se desprendesse da parede do tubo. Após centrifugação em velocidade máxima por 2 minutos, o tubo foi deixado em temperatura ambiente por 16 a 18 horas.

### **3.11.3 Transformação por eletroporação**

Para a realização da transformação, foi utilizada a cepa *E. coli* DH10B como a célula receptora do vetor. Primeiramente, foi feita uma nova reação de purificação e precipitação no tubo contendo a reação de ligação do vetor com o DNA genômico, como descrita anteriormente (item 3.11.2). Após a completa secagem do álcool utilizado para a precipitação do DNA, foi feita uma suspensão com 30  $\mu\text{L}$  de água gelada e o tubo foi deixado no gelo até o momento de uso.

Para tornar a *E. coli* DH10B competente, 2 a 3 colônias de um repique fresco foram inoculadas em 10 mL de caldo LB (Luria-Bertani, Becton, Dickinson) em um tubo Falcom de 50 mL, incubados no agitador a 37°C, 110 rpm, por 4 horas. Após esse período, o tubo contendo o caldo crescido foi centrifugado a 5800 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspendido com 1 mL de água ultrapura gelada, transferindo-se todo o volume para um microtubo. Centrifugou-se o microtubo por 2 minutos a 15700 xg e o sobrenadante foi descartado. A lavagem com 1 mL de água gelada e breve centrifugação foi repetida mais 2 vezes e, após a última lavagem, o precipitado foi ressuspendido com 60 µL de água ultrapura gelada e o microtubo foi mantido no gelo até o momento da eletroporação. Antes da transformação, para cada amostra a ser transformada, 400 µL do caldo SOC (Anexo 2) foram colocados em um microtubo e deixados a 37°C até o momento de uso.

Para a eletroporação, 50 µL da *E. coli* DH10B competente e 20 µL do vetor e DNA genômico ligados foram adicionados a uma cubeta de 1 mm e deixados no gelo por 1 minuto. No eletroporador, foi selecionado o modo “Ec1”, a cubeta foi retirada do gelo, removendo qualquer excesso de gelo ou água da parte externa, e submetida ao pulso elétrico. Após o choque, toda a bactéria foi, rapidamente, transferida para o microtubo contendo o caldo SOC e incubados em termobloco a 37°C por 2 horas.

Durante as 2 horas, foram preparadas as placas contendo o meio de cultura para a seleção e *screening* das colônias recombinantes. A seleção de clones recombinantes foi feita em placas contendo 20 mL do ágar TSA acrescido de 20 µL de cloranfenicol 30 mg/mL (concentração final 30 µg/mL) e 10 µL de gentamicina 100 mg/mL (concentração final 50 µg/mL). Para a distinção de células transformadas recombinantes e não recombinantes foi feito o “Blue-White Screening” com o X-gal (Fermentas). Para isso, em uma placa contendo 20 mL TSA, foram adicionados 20 µL de cloranfenicol 30 mg/mL e 20 µL de X-gal. As placas foram deixadas a temperatura ambiente até o momento de uso.

Após as 2 horas de incubação, 100 µL do caldo SOC crescido foi semeado em cada uma das placas contendo cloranfenicol + gentamicina e cloranfenicol + X-gal e deixadas em estufa 35° ± 2°C por 24 horas. O vetor pBC-SK(-) possui como marcador um gene de resistência ao cloranfenicol. O gene de interesse inserido ao vetor possuía resistência a gentamicina. Assim, colônias crescidas na placa de TSA com cloranfenicol e gentamicina foram consideradas como células recombinantes possuindo o gene de resistência a gentamicina ligado ao vetor. X-gal é um composto cromogênico que serve de substrato para a enzima β-galactosidase que o hidrolisa, mudando sua cor para azul. O vetor pBC-SK(-) possui uma porção do gene *lacZ*, que codifica a β-galactosidase, onde fica o sítio de ligação para o inserto. Se ocorrer a recombinação, a região codificadora do *lacZ* é interrompida e a enzima β-galactosidase não é produzida. No “Blue-White Screening” células recombinantes permanecem com a coloração branca, pois não produzem β-galactosidase para hidrolisar o X-gal do meio, enquanto células não recombinantes possuíam uma coloração azulada, pois, sem o inserto, a região codificadora do *lacZ* não foi interrompida, produzindo a enzima β-galactosidase que hidrolisou o X-gal do meio gerando uma coloração azul das células.

Para o controle de eficiência da reação, foi feita eletroporação em uma cubeta de 0,2 cm, adicionando 1µL do plasmídeo pUC18 a 10 pg/ µL amp<sup>R</sup> e 50 µL da *E. coli* DH10B. Imediatamente, foram adicionados 3 mL do meio SOC à cubeta e, posteriormente, transferido para um tubo falcon, deixando no agitador por 1 hora a 37°C. Após 1 hora, foram adicionados 7 mL do meio SB na cultura e semeou-se 1 µL, 10 µL e 100 µL em uma placa com Agar LB e ampicilina (concentração final 100 µg/mL). As células eram consideradas competentes quando a competência estivesse acima de 1x10<sup>5</sup> colônias/µg de plasmídeo.

### **3.12 Sequenciamento do plasmídeo recombinante**

Para o sequenciamento do vetor plasmidial dos clones recombinantes, primeiro, foi feita a extração de plasmídeo conforme descrito anteriormente (item 3.9). O sequenciamento foi realizado pelo método de *Primer Walking* e, para a realização da primeira reação de sequenciamento, foi escolhida a região promotora T7 e T3 localizado na região de Múltiplos sítios de clonagem (MSC) do vetor. Os sequenciamentos com os primers T3 e T7 foram realizados conforme o item 3.7. Primers de extensão, primers de clonagem e de detecção foram desenhados através do programa Primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). As análises do sequenciamento do plasmídeo e da caracterização do novo gene foram feitas através do BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>), ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) e NEB Cutter (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

### **3.13 Sequenciamento completo e montagem dos plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11**

Para o sequenciamento completo de plasmídeos, foram selecionados os plasmídeos pKp64/11 que carrega o gene *rmtD1*, pKp368/10 que carrega o gene *rmtD2* e pKp84/11 que carrega o gene *rmtG*. Os plasmídeos foram extraídos das cepas 64/11, 368/10 e 84/11 e, então, foi feita a transformação por eletroporação em *E. coli* TOP10. Os plasmídeos das células transformadas foram extraídos com o kit Qiagen plasmid maxi (Qiagen, Valencia, CA). Essa etapa foi realizada em colaboração com o Dr. Yohei Doi, no laboratório da Universidade de Pittsburgh. O sequenciamento foi feito através da plataforma PacBio RS II single-molecule real-time (SMRT) sequencing instrument (Pacific Biosciences, Menlo Park, CA) no Centro de Análises de Genoma de Yale, EUA. O sequenciamento pela plataforma SMRT gera *reads* longas facilitando a montagem de regiões de repetição presente em múltiplas cópias do genoma. Porém, as sequências geradas

por esse sequenciamento são mais propensas a erros, com uma taxa de erro de aproximadamente 11% ([http://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective\\_UnderstandingAccuracySMRTSequencing.pdf](http://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective_UnderstandingAccuracySMRTSequencing.pdf), acesso em 24/10/17). Foi feita a montagem *de novo* dos plasmídeos usando o processo de montagem de genoma hierárquico (HGAP) pelo software SMRT Analysis v2.1 (Pacific Biosciences). O *contig* que representava os plasmídeos de interesse foi circularizado e usado como referência para uma nova montagem através da ferramenta Quiver v1, também disponível no software SMRT Analysis v2.1. Na montagem HGAP é feita uma pré-montagem a partir da sobreposição das *reads* mais longas com a correção de erros dessas sequências longas usando as *reads* mais curtas presentes na mesma biblioteca genômica (Chin et al, 2013). A cobertura do sequenciamento dos plasmídeos foi de 77x para pKp64/11, 126x para pKp368/10 e 2.096x para pKp84/11.

### **3.14 Análise das sequências completas dos plasmídeos pKp64/11 e pKp368/10**

A análise das sequências dos plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11 foi feita sob a orientação do Dr. Yohei Doi. As sequências obtidas após sequenciamento e montagem dos plasmídeos foram recebidas em formato .fasta para as etapas de anotação e análise dos plasmídeos. As anotações das sequências completas dos três plasmídeos foram feitas pela ferramenta online Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST) (<http://rast.nmpdr.org/>) e, posteriormente, foi feita uma curadoria manual de cada CDS contra sequências de proteínas depositadas no BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) e no ISFinder ([www-is.biotoul.fr](http://www-is.biotoul.fr)). A sequência dos três plasmídeos foi, então, analisada pela ferramenta online Resfinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>) para a confirmação da identificação de todos os genes de resistência a antimicrobianos contidos nesses plasmídeos. Foi feita, também, a análise pela ferramenta online

PlasmidFinder (<https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) para a confirmação dos grupos de incompatibilidade de cada um dos plasmídeos. Para o mapeamento e confirmação de um arranjo em *tandem* do ambiente genético do pKp64/11 foi feito PCR Long Range, com os primers RmtD Long Range F (CGA GCT GTT TTA CGT GCT GA) e RmtD Long Range R (TTT CGA AGC GAG CAG TTT TT), desenhados pela ferramenta online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). O software EasyFig v.2.1 foi utilizado para a construção de figuras do ambiente genético de genes de resistência e, também, para a construção de figuras de comparação entre dois ou mais ambientes genéticos. Para a construção da figura representando o plasmídeo completo foi usado o software DNA Plotter, destacando todos os genes de resistência presentes em cada plasmídeo.

## **4 RESULTADOS**

### **4.1 Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos**

A fonte de isolamento das 100 cepas testadas foi, em sua maioria, de urina (n=50), seguida de sangue (n=25), secreção traqueal (n=7), ponta de cateter (n=3), líquido (n=1), aspirado traqueal (n=1), secreção de ferida (n=1) e secreção não informada pelo hospital de origem (n=1). Cinco cepas foram isoladas de swab de vigilância (secreção axilar e retal) e 6 cepas não apresentavam informação sobre a fonte de isolamento.

Os valores da CIM para antimicrobianos testados para as 100 cepas estudadas estão apresentados em anexo 3. A tabela 9 mostra os diferentes perfis de resistência obtidos pela CIM através de tiras de Etest®. Aproximadamente 70% das cepas apresentaram resistência a 8 fármacos (TZ, CT, PM, AT, ERT, IP, MP, PTc) dos 12 fármacos testados para todas as cepas.

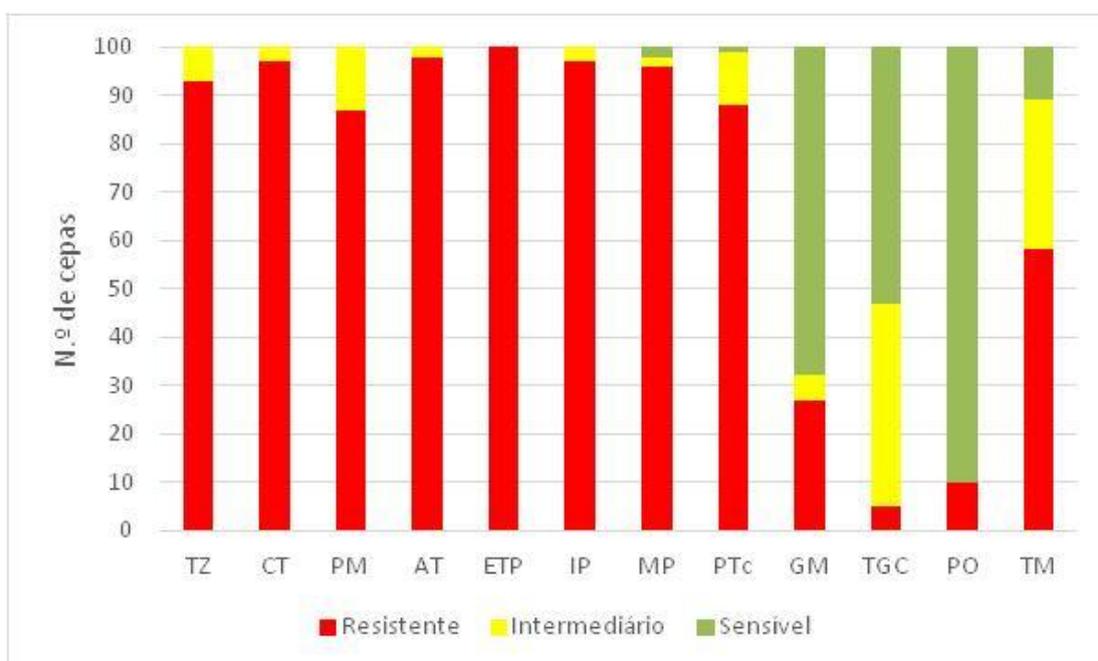
Tabela 9 - Diferentes perfis de resistência, obtidos pela CIM das 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo de 2009 a 2011.

Cepas (n)	Perfil de resistência
24	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub>
18	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , TM
17	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, TM
8	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , PO, TM
4	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM
3	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, TM
2	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub>
2	AT, ETP, IP, MP
2	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , TM
2	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, PO, TM
1	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP
1	CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, TM
1	CT, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , TM
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , TGC, TM
1	TZ, CT, ETP, IP, MP
1	TZ, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, ,MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, TM
1	CT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, TGC
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, PT <sub>c</sub>
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , TGC
1	CT, AT, ETP, IP, MP, PT <sub>c</sub> , GM, TGC, TM
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, PT <sub>c</sub> , TM
1	TZ, CT, AT, ETP, PT <sub>c</sub>
1	CT, AT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, TGC, TM

TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima; PM: cefepime; AT: aztreonam; ETP: ertapenem; IP: imipenem; MP: meropenem; PT<sub>c</sub>: piperaciclina-tazobactam; GM: gentamicina; TGC: tigeciclina; PO: polimixina B; TM: tobramicina

A figura 4 mostra o perfil de sensibilidade dos 12 fármacos testados. As cepas apresentaram resistência em nível elevado para a maioria dos antibióticos testados, sendo que as maiores porcentagens de resistência foram encontradas entre os carbapenêmicos ertapenem (100%), imipenem (97%) e meropenem (96%) as cefalosporinas ceftazidima (93%), cefotaxima (97%), cefepime (87%) e aztreonam (98%). A distribuição dos valores de CIM por ponto de corte das cefalosporinas e dos carbapenêmicos está representada nas figuras 5 e 6. Uma limitação do trabalho foi o uso de tiras Etest® para a determinação da CIM para polimixina B, pois o que é recomendado pelo CLSI e EUCAST são os métodos dilucionais.

Os isolados apresentaram também níveis elevados de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para a maioria dos antimicrobianos, com CIM<sub>50</sub> >256 µg/mL para cefotaxima e aztreonam e ≥ 32 µg/mL para os três carbapenêmicos testados. A CIM<sub>90</sub> para todas as cefalosporinas foi de >256 µg/mL, e >32 µg/mL para ertapenem, imipenem e meropenem. A CIM<sub>50</sub> e a CIM<sub>90</sub> de todos os fármacos testados estão demonstradas na tabela 10.



TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima; PM: cefepime; AT: aztreonam; ETP: ertapenem; IP: imipenem; MP: meropenem; PTc: piperaciclina-tazobactam; GM: gentamicina; TGC: tigeciclina; PO: polimixina B; TM: tobramicina; S: sensível; I: intermediário; R: resistente

Figura 4 - Perfil de sensibilidade dos antibióticos testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo.

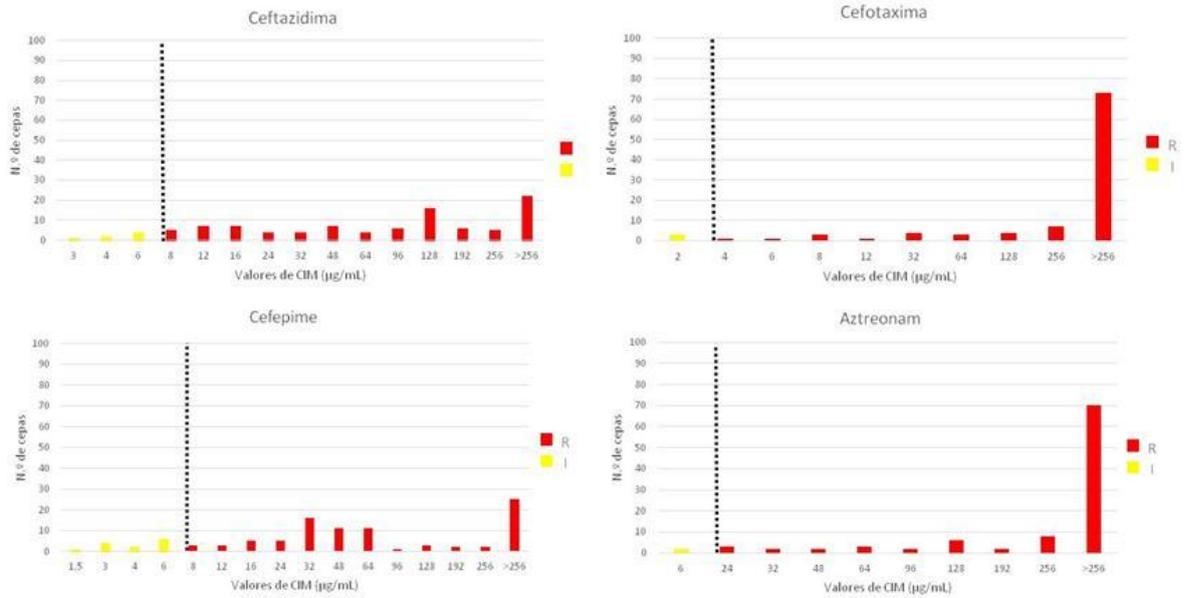


Figura 5 - Distribuição da CIM por ponto de corte das cefalosporinas ceftazidima, cefotaxima, cefepime e do aztreonam testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo.

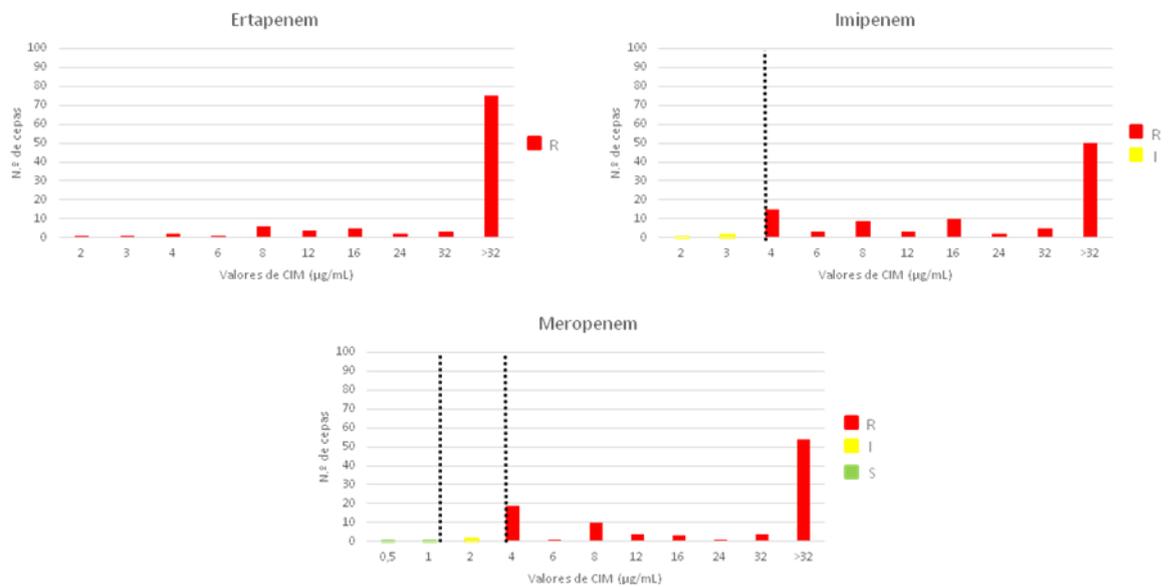


Figura 6 - Distribuição da CIM por ponto de corte dos carbapenêmicos ertapenem, imipenem e meropenem testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo.

Tabela 10 - CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, pontos de corte e atividade dos antibióticos testados para as 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo de 2009 a 2011.

Antimicrobiano	CIM (µg/mL)		Pontos de corte (µg/mL) *			Resultado (%)		
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	S	I	R	S	I	R
Ceftazidima **	96	>256	≤1	2-4	≥8	0	7	93
Cefotaxima *	>256	>256	≤1	2	≥4	0	3	97
Cefepime **	48	>256	≤1	2-4	≥8	0	13	87
Aztreonam **	>256	>256	≤1	2-4	≥8	0	2	98
Ertapenem *	>32	>32	≤0,5	1	≥2	0	0	100
Imipenem *	32	>32	≤1	2	≥4	0	3	97
Meropenem *	>32	>32	≤1	2	≥4	2	2	96
Piperaciclina/tazobactam*	>256	>256	≤16	32-64	≥128	1	11	88
Tigeciclina **	1	3	≤1	2	≥4	53	42	5
Polimixina B **	0,5	2	≤2	-	≥4	90	0	10
Gentamicina *	1,5	>256	≤4	8	≥16	68	5	27
Tobramicina*	16	96	≤4	8	≥16	11	31	58

S: sensível; I: intermediário; R: resistente, \* CLSI, 2013; \*\* EUCAST, de acordo com a NT 01/2013 da Anvisa

#### 4.2 Testes fenotípicos para a produção de betalactamases

O resultado da detecção fenotípica de ESBL e MBL por tiras de Etest® está representado no anexo 3. Das 100 cepas testadas, todas foram positivas para o teste de detecção fenotípico de ESBL por disco aproximação. No entanto, no teste de ESBL por Etest®, 5 cepas deram negativas para a produção de ESBL. Para a detecção fenotípica de MBL por tiras de Etest®, todas as 100 cepas testadas apresentaram-se negativas.

#### 4.3 Detecção fenotípica de metiltransferases 16S rRNA

Cepas produtoras de metiltransferases 16S rRNA possuem resistência em nível elevado para os principais aminoglicosídeos de uso terapêutico: amicacina, gentamicina e tobramicina. A resistência total, com ausência de halo de inibição no disco difusão para esses antimicrobianos é um indicativo de produção dessas metiltransferases. Das 100 cepas

estudadas, 9 apresentaram essa característica no teste de sensibilidade por disco difusão e foram submetidas a CIM para os fármacos amicacina, gentamicina e tobramicina. Todas apresentaram resistência em nível elevado para os 3 aminoglicosídeos, com valores > 256 µg/mL. No teste fenotípico com o aminoglicosídeo arbecacina, 7 cepas apresentaram-se totalmente resistentes indicando possível produção de metiltransferase 16S rRNA.

#### **4.4 Detecção e caracterização de genes de resistência**

A detecção dos genes de resistência aos betalactâmicos das 100 cepas estudadas está representada na figura 7. Em relação a detecção de betalactamases, 80% foram positivas para os genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, 97% para *bla*<sub>SHV</sub> e 26% para *bla*<sub>TEM</sub>. A caracterização a partir do sequenciamento dos genes positivos na PCR revelou que das 26 cepas positivas para o *bla*<sub>TEM</sub>, todas foram determinadas no sequenciamento como TEM-1. Das 97 cepas positivas para *bla*<sub>SHV</sub>, 93 foram positivas para SHV do tipo betalactamase de espectro limitado, sendo 1 cepa positiva para SHV-1, 3 para SHV-110 e 89 cepas positivas para SHV-11. As outras 4 cepas positivas para o *bla*<sub>SHV</sub> foram confirmadas como SHV-12, que é uma enzima do tipo ESBL. Das 80 cepas positivas para *bla*<sub>CTX-M</sub>, 61 foram determinadas como CTX-M-15, 7 como CTX-M-2, 7 como CTX-M-8, 1 como CTX-M-35. Duas cepas foram positivas para CTX-M-2 e CTX-M-15 e duas foram positivas para CTX-M-59 e CTX-M-8. As 100 cepas estudadas tinham sido previamente confirmadas para a presença do *bla*<sub>KPC</sub> e, a partir do sequenciamento, 100% foram caracterizadas como produtoras de KPC-2.

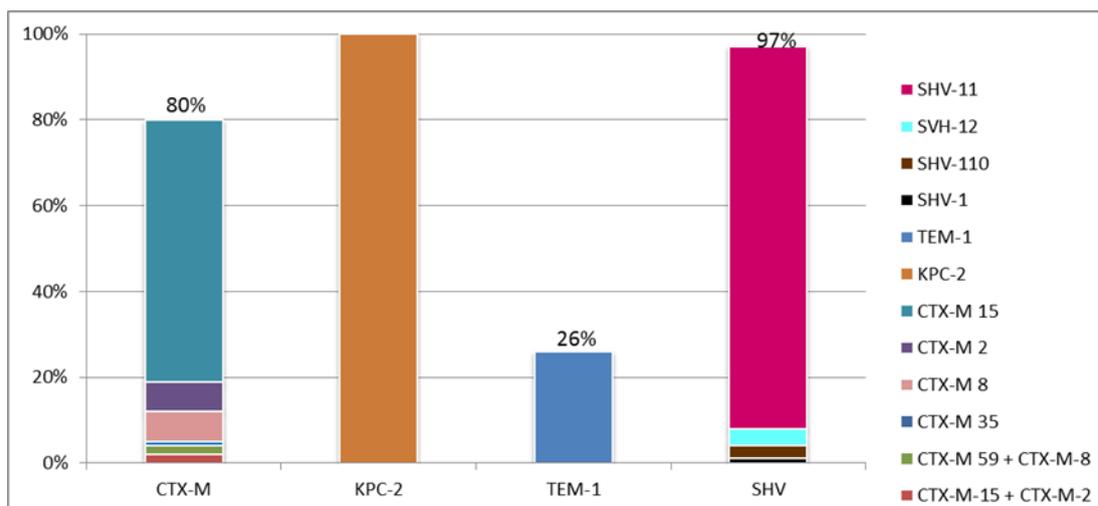


Figura 7- Porcentagem de betalactamases detectadas nas 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no Estado de São Paulo de 2009 a 2011.

As enzimas CTX-M hidrolisam preferencialmente a cefalosporina cefotaxima. Das 80 cepas positivas para essa enzima, 72 (90%) apresentaram resistência em nível elevado (CIM  $\geq$  256  $\mu\text{g/mL}$ ) para a cefotaxima, 3 cepas apresentaram CIM de 128  $\mu\text{g/mL}$ , 2 cepas de 64  $\mu\text{g/mL}$ , 1 cepa de 32  $\mu\text{g/mL}$  e 2 cepas apresentaram CIM de 8  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação aos testes fenotípicos para ESBL, todas as 81 cepas positivas para CTX-M e/ou SHV do tipo ESBL foram positivas no teste de disco aproximação. Das 5 cepas que foram negativas para o teste de ESBL por tiras de Etest® de CT/CTL, nenhuma produzia CTX-M, sendo todas produtoras da betalactamase SHV-11 e uma co-produtora dessa enzima e da betalactamase TEM-1. A figura 8 representa a co-produção de betalactamases das 100 cepas de *K. pneumoniae* estudadas. Nenhuma cepa era produtora apenas da enzima KPC-2. A maioria das amostras (59%) foram co-produtoras de KPC-2, SHV e CTX-M.

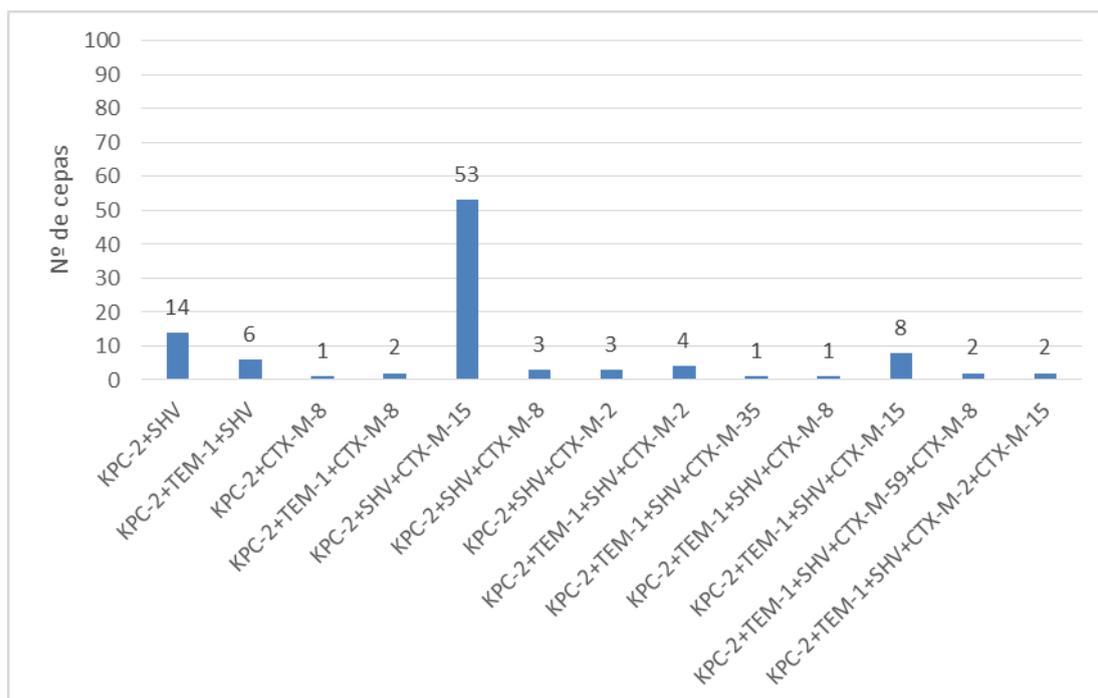


Figura 8 - Frequência dos diferentes perfis de co-produção de betalactamases das 100 cepas de *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas no estado de São Paulo no período de 2009 a 2011.

Em relação aos genes de resistência de metiltransferases 16S rRNA, das 7 cepas que apresentaram resistência em nível elevado (>256 µg/mL) para os aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina e total resistência a arbecacina, 3 foram positivas para o gene *rmtD* no PCR Multiplex. As outras 4 cepas não amplificaram para nenhum dos genes de metiltransferases testados nos dois Multiplex e foram selecionadas para a investigação de produção de uma nova metiltransferase. O sequenciamento das 3 amostras positivas para o gene *rmtD* mostrou que 2 cepas são produtoras de RmtD2 e uma produtora de RmtD1. As cepas produtoras de RmtD2 co-produziam, também, a ESBL CTX-M-8, enquanto a cepa produtora de RmtD1 era co-produtora da ESBL CTX-M-15, apresentando um maior nível de resistência às cefalosporinas. As 3 cepas produtoras da metiltransferase RmtD, apresentaram-se sensíveis apenas a polimixina B e a tigeciclina.

#### 4.5 Identificação de *Klebsiella* spp. para as cepas negativas para *bla*<sub>SHV</sub>

*K. pneumoniae* está relacionada com a presença do gene da betalactamase *bla*<sub>SHV</sub> em seu cromossomo. As cepas 259/09, 492/11 e 672/11 apresentaram-se negativas para os genes *bla*<sub>SHV</sub> e, por essa razão, foi realizada a identificação fenotípica através de uma extensa série bioquímica, identificação genotípica através da presença das betalactamases cromossomais *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>LEN</sub> e *bla*<sub>OKP</sub> e confirmação da identificação a partir do sequenciamento dos genes 16S rRNA e *rpoB*. O resultado das provas bioquímicas está representado no anexo 5. A produção de ácido a partir do adonitol e da sorbose e a utilização do ácido tricarbálico como única fonte de carbono podem ser considerados características diferenciais para a identificação de espécies de *Klebsiella* spp. (Brisse et al, 2014). A cepa 259/09 apresentou-se negativa para a fermentação do adonitol, positiva para a fermentação da sorbose e positiva para a utilização do ácido tricarbálico, enquanto que as cepas 492/11 e 672/11 apresentaram-se positivas para a fermentação do adonitol, negativas para a fermentação da sorbose e positivas para utilização do ácido tricarbálico.

A identificação a partir da detecção das betalactamases cromossomais SHV, LEN e OKP pela PCR Multiplex mostrou que as cepas 492/11 e 672/11 eram positivas para *bla*<sub>OKP</sub>, sendo consideradas, então, *K. quasipneumoniae*. A cepa 259/09 foi positiva para *bla*<sub>LEN</sub>, sendo considerada *K. variicola*. A *K. pneumoniae* ATCC 700603 apresentou-se positiva para os genes *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. A figura 9 mostra o resultado da PCR multiplex para os genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>LEN</sub> e *bla*<sub>OKP</sub>.

Em relação a identificação genotípica através do sequenciamento do gene do 16S rRNA e *rpoB*, a cepa 259/09 mostrou 100% de identidade das regiões sequenciadas com ambas as sequências de 16S rRNA e *rpoB* de *K. variicola*, enquanto que as cepas 492/11 e 672/11 apresentaram 100% de identidade das regiões sequenciadas com as sequências dos genes de 16S rRNA e *rpoB* de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. O

alinhamento das sequências do gene de 16S rRNA e do *rpoB* das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as sequências dos mesmos genes das cepas de referência para *K. variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* estão representados nos anexos 6 ao 9. As figuras 10 e 11 representam a árvore filogenética e o dendrograma baseados nos alinhamentos das sequências do gene 16S rRNA e do *rpoB*, respectivamente, das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as cepas de referência para *K. variicola*, *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*.

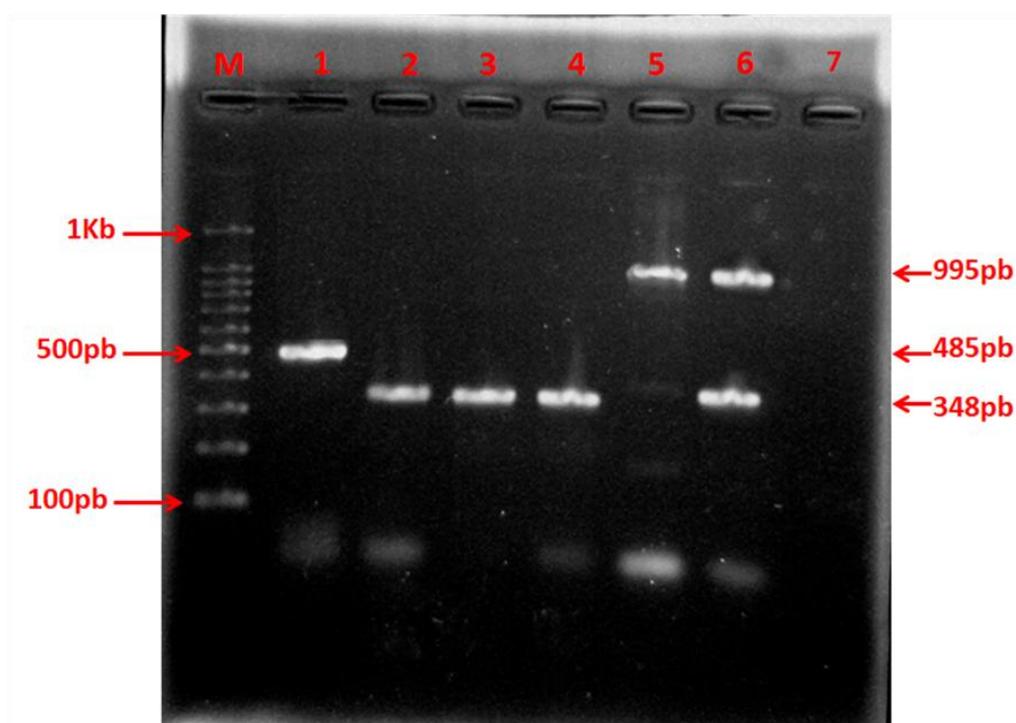


Figura 9 - PCR Multiplex para identificação de espécies de *Klebsiella* (Fonseca et al., 2017). M: Marcador de 100pb (Sinapse); linha1: Kp259/09; linha 2: Kp492/11; linha 3: Kp672/11; linha 4: controle positivo *bla*<sub>OKP</sub>; linha 5: controle positivo *bla*<sub>SHV</sub>; linha 6: *K. pneumoniae* ATCC 700603; linha 7: controle negativo da reação.

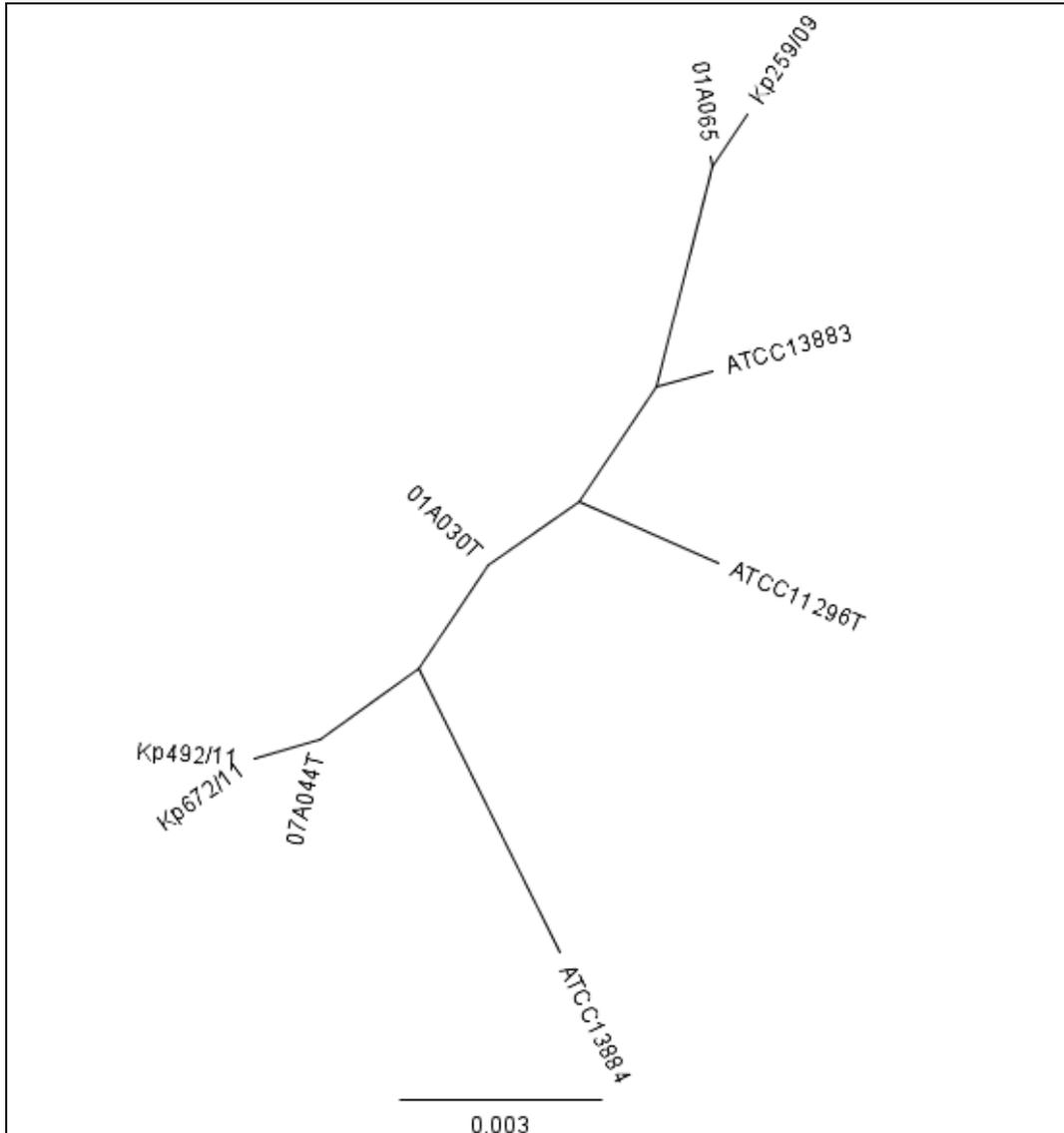


Figura 10 – Árvore filogenética baseada no alinhamento das sequências do gene 16S rRNA das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as cepas de referência para *K. variicola* (01A065), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (07A044T), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (01A030T), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC13883), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (ATCC11296T) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ATCC13884), construída usando o método de Neighbor-joining baseada na matrix de distância Jukes-Cantor.

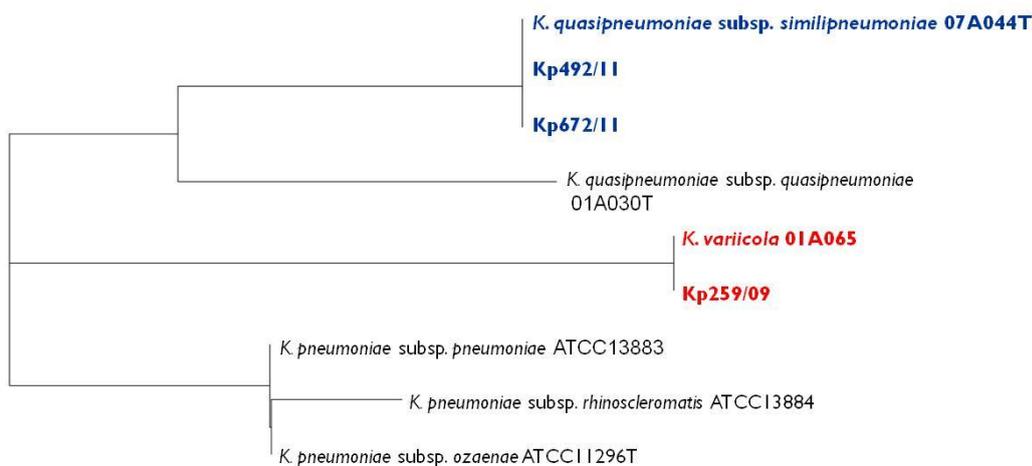


Figura 11 – Dendrograma baseado no alinhamento das sequências do gene 16S rRNA das cepas 259/09, 492/11 e 672/11 com as cepas de referência para *K. variicola* (01A065), *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (07A044T), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (01A030T), *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (ATCC13883), *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (ATCC11296T) e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (ATCC13884), construída usando o método de Neighbor-joining baseada na matrix de distância Jukes-Cantor.

#### 4.6 Caracterização de novo gene de metiltransferase 16S rRNA

Para as 4 cepas suspeitas de produzirem uma metiltransferase 16S rRNA, e que não foram positivas para nenhum gene de metiltransferase testado por PCR, foram feitos experimentos de clonagem com a construção de três bibliotecas genômicas com as enzimas de restrição Apal, EcoRI e HindIII. A biblioteca genômica feita a partir do DNA da cepa 350/10 digerido com a enzima de restrição HindIII apresentou 9 colônias recombinantes selecionadas em placa de TSA contendo cloranfenicol e gentamicina. A partir do sequenciamento, com os *primers* T3 e T7, do plasmídeo recombinante contendo a região de interesse foi possível desenhar mais 2 pares de primers de extensão descritos na tabela 11.

A amostra 350/10 não fazia parte do nosso banco de dados por não

ser produtora da enzima KPC, mas, assim como as 4 cepas utilizadas neste estudo, essa cepa possuía o mesmo gene codificador da nova metiltransferase, posteriormente confirmado por PCR e sequenciamento.

Tabela 11 - Primers de extensão, clonagem e detecção desenhados para a caracterização da nova metiltransferase 16S rRNA.

Primer	Sequência (5'→3')
<b>Extensão</b>	
RmtG-T3-F1	TTA CGC GAT GGA CGA TAA GC
RmtG-T7-F1	ACA CGG CAT CTG TTT CTT CC
RmtG-T3-F2	GGA AGA AAC AGA TGC CGT GT
RmtG-T7-F2	GCC ATT TTC AAA ACG TCC AT
<b>Clonagem</b>	
RmtG-F-XbaI	GCTCTAGAATGCGTGATCCGTTGTTT
RmtG-R-BamHI	GCGGATCCTCATTTCAGATTCCCGATG
<b>Detecção</b>	
RmtG-F	AAA TAC CGC GAT GTG TGT CC
RmtG-R	ACA CGG CAT CTG TTT CTT CC

A sequência completa do inserto foi confirmada após o sequenciamento com o segundo par de *primers* de extensão (T3-F2 e T7-F2). Um *contig* da sequência obtida pelos primers T3 e T7 com as 2 sequências geradas pelos 2 pares de primers de extensão gerou uma sequência de aproximadamente 1.9 kb. A partir da análise da sequência completa pelo site NEB cutter v 1.0 foi possível detectar as 2 pontas contendo a enzima de restrição Hind III que flanqueiam o inserto (figura 12). Com essa ferramenta, foi possível obter a exata sequência do inserto, com 1.6 kb, que foi ligada ao vetor na construção da biblioteca genômica, representada na figura 13.

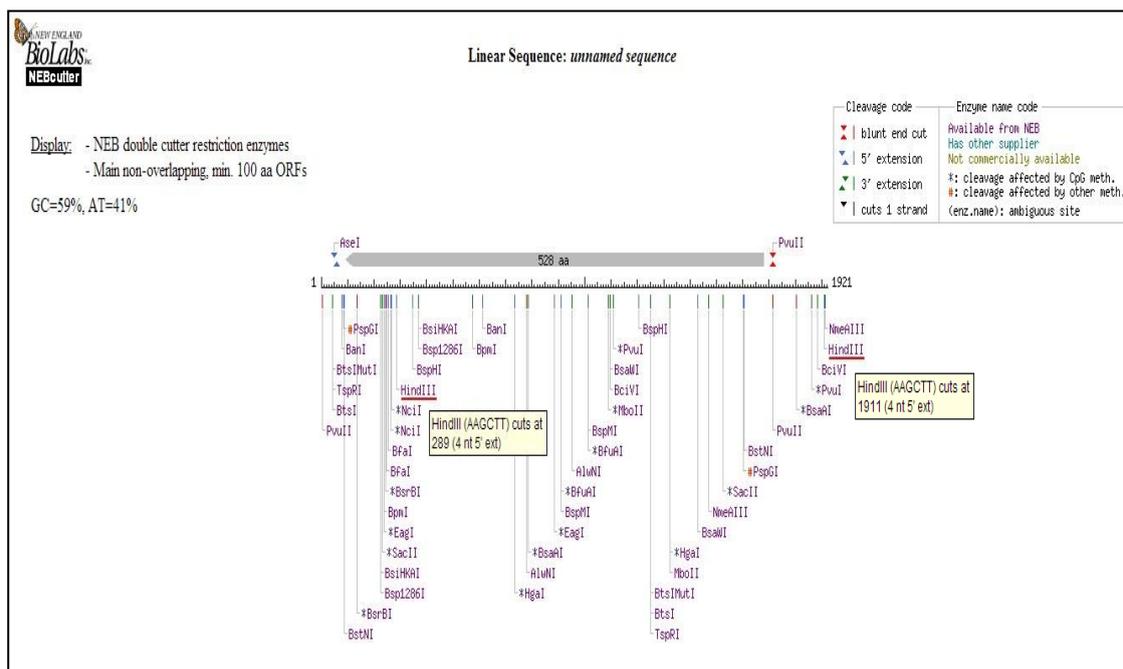


Figura 12 - Análise dos sítios de restrição da sequência do inserto de 1.9 kb gerada a partir do contig da sequência com T3 e T7 e os 2 pares de primers de extensão. A análise foi feita a partir da ferramenta NEB cutter v1.0 (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>)

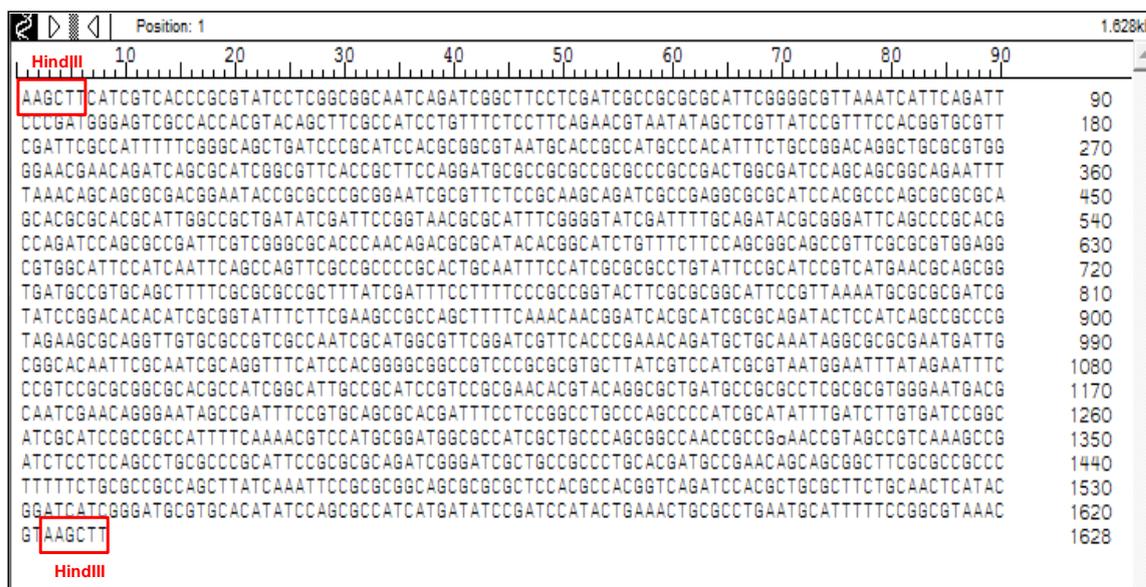


Figura 13 - Sequência completa do inserto de 1.6 kb flanqueadas nas duas extremidades pela enzima HindIII.

A sequência reversa e complementar da sequência completa do inserto foi obtida e, após análise no site ORF finder, observou-se a existência de 2 ORFs (Open Reading Frames) representadas na figura 14. A primeira ORF corresponde a uma sequência de 252 aminoácidos com 76% de identidade com uma suposta tRNA ribosiltransferase. A segunda ORF se sobrepõe com a primeira em 8 aminoácidos e corresponde a uma sequência de 264 pb que mostrou 58% e 57% de semelhança com RmtD1 e RmtD2 respectivamente, 36% com RmtA, RmtB2 e RmtF, 35% com RmtB1, 29% com RmtE, 23% com RmtC e 22% com ArmA (figura 15). Essa ORF codificava uma nova metiltransferase 16S rRNA que foi denominada RmtG. A nova sequência identificada foi depositada no GenBank com o número de acesso JX486113. A figura 16 representa o dendrograma das metiltransferases já descritas em relação a nova metiltransferase RmtG.

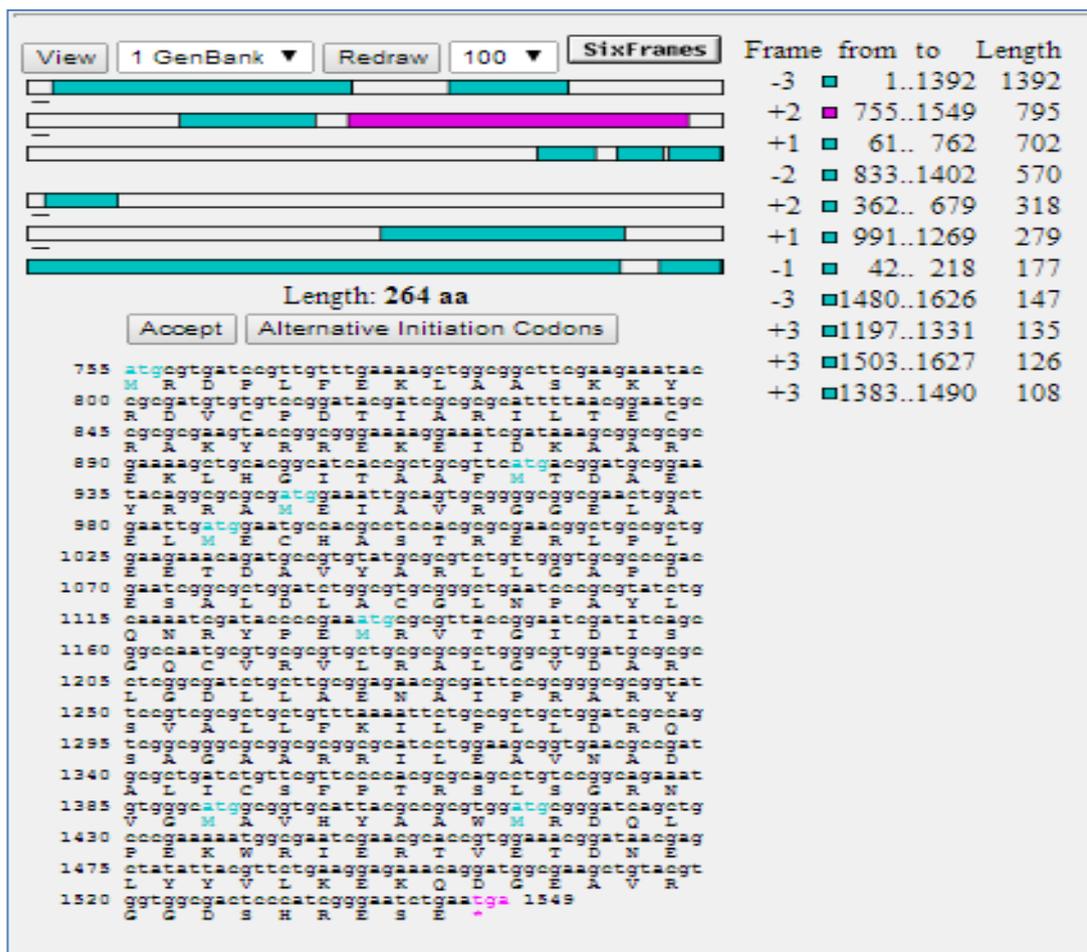


Figura 14 – Análise pela ferramenta ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) da sequência completa do inserto contendo uma sequência de 252 aminoácidos de uma tRNA ribosiltransferase e uma sequência 264 aminoácidos referente a nova metiltransferase RmtG.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

ArmA      ----MDKNDVVKKILSKKYENLDSQIVEKVVSISEKKYK-LKEVENYSKKLKHQIWGS
RmtC      MKTNDNYIEEVTAKVLTSGKYSTLYPPTVRRVTERLFDRIYP-PKQLEKEVRRKLLHQAYGA
RmtE      ----MNIDEMVAEVLSSKKYTSVDPVAVRRVCMETAPKYPKKKEAIKAVKNELHIIHEV
RmtH      ----MTIEQAAADILSSKKYQLLCPDVTVRRILTQEWGRHKPKQAVERTRELRHGICGA
RmtA      ----MSFDDALASILSSKKYRSLCPDVTVRRILDQEWGRHKSPKLAVEATRRLHGICGA
RmtB1     ----MNINDALTSILASKKYRALCPDVTVRRILTEEWGRHKSPKQVAAARTRLHGICGA
RmtB2     ----MNINDALTSILASKKYRALCPDVTVRRILTEEWGRHKSPKQAVEAARTRLHGICGA
RmtF      ---MDERAQAALDALLSAKNLRDVCPETVRRVFMELLPRYRKPDAEKAARTHLHQITGA
RmtG      ----MRDPLFEKLAASKYRDVCPDIIARILTECRACYRREKEIDKAAREKLGHTAA
RmtD1     ----MSELKEKLLASKKYRDVCPDIIERINRECSAKFKKEKDADKAAREALHGVGTGA
RmtD2     ----MSELKEKLLASKKYRDVCPDIIERINRECSAKFKKEKDADKAAREALHGVGTGA
          .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .   .
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

ArmA      YYSAYP--NWDKLLKKYNQGG-----LSTIEDLLKHSSTNERVATLN--D
RmtC      YIGGIDGKRLEKKIEKIIEHPNPTTDEATRTEWEKEICLKIINLHTSTNERVAYD--E
RmtE      FLQNECYKNALSFLSQLSLDF-----NNAQLDITMQIMQSHTSTKERLGDIE--A
RmtH      YLAPQVEKQASTALAA-----GDVQKALALHASTRERLDTYP--Q
RmtA      YVTPESLKAAAAALSV-----GDVQKALSLHASTKERLAELD--C
RmtB1     YVTPESLKAAAAALSA-----GDVKKALSLHASTKERLAELD--T
RmtB2     YVTPESLKAAAAALSA-----GDVKKALSLHASTKERLAELD--T
RmtF      FMTADAQKKARALLARWNEG-----E-----SALAAALSLHASTRERLPGAD--E
RmtG      FMTDAEYRRAMEIAVR-----G-----GELAELEMECHASTRERLPLEETDA
RmtD1     FMTEREYKRAMEMAAA-----RDWEALLGMHASTRERLPPVESMDR
RmtD2     FMTEREYKRAMELAAT-----RDWEALLGMHASTRERLPPVESMDR
          :                                     :   :   :   :   :   :   :
          :                                     :   :   :   :   :   :   :

ArmA      FYTYVFGNIKHVSSILDGCGFNPLALYQWNEK-IYHAYDIDRAEIAFLSSIGKLLK
RmtC      LYQKIEFVTGVPSTITDAGCALNPFSPFFFEAGMLGGQYIGFDLDKGMTIEATHSRLTN
RmtE      VCSFLSTHISKEGVSMDIGCGFNPFALPLLH--EFPATYYAYDICEGGINLKYFSILK
RmtH      LYQFVFE--NNLPARVLDIACGLNPLMLHRQ---GV-ASVWGCETHQGLGNVLTTPYA-QKH
RmtA      LYDFIFS--GGVPHRVLDIACGLNPLALFIR---DI-TSVWACDIHQGLGDVITPFA-HHQ
RmtB1     LYDFIFS--AETPRRVLDIACGLNPLALYER---GI-ASVWGCETHQGLGDVITPFA-REK
RmtB2     LYDFIFS--AETPRRVLDIACGLNPLALYER---GV-ASVWGCETHQGLGDVITPFA-REK
RmtF      WMRRVSPFLGADARVLDLACGLNPILLGSM---GV-TNALGMDIHLGCVRLVNETA-RAR
RmtG      VYARLLGAPD--ESALDLACGLNPAYLQNRV--PE-MRVTGDISGGQCVRLRALG---
RmtD1     VFDQLFEASGTPARILDACGLNPVYLAHRL--PN-AAITGVDTISGGQCVNVRAFG-G--
RmtD2     VFDQLFEAITPARILDACGLNPVYLAHRL--PN-AAITGVDTISGGQCVNVRAFG-G--
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

ArmA      TT--IKYRFLNKEESD--VYKGYDVVFLKMLPVLKQDQV-NILDFLQLFHTQNFVISFP
RmtC      APEGIVVKQGDILSD--PSGESDLLMFKLYTLDRQEEASGLKILQEWKYKNAVISFP
RmtE      -KGEYRAELLDAVSV--TPKEKVDVALLFKLLPLLQQQKGRGFSILEELDFDKAIVSFP
RmtH      -GWDFTFALHDVLC--PVAASGDMALVFKLLPLLEREQPGAALALLRTLDPVIVSFP
RmtA      -GLDFTFALQDVMCT--PPTETGDLALVFKLLPLLEREQAGAMALLQALATPRAVSVFP
RmtB1     -DWDFTFALQDVLCA--PPAEGDLALIFKLLPLLEREQAGSAMALLQSLNTPRMAVSVFP
RmtB2     -DWDFTFALQDVLCA--PPAETGDLALIFKLLPLLEREQAGSAMALLQSLNTPRMAVSVFP
RmtF      -GWHTRARACDLLE--IPAEEADAALLMKLLPVLEAQTGRAEALLASLRAPRLVVTFF
RmtG      ---VDARLDGLLAENAIPTPRARYSVALLFKILPDRQSGAARRILEAVNADALIC5FP
RmtD1     ---AEARLDGLLCE--IPEDEANAALLFKVLPPLLERQAGAAAMDALMRVNAEWIVASFP
RmtD2     ---AEARLDGLLCE--IPEDEADAALMFKVLPPLLERQRTGAAMEALMRVNAEWIVASFP
          :   .   .   .   .   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :

ArmA      IKSLSGKEKGMENYQLWFESFT-KGWIKILDSKVIQNELVYITSGFQK-----
RmtC      IKTISGRDVGMEENYVKFENDLVGSDLRIMQKLLKGNEMFYIVSRL-----
RmtE      IKSLGGKQKMETFYSNLFEENL-PSSLEIEKQTFSEMFYVIQNKTKNGGNQS-----
RmtH      TRSLGGRGKGMHQHYATWFEGLV-APHFTVQHHTLIGDELLYRIQPNPA-----
RmtA      TRSLGGRGKGMENYSAWFEGL-PDEFIEEDTKTIGIELVYMIKRK-----
RmtB1     TRSLGGRGKGMENYAAWFEGL-PAEFEIEDKKTIGTELYLIKNG-----
RmtB2     TRSLGGRGKGMENYAAWFEGL-PTEFEIEDKKTIGTELYLIKNG-----
RmtF      TRTLGGRVGMKHYADWFERIL-PDLSVDRDFTVSDLVYLVERT-----
RmtG      TRSLGGRVGMKHYAANMRDQL-PEKWRERTVETDNELYVLEKEQDGEAVRGGDSHR
RmtD1     TRSLGGRVGMKHYENMEAHV-PENRATAARLTGENELFYVLRK-----
RmtD2     TRSLGGRVGMKHYENMEAHV-PENRATAARLTGENELFYVLRK-----
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
          :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :   :
  
```

Figura 15 - Alinhamento das seqüências de aminoácido das metiltransferases ArmA (AAP50754), RmtA (BAD12551), RmtB1 (BAC81971), RmtB2 (JN968578), RmtC (BAE48305), RmtD1 (ABJ53409), RmtD2 (ADW66545), RmtE (ADA63498), RmtF (AFJ11385) e RmtH (AGH19769) com a nova metiltransferase RmtG, feito com Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

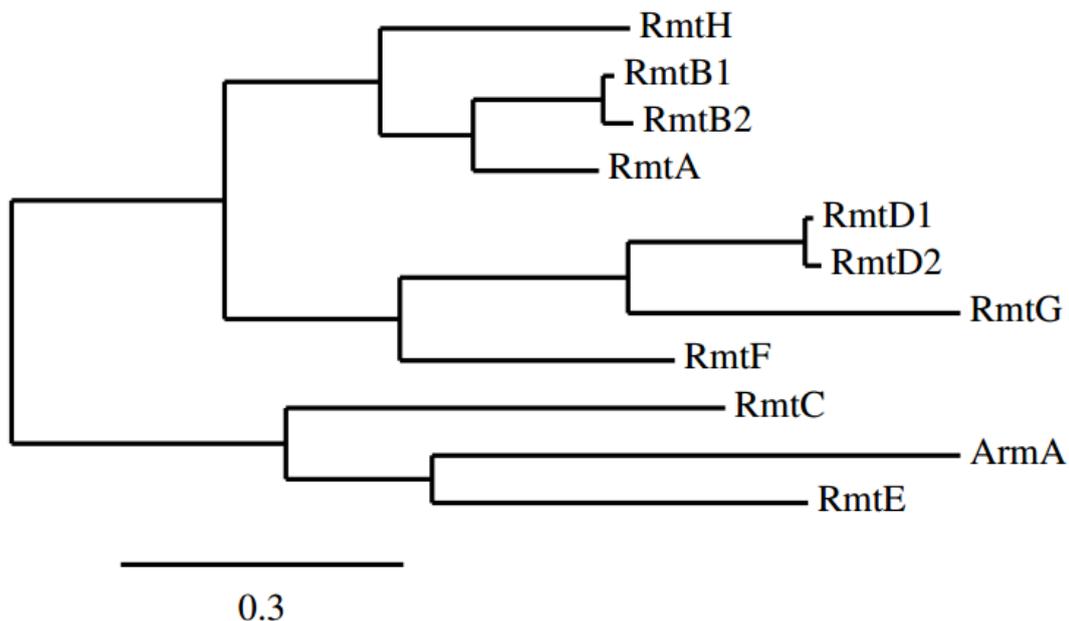


Figura 16 - Dendrograma das metiltransferases ArmA, RmtA, RmtB1, RmtB2, RmtC, RmtD1, RmtD2, RmtE, RmtF e RmtG, gerado a partir de ferramentas disponíveis em <http://www.phylogeny.fr> (Dereeper et al, 2008).

A PCR e o sequenciamento realizado com o par de *primers* de detecção para a RmtG (Tabela 11) mostrou que as outras 3 cepas negativas para as metiltransferases testadas foram positivas para *rmtG* com seqüências de nucleotídeos idênticas à seqüência originalmente identificada como *rmtG*. Com os primers de clonagem desenhados, foi possível amplificar o gene estrutural da *rmtG*. O produto amplificado foi digerido com as enzimas de restrição XbaI e BamHI e ligado ao vetor pBC-SK (-), utilizando-o para transformação com *E. coli* DH10B. As células recombinantes foram utilizadas para a realização do CIM dos aminoglicosídeos gentamicina, tobramicina, amicacina, arbecacina, neomicina e apramicina. Foi observado uma resistência em nível elevado para os aminoglicosídeos 4,6-DOS mas não aos 4,5- DOS, sugerindo que a RmtG é uma metiltransferase do grupo N7 G1405 (Tabela 12). A co-produção da betalactamase TEM-1 e da ESBL CTX-M foi observada nas 4

cepas produtoras de RmtG, sendo 2 cepas produtoras de CTX-M-59, 1 cepa produtora de CTX-M-2 e 1 cepa produtora de CTM-M-15 (Tabela 12).

Tabela 12 - Valores da CIM dos aminoglicosídeos e betalactâmicos e co-produção de betalactamases das cepas de *Klebsiella* spp. e *E. coli* DH10B produtoras de RmtG.

Cepa	Hospital	CIM (µg/mL)												Metiltransferase 16s rRNA	Co-produção β-lactamase
		GM	TM	AK	ABK	NEO	APR	TZ	CT	PM	ETP	MP	IP		
84/11	50	>256	>256	>256	>256	16	2	>256	>256	32	>32	>32	16	<i>rmtG</i>	KPC-2, CTX-M-59, TEM-1, SHV-110
145/11	47	>256	>256	>256	>256	16	4	32	32	12	>32	32	>32	<i>rmtG</i>	KPC-2, CTX-M-59, CTX-M-8, TEM-1, SHV-11
922/11	38	>256	>256	>256	>256	16	8	128	>256	>256	>32	>32	>32	<i>rmtG</i>	KPC-2, CTX-M-2, TEM-1, SHV-12
1194/11	20	>256	>256	>256	>256	16	4	>256	>256	48	8	4	8	<i>rmtG</i>	KPC-2, CTX-M-15, TEM-1, SHV-11
<i>E. coli</i> DH10B ( <i>rmtG</i> )	-	>256	>256	>256	>256	2	4	-	-	-	-	-	-	<i>rmtG</i>	-
<i>E. coli</i> DH10B [pBC-SK(-)]	-	1	0,5	2	1	2	8	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> DH10B	-	1	1	2	1	4	4	-	-	-	-	-	-	-	-

GM: gentamicina; TM: tobramicina; AK: amicacina; ABK: arbecacina; NEO: neomicina; APR: apramicina; TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima; PM: cefepime; ETP: ertpenem; MP: meropenem; IP: imipenem;

#### 4.7 Sequenciamento completo dos plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11 que carregam os genes *rmtD1*, *rmtD2* e *rmtG*, respectivamente

O plasmídeo pKp64/11 que carrega o gene da metiltransferase 16S rRNA *rmtD1* possui 78.828 pb com 114 *Open Reading frames* (ORFs), pertencendo ao grupo de incompatibilidade IncL/M com um conteúdo GC de 53,6%. A região de *core* deste plasmídeo é composta pelo gene *repA*, que codifica a proteína de iniciação da replicação para o IncL/M, 14 genes *tra* (*traJKLMNOPQRUWXY*), 4 genes *trb* (*trbCBAN*) e os genes *tir*, *mobABC* e *excA* que formam a região de transferência. Também possui os genes *klcA*, *ssb*, *parB*, *pemIK* e *relB* envolvidos na estabilidade do plasmídeo durante a conjugação. pKp64/11 codifica o gene de resistência a betalactamase *bla*<sub>TEM</sub>.

<sup>1b</sup>, o gene de resistência a sulfonamida *sul1*, o gene de resistência a trimetropim *dfrA22* e o gene da metiltransferase 16S rRNA *rmtD1*, que confere resistência aos aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina (Figura 17). O *bla*<sub>TEM-1b</sub> está inserido em um transposon Tn3, os genes *sul1* e *dfrA22* estão localizados em um integron de classe 1, flanqueados por duas cópias da sequência de inserção IS26. O *rmtD1*, juntamente com os genes *groEL* e *tgt* estão flanqueados por duas cópias da IS26. *rmtD1-tgt-groEL* estão duplicados em *tandem* com uma única IS26 entre as regiões repetidas. Esse arranjo foi confirmado por mapeamento por PCR Long Range.

O plasmídeo pKp368/10 contendo o gene da metiltransferase 16S rRNA *rmtD2* tem 170.244 pb e possui 214 genes, pertencendo ao grupo de incompatibilidade IncA/C e com um conteúdo GC de 55,3%. pKp368/10 possui uma região *core* composta pelo gene *repA* e região de transferência contendo 3 genes *tra* (*traFGH*), 9 genes *trb* (*trbBCDEFGIJL*) e o gene *tir*. Este plasmídeo também carrega os genes *parAB*, *pemIK*, *resD* e *stbA*, envolvidos na sua estabilidade. pKp368/10 codifica o gene de resistência *cat*, que confere resistência a cloranfenicol, o gene da metiltransferase 16S rRNA *rmtD2*, *sul1*, *ant(3'')-Ia* que é uma nucleotidiltransferase que confere resistência a espectinomicina e estreptomicina, o gene da N-acetiltransferase *aac(6')-Ib* que confere resistência a amicacina e gentamicina e *bla*<sub>CTX-M-8</sub> que codifica uma ESBL (Figura 18). O gene *cat* está flanqueado pelas sequências de inserção IS1 e IS4321R, e o arranjo *rmtD2-tgt-ΔgroEL* está flanqueado por duas cópias de ISCR3. Os genes *aac(6')-Ib*, *ant(3'')-Ia* e *sul1* compõem um integron de classe 1, porém o gene *int1*, que compõe esse integron, está faltando devido a inserção do transposon Tn3. Todos estes genes são carregados pelo Tn3. O *bla*<sub>CTX-M-8</sub> está flanqueado por duas cópias da IS26.

O plasmídeo pKp84/11 contendo o gene da metiltransferase 16S rRNA *rmtG* possui 209.419 pb com 260 ORFs e conteúdo GC de 47,3%. A região *core* do pKp84/11 é composta pelo gene *repA*, que codifica a proteína de iniciação da replicação para o IncHI1B. Contém, também, uma região de

transferência composta por 14 genes *tra* (*traBCDEFGHIJKLNUW*), 2 genes *trb* (*trbCl*) e os genes *trhOZV*. Esse plasmídeo também carrega os operons *stbDE* e *parAB* envolvidos na estabilidade dos plasmídeos durante a conjugação. Este plasmídeo contém os genes de resistência *dfrA15*, que confere resistência ao trimetoprim; *cmIA1* que confere resistência ao cloranfenicol; o gene *aadA2* que codifica uma adeniltransferase que gera resistência aos aminoglicosídeos espectinomicina e estreptomicina, e os genes *bla<sub>CTX-M-59</sub>*, *sul1*, *sul2* e *rmtG* (Figura 19). pKp84/11 possui um arranjo de genes de resistência composto por um complexo integron de classe 1-*ISCR1* associado a uma *IS26* que carrega os cassetes genéticos *dfrA15*, *cmIA1*, *aadA2*, o gene de resistência ao brometo de etídio, truncado *qacEΔ1* e o gene *sul1*, os genes *bla<sub>CTX-M-59</sub>*, uma segunda cópia intacta do *qacE*, e uma segunda cópia do *sul1* e composto, também, pela região contendo os genes *rmtG* e *sul2*, flanqueados por duas cópias de *ISCR2* (segunda cópia truncada), os quais estão delimitados por duas cópias da *IS26*. Todo esse arranjo de genes de resistência está sendo carregado por um transposon Tn21 que também carrega genes envolvidos em um operon de resistência ao mercúrio (*merEDACTR*).

Comparando o ambiente genético da *rmtD1* do plasmídeo pKp64/11 com a sequência previamente descrita de *K. pneumoniae* R2 (EU269034), os genes *rmtD1*, *tgt* e *groEL* estão localizados *upstream* de um integron de classe 1 que contém o cassete genético de resistência ao trimetoprim *dfrA22*, flanqueados por duas cópias da *IS26*, em ambos os plasmídeos. Porém, *K. pneumoniae* R2 possui, ainda, uma associação com uma *ISCR14*, que não é observada no pKp64/11 (Figura 20).

O ambiente genético do gene *rmtD2* do pKp368/10 em comparação com a sequência descrita de *Enterobacter aerogenes* Q4079 (HQ401565) mostra que ambos os plasmídeos possuem *rmtD2*, *tgt* e  $\Delta$ *groEL* flanqueados pelos elementos *ISCR3* e *ISCR14*, respectivamente. Porém, diferente de *E. aerogenes* Q4079, onde *ISCR3/14* está inserida em um transposon Tn21-like, no pKp368/10 carrega esse elemento em um Tn3. (Figura 20)

A comparação do ambiente genético da *rmtG* do plasmídeo pKp84/11

com o plasmídeo pKp13f, previamente descrito em uma *K. pneumoniae* isolada no Brasil (NZ\_CP004000) e o plasmídeo pK190R1 de uma *K. pneumoniae* isolada em Miami (KX029331), mostra que os três plasmídeos carregam *rmtG*, *tgt* e *rsmH* flanqueados por duas cópias de ISCR2, com umas dessas cópias truncada (Figura 21).

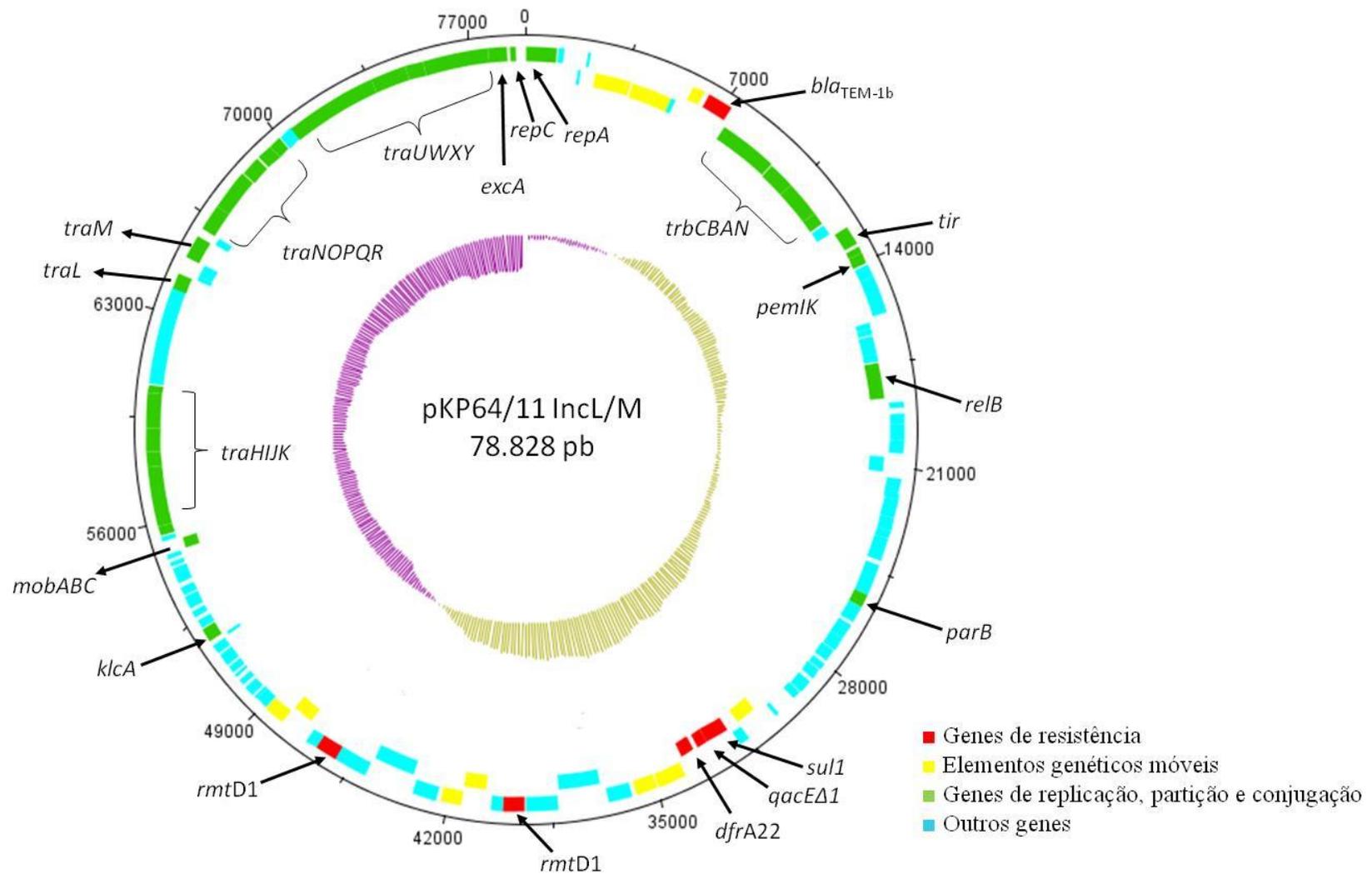


Figura 17 - Estrutura do plasmídeo IncL/M pKp64/11 que carrega o gene *rmtD1*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.

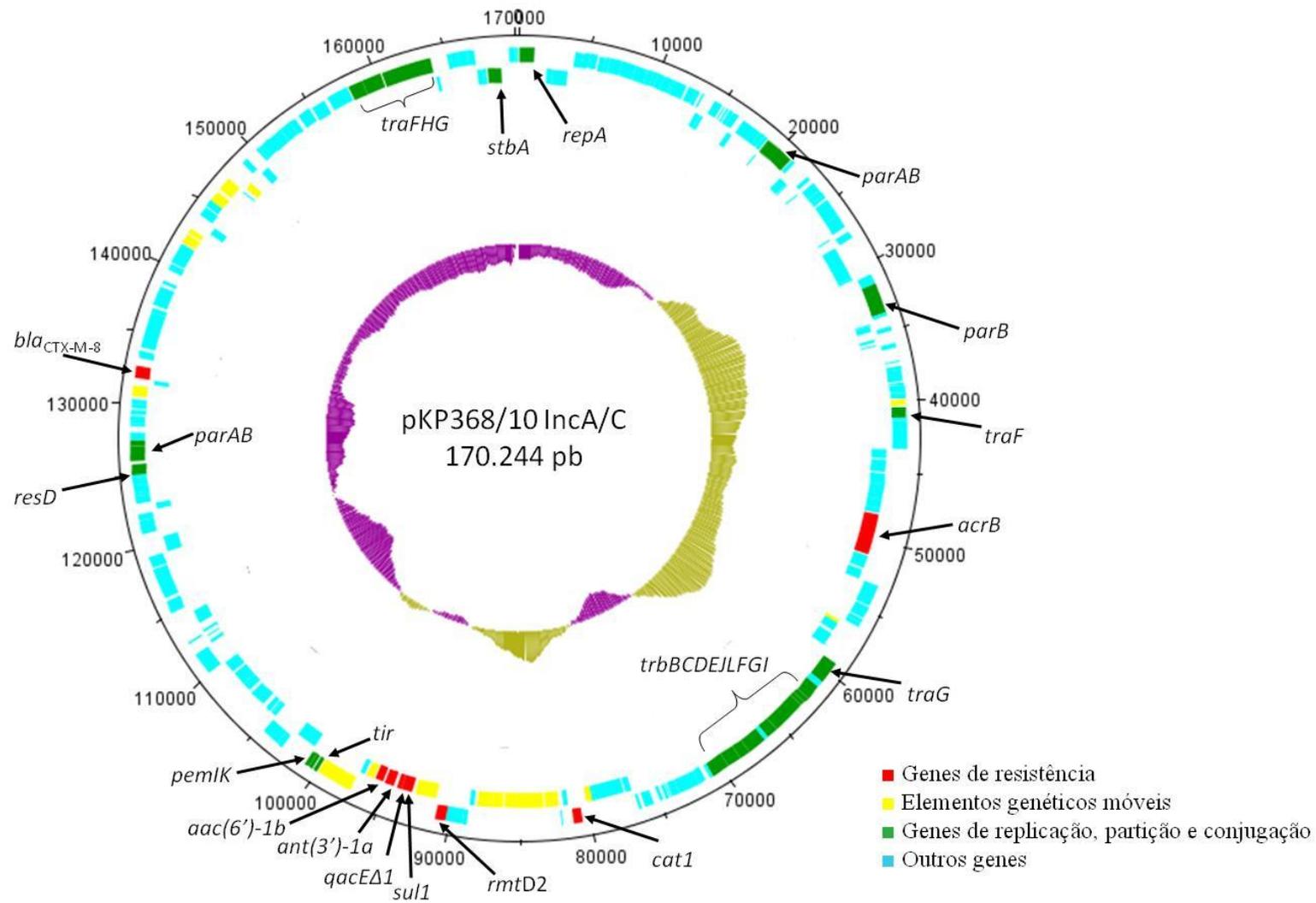


Figura 18 - Estrutura do plasmídeo IncA/C pKp368/10 que carrega o gene *rmtD2*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.

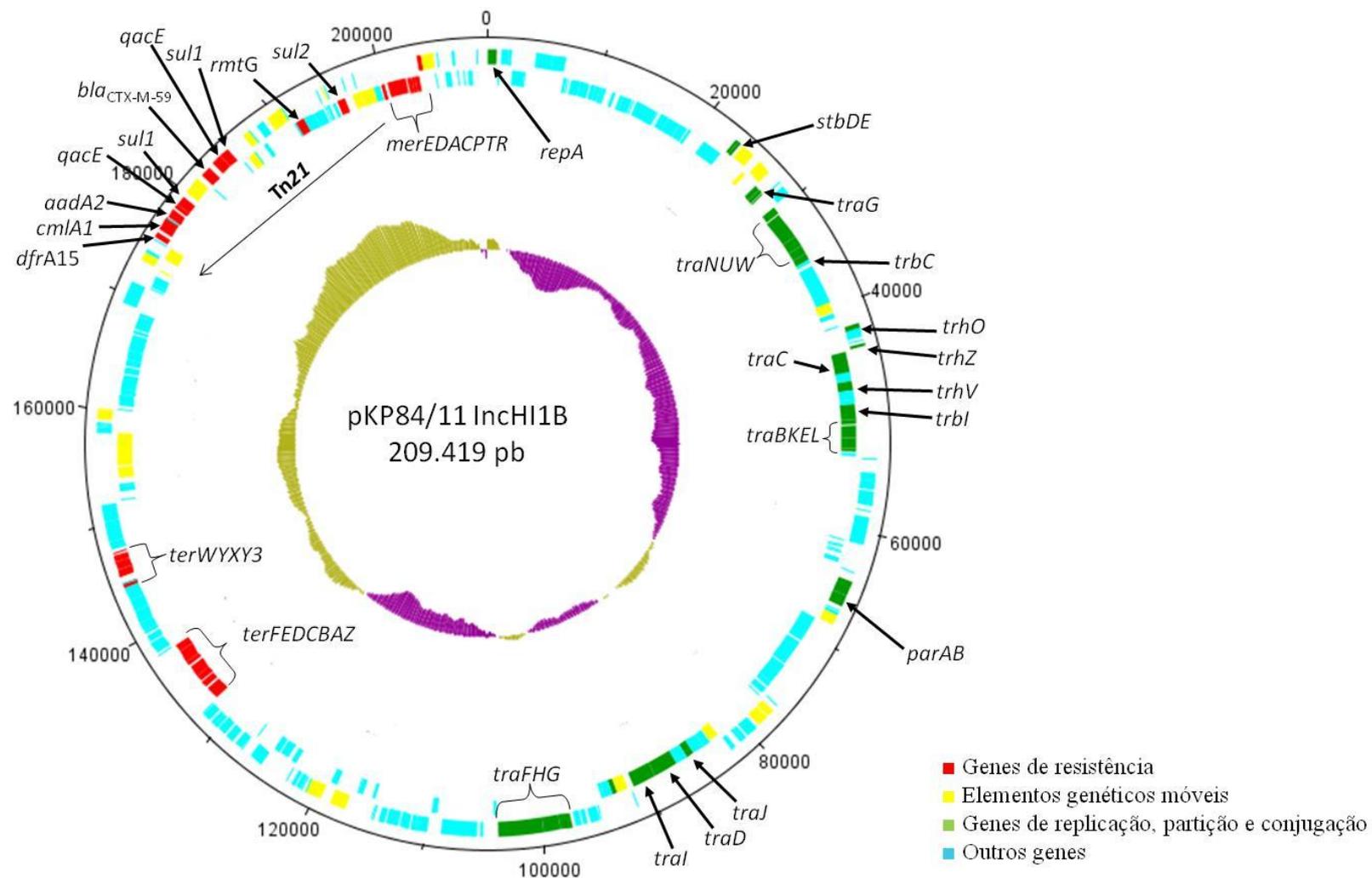


Figura 19 - Estrutura do plasmídeo IncHI1B pKp84/11 que carrega o gene *rmtG*. Os círculos internos na cor magenta e amarelo indicam o conteúdo C+G.

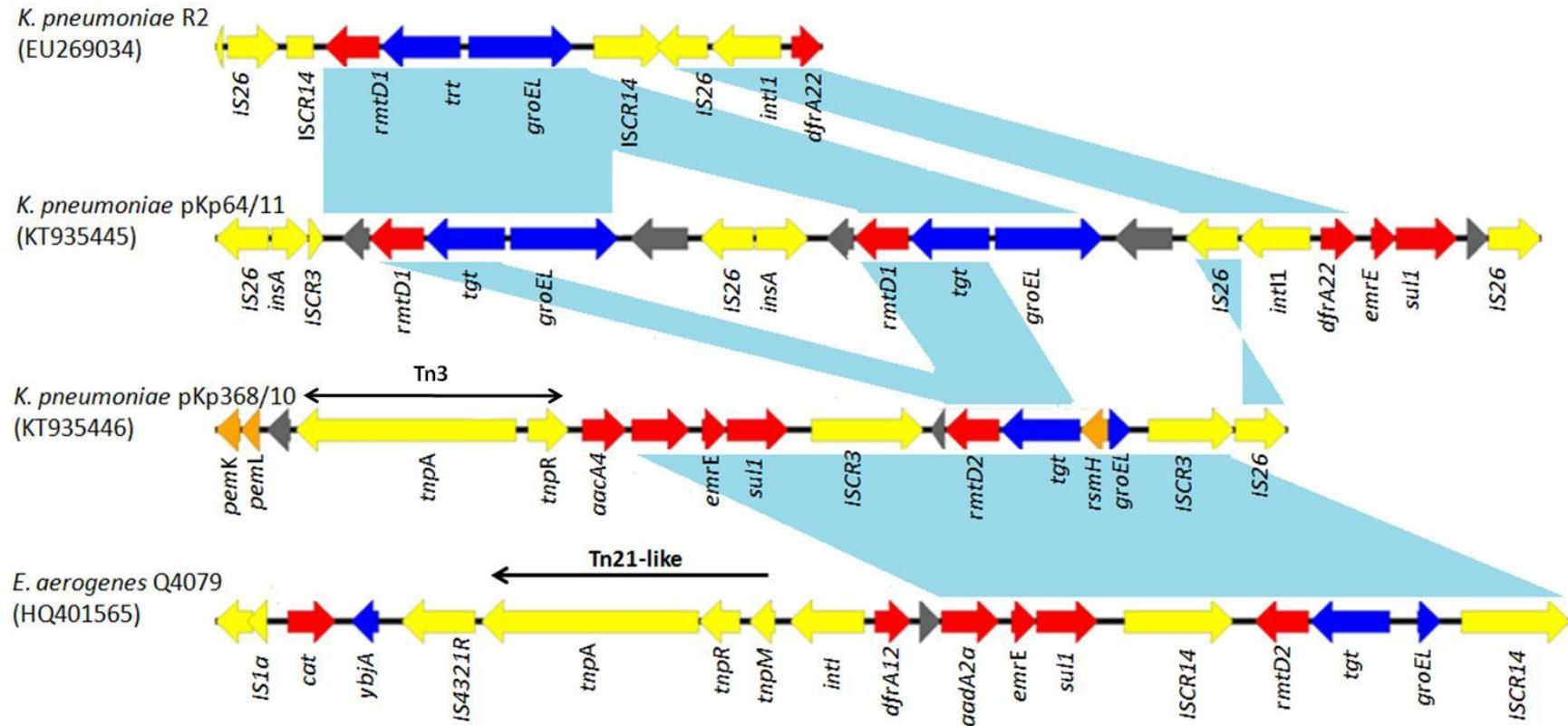


Figura 20 - Alinhamento do ambiente genético dos genes *rmtD1* e *rmtD2* dos plasmídeos pKp64/11 e pKp368/10 com seqüências depositadas no GenBank de *Enterobacteriaceae* isoladas na América do Sul. As áreas sombreadas em azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas azuis indicam genes envolvidos na virulência e vias bioquímicas. Genes acessórios de elementos móveis estão indicados por flechas amarelas e os genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo estão representados por flechas laranjas. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, e flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida.

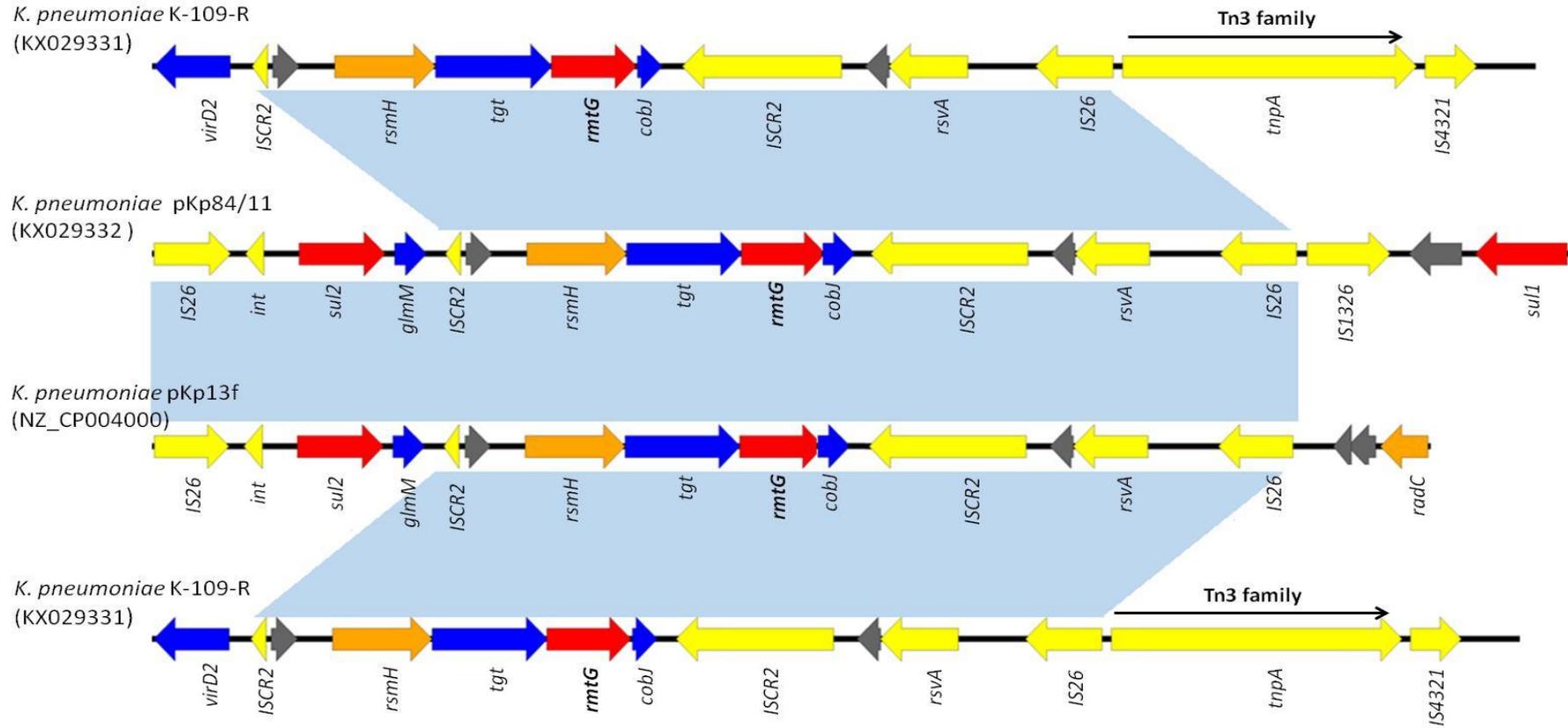


Figura 21 - Alinhamento do ambiente genético do gene *rmtG* do plasmídeo pKp84/11 com as sequências de plasmídeos de *K. pneumoniae*, contendo *rmtG*, depositadas no GenBank. As áreas sombreadas em azul indicam regiões com um alto grau de homologia. As ORFs estão representadas por flechas, coloridas de acordo com suas funções. Flechas azuis indicam genes envolvidos na virulência e vias bioquímicas. Genes acessórios de elementos móveis estão indicados por flechas amarelas e os genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo estão representados por flechas laranjas. As flechas vermelhas indicam os genes de resistência, e flechas cinzas indicam genes que codificam proteínas hipotéticas com função desconhecida.

## 5 DISCUSSÃO

A produção de ESBL é o principal mecanismo de resistência antimicrobiana em microrganismos Gram-negativos. A frequência e predominância dos tipos de ESBL variam de região para região e, até mesmo, entre instituições dentro da mesma região. A maior prevalência de cepas produtoras de ESBL foi registrada na América do Sul, sendo que, no México e no Peru, ESBLs são prevalentes em *E. coli*, enquanto que no Brasil, Cuba, Equador e Venezuela, a prevalência de ESBL é maior em *Klebsiella* spp. (Nogueira et al, 2015). No grupo das SHV, as variantes SHV-2, SHV-5 e SHV-12 são as mais encontradas. ESBLs do tipo TEM não são frequentemente relatadas, enquanto enzimas do tipo CTX-M são endêmicas e amplamente dominantes nessa região (Dropa et al, 2010). No Brasil, a frequência de microrganismos produtores de ESBL é de aproximadamente 50% em *K. pneumoniae*, muito mais alta que nos Estados Unidos, Europa e Japão. A CTX-M é a ESBL mais prevalente no país, tendo sido encontradas, principalmente, as variantes CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-16 e CTX-M-59 (Rossi, 2011; Rocha et al, 2015).

A porcentagem de detecção de ESBL nas cepas desse estudo foi de 81%, um pouco elevada em comparação aos encontrados na literatura. No entanto, a maioria das cepas encaminhadas ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do IAL são suspeitas de produzirem ESBL e carbapenemases, principalmente KPC. Dessa forma, a detecção de ESBL nas nossas cepas não representam de maneira proporcional a frequência de detecção dessas enzimas no ambiente hospitalar. Um estudo feito por Seki e colaboradores (2013) mostrou uma porcentagem de detecção de ESBL de 49% em *K. pneumoniae*. Essa porcentagem subia para 80% nas *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2. A frequente associação de ESBL com *K. pneumoniae* produtoras de KPC em outros estudos sugere a aquisição de plasmídeos transferíveis carreando *bla<sub>KPC-2</sub>* por cepas endêmicas locais ou pela aquisição de plasmídeos transferíveis contendo *bla<sub>ESBL</sub>* por clones

endêmicos produtores de KPC (Andrade et al 2011).

As ESBLs do tipo CTX-M vêm se disseminando mundialmente, superando as ESBLs do tipo TEM e SHV e se tornando a mais prevalente, não apenas no ambiente hospitalar, mas também em infecções comunitárias, de animais de estimação e agrários e no ambiente, em água de rios. Foram encontradas variantes da CTX-M do grupo 1 (CTX-M-15), grupo 2 (CTX-M-2, CTX-M-59 e CTX-M-35) e grupo 8 (CTX-M-8). A CTX-M-8 foi descrita pela primeira vez no Brasil em 3 cepas de diferentes espécies de enterobactérias (*E. cloacae*, *Citrobacter amanolaticus* e *E. aerogenes*) isoladas no Rio de Janeiro (Bonnet et al, 2000). Desde então, outros trabalhos no Brasil descreveram essa variante da CTX-M em *E. coli* em Minas Gerais (Minarini et al 2009) e em *K. pneumoniae* no Rio de Janeiro (Peirano et al, 2009 e Chagas et al, 2011), sendo prevalente entre as cepas isoladas de animais de consumo (Aizawa et al, 2014; Casella et al, 2015; Fernandes et al, 2016). Cepas produtoras da CTX-M-8 já foram relatadas também em países da Europa, Ásia, América do Sul e nos Estados Unidos (Garrido et al, 2013; Eller et al 2014; Kawamura et al 2014; Sennati et al 2012; Garcia-Fulgueira et al, 2011; Lewis et al, 2007).

Em 1989, a variante CTX-M-2 foi detectada em Buenos Aires, Argentina e, desde então, essa enzima se disseminou pelos países vizinhos se tornando a variante mais prevalente na América do Sul (Villegas et al, 2008). No Brasil, a CTX-M-2 tem sido descrita em muitos trabalhos, isoladas em diversas espécies de bactérias e em diversas cidades, mostrando sua disseminação e predominância no país. de Oliveira Garcia et al (2008) descreveram um surto em uma UTI neonatal em 2003 com 10 cepas de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas. Neste estudo, 6 isolados eram produtores de CTX-M-2 e, em 4 isolados, uma nova variante da CTX-M-2 foi descrita pela primeira vez. Essa nova variante, denominada CTX-M-59, possuía uma única substituição de aminoácido na posição 89 (His→Leu) em relação a CTX-M-2. Desde a sua descrição, o gene *bla*<sub>CTX-M-59</sub> tem sido detectado em diversos Estados, como São Paulo, Rio de Janeiro e Paraná (Clímaco et al, 2010; Tollentino et al, 2011; Queiroz et al, 2012; Nogueira et

al, 2014), com uma única descrição em outro país em uma *E. coli* isolada em um hospital da Espanha em 2010 (Garrido et al, 2013). No presente estudo, a CTX-M-59 foi detectada em 2 isolados. Outra variante da CTX-M-2, a CTX-M-35, foi identificada em apenas uma cepa. A CTX-M-35 hidrolisa, preferencialmente, a ceftazidima, devido a uma substituição do aminoácido prolina por uma serina na posição 167. Essa enzima já foi relatada em cepas de *Enterobacteriaceae* no Japão e em um isolado de *Citrobacter koseri* em Pittsburgh, Estados Unidos (Tian et al 2010). Assim como a cepa produtora de CTX-M-35 do nosso estudo, a cepa descrita nos Estados Unidos apresentava uma CIM > 256 µg/mL para ceftazidima e de 256 µg/mL para cefotaxima, porém o clone *E. coli* DH10B contendo o gene *bla*<sub>CTX-M-35</sub> apresentou uma CIM de 192 µg/mL para ceftazidima e de 4 µg/mL para cefotaxima, mostrando a preferência dessa enzima pela ceftazidima. Isso não foi observado na cepa produtora de CTX-M-35 do nosso estudo devido, provavelmente, a co-produção de KPC-2 ou outros mecanismos de resistência que podem ter elevado o nível de resistência às cefalosporinas.

Em um estudo feito por Clímaco et al (2010), cepas de *Klebsiella* spp de 2000 e 2006 foram comparadas em relação à produção de ESBL. Nos isolados de 2000, a CTX-M-2 esteve presente em todas as cepas, enquanto que nos isolados de 2006, apesar da predominância de CTX-M-2, uma maior diversidade de variantes foi também detectada, como a CTX-M- 59 e a CTX-M-9. Das 80 cepas positivas em nosso estudo, apenas 9 foram positivas para *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, com uma predominância de cepas produtoras de CTX-M-15, presente em 63 cepas. Em duas cepas (534/11 e 635/11) houve a co-produção das CTX-M-15 e CTX-M-2. Muitos trabalhos no Brasil mostram que CTX-M-2 está endêmica no país e disseminada em diversas cidades como Curitiba (Nogueira et al, 2011; Nogueira et al 2014; Nogueira et al 2015), Rio de Janeiro (Chagas et al, 2011; Queiroz et al 2012), São Paulo (do Carmo Filho et al, 2008, Tollentino et al, 2011), Minas Gerais (Minarini et al 2009) e Recife (Lopes et al, 2010; Cabral et al, 2012). Porém, os isolados destes trabalhos datam de 1998 a 2008, diferente das cepas desse estudo que foram isoladas de 2009 a 2011. Um estudo feito na Argentina em 2010

(Senatti et al 2012) mostrou uma mudança da epidemiologia molecular das ESBLs circulantes no país. Foi observado que apesar da CTX-M-2 continuar endêmica na Argentina, houve uma emergência de CTX-M-15, principalmente em *E. coli* e *Klebsiella spp.* Outro estudo conduzido no Uruguai com *K. pneumoniae* e *E. coli*, não produtoras de KPC, isoladas de 2010 a 2011, mostrou que de 54 cepas, 47 eram positivas para CTX-M-15 (sendo 11 co-produtoras de CTX-M-14) e apenas 2 produziam CTX-M-2 (Bado et al, 2016).

No Brasil, a CTX-M-15 foi primeiramente detectada em cepas de *K. pneumoniae* isoladas no estado de São Paulo de 2005 a 2007 (Tollentino et al, 2011). Neste estudo a CTX-M do grupo 2 foi predominante e cepas produtoras de CTX-M-15 apareceram em 18% dos isolados. Desde então, muitos outros estudos relataram a presença de CTX-M-15 em vários membros da família *Enterobacteriaceae* em São Paulo, Paraná e Rio de Janeiro (Nogueira et al 2014; Peirano et al, 2011; Cergole-Novella et al 2010). Assim como o estudo conduzido na Argentina, Seki et al (2013) avaliaram a epidemiologia molecular da CTX-M em cepas de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *E. coli* isoladas no Rio de Janeiro de 2007 a 2008. A variante CTX-M-15 apareceu em 61% (n=85) das cepas, sendo que a maioria foi detectada em *K. pneumoniae* (38 cepas). O mesmo estudo também mostrou que das cepas de *K. pneumoniae* que eram produtoras de KPC-2, 80% co-produziam CTX-M-15. Assim como no presente estudo, há uma forte associação dos genes *bla<sub>KPC-2</sub>* e *bla<sub>CTX-M-15</sub>* em *K. pneumoniae*, principalmente pertencente ao CC11, tendo sido observado na Hungria, Espanha e China (Damjanova et al, 2005; Oteo et al, 2009; Qi et al, 2011). A disseminação dessa co-produção pelo meio ambiente também foi observada, em um estudo conduzido por Oliveira e colaboradores (2014), que relataram 3 cepas de *K. pneumoniae* co-produtoras de KPC-2 e CTX-M-15 isoladas em rios urbanos na cidade de São Paulo. Cepas co-produtoras de CTX-M-15 e uma outra carbapenemase foram descritas em Porto Alegre, em uma cepa de *E. hormaechei* produtora dessa CTX-M e de NDM-1. Até o momento, nenhum estudo sobre a epidemiologia molecular da CTX-M,

mostrando a mudança da predominância da CTX-M do grupo 2 para a CTX-M-15, foi publicado em São Paulo. Porém, o presente estudo mostra uma alta predominância de *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M, principalmente da variante CTX-M-15 que co-produzam KPC-2.

O gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> tem sido localizado em plasmídeos específicos pertencentes ao grupo IncF. Esses plasmídeos são os mais frequentemente detectados em *Enterobacteriaceae*, geralmente associados com a disseminação de outros genes de resistência como a KPC, AmpC (*bla*<sub>CMY</sub> e *bla*<sub>DHA</sub>), *aac(6)-Ib-cr*, *qnr*, *armA* e *rmt*. O gene *bla*<sub>TEM-1</sub> geralmente coexiste com o *bla*<sub>CTX-M-15</sub> no mesmo plasmídeo (Caratolli, 2009). A associação desses dois genes foi observada em 9 cepas do presente estudo. Além das betalactamases, 2 cepas produtoras de CTX-M-15 também apresentavam resistência elevada aos aminoglicósidos devido a co-produção de metiltransferases, sendo uma cepa produtora de RmtD1 e uma produtora de RmtG.

Todas as 100 cepas foram caracterizadas como produtoras de KPC-2, o único tipo detectado no Brasil até o momento (Sampaio & Gales, 2016). As variantes KPC-2 e KPC-3 são as mais dominantes, sendo consideradas endêmicas nos Estados Unidos, Grécia e Israel, e com aumento de relatos na China, América do Sul e em muitos países da Europa (Woodford et al, 2011). A KPC hidrolisa todos os betalactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Cefamicina e ceftazidima são fracamente hidrolizados e os carbapenêmicos, a cefotaxima, o aztreonam são hidrolizados com uma menor eficiência que as penicilinas e as cefalosporina de espectro restrito (Livermore, 2012). Esse perfil de resistência não foi observado em nossos isolados, que apresentaram CIM<sub>50</sub> > 256 µg/mL para cefotaxima e aztreonam e ≥32 µg/mL para todos os carbapenêmicos e CIM<sub>90</sub> > 256 µg/mL para todas as cefalosporinas. Esse resultado pode indicar uma associação de outros mecanismos de resistência com a produção de KPC, como produção de outras betalactamases e perda de porina. Tsai et al (2013) observaram que a perda das porinas OmpK35 e OmpK36 ou a perda de uma única porina associada à expressão do gene *bla*<sub>CTX-M-15</sub> são

suficientes para levar a resistência ao ertapenem.

A co-produção de KPC-2 e uma ESBL foi observada em 81 cepas, sendo que 63 isolados possuíam os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Essa associação tem sido relatada no Brasil (Seki et al, 2013; Fehlberg et al, 2012), China (Liu et al, 2013), Hungria (Tóth et al, 2010) e Estados Unidos (Castanheira et al, 2010). A rápida disseminação do *bla*<sub>KPC</sub> pode ser atribuída à sua mobilidade e presença em plasmídeos ou transposons. Os plasmídeos que carregam *bla*<sub>KPC</sub> são diversos na sua estrutura e frequentemente capazes de transferência para outras cepas através de conjugação (Doi & Paterson, 2015).

Foi verificada uma positividade de 97% para *bla*<sub>SHV</sub>, com a presença dos tipos SHV-11, SHV-1, SHV-110 e SHV-12. A SHV-11 foi o tipo mais predominante, e se diferencia da SHV-1 por apenas um aminoácido na posição 35 (Leu→Glu) (Nuesch-Inderbilen, 1997). A SHV-110 é uma betalactamase com espectro de atividade não caracterizado ainda. Porém, Ramos et al (2014) ao sequenciarem o genoma inteiro de uma cepa de *K. pneumoniae* multi-resistente Kp13, encontraram o gene *bla*<sub>SHV-110</sub> no cromossomo dessa bactéria. As variantes SHV-11 e SHV-1 são betalactamases de espectro limitado e, em *K. pneumoniae*, são codificadas no cromossomo (Lee et al, 2006). A SHV-12 foi encontrada em 4 isolados, e foi a única SHV do tipo ESBL detectada nas cepas estudadas. Essa é uma variante da SHV já disseminada mundialmente, com relatos na Ásia, Europa, Estados Unidos e América do Sul (Hawkey, 2008; Cantón et al, 2008; Bush, 2008; Pallechi et al 2007). No Brasil, Tollentino et al (2011) descreveram a SHV-12 pela primeira vez em 9 cepas de um estudo com 65 *K. pneumoniae* isoladas no nordeste do estado de São Paulo no período de 2005 a 2007. No trabalho de Ramos et al (2014) onde foi encontrado o *bla*<sub>SHV-110</sub> integrado no cromossomo da *K. pneumoniae* Kp13, uma cópia do gene *bla*<sub>SHV-12</sub> foi detectada em um dos 6 plasmídeos presentes nessa cepa.

As 100 cepas desse estudo foram identificadas fenotipicamente na rotina do Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por patógenos especiais do Centro de Bacteriologia do IAL como *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

Porém, durante a caracterização dos genes de betalactamase, 3 cepas apresentaram-se negativa para *bla*<sub>SHV</sub> e, após confirmação da identificação da espécie por métodos genotípicos, 2 cepas foram reclassificadas como *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* e 1 cepa como *K. variicola*.

Cepas classicamente identificadas como *K. pneumoniae* foram previamente subdivididas nos filogrupos KpI, KpII-A, KpII-B e KpIII e, recentemente, análises filogenéticas demonstraram que KpI e KpIII correspondem a *K. pneumoniae* e *K. variicola*, respectivamente. O filogrupo KpII, baseado em características fenotípicas e genéticas, foi dividido em 2 *clusters* denominados *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* (KpII-A) e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* (KpII-B). As propriedades bioquímicas, tais como, produção de ácido a partir de adonitol e L-sorbose e a habilidade de usar 3-fenilpropionato, 5-keto-D-gluconato e ácido tricarbálico como fonte de carbono podem auxiliar na diferenciação de KpII-A, KpII-B, *K. pneumoniae* e *K. variicola*. A fermentação do adonitol é negativa em *K. variicola* e positiva em *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*, e a fermentação do L-sorbose é positiva em *K. variicola* e negativa em *K. pneumoniae* e *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae*. A utilização do ácido tricarbálico como única fonte de carbono apresenta-se negativo, em sua maioria, para *K. pneumoniae* (Brisse et al, 2014). Entretanto, características fenotípicas podem ser instáveis, pois já foram observadas *K. variicola* adonitol positivo e *K. pneumoniae* adonitol negativo (Alves et al, 2006). De acordo com os nossos dados, a cepa 259/09 apresentou-se negativa para a fermentação do adonitol, positiva para a fermentação da sorbose e positiva para a utilização de ácido tricarbálico e as cepas 492/11 e 672/11 apresentaram-se positivas para a fermentação do adonitol, negativas para a fermentação da sorbose e positivas para a utilização de ácido tricarbálico.

Devido a dificuldade de diferenciação entre essas 2 espécies de *Klebsiella* por testes fenotípicos clássicos ou automatizados, muitas cepas de *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* são erroneamente identificadas como *K. pneumoniae*. Long et al (2017) ao sequenciarem o genoma completo de

1777 cepas produtoras de ESBL, identificadas como *K. pneumoniae* através do MALDI-TOF MS, observaram que 15 cepas eram *K. quasipneumoniae* e 13 cepas eram *K. variicola*, mostrando que, no hospital estudado, aproximadamente 2% das infecções atribuídas a *K. pneumoniae* eram causadas, na verdade, por *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* produtoras de ESBL. O sequenciamento completo do genoma demonstrou que essas 3 espécies de *Klebsiella* compartilham genes cromossomais e genes presentes em elementos móveis que codificam fatores de virulência e mecanismos de resistência antimicrobiana, sendo que muitos replicons de plasmídeos e genes de resistência antimicrobiana detectados nas *K. quasipneumoniae* e *K. variicola* produtoras de ESBL também foram identificados em *K. pneumoniae*.

Os genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>LEN</sub> estão inseridos no mesmo contexto genético nos genomas de *K. pneumoniae*, *K. quasipneumoniae* e *K. variicola*, respectivamente. Nessas espécies, os genes *bla* correspondentes estão flanqueados pelos genes *deoR* codificados cromossômicamente e por um gene que codifica para uma ATPase que faz parte do genoma estável bacteriano. Baseado nisso, Fonseca et al (2017) descreveram um PCR Multiplex *one-step* para a diferenciação de *Klebsiella* spp baseado na amplificação de genes das betalactamases cromossomais SHV, OKP e LEN. A utilização de um único *primer reverse*, que se anela no gene cromossômico *deoR*, evita que alelos presentes em plasmídeos sejam amplificados. Porém, Long et al (2017) descreveram a presença de *K. variicola* carreando uma cópia de *bla*<sub>OKP</sub> em seu cromossomo, além do *bla*<sub>LEN</sub>, através de uma recombinação homóloga. Além disso, a presença do gene *deoR* no contexto genético do *bla*<sub>SHV</sub> plasmidial também já foi descrita (Naas et al, 2007; Kassis-Chikhani et al, 2013; Liakopoulos et al, 2016). Eventos como este podem dificultar a identificação de *Klebsiella* spp. através da presença de betalactamases cromossomais específicas de cada espécie.

Interessantemente, a cepa padrão *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, primeiramente identificada como *K. pneumoniae* e utilizada como referência para o controle de qualidade na detecção de ESBL em

*Enterobacteriaceae* devido a produção da SHV-18, após sequenciamento completo do seu genoma, foi identificada como *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* possuindo a betalactamase *bla*<sub>OKP-B-7</sub> no seu cromossomo (Elliott et al, 2016). Na PCR Multiplex para identificação de *Klebsiella* spp, essa cepa apresentou-se positiva para os genes *bla*<sub>OKP</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>. O *bla*<sub>SHV-18</sub> está presente no plasmídeo pKQPS2, com uma cópia do gene *deoR downstream* (número de acesso no GenBank CPO14698.2).

No Brasil, Aires et al (2016) caracterizaram 16 *Klebsiella* spp. produtoras de NDM-1 isoladas de oito instituições de saúde em 3 cidades do Rio de Janeiro, de julho de 2013 a novembro de 2014. Entre elas, a cepa CCBH16302 foi identificada como *K. quasipneumoniae* através do sequenciamento do genoma completo, sendo co-produtora de TEM e CTX-M.

As cepas do nosso estudo identificadas como *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* foram provenientes de diferentes hospitais da cidade de São Paulo, foram positivas para *bla*<sub>OKP</sub> e, em ambos os isolados, houve a co-produção de KPC-2 e CTX-M-8, sendo que uma delas também produzia a betalactamase TEM-1. A cepa identificada como *K. variicola*, positiva para *bla*<sub>LEN</sub>, também co-produzia KPC-2, CTX-M-8 e TEM-1. Co-produção de ESBL e carbapenemases como NDM-1 e CTX-M (Aires et al, 2017) e NDM-5 e CTX-M-14 (Gan et al, 2017) em *K. quasipneumoniae* e NDM-1 e CTX-M-15 (Long et al, 2017) e NDM-9 e CTX-M-65 (Di et al, 2017) em *K. variicola* já foram descritas, assim como a produção de KPC-2 por ambas as espécies (Long et al, 2017).

Em relação a detecção e caracterização de genes de metiltransferases 16S rRNA, 2 cepas foram positivas para *rmtD2*, 1 para *rmtD1* e, em 4 cepas, foi detectada uma nova metiltransferase, a RmtG, descrita nesse estudo. A RmtD1 foi a enzima primeiramente descrita no Brasil, e já foi identificada em muitas espécies da família *Enterobacteriaceae* no Brasil, Argentina e Chile. A RmtD2 difere em 9 aminoácidos da RmtD1 e foi descrita na Argentina em *E. cloacae* e *C. freundii* e, diferente da metiltransferase descrita no Brasil, essa variante não possuía associação

com metalo betalactamases.

Durante a caracterização, no presente estudo, da nova metiltransferase 16S rRNA, RmtG, foi obtido um inserto de 1.6 kb que continha duas ORFs sobrepostas, uma ORF correspondente a uma tRNA ribosiltransferase com 76% de semelhança com uma mesma proteína descrita *upstream* dos genes *rmtD1* e *rmtD2*, e outra ORF correspondente a nova metiltransferase. A maior similaridade da RmtG com outra metiltransferase foi também com a RmtD. A similaridade entre as proteínas RmtD e RmtG e a analogia no alinhamento das tRNA ribosiltransferase, encontradas antes dos genes de ambas as enzimas, podem nos mostrar que essas 16S-RMTases foram originadas de espécies não patogênicas intimamente relacionadas.

Após a descrição da nova metiltransferase RmtG no presente estudo (Bueno et al 2013), essa enzima foi relatada no Brasil, Chile, Miami e Índia (Poirel et al, 2014; Ramos et al, 2014; Hu et al, 2014; Filgona et al, 2015) e, assim como as 2 variantes da RmtD, estão localmente distribuídas, principalmente, na América do Sul. Poirel et al (2014) relataram a presença da RmtG em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada de um paciente em Santiago, Chile, em junho de 2012. O isolado apresentava-se resistente a maioria dos betalactâmicos de amplo espectro com CIM de 256 µg/mL para cefotaxima e cefepime e de 8 µg/mL para ceftazidima, sendo sensíveis aos carbapenêmicos e a tigeciclina. Em relação aos outros genes de resistência, a cepa foi positiva para o gene da ESBL *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e para os genes das betalactamases *bla*<sub>TEM-1</sub> e *bla*<sub>SHV-1</sub>. Assim como a cepa isolada no Chile, todas as cepas do presente estudo produtoras de RmtG co-produziam uma CTX-M e a TEM-1. Além disso, as cepas desse estudo apresentavam o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, tornando-as resistente também aos carbapenêmicos.

No Brasil, Ramos e colaboradores (2014) ao sequenciarem o genoma completo (cromossomo e 6 plasmídeos) da *K. pneumoniae* Kp13, isolada em um hospital de Londrina, Paraná, detectaram o gene *rmtG* no plasmídeo PKP13f dessa bactéria. Essa cepa possuía um perfil de genes de resistência semelhante a cepa 922/11 do presente estudo, pois ambas apresentavam os

genes *bla*<sub>KPC-2</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> e *rmtG*. No estudo de Ramos et al, os genes *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub> e *rmtG* estavam todos localizados no plasmídeo PKP13f, enquanto que o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> estava localizado em outro plasmídeo, o PKP13d.

Hu et al (2014) relataram a presença da RmtG fora da América do Sul, em uma cepa de *K. pneumoniae* resistente aos aminoglicosídeos gentamicina, amicacina e tobramicina e aos carbapenêmicos ertapenem e meropenem, isolada em um hospital em Miami nos Estados Unidos. Essa cepa não era produtora de KPC, mas co-produzia CTX-M-2 e CTX-M-15, juntamente com o gene *rmtG*. Duas cepas produtoras da RmtG do presente estudo (84/11 e 145/11) também eram co-produtoras de duas CTX-M, a CTX-M-8 e a CTX-M-59.

Filgona et al (2015) detectaram o gene *rmtG* em 7 cepas de *K. pneumoniae* e em 3 cepas de *E. coli*, na Índia. A detecção desse gene foi feita apenas por PCR com *primers* específicos, sendo necessário mais estudos e confirmação desses genes por sequenciamento para afirmar a disseminação da *rmtG* para outro continente.

O sequenciamento completo de duas cepas de *E. hormaechei*, produtoras de RmtG, isoladas em 2013 e 2014 na Colômbia foram depositadas no NCBI (números de acesso NZ\_JZLE00000000 e NZ\_JZXU00000000). Além disso, o gene *rmtG* foi detectado em 7 amostras de *P. aeruginosa* isoladas do trato respiratório de um mesmo paciente com fibrose cística. Inúmeras tentativas, sem sucesso, de mobilização desse gene por conjugação e transformação e de hibridação com sonda específica, mostrou que, provavelmente, o *rmtG* tinha localização cromossômica (Francisco et al, 2015) Após este estudo, foi feito o sequenciamento do genoma completo de uma das *P. aeruginosa* produtoras de RmtG isolada de paciente com fibrose cística (*P. aeruginosa* 538) e a análise desse sequenciamento não mostrou a presença de nenhum replicon plasmidial, sugerindo, mais uma vez, a localização do gene *rmtG* no cromossomo dessa cepa (Bueno et al, 2017). A detecção do gene *rmtG* em *P. aeruginosa* e *E. hormaechei* mostra a capacidade de mobilização interespecie desse gene.

Além disso, as cepas produtoras de RmtG do presente estudo foram isoladas de diferentes hospitais do Estado de São Paulo mostrando a capacidade de disseminação do gene codificador dessa 16S RMTase.

Após a descrição da RmtG, a metiltransferase 16S rRNA RmtH, foi descrita em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada no Iraque em 2006. Essa 16S RMTase apresentava 64% de similaridade na sequência de aminoácidos com RmtB1 e RmtB2 e 63 % de similaridade com RmtA. Além disso, a *K. pneumoniae* produtora de RmtH era co-produtora das betalactamases CTX-M-15, SHV-1 e OXA-1. Tentativas em mobilizar o gene *rmtH* por transformação ou conjugação não foram bem-sucedidas, e a técnica de hibridação de DNA tratado com S1 nuclease revelou que o gene *rmtH* está, provavelmente, localizado no cromossomo (O'Hara et al, 2013). Recentemente, Beyrouthy et al (2017) descreveram a presença do gene *rmtH* em um plasmídeo de uma *K. pneumoniae*, isolada de um recém-nascido, em um hospital no Líbano em 2012.

Além da KPC-2, as cepas produtoras de RmtD e RmtG eram co-produtoras também de outras betalactamases. Co-produção de uma metiltransferase 16S rRNA em *K. pneumoniae* produtora de KPC já foi relatada (Galani et al 2012; Zacharczuk et al 2011), assim como a co-produção com enzimas do tipo CTX-M (Doi et al, 2008c, Habeeb et al, 2013; Naas et al 2011).

No presente estudo, foram sequenciados os plasmídeos pKp64/11, pKp368/10 e pKp84/11 que carregam os genes *rmtD1*, *rmtD2* e *rmtG*, respectivamente. O plasmídeo pKp64/11 pertence ao grupo de incompatibilidade IncL/M, sua arquitetura plasmidial é similar com outros plasmídeos IncL/M previamente sequenciados (Bonnin et al, 2013). Plasmídeos pertencentes ao IncL/M estão entre os mais identificados em *Enterobacteriaceae*, podendo estar associado com genes de resistência de ESBL (*bla*<sub>CTX-M-3</sub>, *bla*<sub>SHV-5</sub>), carbapenemases de classe A, B e D (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, and *bla*<sub>OXA-48</sub>), betalactamases AmpC (*bla*<sub>FOX-7</sub>), como também com o gene da metiltransferase 16S rRNA *armA* (Carattoli et al, 2015).

O plasmídeo pKp368/10 pertence ao grupo de incompatibilidade

IncA/C e possui 170.244 pb, codificando os genes de resistência *rmtD2*, *sul1*, *ant(3')1a*, *aac(6')-1b* e *bla<sub>CTX-M-8</sub>* (Bueno et al, 2016). Plasmídeos da família IncA/C são, geralmente, grandes (140.000 a 200.000 pb) e se disseminam entre várias espécies de *Enterobacteriaceae*, podendo mobilizar genes que conferem resistência aos betalactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamida, trimetoprim, quinolonas e tetraciclina (Carraro et al, 2015). Sequenciamento completo de plasmídeos IncA/C mostrou que eles possuem pelo menos 3 pontos de acessos para a integração de elementos genéticos móveis podendo formar arranjos únicos (Johnson & Lang, 2012). A arquitetura plasmidial do pKp368/10 possui algumas diferenças com outros plasmídeos IncA/C já sequenciados, pois no plasmídeo pKp368/10 a região de transferência composta pelos genes *traIDLEKBVACWUN* não está presente, contendo uma região composta pelos genes conjugativos *trbBCDEJLFGI* não comumente encontrada em plasmídeos IncA/C já descritos (Fernández-Alarcón et al, 2011) Os plasmídeos da família IncA/C possuem uma estrutura plasmidial conservada, porém esse alto nível de conservação não é sempre observado. Sequência de plasmídeos IncA/C de *Aeromonas hydrophila*, *Xenorhabdus nematophila* e *Aeromonas salmonicida* depositadas compartilhavam apenas 72 a 94 % de semelhança na sequência de nucleotídeos com a estrutura plasmidial de outros plasmídeos IncA/C já descritos (Johnson & Lang, 2012).

O plasmídeo pKp84/11 que carrega o gene *rmtG* possui 209.419 pb e pertence ao grupo de incompatibilidade IncHI1B. Os plasmídeos IncHI1 são geralmente maiores que 180 Kb devido a incorporação de genes de resistência a antimicrobianos e metais pesados. Esses genes podem fazer parte de múltiplos elementos móveis inseridos nos plasmídeos IncHI1, como por exemplo no transposon Tn10 com resistência a tetraciclina ou no transposon Tn21 codificando resistência ao cloranfenicol e ao mercúrio (Kubasova et al, 2016). pKp84/11 codifica os genes *dfrA15*, *cmlA1*, *aadA2*, duas cópias do gene *sul1*, *bla<sub>CTX-M-59</sub>*, *rmtG* e *sul2* carregados em um Tn21 que também carrega um operon de genes de resistência ao mercúrio (*merEDACPTR*).

Em relação ao ambiente genético dos genes de ESBLs encontrados nos plasmídeos sequenciados, o gene *bla*<sub>CTX-M-8</sub> localizado no plasmídeo pKp368/10 está associado com a sequência de inserção IS26. A sequência de inserção IS26 tem um importante papel na disseminação de genes de resistência em bactérias Gram-negativas, estando associada com genes que conferem resistência a diferentes classes de antibióticos (Harmer & Hall, 2015). Dropa et al (2016) descreveram a presença de *bla*<sub>CTX-M-8</sub> associado com a IS26 localizados em plasmídeos de bactérias isoladas em cinco estações de tratamento de esgoto de São Paulo. O gene *bla*<sub>CTX-M-59</sub> carregado pelo plasmídeo pKp84/11 está inserido em um complexo integron de classe 1-*ISCR1* associado a uma cópia da IS26, juntamente com os cassetes genéticos *dfrA15*, *cmiA1*, *aadA2*, *qacE* e *sul1*. CTX-M do grupo 2 são codificadas por genes frequentemente localizados nesse complexo compostos pela associação da sequência de inserção *ISCR1* com integrons de classe 1, podendo contribuir para o aumento da mobilização de genes de resistência (Toleman & Walsh, 2011). Esse complexo integron de classe 1-*ISCR1* já foi descrito no Brasil e em países da América Latina, sendo responsável pela disseminação das enzimas CTX-M-2 nessa região (Power et al, 2005; Quiroga et al, 2013). No Brasil, Dropa et al (2015) mostraram a presença do *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>CTX-M-59</sub> inseridos no complexo integrons de classe 1-*ISCR1* em sete espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas em sete diferentes enfermarias de um hospital de São Paulo, mostrando o grande potencial de mobilidade dessas estruturas.

O gene *rmtD1*, localizado no plasmídeo pKp64/11, juntamente com os genes *groEL* e *tgt* estão flanqueados por duas cópias da IS26. *rmtD1-tgt-groEL* estão duplicados em *tandem* com uma única IS26 entre as regiões repetidas. A duplicação em *tandem* de estruturas flanqueadas pela IS26 tem sido observada na presença de pressão seletiva do antimicrobiano correspondente (Bertini et al, 2007; Loli et al, 2006; Zienkiewicz et al, 2013; He et al, 2015). Arranjo em *tandem* também foi observado no plasmídeo pRmtH, que carregava a metiltransferase 16S rRNA RmtH, isolada de *K. pneumoniae* no Líbano. Esse plasmídeo apresentou o arranjo *ISCR2-rmtH*

repetido 4 vezes e, assim como no presente estudo, foi feita a confirmação desse arranjo em *tandem* por PCR Long Range (Beyrouthy et al, 2016).

A comparação do ambiente genético da *rmtD1* do plasmídeo pKp64/11 com a sequência da *K. pneumoniae* R2 (EU269034), mostrou que, nos dois plasmídeos, os genes *rmtD1*, *tgt* e *groEL* estão localizados *upstream* de um integron de classe 1 flanqueados por 2 cópias da IS26. A associação do *rmtD1* com um integron de classe 1 foi observado na *P. aeruginosa* PA0905, onde o *rmtD1* foi primeiramente descrito, porém sem a associação com a IS26 (Doi et al, 2007).

No plasmídeo pKp368/10, o arranjo *rmtD2-tgt-ΔgroEL* está flanqueado por duas cópias de ISCR3, fazendo parte de um transposon Tn3. A mobilização dos genes das metiltransferases 16S rRNA *armA* e *rmtH* também está associada aos elementos ISCR (Doi et al, 2016). A comparação do contexto genético do gene *rmtD2* do pKp368/10 com a sequência de *Enterobacter aerogenes* Q4079 (HQ401565) mostra que o arranjo *rmtD2-tgt-ΔgroEL*, em ambos os plasmídeos, está flanqueado pelos elementos ISCR3 e ISCR14, respectivamente. ISCR3/14 parece estar envolvido na mobilização dos genes *rmtD* e *rmtB* para patógenos Gram-negativos a partir de fontes ainda não definidas (Wachino et al, 2006; Yu et al, 2010). Os genes *rmtD1* e *rmtD2* são encontrados exclusivamente na América do Sul e estão localizados em transposons complexos em plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade, porém com o arranjo *rmtD-tgt-groEL* conservado, sugerindo sua aquisição independente a partir de uma origem comum (Bueno et al, 2016).

Comparando o ambiente genético do gene *rmtG* do plasmídeo pKp84/11 com o plasmídeo pKp13f isolado em *K. pneumoniae* no Brasil (NZ\_CP004000) e o plasmídeo pK190R1 de uma *K. pneumoniae* isolada em Miami (KX029331), os genes *rmtG*, *tgt* e *rsmH* estão flanqueados por duas cópias de ISCR2, com uma dessas cópias truncada, nos três plasmídeos. ISCR2 é um elemento móvel da família IS91 que tem sido encontrado próximo a genes de resistência a sulfonamida, trimetoprim e cloranfenicol em microrganismos Gram-negativos (Toleman et al, 2006). Nos plasmídeos

isolados de *K. pneumoniae* do Brasil (pKp84/11 e pKp13f), o arranjo ISCR2-*rmtG-tgt-rsmH-ΔISCR2*, juntamente com os genes *ΔglmM* e *sul2* estão flanqueados por duas cópias da IS26. Esse arranjo não foi observado no plasmídeo pK190R1 que possui apenas uma cópia da IS26, sugerindo uma possível mobilização inicial do *rsmH-tgt-rmtG* pela ISCR2. IS26 forma uma co-integração entre a molécula de DNA a qual pretence e a molécula alvo resultando em duas cópias da IS26 em cada extremidade entre as duas moléculas participantes (Iida et al, 1984). Dessa forma, a presença de duas cópias da IS26 no plasmídeo pKp84/11 e apenas uma cópia no plasmídeo pK190R1 sugere que a IS26 teve um papel na mobilização subsequente do arranjo contendo ISCR2 e *rsmH-tgt-rmtG*. A mobilização inicial do gene da metiltransferase *rmtH* também tem sido associada com a ISCR2 (O'Hara et al, 2013; Beyrouthy et al, 2016).

O contexto genético do gene *rmtG* mostrou um arranjo *rsmH-tgt-rmtG* conservado que, provavelmente, foi inicialmente carregado de uma origem desconhecida por uma ISCR2 funcional. A sequência de inserção IS26 pode ter sido responsável pela mobilização subsequente desse gene para plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade e pela disseminação desse gene de metiltransferase 16S rRNA.

## 6 CONCLUSÃO

- Todas as 100 cepas desse estudo apresentaram resistência em nível elevado para a maioria dos antibióticos testados, com maiores porcentagens de resistência para os carbapenêmicos e cefalosporinas.
- Houve uma maior prevalência de cepas de *K. pneumoniae*.
- Fenótipos de resistência para KPC e ESBL foram observados em todas as 100 cepas, enquanto que nenhuma cepa apresentou características fenotípicas de produção de MBL.
- Sete cepas apresentaram característica fenotípica de microrganismos produtores de metiltransferases 16S rRNA.
- O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi detectado em todas as cepas, e foi o único gene codificado de uma carbapenemase encontrada entre os nossos isolados.
- Houve uma predominância da produção da ESBL CTX-M-15 nas cepas desse estudo.
- O gene *rmtD* foi detectado em 3 cepas e um novo gene codificador de metiltransferase foi descrito e identificado em 4 isoladas, sendo denominado *rmtG*.
- O plasmídeo pKp64/11, contendo o gene *rmtD1*, pertence ao grupo de incompatibilidade IncL/M. O ambiente genético do *rmtD1* mostrou uma associação com a sequência de inserção IS26.
- pKp368/10 carreador do gene *rmtD2* pertence ao IncA/C. O *rmtD2* está flanqueado por ISCR3, inserido em um transposon da família Tn3.

- pKp84/11, contendo o gene *rmtG*, pertence ao IncHI1B. O contexto genético do *rmtG* mostrou uma associação da ISCR2 com a IS26.

## REFERÊNCIAS

Abboud CS, Bergamasco MD, Doi AM, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D, et al. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. *Journal of Infection Prevention*. 2011; 12(4): 150-153.

Adams MD, Goglin K, Molyneaux N, Hujer KM, Lavender H, Jamison JJ, et al. Comparative genome sequence analysis of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Bacteriol*. 2008; 190: 8053-8064.

Aires CAM, Pereira PS, de Araujo CFM, Chagas TPG, Oliveira JCR, Buonora SN, et al. Multiclonal expansion of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing NDM-1 in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(4):1-6.

Aizawa J, Neuwirt N, Barbato L, Neves PR, Leigue L, Padilha J, et al. Identification of fluoroquinolone-resistant extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (CTX-M-8)-producing *Escherichia coli* ST224, ST2179 and ST2308 in buffalo (*Bubalus bubalis*). *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(10):2866-2869.

Alekshun MN & Levy SB. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*. 2007;128(6):1037-1050.

Al Sheikh YA, Marie MA, John J, Krishnappa LG, Dabwab KH. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Saudi Arabia. *Libyan J Med*. 2014;9:24432.

Alves MS, Dias RC, de Castro AC et al. Identification of clinical isolates of

índole-positive and indole-negative *Klebsiella* spp. J. Clin. Microbiol. 2006; 44:3640-3646.

Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980; 289: 321-331.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R et al. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(7): 3579-3583.

Aragon LM, Mirelis B, Miro E, Mata C, Gomez L, Rivera A, et al. Increase in  $\beta$ -lactam-resistant *Proteus mirabilis* strains due to CTX-M- and CMY-type as well as new VEB-1 and inhibitor-resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother. 2008; 61: 1029-1032.

Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Johnson K, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. South Med J. 2011; 104(1): 40-45.

Bado I, Gutiérrez C, García-Fulgueiras V, Cordeiro NF, Araújo Pirez L, Seija V, Bazet C, et al. CTX-M-15 in combination with *aac*(6')-Ib-cr is the most prevalent mechanism of resistance both in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*, including *K. pneumoniae* ST258, in an ICU in Uruguay. J Glob Antimicrob Resist. 2016;6:5-9.

Barthélémy M, Peduzzi J, Yaghlane B, Labia, R. Single amino acid substitution between SHV-1  $\beta$ -lactamase and cefotaxime-hydrolysing SHV-2 enzyme. FEBS Letters. 1988; 231: 217-220.

Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), disponível em:

<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

Bauernfeind A. Perspectives of beta-lactamases inhibitors in therapy of infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella* with plasmidic resistance to third-generation cephalosporins. *Infection*.1990; 18: 48-52.

Bauernfeind A., Stemplinger I, Jungwirth R, Mangold P, Amann S, Akalin E, et al. Characterization of beta-lactamase gene *bla*<sub>PER-2</sub>, which encodes an extended-spectrum class A beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*.1996; 40: 616-620.

Bennett PM. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *Br J Pharmacol*. 2008;153 Suppl 1:S347-357.

Bertini A, Poirel L, Bernabeu S, Fortini D, Villa L, Nordmann P, Carattoli A. Multicopy *bla*OXA-58 gene as a source of high-level resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:2324–2328.

Beta Lactamase Data Resources - Pathogen Detection – NCBI, disponível em: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pathogen/betalactamases/Allele.tab>

Beyrouthy R, Robin F, Hamze M, Bonnet R. IncFIIk plasmid harbouring an amplification of 16S rRNA methyltransferase-encoding gene *rmtH* associated with mobile element ISCR2. *J Antimicrob Chemother*. 2017;72(2):402-406.

Bonnet R, Sampaio JLM, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viillard JL, e al. A novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44(7): 1936-1942.

Bonnet R. Growing Group of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: the CTX-M Enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1): 1-14.

Bonnin RA, Nordmann P, Carattoli A, Poirel L. Comparative genomics of IncL/M-type plasmids: evolution by acquisition of resistance genes and insertion sequences. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):674-676.

Bonnin RA, Nordmann P, Potron A, Lecuyer H, Zahar JR, Poirel L. Carbapenem-Hydrolyzing GES-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(1): 349-354.

Bradford PA. Extended-Spectrum  $\beta$  -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001; 14(4): 933-951.

Brisse S, Passet V, Grimont PA. Description of *Klebsiella quasipneumoniae* sp. nov., isolated from human infections, with two subspecies, *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* subsp. nov. and *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* subsp. nov., and demonstration that *Klebsiella singaporensis* is a junior heterotypic synonym of *Klebsiella variicola*. *J Syst Evol Microbiol.* 2014; 64:3146–3152.

Brisse S, van Himbergen T, Kusters K, Verhoef J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. *Clin Microbiol Infect.* 2004; 10:942–945.

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Microbial Genetics: Plasmids. In: *Biology of Microorganisms*. New Jersey: Englewood Cliffs; 1994. p. 259-261.

Bueno MF, Francisco GR, Cerdeira L, lenne S, Souza TA, Lincopan N, de

Oliveira Garcia D. Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from a cystic fibrosis patient. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;8:106-107.

Bueno MFC, Francisco GR, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing rmtD1 and rmtD2 16S rRNA methyltransferase genes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60:1928–1931.

Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(5):2397-2400.

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989a. 33: 264-270.

Bush K. Classification of beta-lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3 and 4. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989b. 33: 271-276.

Bush K. Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin Microbiol Infect*. 2008; 14(5): 21-24.

Bush K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. *Critical Care*. 2010;14:224.

Busk K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Houvinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 894-896.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 36(6): 1211-1233.

Bush K & Jacoby GA. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010; 54(3): 969-976.

Cabral AB, Melo RCA, Maciel MAV, Lopes ACS. Multidrug resistance genes, including *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012; 45(5): 572-578.

Cantón R, Novais A, Valverde A, Machado E, Peixe L, Baquero F, et al. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14(5): 21-24.

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 413-431.

Carattoli A. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(6):2227-2238.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005; 63: 219-228.

Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One.* 2015;10(5):e0123063.

Carmo Junior NV, Filho HF, Gomes e Costa DA, Calvalcante AJ, de Oliveira Garcia D, Furtado JJ. First report of a NDM-producing *Providencia rettgeri* strain in the state of São Paulo. *Braz J Infect Dis.* 2015;19(6):675-676.

Carraro N, Matteau D, Burrus V, Rodrigue S. Unraveling the regulatory

network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mob Genet Elements*. 2015;5(3):1-5.

Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(2):249-51.

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TGP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 2956-2957.

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TGP, et al. Detection of NDM-1, CTX-M-15 and qnr-B4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(4): 2475-2476.

Casella T, Rodríguez MM, Takahashi JT, Ghiglione B, Dropa M, Assunção E, Nogueira ML, Lincopan N, Gutkind G, Nogueira MC. Detection of blaCTX-M-type genes in complex class 1 integrons carried by *Enterobacteriaceae* isolated from retail chicken meat in Brazil. *Int J Food Microbiol*. 2016;197:88-91.

Castanheira M, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. *Microb Drug Resist*. 2010;16(1):61-5.

Cayô R, Rodrigues-Costa F, Matos AP, Carvalhoes CG, Jové T, Gales AC. Identification of a new integron harboring blaIMP-10 in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:3687–3689.

Center for Genomic Epidemiology. Resfinder 2.1, disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/>

Center for Genomic Epidemiology. PlasmidFinder 1.3, disponível em: <https://cge.cbs.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>

Cergole-Novella MC, Guth BEC, Castanheira M, Carmo MS, Pignatari ACC. First Description of *bla*<sub>CTX-M-14</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub>-Producing *Escherichia coli* Isolates in Brazil. *Microbial Drug Resistance*. 2010; 16(3): 177-184.

Chagas TPG, Alves RM, Vallim DC, Seki LM, Campos LC, Asensi MC. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011; 15(5):420-425.

Chin CS, Alexander DH, Marks P, Klammer AA, Drake J, Heiner C, Clum A, Copeland A, Huddleston J, Eichler EE, Turner SW, Korlach J. Nonhybrid, finished microbial genome assemblies from long-read SMRT sequencing data. *Nat Methods*. 2013 Jun;10(6):563-9.

Chroma M, Kolar M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Biomed Pap Med Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2010; 164(4): 289-296.

Clímaco EC, Minarini LAR, Darini ALC. CTX-M–producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? *Diag Microbiol Infect Dis*. 2010; 68:186-189.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-three informational supplement, M100-S23. Clinical and Laboratory Institute; Wayne, PA. 2013.

Clustal Omega, disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

Coque T, Novais MA, Carattoli A, Poirel L, Pitout J, Peixe L, et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum  $\beta$ -lactamase CTX-M-15. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 195-200.

Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini M. Metallo- $\beta$ -lactamases: a last frontier for  $\beta$ -lactams?. *Lancet Infect Dis*. 2011; 11: 381-393.

Corrêa JC & Correa VLF. Antibióticos no Dia-a-Dia. Rio de Janeiro: Rubio, 2001. P. 23-24.

Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Bauernfeind A, Füzi M. Nationwide spread of clonally related CTX-M-15-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006;25(4):275-8.

Datta N & Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. *Nature*. 1965; 208: 239-241.

Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. Discovery of a gene conferring multiple aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(6):2666-9.

de Oliveira Garcia, DO, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TMI, Leite D et al. Multiclonal Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase CTX-M-2 and Novel Variant CTX-M-59 in a Neonatal Intensive Care Unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52(5): 1790-1793.

Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard

JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 2008; 36:W465–W469.

Di DY, Jang J, Unno T, Hur HG. Emergence of *Klebsiella variicola* positive for NDM-9, a variant of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase, in an urban river in South Korea. *J Antimicrob Chemother*;72(4):1063-1067.

Diestra K., Juan C, Curiao T, Moya B, Miro´ E, Oteo J, et al. Characterization of plasmids encoding *bla*<sub>ESBL</sub> and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother.*2009; 63: 60-66.

Do Carmo Filho JR, Silva RM, Castanheira M, Tognim MCB, Gales AC, Sader HS. Prevalence and Genetic Characterization of *bla*<sub>CTX-M</sub> Among *Klebsiella pneumoniae* Isolates Collected in an Intensive Care Unit in Brazil. *J Chemother.* 2008; 20(5): 600-603.

Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. Genetic Enviroment of 16S rRNA Methylase Gne *rmtD*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008b;52(6): 2270-2272.

Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. *Escherichia coli* isolate coproducing 16S rRNA Methylase and CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase isolated from an outpatient in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008c;52(3):1204-5.

Doi Y & Arakawa Y. 16S Ribosomal RNA Methylation: Emerging Resistance Mechanism against Aminoglycosides. *Antimicrob Resist.* 2007;45: 88-94.

Doi Y, Garcia DO, Adams J, Paterson DL. Coproduction of Novel 16S rRNA Methylase *RmtD* and Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 in a Pan resistant

*Pseudomonas aeruginosa* Isolate from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2007a; 51(3): 852-856.

Doi Y, Ghilard ACR, Garcia DO, Adams J, Paterson DL. High Prevalence of Metallo- $\beta$ -Lactamase and 16S rRNA Methylase Coproduction among Imipenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2007b; 51(9): 3388-3390.

Doi Y, Paterson DL. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Semin Respir Crit Care Med. 2015;36(1):74-84.

Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. Infect Dis Clin North Am. 2016;30(2):523-537.

Doi Y, Wachino J, Arakawa Y. Nomenclature of Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylases Responsible for Pan aminoglycoside Resistance. Antimicrob Agents Chemother. 2008a; 52(6): 2287-2288.

dos Santos N, Garcia D, Bueno MF, Francisco G. Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* producing RmtB, KPC and CTX-M in hospitals of São Paulo State, Brazil. In: 27<sup>o</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2017; Abril 22-25. Viena, Austria.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Mamizuka EM, Murakami T, Cassettari VC, et al. Extended spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil Rev Inst Med Trop. 2009; 51(4): 203-209.

Dropa M, Balsalobre LC, Lincopan N, Matté GR, Matté MH. Complex class 1 integrons harboring CTX-M-2-encoding genes in clinical *Enterobacteriaceae* from a hospital in Brazil. J Infect Dev Ctries. 2015;9(8):890-897.

Dropa M, Lincopan N, Balsalobre LC, Oliveira DE, Moura RA, Fernandes MR, da Silva QM, Matté GR, Sato MI, Matté MH. Genetic background of novel sequence types of CTX-M-8- and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from public wastewater treatment plants in São Paulo, Brazil. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2016;23(5):4953-4958

Dropa M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*<sub>SHV-40</sub>, *bla*<sub>TEM-116</sub> and the class 1 integron associated *bla*<sub>GES-7</sub>, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16(6): 630-632.

Eldestein M, Pimkin M, Palagin I, Eldestein I and Stratchounski L. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3724-3732.

Eller C, Leistner R, Guerra B, Fischer J, Wendt C, Rabsch W, et al. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) CTX-M-8 in Germany. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(2):562-4.

Elliott AG, Ganesamoorthy D, Coin L, Cooper MA, Cao MD. Complete Genome Sequence of *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Strain ATCC 700603. *Genome Announc.* 2016;4(3)

Escobar Pérez JÁ, Olarte Escobar NM, Castro-Cardozo B, Valderrama Márquez IA, Garzón Aguilar MI, de La Berrera LM, et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013, 57(4):1957-1960.

Essack SY, Hall LMC, Pillay DG, McFadyen ML, Livermore DM. Complexity and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001; 45: 88-95.

Fehlberg LCC, Carvalho AMC, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16(6): 577-580.

Feng J, Qiu Y, Yin Z, Chen W, Yang H, Yang W, et al. Coexistence of a novel KPC-2-encoding MDR plasmid and an NDM-1-encoding pNDMHN380 like plasmid in a clinical isolate of *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:2987-91.

Fernandes SA, Camargo CH, Francisco GR, Bueno MF, Garcia DO, Doi Y, Tiba Casas MR. Prevalence of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases CTX-M-8 and CTX-M-2-Producing *Salmonella* Serotypes from Clinical and Nonhuman Isolates in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2016;[Epub ahead of print]

Fernández-Alarcón C, Singer RS, Johnson TJ. Comparative genomics of multidrug resistance-encoding IncA/C plasmids from commensal and pathogenic *Escherichia coli* from multiple animal sources. *PLoS One*. 2011;6(8):e23415.

Filgona J, Banerjee T, Anupurba S. Incidence of the novel *rmtF* and *rmtG* methyltransferases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* from a hospital in India. *J Infect Dev Ctries*. 2015;9(9):1036-1039.

Fonseca EL, Ramos ND, Andrade BG, Morais LL, Marin MF, Vicente AC. A one-step multiplex PCR to identify *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae* in the clinical routine. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017;87(4):315-317.

Fonseca EL, Viera VV, Cipriano R, Vicente ACP. Emergence of *bla*<sub>GES-5</sub> in clinical colistin-only sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 59(3): 576-577.

Fontes LC, Neves PR, Oliveira S, Silva KC, Hachich EM, Sato MIZ, et al. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* Coproducing Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 and 16S rRNA Methylase RmtD1 in an Urban River. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6): 3063-3064.

Francisco GR, Nora ST, Bueno MF, da Silva Filho LV, de Oliveira Garcia D. Identification of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing RmtG 16S rRNA methyltransferase in a cystic fibrosis patient. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2967-2968.

Franco MR, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F: Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian university hospital. *Clinics.* 2010, 65(9): 825-829.

Frase H, Smith CA, Toth M, Champion MM, Mobashery S, Vakulenko SB. Identification of products of inhibition of GES-2  $\beta$ -lactamase by tazobactam by X-ray crystallography and spectrometry. *J Biol Chem.* 2011; 286: 14396-14409.

Freire MP, de Oliveira Garcia D, Cury AP, Spadão F, Di Gioia TS, Francisco GR, Bueno MF, et al. Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* among kidney transplant recipients. *J Antimicrob Chemother.* 2016;71(9):2577-85.

Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(5):1843-1845.

Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek university hospital. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(3):52-4

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *J Antimicrob Chemother.* 2003; 52: 699-702.

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jul;56(7):3960-2.

Galimand M, Courvalin P, Lambert T. Plasmid-Mediated High-Level Resistance to Aminoglycosides in Enterobacteriaceae Due to 16S rRNA Methylation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(8): 2565-2571.

Gan HM, Rajasekaram G, Eng WWH, Kaniappan P, Dhanoa A. Whole-Genome Sequences of Two Carbapenem-Resistant *Klebsiella quasipneumoniae* Strains Isolated from a Tertiary Hospital in Johor, Malaysia. *Genome Announc.* 2017 Aug 10;5(32).

Garcia DO, Abboud CS, Doy C, Saraiva CR, Pereira GH. Interhospital dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in São Paulo City, Brazil- first report. In: 50th Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother; 2010 setembro 12-15. Boston.

García-Fulgueiras V, Bado I, Mota MI, Robino L, Cordeiro NF, Varela A, et al. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and plasmid-mediated quinolone resistance in enterobacterial clinical isolates in the paediatric hospital of Uruguay. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(8):1725-9.

Garneau-Tsodikova S & Labby KJ. Mechanisms of Resistance to Aminoglycoside Antibiotics: Overview and Perspectives. *Medchemcomm.* 2016;7(1):11-27.

Garrido A, Seral C, Gude MJ, Casado C, González-Domínguez M, Sáenz Y, et al. Characterization of Plasmid-Mediated  $\beta$ -Lactamases in Fecal Colonizing Patients in the Hospital and Community Setting in Spain. *Microb Drug Resist.* 2013.

Garza-Ramos U, Silva-Sánchez J, Catalán-Nájera J, Barrios H, Rodríguez-Medina N, Garza-González E, et al. Draft Genome Sequence of a Hypermucoviscous Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-Producing *Klebsiella quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* Clinical Isolate. *Genome Announc.* 2016;4(4):1-2.

Giedraitienė A, Vitkauskienė A, Naginienė R, Pavilionis A. Antibiotic Resistance Mechanisms of Clinically Important Bacteria. *Medicina (Kaunas).* 2011; 47(3): 137-146.

Girlich D, Poirel L, Leelaporn A, Karim A, Tribuddharat C, Fennewald M, Nordmann P. Molecular epidemiology of the integrin located VEB-1 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in nosocomial enterobacterial isolates in Bangkok, Thailand. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 175-182.

Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, Verbruggen AM, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(2): 168-172.

Glupczynski Y, Jousset A, Evrard S, Bonnin RA, Huang TD, Dortet L, et al. Prospective evaluation of the OKN K-SeT assay, a new multiplex immunochromatographic test for the rapid detection of OXA-48-like, KPC and NDM carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2017 Jul 1;72(7):1955-1960.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: Importância

terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim Nova*. 2010; 33(3): 667-679.

Gutmann L, Ferré B, Goldstein FW, Rizk N, Pinto-Schuster E, Acar JF, et al. SHV-5, a Novel SHV-Type  $\beta$ -Lactamase That Hydrolyzes Broad-Spectrum Cephalosporins and Monobactams. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989; 33(6): 951-956.

Hæggman S, Löfdahl S, Paauw A, Verhoef J, Brisse S. Diversity and evolution of the class A chromosomal beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2004; 48:2400–2408.

Habeeb MA, Haque A, Nematzadeh S, Iversen A, Giske CG. High prevalence of 16S rRNA methylase RmtB among CTX-M extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* from Islamabad, Pakistan. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(6):524-6.

Harada S, Ishii Y, Yamaguchi K. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. *Korean J Lab Med*. 2008; 28: 401-412.

Harmer CJ & Hall RM. IS26-Mediated Precise Excision of the IS26-*aphA1a* Translocatable Unit. *MBio*. 2015;6(6):e01866-15.

Hawkey PM. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. *Br J Pharmacol*. 2008; 153: 406-413.

He S, Hickman AB, Varani AM, Siguier P, Chandler M, Dekker JP, Dyda F. Insertion sequence IS26 reorganizes plasmids in clinically isolated multidrug-resistant bacteria by replicative transposition. *mBio*. 2015;6:e00762-15.

Heritage J, M'zali FH, Gascoyne-Binzi D, Hawkey PM. Evolution and spread

of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria. J Antimicrob Chemother. 1999; 44: 309-318.

Hidalgo L, Hopkins KL, Gutierrez B, Ovejero CM, Shukla S, Douthwaite S, et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in *Enterobacteriaceae* isolated in India and the UK. J Antimicrob Chemother. 2013 Jul;68(7):1543-50.

Holt KE, Wertheim H, Zadoks RN, Baker S, Whitehouse CA, Dance D et al. Genomic analysis of diversity, population structure, virulence, and antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae*, an urgent threat to public health. Proc Natl Acad Sci USA. 2015;112(27):3574-81.

Hrabak J, Empel J, Gniadkowski M, Halbhuber Z, Rebl K, Urbaskova P. CTX-M-15-producing *Shigella sonnei* strain from a Czech patient who traveled in Asia. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2147-2148.

Hu F, Munoz-Price LS, DePascale D, Rivera JI, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(8):4980-4981.

Iida S, Mollet B, Meyer J, Arber W. Functional characterization of the prokaryotic mobile genetic element IS26. Mol Gen Genet. 1984;198(2):84-89. IS Finder, disponível em: [www-is.biotoul.fr](http://www-is.biotoul.fr)

Jacoby GA. Extended-spectrum beta-lactamases and other enzymes providing resistance to oxyimino-beta-lactams. Infect Dis Clin. 1997; 11: 875-887.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum  $\beta$ -lactamases conferring transferable resistance to newer  $\beta$ -lactam agents in

*Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. Rev Infect Dis. 1988; 10: 867-878.

Jeon BC, Jeong SH, Bae IK, Kwon SB, Lee K, Young D, et al. Investigation of a Nosocomial Outbreak of Imipenem-Resistant *Acinetobacter baumannii* Producing the OXA-23  $\beta$ -Lactamase in Korea. J of Clin Microbiol. 2005; 43(5): 2241-2245.

Jin JS, Kwon KT, Moon DC, Lee JC. Emergence of 16S rRNA methylase *rmtA* in colistin-only-sensitive *Pseudomonas aeruginosa* in South Korea. Int J Antimicrob Agents. 2009;33(5):490-491.

Johnson TJ & Lang KS. IncA/C plasmids: An emerging threat to human and animal health? Mob Genet Elements. 2012;2(1):55-58.

Kang HT, Kim KY, Kim J, Lee JC, Lee YC, Cho DT, et al. Distribution of Conjugative-Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase Genes among Amikacin-Resistant *Enterobacteriaceae* Isolates Collected in 1995 to 1998 and 2001 to 2006 at a University Hospital in South Korea and Identification of Conjugative Plasmids Mediating Dissemination of 16S rRNA Methylase. J Clin Microbiol. 2008; 46(2): 700-706.

Kassis-Chikhani N, Frangeul L, Drieux L, Sengelin C, Jarlier V, Brisse S, et al. Complete nucleotide sequence of the first KPC-2- and SHV-12-encoding IncX plasmid, pKpS90, from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2013 Jan;57(1):618-20.

Kawamura K, Goto K, Nakane K, Arakawa Y. Molecular epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and *Escherichia coli* isolated from retail foods including chicken meat in Japan. Foodborne Pathog Dis. 2014;11(2):104-10.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3365-3370

Kubasova T, Cejkova D, Matiasovicova J, Sekelova Z, Polansky O, Medvecký M, et al. Antibiotic Resistance, Core-Genome and Protein Expression in IncHI1 Plasmids in *Salmonella Typhimurium*. *Genome Biol Evol.* 2016 Jun 13;8(6):1661-71.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:597-602.

Lahlaoui H, Poirel L, Moussa MB, Ferjani M, Omrane B, Nordmann P. Nosocomial dissemination of extended spectrum  $\beta$ -lactamase VEB-1a-producing *Providencia stuartii* isolates in a Tunisian Hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011; 30: 1267-1270.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(7): 1584-1590.

Lee CS, Hu F, Rivera JI, Doi Y. *Escherichia coli* sequence type 354 coproducing CMY-2 cephalosporinase and RmtE 16S rRNA methyltransferase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(7):4246-4247.

Lee H, Yong D, Yum JH, Roh KH, Lee K, Yamane K, Arakawa, et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea.

Diagn Microbiol Infect Dis.2006; 56: 305–312.

Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 beta-lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 beta-lactamase gene. J Antimicrob Chemother. 2006; 57(6): 1259-1261.

Lewis JS 2nd, Herrera M, Wickes B, Patterson JE, Jorgensen JH. First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. Antimicrob Agents Chemother. 2007 Nov;51(11):4015-21. Epub 2007 Aug 27. Erratum in: Antimicrob Agents Chemother. 2008 Feb;52(2):810.

Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A Review of SHV Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. Front Microbiol. 2016 Sep 5;7:1374.

Liu Y, Li XY, Wan LG, Jiang WY, Yang JH, Li FQ. Acquisition of carbapenem resistance in multiresistant *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 11 at a university hospital in China. Diagn Microbiol Infect Dis. 2013;76(2):241-3.

Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly?. J Antimicrob Chemother. 2012a; 67: 1569-1577.

Livermore DM. Fourteen years in resistance. Int J Antimicrob Agents.2012b; 39: 283- 294.

Livermore DM.  $\beta$ -lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. Clin Microbiol Rev. 1995; 8(4): 557-584.

Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla<sub>VIM-1</sub>*. J Antimicrob Chemother. 2006;58:669–672.

Long SW, Linson SE, Ojeda Saavedra M, Cantu C, Davis JJ, Brettin T, Olsen RJ. Wholegenome sequencing of human clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates reveals misidentification and misunderstandings of *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella variicola*, and *Klebsiella quasipneumoniae*. mSphere.2017;2(4):1-15.

Lopes ACS, Veras DL, Lima AMS, Melo RCA, Ayala J. *bla<sub>CTX-M-2</sub>* and *bla<sub>CTX-M-28</sub>* extended-spectrum  $\beta$ -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2010; 105(2): 163-167.

Maatallah M, Vading M, Kabir MH, Bakhrouf A, Kalin M, Nauc ler P, Brisse S, Giske CG. *Klebsiella variicola* is a frequent cause of bloodstream infection in the Stockholm area, and associated with higher mortality compared to *K. pneumoniae*. PLoS One.2014;9(11):2-21.

Magnet S & Blanchard JS. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. Chemical Reviews. 2005; 105(2): 477-497.

Mahenthalingam E, Bischof J, Byrne SK, Radomski C, Davies JE, Av-Gay Y, et al. DNA-Based Diagnostic Approaches for Identification of *Burkholderia cepacia* Complex, *Burkholderia vietnamiensis*, *Burkholderia multivorans*, *Burkholderia stabilis*, and *Burkholderia cepacia* Genomovars I and III. J Clin Microbiol. 2000; 38(9):3165-3173.

Maltezou HC. Metallo- $\beta$ -lactamases in Gram-negative bacteria: introducing the era of pan-resistance?. Int J Antimicrob Agents.2009; 33: 405–405.

Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamase in hospitals from southern Brazil. *Infection*. 2007; 35(6):457-460.

Martins WMBS & Gales AC. Frequent Tn2 Misannotation in the Genetic Background of *rmtB*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8):811-17.

Mataseje LF, Boyd DA, Lefebvre B, Bryce E, Embree J, Gravel D, et al. Complete sequences of a novel bla<sub>NDM-1</sub>-harbouring plasmid from *Providencia rettgeri* and an FII-type plasmid from *Klebsiella pneumoniae* identified in Canada. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69(3):637-42.

Mathers AJ, Peirano G, Pitout JDD. The Role of Epidemic Resistance Plasmids and International HighRisk Clones in the Spread of Multidrug-Resistant *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Ver*. 2015;28(3):565-591.

Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-β-lactamase gene, *bla*<sub>IMP-16</sub>, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'* report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004; 48: 4693-4702.

Minarini LAR, Poirel L, Trevisani NAC, Darini ALC, Nordmann P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009. 65: 202–206.

Molecular Info. Molecular Techniques & Methods: Plasmids Maps pBCSK-, disponível em: <http://www.molecularinfo.com/MTM/K/K2/K2-1/pBCSK-.pdf>

Mollet C, Drancourt M, Raoult D. *rpoB* sequence analysis as a novel basis for bacterial identification. *Mol Microbiol*. 1997;26(5):1005-1011.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(1): 333-334.

Muzaheed, Doi Y, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad SM, et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 1393-1394.

Naas T, Bentchouala C, Cuzon G, Yaou S, Lezzar A, Smati F, Nordmann P. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;38(2):135-9.

Naas T, Namdari F, Réglie-Poupet H, Poyart C, Nordmann P. Panresistant extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing *Acinetobacter baumannii* from New York City. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Nov;60(5):1174-6.

Nasser U & Sundsfjord A. The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones. *Microbial Drug Resistance.* 2010; 17(1): 83-97.

Naves ZVF; Tonon LS; Ogassawara CT; Garcia DO. Rapid dissemination of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in several hospitals in Great São Paulo, Brazil. In: 4th Congress of European Microbiologists; 2011 Junho 26-30. Genebra, Suíça.

NEB Cutter, disponível em: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>

Nogueira KS, Conte D, Maia FV, Dalla-Costa LM. Distribution of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. *Rev Soc Bras*

Med Trop. 2015;48(2):162-169.

Nogueira KS, Daur AV, Reason ITM, Gales AC, Costa LMD. Cefepime versus extended spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. Braz J Infect Dis. 2011; 15(2):167-169.

Nogueira KS, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Reason ITM, Silva MJ, et al. Emergence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacter* spp. In patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2014;32(2):87–92.

Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V; European Network on Carbapenemases. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Clin Microbiol Infect. 2012;18(5):432-438.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. 2011; 17(10): 1791-1798.

Nordmann P & Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase - producing *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2013; 68: 487-489.

Normark BH & Normark S. Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med. 2002;252(2):91-106.

NOTA TÉCNICA N.º 01/2013. Medidas e prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Brasília, DF. 2013.

Nüesch-Inderbinen MT, Kayser FH, Hächler H. Survey and molecular genetics of SHV beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Switzerland: two novel enzymes, SHV-11 and SHV-12. Antimicrob Agents Chemother.

1997;41(5):943-9.

O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP, Doi Y. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2413-6

Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch J, Dropa M, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11(ST437 and ST340) in urban Rivers. *J Antimicrob Chemother.* 2014: 849-852.

Open Reading Frame (ORF) Finder, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>

Ote I, Bogaerts P, Denorme L, Borlon C, Thunissen C, Glupczynski Y, et al. Development of a novel immunochromatographic confirmatory test for the detection of OXA-48 carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. In: 25<sup>o</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2015; Copenhagen, Denmark.

Oteo J, Orden B, Bautista V, Cuevas O, Arroyo M, Martínez-Ruiz R, et al. CTX-M-15-producing urinary *Escherichia coli* O25b-ST131-phylogroup B2 has acquired resistance to fosfomicin. *J Antimicrob Chemother.* 2009;64(4):712-7.

Pallecchi L, Bartoloni A, Fiorelli C, Mantella A, Di Maggio T, Gamboa, et al. Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(8): 2720-2725.

Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO). Epidemiological Update: Carbapenemases of type New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase (NDM). 2014

Pasteran F, Denorme L, Ote I, Gomez S, De Belder D, Glupczynski Y et al. Rapid identification of OXA-48 and OXA-163 subfamilies in carbapenem-resistant Gram-negative bacilli with a novel immunochromatographic lateral flow assay. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 2832-6.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14: 117-1180.

Partridge SR. Analysis of antibiotic resistance regions in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*. 2011;35(5):820-855.

Partridge SR, Tsafnat G, Coiera E, Iredell JR. Gene cassettes and cassette arrays in mobile resistance integrons. *FEMS Microbiol Rev*. 2009;33(4):757-784.

Patel G & Bonomo RA. "Stormy waters ahead": Global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiology*.2013; 4: 1-17.

Paterson DL. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infec Control*. 2006; 34(5): 20-28.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005; 18(4): 657-686.

Paterson DL, Hujer, KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB et al. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of

SHV- and CTX-M-Type  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47: 3554-3560.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6): 2702.

Peirano G, Asensi MD, Pitonto-Silva A, Pitout JDD. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17 (7): 1039-1043.

Peirano G, Seki LM, Passos VLV, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 265–268.

Pellegrino FLP, Netto-dos Santos KR, Riley LW, Moreira BM. *bla*<sub>GES</sub> carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2006; 10(4): 251-253.

Pereira PS, Borghi M, de Araújo CFM, Aires CAM, Oliveira JCR, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59:4453– 4456.

Phylogeny.fr. Robust Phylogenetic Analysis For The Non-Specialist, disponível em: <http://www.phylogeny.fr/>

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of  $\beta$  –Lactamases Produced by Ceftazidime-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates Causing Bloodstream Infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(9): 3908-3913.

Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 796–807.

Podschun R & Ullmann U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clinical Microbiology Reviews.* 1998; 11(4): 589-603.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Analysis of the resistome of a multidrug-resistant NDM-1-producing *Escherichia coli* strain by high-throughput genome sequencing. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011a;55(9): 4224-4229.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012b; 56(1): 559-562.

Poirel L, Hértier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; 48(1): 15-22.

Poirel L, Labarca J, Bello H, Rioseco ML, Bernabeu S, Nordmann P. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;58(1):618-9.

Poirel L, Pitout JD, Calvo L, Rodriguez-Martinez JM, Church D, Nordmann P. In vivo selection of fluoroquinolone resistant *Escherichia coli* isolates expressing plasmid mediated quinolone resistance and expanded-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50: 1525–1527.

Poirel L, Potron A, Nordman P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom

menace. J Antimicrob Chemother. 2012a; 67: 1597-1606.

Poirel L, Thomas IL, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(3): 622-632.

Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemases genes. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011b; 70:119-123.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. Antimicrob Agents Chemother. 2001; 45: 2598-2603.

Poupart MC, Chanal C, Sirot D, Labia R, Sirot J. Identification of CTX-2, a novel cefotaximase from a *Salmonella mbandaka* isolate. Antimicrob Agents Chemother. 1991; 35: 1498-1500.

Power P, Galleni M, Di Conza J, Ayala JA, Gutkind G. Description of In116, the first *bla*<sub>CTX-M-2</sub>-containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. J Antimicrob Chemother. 2005;55(4):461-465.

Primer 3, disponível em: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. J Antimicrob Chemother. 2011; 66:307-312.

Quale J. Global spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. Microbe. 2008; 3(11):516-520.

Queenan AM & Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. Clin Microbiol Rev. 2007; 20(3): 440-458.

Queiroz MLP, Antunes P, Mourão J, Merquior VLC, Machado E, Peixe L. Characterization of extended-spectrum beta-lactamases, antimicrobial resistance genes, and plasmid content in *Escherichia coli* isolates from different sources in Rio de Janeiro, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2012; 74: 91–94.

Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, Gales AC, Pignatari AC. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and *armA* among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. Braz J Med Biol Res. 2015;48(2):174-177.

Quiroga MP, Arduino SM, Merkier AK, Quiroga C, Petroni A; Argentinian Integron Study Group., Roy PH, Centrón D. "Distribution and functional identification of complex class 1 integrons". Infect Genet Evol. 2013;19:88-96.

Radice M, Power P, Di CJ, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 602–604.

Ramirez MS & Tolmasky ME. Aminoglycosides Modifying Enzymes. Drug Resist Updat. 2010; 13(6): 151-171.

Ramos PIV, Picão RC, de Almeida LGP, Lima NCB, Girardello R, Vivan ACP, et al. Comparative analysis of the complete genome of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* Kp13 reveals remarkable genome plasticity and a wide repertoire of virulence and resistance mechanisms. BMC Genomics. 2014; 15(54): 1-16.

Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST), disponível em: <http://rast.nmpdr.org/>

Rasheed J, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB. Detection of KPC-2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *Klebsiella oxytoca* carrying a common plasmid. J Clin Microbiol. 2008; 46: 2066-2069.

Rocha FR, Pinto VP, Barbosa FC. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. Microb Drug Resist. 2016;22(4):301-311.

Rossi F & Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo. 2005. Ed Atheneu: 21-26.

Rossi F. The Challenges of Antimicrobial Resistance in Brazil. Antimicrobial Resistance. 2011; 52: 1138-1143.

Rossolini GM, D'Andrea MM, Mugnaioli C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect. 2008; 14: 33-41.

Sader HS, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo-beta-lactamases in latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Int J Antimicrob Agents. 2005b; 25(1): 57-61.

Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and PMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. Cin Microbiol Infect. 2005a; 11(1): 73-76.

Sampaio JLM. Consenso em detecção de resistência bacteriana aos

antimicrobianos em bacilos Gram-negativos. Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia. 2008;3:18-27.

Sampaio JLM & Gales AC. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. Braz. J. Microbiol. 2016;47S:31-37.

Sampaio JLM, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, da Silva RC, Dalarosa MG, Luz DI, Vieira FJ, Antochewis LC, Barth AL, Zavascki AP. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58(6):3566-3567.

Sanders CC & Sanders WE Jr.  $\beta$ -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clinical Infectious Diseases. 1992; 15: 824- 839.

Savic M, Lovric J, Tomic TI, Vasiljevic B, Conn GL. Determination of the target nucleosides for members of two families of 16S rRNA methyltransferases that confer resistance to partially overlapping groups of aminoglycoside antibiotics. Nucleic Acids Research. 2009; 37(16): 5420-5431.

Scarpate ECB & Cossatis JJ. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de  $\beta$ -lactamase de Epectro Estendido no ambiente hospitalar. Saúde & Amb. Rev. 2009; 4 (1): 1-11.

Sennati S, Santella G, Di Conza J, Pallecchi L, Pino M, Ghiglione B, et al. Changing epidemiology of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Argentina: emergence of CTX-M-15. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Nov;56(11):6003-5.

Seki LM, Pereira PS, Conceição MS, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis.* 2013; 17(3): 640-646.

Shaw KJ, Rather PN, Hare RS, Miller GH. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes. *Microbiol Rev.* 1993;57(1):138-163.

Siefert JL, GogartenMB, Gogarten JP, Olendzenski L. Horizontal Gene Transfer: Genome in Flux. In: *Defining the mobilome.* New York: Humana Press; 2009. P. 13-27.

Siguier P, Gourgouyere E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014;38(5):865-891.

Silva KC & Lincopan N. Epidemiologia das beta-lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. *J Bras Patol Med Lab.* 2012; 48: 91-99.

Silva KE, Cayô R, Carvalhaes CG, Sacchi FPC, Rodrigues-Costa F, da Silva ACR, Croda J, Gales AC, Simionatto S. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian teaching hospital. *J Clin Microbiol.* 2015;53:2324 –2328.

Sougakoff W, Goussard S, Gerbaud G, Courvalin P. Plasmid mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 879-884.

Sykes RB & Bush K. Physiology, biochemistry and inactivation of beta-lactamases. In R. B. Morin and M. Gorman (ed.). *The chemistry and biology of beta-lactam antibiotics*, vol. 3. Academic Press, London, England. 1982. p. 155–207.

The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017, disponível em <http://www.eucast.org>

Tian GB, Adams-Haduch JM, Wang HN, Doi Y. CTX-M-35 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase conferring ceftazidime resistance in *Citrobacter koseri*. Letters to the Editor / Int J Antimicrob Agents. 2010; 35: 410–416.

Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C, WHONET-Argentina Group, Low DE, et al. *rmtD2*, a New Allele of a 16S rRNAMethylase Gene, Has Been Present in Enterobacteriaceae Isolates from Argentina for More than a Decade. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55(2): 904-909.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SMP-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. J Antimicrob Chemother. 2002; 50(5):673-679.

Toleman MA & Walsh TR. Combinatorial events of insertion sequences and ICE in Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2011; 35:912-935.

Tollentino F, Garcia D, Francisco G, Bueno MF, Nogueira M. Co-production of 16S ribosomal RNA methyltransferase RmtB with KPC and CTX-M-14 in *Klebsiella pneumoniae* in Sao Paulo State, Brazil, from 2011 to 2014. In: 25<sup>o</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases; 2015; Abril 25-28. Copenhagen, Dinamarca.

Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mamizuka EM, et al. High Prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> Extended Spectrum Beta-lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First Report of *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-31</sub>, *bla*<sub>SHV-38</sub> and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in Brazil. Microb Drug Resist. 2011; 17(1): 7-16.

Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Microbiol Infect Dis*. 2010; 29(7): 765-769.

Tsai Y, Liou C, Fung C, Lin J, Siu LK. Single or in Combination Antimicrobial Resistance Mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to Varied Susceptibility to Different Carbapenems. *PLOS ONE*. 2013; 8(11): 1-8.

Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and Other *Enterobacteriaceae*: an Evolving Crisis of Global Dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012; 25(4): 682-707.

Understanding Accuracy in SMRT® Sequencing, disponível em: [http://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective\\_UnderstandingAccuracySMRTSequencing.pdf](http://www.pacb.com/wp-content/uploads/2015/09/Perspective_UnderstandingAccuracySMRTSequencing.pdf)

Veron M. Nutrition et taxonomie des Enterobacteriaceae et bactéries voisines. I. Méthode d'étude des auxanogrammes. *Ann Inst Pasteur Microbiol*.1975; 126A, 267–274.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*.2006; 50: 2880-2882.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, and the Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*.2007; 51: 1553-1555.

Villegas MV, Kattan JN, Quinteros MG, Casellas JM. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin Microbiol Infect.* 2008; 14 (Suppl. 1): 154–158.

von Wintersdorff CJ, Penders J, van Niekerk JM, Mills ND, Majumder S, van Alphen LB, et al. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Front Microbiol.* 2016;7:173

Wachino J & Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: An update. *Drug Resist Updat.* 2012; 15: 133-148.

Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, et al. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA m1A1408 Methyltransferase, NpmA, Found in a Clinically Isolated *Escherichia coli* Strain Resistant to Structurally Diverse Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007; 51(12): 4401-4409.

Wachino J, Yamane K, Shibayama K, Kurokawa H, Shibata N, Suzuki S, et al. Novel Plasmid-Mediated 16S rRNA Methylase, RmtC, Found in a *Proteus mirabilis* Isolate Demonstrating Extraordinary High-Level Resistance against Various Aminoglycosides. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(1): 178-184.

Walther-Rasmussen J & Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(3): 470-482.

Wareham DH, Shah R, Betts JW, Phee LM, Momin MH. Evaluation of an immunochromatographic lateral flow assay (OXA-48 K-SeT) for rapid detection of OXA-48 like carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2016; 54: 471–3.

Woodford N, Turton JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev.* 2011; 35: 736–755.

Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiology Letters.* 2000; 184:53-56.

Yamane K, Rossi F, Barberino MGMA, Adams-Haduch JM, Doi Y, Paterson DL. 16S ribosomal RNA methylase RmtD produced by *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(3): 746–747.

Yamane K, Wachino J, Suzuki S, Shibata N, Kato H, Shibayama K, et al. 16S rRNA Methylase-producing Gram-negative Pathogens, Japan. *Emerg Infect Dis.* 2007; 13(4): 642-646.

Yokoyama K, Doi Y, Yamane K, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. *Lancet.* 2003; 362: 1888-1893.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*<sub>(NDM-1)</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5046-5054.

Yu FY, Yao D, Pan JY, Chen C, Qin Z, Parsons C, et al. High prevalence of plasmid-mediated 16S rRNA methylase gene *rmtB* among *Escherichia coli* clinical isolates from a Chinese teaching hospital. *BMC Infect Dis.* 10:184, 2010.

Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(1):443-6

Zhang J, Zhou K, Zheng B, Zhao L, Shen P, Ji J, et al. High Prevalence of ESBL-Producing *Klebsiella pneumoniae* Causing Community-Onset Infections in China. *Front Microbiol.* 2016;7:1830.

Zhou Y, Yu H, Guo Q, Xu X, Ye X, Wu S et al. Distribution of 16S rRNA methylases among different species of Gram-negative bacilli with high-level resistance to aminoglycosides. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2010; 29:1349–1353.

Zienkiewicz M, Kern-Zdanowicz I, Carattoli A, Gniadkowski M, Ceglowski P. Tandem multiplication of the IS26-flanked amplicon with the *bla*<sub>SHV-5</sub> gene within plasmid p1658/97. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;341:27–36.

## ANEXOS

### ANEXO 1 – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEPIAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ  
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL  
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859 e-mail: [cepi@ial.sp.gov.br](mailto:cepi@ial.sp.gov.br)



São Paulo, 17 de fevereiro de 2012.

**Protocolo: 008/2012**

Registro CEPIAL nº 045/2011 de 05/12/11.

1º Parecer – Protocolo nº 094/2011 de 20/12/11

Projeto de Pesquisa: “Caracterização de genes de resistência em *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo”.

Pesquisador Responsável: Doroti de Oliveira Garcia

Instituição: Instituto Adolfo Lutz - IAL

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de 16 de fevereiro de 2012, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Trata-se de estudo com cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas, depositadas e catalogadas no Núcleo de Coleção de Microrganismos do Centro de Procedimentos Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz, com declaração expressa do responsável técnico pelo repositório, e não envolve dados secundários e/ou material biológico de humanos, dos quais foram obtidas.

Há declaração expressa da pesquisadora responsável, Doroti de Oliveira Garcia, no que se refere ao cumprimento das Normas de Biossegurança Internacionais da IATA para o transporte das cepas, a partir do IAL ao Laboratório na Faculdade de Medicina da Universidade de Pittsburgh, PA, EUA, sob responsabilidade do Professor Assistente Yohei Doi, o qual declarou colaborar nas etapas propostas no projeto.

Há declaração expressa do diretor geral do IAL, Dr. Alberto José da Silva Duarte, de ciência e concordância com o projeto.

*fmj*



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE  
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS  
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL

Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902  
Fone: 3068-2859 e-mail: [cepial@ial.sp.gov.br](mailto:cepial@ial.sp.gov.br)



A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em projeto similar, declarou não ser concernente a apreciação ética à luz da Resolução CNS 196/1996.

A aplicação da Resolução CNS 196/1996 e resoluções complementares no estudo com cepas de microrganismos, isoladas de material biológico humano, depositadas e catalogadas em repositório institucional, para as quais não há qualquer relação direta ou indireta com seres humanos, é uma questão a se compreender perfeitamente.

O CEPIAL deverá reunir-se com a CONEP para enunciar decisivamente o procedimento de análise de projetos de pesquisa com cepas de microrganismos isoladas, depositadas e catalogadas.

O CEPIAL aprova o projeto de pesquisa e não encaminhará para a CONEP nesse caso específico.

Luz Marina Trujillo

Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos  
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via - Coordenador  
2ª via - Diretor Geral do IAL  
3ª via - CEPIAL  
LMT/dvmp

## ANEXO 2 – PREPARO DE TAMPÕES, SOLUÇÕES E MEIOS DE CULTURA

### **SOLUÇÃO DE PURIFICAÇÃO PÓS-SEQUENCIAMENTO**

0,3mL 3M NaOAc (pH 5,3)

6.25 mL Etanol 95%

1,45 mL Água Mili-Q estéril

### **TAMPÃO DE LISE TES**

75 mM de NaCl

25 mM de EDTA

20 mM de Tris pH 7,5

### **CALDO SOC**

0,5% de Extrato de Levedura

2% de Triptona

10 mM de NaCl

2,5 mM de KCl

10 mM de MgCl<sub>2</sub>

10 mM de MgSO<sub>4</sub>

20 mM de glicose (adicionada após autoclavagem da solução)

**SOLUÇÃO “METAUX 70” (OLIGO ELEMENTOS)- M70 (PARA VERIFICAR A UTILIZAÇÃO DE FONTES DE CARBONO)**

Dissolver na ordem (com um pouco de H<sub>2</sub>O destilada):

H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	1,96 mL	0,98 mL
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,0556g	0,0278g
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,029g	0,0145g
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,022g	0,011g
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,0025g	0,00125g
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,003g	0,0015g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,007g	0,0035g
H <sub>2</sub> O dest. q.s.p estéril	1000 mL	500 mL

**Solução “Pho-Ca-Mag” (Sol. A)**

Dissolver na ordem:

CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,0147g	0,0294g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,123g	0,246g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,68g	1,36g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2,61g	5,22g
Sol. "Metaux 70"	10 mL	20 mL
H <sub>2</sub> O dest. q.s.p estéril	500 mL	1000 mL

Ajustar pH para 7,2.

**Base Azotada (Sol. B)**

Dissolver em H<sub>2</sub>O destilada:

NaCl	10g	20g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1g	2g
H <sub>2</sub> O dest. q.s.p estéril	500 mL	1000 mL

Ajustar pH para 7,2.

Juntar as Soluções A e B. Armazenar a 4°C.

Preparo dos substratos:

Preparar solução de ácido tricarbálico a 1%. Dissolver em H<sub>2</sub>O destilada. Acertar o pH para 7,0.

Para uso:

0,3 mL da solução do substrato a 1% em 3 mL de M-70

ANEXO 3 - Concentração inibitória mínima (CIM) das 100 cepas de *Klebsiella\_spp* produtoras de KPC-2 isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo no período de 2009 a 2011, no destaque em cinza estão as cepas de *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*.

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	CT/CTL	PM	AT	ETP	IP	IP/IPI	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
143/09	3	Santo André	Urina	06/09	6	2	4/0,06	1,5	24	>32	4	4/2	>32	32	1	1,5	2	6	
202/09	43	São Paulo	Sangue	09/09	128	>256	>16/0,5	64	>256	>32	24	4/2	4	>256	0,5	2	1,5	8	
259/09	17	Taboão da Serra	Urina	11/09	8	64	>16/>1	64	48	>32	>32	128/64	>32	>256	8	0,125	1,5	12	
260/09	43	São Paulo	Urina	11/09	128	>256	>16/0,5	64	>256	4	4	4/2	4	>256	0,5	2	1,5	8	
278/09	7	São Paulo	Urina	12/09	>256	>256	16/>1	32	>256	>32	>32	<4/<1	>32	>256	1	1	1,5	8	
97/10	16	Guarulhos	Sangue	06/10	12	64	8/>1	6	64	>32	6	4/1	>32	>256	2	3	0,5	1	
98/10	7	São Paulo	Sangue	06/10	128	>256	>16/>1	64	>256	>32	8	<4/<1	8	128	1	2	0,5	8	
166/10	17	Taboão da Serra	Sangue	07/10	96	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	128/>64	>32	>256	2	2	0,5	24	
266/10	27	Barueri	Sangue	09/10	12	>256	>16/>1	>256	128	>32	>32	>256/>64	>32	>256	96	1	0,75	24	
281/10	12	Diadema	Sangue	10/10	8	8	>16/>1	12	64	>32	12	<4/<1	8	128	8	1	1,5	24	
295/10	49	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	10/10	48	>256	>16/0,25	32	>256	>32	4	<4/<1	8	>256	2	2	1	24	
337/10	51	Ribeirão Preto	Secreção de ferida	11/10	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	3	1	0,19	24	
364/10	34	São Paulo	Urina	11/10	12	>256	>16/>1	256	256	>32	12	6/<4	>32	>256	64	0,75	0,38	24	
368/10	39	Jundiaí	Não Informado	11/10	12	64	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	>256	0,75	0,38	>256	>256
370/10	53	Santos	Não Informado	11/10	32	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	32/8	>32	>256	0,5	0,38	0,38	1	
392/10	54	São Paulo	Sangue	11/10	>256	>256	>16/0,125	4	6	>32	>32	>64/24	>32	12	0,5	2	0,25	12	
403/10	16	Guarulhos	Urina	12/10	64	>256	>16/>1	256	256	>32	16	<4/1	>32	256	2	2	0,5	16	
411/10	32	São Paulo	Swab axilar	12/10	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>64/32	>32	>256	2	1	0,38	16	
414/10	31	Jundiaí	Urina	12/10	>256	>256	>16/>1	>256	>256	16	16	<4/4	4	>256	1,5	1,5	0,5	12	
416/10	51	Ribeirão Preto	Urina	12/10	>256	256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>64/24	>32	>256	3	1	0,5	24	
419/10	23	Santo André	Urina	12/10	96	>256	>16/>1	>256	256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	1,5	1	8	16	
427/10	46	São José dos Campos	Urina	12/10	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>64/32	>32	>256	1,5	1	0,5	16	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	CT/CTL	PM	AT	ETP	IP	IP/IPI	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
453/10	7	São Paulo	Urina	12/10	128	>256	>16/>1	48	>256	>32	>32	<4/1,5	>32	>256	0,75	2	0,5	12	
32/11	63	São Paulo	Urina	01/11	16	>256	>16/0,38	16	128	>32	>32	<4/<1	>32	48	1,5	0,25	0,5	6	
35/11	62	São Paulo	Urina	01/11	16	>256	>16/>1	16	>256	>32	>32	<4/4	16	>256	1	2	0,5	12	
55/11	12	Diadema	Sangue	01/11	>32	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	32/>64	>32	>256	2	1	2	16	
64/11	34	São Paulo	Secreção Traqueal	01/11	128	>256	>16/>1	128	>256	>32	16	<4/2	>32	>256	>256	1	0,5	>256	>256
84/11	50	Piracicaba	Secreção Traqueal	01/11	>256	>256	>16/>1	32	>256	>32	16	6/8	>32	>256	>256	0,125	0,5	>256	>256
92/11	25	Santo André	Secreção Traqueal	01/11	192	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	64/>64	>32	>256	1	2	12	24	
107/11	37	Piracicaba	Urina	01/11	192	>256	>16/0,19	32	>256	>32	>32	<4/<1	8	96	0,75	0,5	0,25	16	
108/11	30	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	01/11	>256	32		3	32	>32	>32	<4/<1	>32	64	0,5	2	1,5	1,5	
111/11	14	Piracicaba	Sangue	01/11	128	>256	>16/0,25	32	>256	12	12	<4/2	>32	256	0,75	1	1	16	
122/11	31	Jundiá	Sangue	02/11	16	12	12/>1	6	64	>32	>32	<4/<1	>32	256	1	2	1	16	
137/11	7	São Paulo	Sangue	02/11	>256	>256	>16/>1	48	>256	>32	8	<4/2	>32	>256	0,5	0,75	0,25	12	
143/11	45	Piracicaba	Sangue	02/11	96	>256	>16/0,094	32	>256	3	>32	>256/>64	>32	>256	0,5	1	0,5	12	
145/11	47	Piracicaba	Secreção Retal	02/11	32	32	>16/0,38	12	256	>32	>32	16/16	32	>256	>256	0,125	32	>256	>256
170/11	47	Piracicaba	Urina	02/11	16	>256	>16/>1	12	96	>32	>32	<4/1,5	>32	>256	0,5	0,38	0,38	1	
180/11	42	São José dos Campos	Urina	02/11	8	2	12/>1	8	128	8	>32	<4/1	>32	256	192	1	0,38	128	
189/11	22	São Caetano do Sul	Urina	02/11	6	6	>16/>1	6	>256	>32	16	4/2	4	256	1	0,5	0,19	24	
192/11	10	Cubatão	Urina	02/11	48	>256	16/0,75	24	>256	>32	>32	4/3	12	>256	0,5	0,38	0,19	12	
194/11	56	São Paulo	Urina	02/11	16	>256	>16/0,5	6	256	>32	>32	<4/1	12	192	0,38	0,75	0,19	0,38	
197/11	4	São Caetano do Sul	Secreção Traqueal	02/11	48	>256	>16/0,38	48	256	>32	>32	<4/<1	4	96	0,75	1	0,25	16	
208/11	45	Piracicaba	Não Informado	03/11	64	>256	>16/0,25	24	>256	4	4	<4/<1	4	256	0,5	0,38	0,094	12	
216/11	7	São Paulo	Sangue	03/11	8	>256	>16/0,25	3	24	>32	>32	<4/1	4	128	0,75	1	0,25	16	
228/11	58	São Paulo	Urina	03/11	48	>256	>16/0,19	32	>256	>32	>32	16/>64	4	64	0,75	1	0,25	12	
230/11	6	Ribeirão Preto	Urina	03/11	48	128	>16/>1	48	256	>32	>32	4/0,5	>32	>256	64	0,19	0,125	8	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	CT/CTL	PM	AT	ETP	IP	IP/IPI	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
232/11	57	São Paulo	Secreção	03/11	>256	>256	>16/>1	64	>256	>32	>32	4/0,5	32	>256	1,5	1	0,19	12	
233/11	55	São Paulo	Urina	03/11	>256	>256	>16/>1	96	>256	>32	>32	4/2	>32	>256	1	1,5	0,125	12	
237/11	46	São José dos Campos	Urina	03/11	48	256	>16/>1	32	>256	>32	24	<4/1,5	>32	>256	64	0,75	0,125	16	
253/11	26	Campinas	Swab anal	03/11	8	256	>16/>1	>256	256	>32	>32	>256/48	>32	>256	>256	0,25	0,25	>256	>256
276/11	61	São Paulo	Sangue	03/11	3	256	>16/0,94	6	6	>32	>32	<4/2	4	24	0,38	1,5	0,5	8	
277/11	61	São Paulo	Urina	03/11	>256	>256	>16/>1	>256	>256	8	4	4/4	12	>256	2	2	32	24	
314/11	35	São Paulo	Sangue	03/11	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	128/>64	>32	>256	2	2	<0,06 4	12	
326/11	23	Santo André	Sangue	04/11	64	>256	>16/>1	32	>256	>32	8	<4/2	8	>256	64	8	0,19	8	
337/11	1	São Paulo	Urina	04/11	>256	>256	>16/>1	48	>256	24	8	<4/1,5	8	>256	1,5	8	0,19	16	
354/11	40	Rio Claro	Urina	04/11	>256	>256	>16/0,19	32	>256	>32	3	<4/1	2	192	1,5	0,5	0,25	6	
365/11	8	São Paulo	Sangue	04/11	128	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	256/48	>32	>256	1,5	3	2	16	
366/11	48	Cubatão	Urina	04/11	192	>256	>16/>1	128	>256	>32	4	<4/1	12	192	1,5	4	0,75	12	
404/11	28	São José dos Campos	Sangue	05/11	48	>256	>16/>1	16	>256	>32	4	<4/1,5	6	256	48	2	0,75	16	
416/11	6	Ribeirão Preto	Urina	05/11	24	32	>16/>1	8	>256	>32	16	6/2	>32	>256	>256	0,75	1	32	
417/11	51	Ribeirão Preto	Não Informado	05/11	>256	256	>16/>1	192	>256	>32	>32	96/32	>32	>256	12	2	32	24	
419/11	29	Guarulhos	Sangue	05/11	6	32	>16/>1	64	>256	>32	6	4/3	>32	>256	>256	1	1	96	
425/11	28	São José dos Campos	Ponta de catéter	05/11	128	>256	>16/>1	48	>256	16	3	>256/>64	4	>256	>256	3	0,38	>256	>256
428/11	28	São José dos Campos	Urina	05/11	128	>256	>16/>1	32	>256	>32	4	4/1,5	4	>256	128	3	2	64	
467/11	22	São Caetano do Sul	Sangue	05/11	128	>256	>16/>1	64	>256	12	>32	6/6	8	>256	1	2	1,5	12	
483/11	44	São José dos Campos	Urina	05/11	256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	8	8/12	24	>256	1,5	0,5	0,5	1,5	
488/11	52	São Paulo	Swab Vigilância	05/11	4	8	8/>1	4	24	8	6	<4/2	4	>256	128	4	1,5	32	
492/11	19	São Paulo	Sangue	05/11	24	128	>16/>1	>256	>256	>32	>32	192/>64	>32	>256	12	0,38	0,5	24	
493/11	13	São Paulo	Urina	05/11	96	256	>16/0,19	32	>256	>32	4	4/1,5	0,5	256	1,5	2	1,5	16	
513/11	65	São Bernardo do Campo	Urina	06/11	96	>256	>16/>1	64	>256	8	>32	<4/1,5	8	256	2	1	0,75	16	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	CT/CTL	PM	AT	ETP	IP	IP/IPI	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
515/11	51	São Paulo	Urina	06/11	32	>256	>16/>1	16	>256	>32	>32	12/6	>32	>256	1	0,75	0,5	0,5	
531/11	41	São José do Rio Preto	LCR	06/11	>256	>256	>16/>1	64	>256	32	32	<4/1,5	>32	>256	2	2	1,5	16	
534/11	5	São Paulo	Não Informado	06/11	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	3	1,5	1	24	
538/11	12	Diadema	Urina	06/11	128	>256	>16/>1	>256	>256	>32	32	12/4	>32	>256	2	1,5	1	8	
576/11	40	Piracicaba	Não Informado	06/11	256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	128/>64	>32	>256	>256	1,5	0,5	>256	>256
635/11	11	São Paulo	Sangue	06/11	16	128	>16/>1	24	128	>32	>32	<4/2	>32	>256	64	1	0,38	32	
641/11	11	São Paulo	Urina	06/11	12	4	>16/>1	6	192	>32	2	<4/<1	1	256	1	0,5	0,5	1	
671/11	59	São Paulo	Urina	06/11	256	>256	>16/>1	48	>256	12	>32	<4/3	4	>256	32	0,38	0,75	4	
672/11	60	São Paulo	Urina	06/11	12	8	>16/0,125	8	>256	32	4	<4/1,5	>32	>256	6	0,38	4	24	
705/11	21	São Paulo	Urina	07/11	256	>256	>16/>1	48	>256	24	32	<4/<1	32	>256	1	1,5	1,5	12	
720/11	36	São Paulo	Urina	07/11	256	>256	>16/>1	128	>256	16	4	4/2	4	>256	64	0,38	0,75	6	
740/11	24	São Paulo	Sangue	07/11	24	>256	>16/>1	32	128	6	32	<4/1,5	>32	>256	256	2	0,38	32	
749/11	13	São Paulo	Urina	07/11	64	>256	>16/0,125	24	>256	>32	8	<4/<1	>32	48	0,75	2	0,38	16	
750/11	35	São Paulo	Urina	07/11	6	128	>16/>1	31	48	16	16	<4/<1	4	96	1,5	2	1	1	
754/11	33	São Paulo	Secreção Traqueal	07/11	128	>256	>16/>1	32	>256	8	16	<4/2	4	>256	1,5	3	1,5	12	
768/11	32	São Paulo	Secreção axilar	07/11	192	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	3	2	16	32	
771/11	51	Ribeirão Preto	Urina	07/11	>256	256	>16/>1	16	>256	12	32	8/4	16	>256	96	1,5	12	32	
779/11	47	Piracicaba	Urina	07/11	128	>256	>16/0,75	32	>256	32	16	>4/2	8	>256	1	0,75	1	12	
815/11	15	São Paulo	Ponta de catéter	08/11	16	>256	>16/>1	192	192	>32	>32	24/16	>32	>256	2	1	0,75	16	
831/11	23	Santo André	Urina	08/11	128	>256	>16/0,38	32	>256	>32	8	<4/<1	4	256	2	1	6	24	
848/11	21	São Paulo	Urina	08/11	192	>256	>16/>1	48	>256	>32	4	<4/<1	>32	>256	1,5	2	1	12	
857/11	9	São Paulo	Aspirado Traqueal	08/11	128	>256	>16/>1	48	>256	2	16	<4/<1	>32	>256	1	3	1	16	
867/11	2	São Caetano do Sul	Urina	08/11	12	>256	>16/>1	64	96	>32	>32	6/12	32	>256	64	0,75	0,5	16	
870/11	65	São Bernardo do Campo	Sangue	08/11	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	>256/>64	>32	>256	>256	1	0,5	16	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	CT/CTL	PM	AT	ETP	IP	IP/IPI	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
886/11	21	São Paulo	Urina	08/11	4	2	2/>1	3	32	16	4	<4/<1	8	48	1	1,5	0,75	1,5	
892/11	18	São Paulo	Sangue	08/11	96	>256	>16/>1	>256	>256	>32	8	12/8	16	128	1,5	2	1	24	
917/11	64	São José dos Campos	Urina	08/11	24	>256	>16/>1	24	128	>32	4	<4/<1	2	48	1	4	0,38	16	
918/11	25	Santo André	Urina	08/11	128	>256	>16/>1	64	>256	>32	4	<4/<1	4	>256	2	2	24	16	
922/11	38	Taubaté	Urina	08/11	>256	>256	>16/>1	>256	>256	>32	>32	16/32	>32	>256	>256	0,19	0,5	>256	>256
1194/11	20	São Paulo	Ponta de cateter	11/11	192	>256	>16/>1	48	>256	8	8	>256/>64	4	>256	>256	0,75	0,5	>256	>256

ETP-ertapenem; IP-imipenem; IP/IPI-imipenem/imipenem com EDTA; MP -meropenem; GM-gentamicina; TGC-tigeciclina; PO-polimixina B; TM-tobramicina; AK-amicacina.

ANEXO 4 - Caracterização de betalactamases por sequenciamento das 100 cepas de *Klebsiella* spp isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo no período de 2009 a 2011, no destaque em amarelo estão as cepas de *K. variicola* e *K. quasipneumoniae*.

Cepa	N.º Hospital	Fonte de isolamento	Data	KPC	CTX-M	TEM	SHV	PER-1	GES	BES	VEB	IBC	SPM	VIM	IMP	NDM	OXA-48	METILTRANS FERASES
143/09	3	Urina	06/09	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
202/09	43	Sangue	09/09	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
259/09	17	Urina	11/09	KPC-2	CTX-M-8	TEM-1		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
260/09	43	Urina	11/09	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
278/09	7	Urina	12/09	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
97/10	16	Sangue	06/10	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
98/10	7	Sangue	06/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
166/10	17	Sangue	07/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
266/10	27	Sangue	09/10	KPC-2	CTX-M 2	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
281/10	12	Sangue	10/10	KPC-2	CTX-M 8		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
295/10	49	Secreção Traqueal	10/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
337/10	51	Secreção de ferida	11/10	KPC-2		TEM-1	SHV-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
364/10	34	Urina	11/10	KPC-2	CTX-M 2		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
368/10	39	NI	11/10	KPC-2	CTX-M-8		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtD2
370/10	53	NI	11/10	KPC-2	CTX-M 2		SHV 110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
392/10	54	Sangue	11/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
403/10	16	Urina	12/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
411/10	32	Swab axilar	12/10	KPC-2		TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
414/10	31	Urina	12/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
416/10	51	Urina	12/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
419/10	23	Urina	12/10	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
427/10	46	Urina	12/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CONTINUA

Cepa	N.º Hospital	Fonte de isolamento	Data	KPC	CTX-M	TEM	SHV	PER-1	GES	BES	VEB	IBC	SPM	VIM	IMP	NDM	OXA-48	METILTRANS FERASES
453/10	7	Urina	12/10	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
32/11	63	Urina	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
35/11	62	Urina	01/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
55/11	12	Sangue	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
64/11	34	Secreção Traqueal	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtD1
84/11	50	Secreção Traqueal	01/11	KPC-2	CTX-M 59/M8	TEM-1	SHV 110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtG
92/11	25	Secreção Traqueal	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
107/11	37	Urina	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
108/11	30	Secreção Traqueal	01/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
111/11	14	Sangue	01/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
122/11	31	Sangue	02/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
137/11	7	Sangue	02/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
143/11	45	Sangue	02/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
145/11	47	Secreção Retal	02/11	KPC-2	CTX-M 59/M8	TEM-1	SHV-110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtG
170/11	47	Urina	02/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
180/11	42	Urina	02/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
189/11	22	Urina	02/11	KPC-2		TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
192/11	10	Urina	02/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
194/11	56	Urina	02/11	KPC-2		TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
197/11	4	Secreção Traqueal	02/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
208/11	45	NI	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
216/11	7	Sangue	03/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
228/11	58	Urina	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
230/11	6	Urina	03/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
232/11	57	Secreção	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CONTINUA

Cepa	N.º Hospital	Fonte de isolamento	Data	KPC	CTX-M	TEM	SHV	PER-1	GES	BES	VEB	IBC	SPM	VIM	IMP	NDM	OXA-48	METILTRANS FERASES
233/11	55	Urina	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
237/11	46	Urina	03/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
253/11	26	Swab anal	03/11	KPC-2	CTX-M-8		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtD2
276/11	61	Sangue	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
277/11	61	Urina	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
314/11	35	Sangue	03/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
326/11	23	Sangue	04/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
337/11	1	Urina	04/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
354/11	40	Urina	04/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
365/11	8	Sangue	04/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
366/11	48	Urina	04/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
404/11	28	Sangue	05/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
416/11	6	Urina	05/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
417/11	51	NI	05/11	KPC-2	CTX-M-8	TEM-1	SHV-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
419/11	29	Sangue	05/11	KPC-2		TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
425/11	28	Ponta de catéter	05/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
428/11	28	Urina	05/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
467/11	22	Sangue	05/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
483/11	44	Urina	05/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
488/11	52	Swab Vigilância	05/11	KPC-2		TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
492/11	19	Sangue	05/11	KPC-2	CTX-M-8	TEM-1	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	‡	
493/11	13	Urina	05/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
513/11	65	Urina	06/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
515/11	51	Urina	06/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
531/11	41	LCR	06/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

CONTINUA

Cepa	N.º Hospital	Fonte de isolamento	Data	KPC	CTX-M	TEM	SHV	PER-1	GES	BES	VEB	IBC	SPM	VIM	IMP	NDM	OXA-48	METILTRANS FERASES
534/11	5	NI	06/11	KPC-2	CTX-M2/M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
538/11	12	Urina	06/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
576/11	40	NI	06/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
635/11	11	Sangue	06/11	KPC-2	CTX-M15/M2	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
641/11	11	Urina	06/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
671/11	59	Urina	06/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
672/11	60	Urina	06/11	KPC-2	CTX-M-8		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
705/11	21	Urina	07/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
720/11	36	Urina	07/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
740/11	24	Sangue	07/11	KPC-2	CTX-M 2	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
749/11	13	Urina	07/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
750/11	35	Urina	07/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
754/11	33	Secreção Traqueal	07/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
768/11	32	Secreção axilar	07/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
771/11	51	Urina	07/11	KPC-2	CTX-M 35	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
779/11	47	Urina	07/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
815/11	15	Ponta de catéter	08/11	KPC-2	CTX-M 2		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
831/11	23	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
848/11	21	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
857/11	9	Aspirado Traqueal	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
867/11	2	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M 2	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
870/11	65	Sangue	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
886/11	21	Urina	08/11	KPC-2			SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
892/11	18	Sangue	08/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
917/11	64	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CONTINUA

Cepa	N.º Hospital	Fonte de isolamento	Data	KPC	CTX-M	TEM	SHV	PER-1	GES	BES	VEB	IBC	SPM	VIM	IMP	NDM	OXA-48	METILTRANS FERASES
918/11	25	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M15		SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
922/11	38	Urina	08/11	KPC-2	CTX-M 2	TEM-1	SHV-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtG
1194/11	20	Ponta de catéter	11/11	KPC-2	CTX-M15	TEM-1	SHV-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	RmtG

ANEXO 5- Resultados das provas bioquímica para a identificação de cepas de *Klebsiella* spp. negativas para o gene *bla<sub>SHV</sub>*

Provas bioquímicas	Kp259/09	Kp492/11	Kp672/11
Produção de indol	-	-	-
VM	-	-	-
VP	+	+	+
Citrato de Simmons	+	+	+
Hidrólise da uréia	+	+	+
LDC	+	+	+
ADH	-	-	-
ODC	-	-	-
Motilidade	-	-	-
Malonato	-	+	+
Nitrato	+	+	+
Lipase	-	-	-
DNase	-	-	-
Gelatinase	-	-	-
Hidrólise da esculina	+	+	+
Produção de ácido a partir de:			
Adonitol	-	+	+
Arabinose	+	+	+
Celbiose	+	+	+
D-manitol	+	+	+
Glicerol	+	+	+
Inositol	+	+	+
Lactose	+	+	+
Maltose	+	+	+
Manose	+	+	+
Melibiose	+	+	+
Rafinose	+	+	+
Ramnose	+	+	+
Sacarose	+	+	+
Salicina	+	+	+
Sorbose	+	-	-
Trealose	+	+	+
Xilose	+	+	+
Utilização de:			
Ácido tricarbálico	+	+	+

ANEXO 6 – Alinhamento das sequências de nucleotídeo do gene 16S rRNA das cepas Kp492/11 e Kp672/11 com as cepas de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* 07A044<sup>T</sup> (HG933295), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* 01A030<sup>T</sup> (HG933296) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC13883 (AF130981).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

AF130981      AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAG
Kp672/11      -GCCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAG
HG933296      AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAG
HG933295      AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGYACTTTCAG
Kp492/11      AGCCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAAGTACTTTCAG
                *****

AF130981      CGGGGAGGAAGGCGATGAGGTTAATAACCTCGTCGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
Kp672/11      CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
HG933296      CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
HG933295      CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
Kp492/11      CGGGGAGGAAGGCGATAAGGTTAATAACCTTGTGATTGACGTTACCCGCAGAAGAAGCA
                *****

AF130981      CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
Kp672/11      CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
HG933296      CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
HG933295      CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
Kp492/11      CCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGGTGCAAGCGTTAATCGGAATT
                *****

AF130981      ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
Kp672/11      ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
HG933296      ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
HG933295      ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
Kp492/11      ACTGGGCGTAAAGCGCACGCAGGCGGTCGTCAAGTCGGATGTGAAATCCCCGGGCTCAA
                *****

AF130981      CCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAG
Kp672/11      CCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAG
HG933296      CCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAG
HG933295      CCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAG
Kp492/11      CCTGGGAAGTGCATTGAAACTGGCAGGCTAGAGTCTTGTAGAGGGGGTAGAATCCAG
                *****

AF130981      GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
Kp672/11      GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
HG933296      GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
HG933295      GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
Kp492/11      GTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATCTGGAGGAATACCGGTGGCGAAGGCGGCCCTGG
                *****

AF130981      ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA
Kp672/11      ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA
HG933296      ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA
HG933295      ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA
Kp492/11      ACAAAGACTGACGCTCAGGTGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTA
                *****

AF130981      GTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
Kp672/11      GTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
HG933296      GTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
HG933295      GTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
Kp492/11      GTCCACGCCGTAACGATGTCGATTTGGAGGTTGTGCCCTTGAGGCGTGGCTTCCGGAGC
                *****

AF130981      TAACGCGTTAAATCGACCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
Kp672/11      TAACGCGTTAAATCGACCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
HG933296      TAACGCGTTAAATCGACCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
HG933295      TAACGCGTTAAATCGACCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
Kp492/11      TAACGCGTTAAATCGACCGCCGTTGGGAGTACGGCCGCAAGGTTAAAACCTCAAATGAATTG
                *****

AF130981      ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
Kp672/11      ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
HG933296      ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
HG933295      ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
Kp492/11      ACGGGGGCCCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTTCGATGCAACGCGAAGAACCCTT
                *****

```

```

AF130981 ACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTCCAGAGATGCATTGGTGCCTTCGGGAACGTGA
Kp672/11 ACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTGGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACGTGA
HG933296 ACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTRCCAGAGATGTTTTGGTGCCTTCGGGAACGTGA
HG933295 ACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTRGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACGTGA
Kp492/11 ACCTGGTCTTGACATCCACAGAACTTGGCAGAGATGCTTTGGTGCCTTCGGGAACGTGA
*****

AF130981 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAA
Kp672/11 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAA
HG933296 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAA
HG933295 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAA
Kp492/11 GACAGGTGCTGCATGGCTGTCGTGCTCAGCTCGTGTGTAAGTGGGTTAAGTCCCGCAA
*****

AF130981 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCC
Kp672/11 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCC
HG933296 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCC
HG933295 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCC
Kp492/11 CGAGCGCAACCCTTATCCTTTGTTGCCAGCGGTTAGGCCGGGAACCAAAGGAGACTGCC
*****

AF130981 AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
Kp672/11 AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
HG933296 AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
HG933295 AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
Kp492/11 AGTGATAAACTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGACCAGGG
*****

AF130981 CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
Kp672/11 CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
HG933296 CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
HG933295 CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
Kp492/11 CTACACACGTGCTACAATGGCATATACAAGAGAAGCGACCTCGCGAGAGCAAGCGGACC
*****

AF130981 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA
Kp672/11 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA
HG933296 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA
HG933295 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTGGA
Kp492/11 TCATAAAGTATGTCGTAGTCCGGATTG--
*****

```

ANEXO 7 - Alinhamento das sequências de nucleotídeo do gene 16S rRNA da cepa Kp259/09 com as cepas de *K. variicola* 01A065 (HG933294) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC13883 (AF130981).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Kp259/09      TCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT
HG933294     TCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT
AF130981     TCCAATCCGGACTACGACATACTTTATGAGGTCCGCTTGTCTCGCGAGGTCGCTTCTCT
*****

Kp259/09      TTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACG
HG933294     TTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACG
AF130981     TTGTATATGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGACG
*****

Kp259/09      TCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCAC TGGCAGTCTCCTTTGAGTTC CCGGCCAACC
HG933294     TCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCAC TGGCAGTCTCCTTTGAGTTC CCGGCCAACC
AF130981     TCATCCCCACCTTCTCCAGTTTATCAC TGGCAGTCTCCTTTGAGTTC CCGGCCAACC
*****

Kp259/09      CTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC
HG933294     CTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC
AF130981     CTGGCAACAAGGATAAAGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTACAACAC
*****

Kp259/09      GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC CCGAAGGCACCAATCCATCTCT
HG933294     GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC CCGAAGGCACCAATCCATCTCT
AF130981     GAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACAGTTC CCGAAGGCACCAATCCATCTCT
*****

Kp259/09      GGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCA
HG933294     GGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCA
AF130981     GGAAAGTTCTGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACCA
*****

Kp259/09      CATGCTCCACC GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGC GGGCGT
HG933294     CATGCTCCACC GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGC GGGCGT
AF130981     CATGCTCCACC GCTTGTGCGGGCCCCGTC AATTCAATTTGAGTTTTAACCTTGC GGGCGT
*****

Kp259/09      ACTCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCC TCAAGGGCACAACC
HG933294     ACTCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCC TCAAGGGCACAACC
AF130981     ACTCCCAGGCGGTGATTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCC TCAAGGGCACAACC
*****

Kp259/09      TCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGGATATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA
HG933294     TCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGGATATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA
AF130981     TCCAAATCGACATCGTTTACAGCGTGGACTACCAAGGATATCTAATCCTGTTTGCTCCCCA
*****

Kp259/09      CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATTCCCT
HG933294     CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATTCCCT
AF130981     CGCTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGATTCCCT
*****

Kp259/09      CCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCACCCCTCTACAAGACTCTA
HG933294     CCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCACCCCTCTACAAGACTCTA
AF130981     CCAGATCTCTACGCATTTACCCGCTACACCTGGAATTCACCCCTCTACAAGACTCTA
*****

Kp259/09      GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGAC
HG933294     GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGAC
AF130981     GCCTGCCAGTTTCGAATGCAGTTCCAGGTTGAGCCCGGGGATTTACATCCGACTTGAC
*****

Kp259/09      AGACCCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATT
HG933294     AGACCCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATT
AF130981     AGACCCGCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATCCGATTAACGCTTGACCCCTCCGTATT
*****

Kp259/09      ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGATGA
HG933294     ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGATGA
AF130981     ACCGCGGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGGTGTCTTCTGCGGGTAACGTCAATCGATGA
*****

Kp259/09      GGTTATTAACCTCACCGCTTCTCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCTTCT
HG933294     GGTTATTAACCTCACCGCTTCTCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCTTCT
AF130981     GGTTATTAACCTCACCGCTTCTCCCGCTGAAAGTGCTTTACAACCCGAAGGCTTCT
*****

Kp259/09      TCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCT
HG933294     TCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCT
AF130981     TCACACACGCGGCATGGCTGCATCAGGCT
*****

```

ANEXO 8 - Alinhamento das sequências de nucleotídeo do gene *rpoB* das cepas Kp492/11 e Kp672/11 com as cepas de *K. quasipneumoniae* subsp. *similipneumoniae* 07A044<sup>T</sup> (CBZR01000023), *K. quasipneumoniae* subsp. *quasipneumoniae* 01A030<sup>T</sup> (CCDF01000034) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700721 (CP000647).

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

```

Kp672/11      GCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCC
Kp492/11      GCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCC
CP000647      GCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCC
CBZR01000023 GCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCC
CCDF01000034 GCGTCTGTCTCTGGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCC
*****

Kp672/11      GATTTCCGCGCAGCTGAAAGAGTTCTTTGGTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCA
Kp492/11      GATTTCCGCGCAGCTGAAAGAGTTCTTTGGTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCA
CP000647      GATTTCCGCGCAGCTGAAAGAGTTCTTTGGTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCA
CBZR01000023 GATTTCCGCGCAGCTGAAAGAGTTCTTTGGTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCA
CCDF01000034 GATTTCCGCGCAGCTGAAAGAGTTCTTTGGTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCA
*****

Kp672/11      GAACAACCCGCTGTCTGAGATCAGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAAGCCGG
Kp492/11      GAACAACCCGCTGTCTGAGATCAGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAAGCCGG
CP000647      GAACAACCCGCTGTCTGAGATCAGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAAGCCGG
CBZR01000023 GAACAACCCGCTGTCTGAGATCAGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAAGCCGG
CCDF01000034 GAACAACCCGCTGTCTGAGATCAGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAAGCCGG
*****

Kp672/11      TCTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTATGGTCG
Kp492/11      TCTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTATGGTCG
CP000647      TCTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTATGGTCG
CBZR01000023 TCTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTATGGTCG
CCDF01000034 TCTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCAAGTTCGAGACGTACACCCGACTCACTATGGTCG
*****

Kp672/11      CGTATGTCCAATCGAAACGCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGTCCGT
Kp492/11      CGTATGTCCAATCGAAACGCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGTCCGT
CP000647      CGTATGTCCAATCGAAACGCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGTCCGT
CBZR01000023 CGTATGTCCAATCGAAACGCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGTCCGT
CCDF01000034 CGTATGTCCAATCGAAACGCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACTCCCTGTCCGT
*****

Kp672/11      GTACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCAGCG
Kp492/11      GTACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCAGCG
CP000647      GTACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCAGCG
CBZR01000023 GTACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCAGCG
CCDF01000034 GTACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCAGCG
*****

Kp672/11      TGTGGTTACTGACGAAATCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAAGGCAACTACGTTATCGC
Kp492/11      TGTGGTTACTGACGAAATCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAAGGCAACTACGTTATCGC
CP000647      TGTGGTTACTGACGAAATCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAAGGCAACTACGTTATCGC
CBZR01000023 TGTGGTTACTGACGAAATCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAAGGCAACTACGTTATCGC
CCDF01000034 TGTGGTTACTGACGAAATCACTACCTGTCTGCTATCGAAGAAAGGCAACTACGTTATCGC
*****

Kp672/11      TCAGGCGAACTCCAACCTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTGACCTGCCG
Kp492/11      TCAGGCGAACTCCAACCTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTGACCTGCCG
CP000647      TCAGGCGAACTCCAACCTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTGACCTGCCG
CBZR01000023 TCAGGCGAACTCCAACCTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTGACCTGCCG
CCDF01000034 TCAGGCGAACTCCAACCTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTGACCTGCCG
*****

Kp672/11      TAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGTGACCAAGTTGACTACATGGACGTATCCAC
Kp492/11      TAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGTGACCAAGTTGACTACATGGACGTATCCAC
CP000647      TAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGTGACCAAGTTGACTACATGGACGTATCCAC
CBZR01000023 TAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGTGACCAAGTTGACTACATGGACGTATCCAC
CCDF01000034 TAGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGTGACCAAGTTGACTACATGGACGTATCCAC
*****

Kp672/11      CCAGCAGGTGGTATCCGTGGTGGTCCCTGATCCCGTTCCTGGAACACGATGACGCCAA
Kp492/11      CCAGCAGGTGGTATCCGTGGTGGTCCCTGATCCCGTTCCTGGAACACGATGACGCCAA
CP000647      CCAGCAGGTGGTATCCGTGGTGGTCCCTGATCCCGTTCCTGGAACACGATGACGCCAA
CBZR01000023 CCAGCAGGTGGTATCCGTGGTGGTCCCTGATCCCGTTCCTGGAACACGATGACGCCAA
CCDF01000034 CCAGCAGGTGGTATCCGTGGTGGTCCCTGATCCCGTTCCTGGAACACGATGACGCCAA
*****

Kp672/11      CCGTGCATTGATGGGTGCAAAACATGCAACGTGACGGCCGTTCCGACTCTGCGCGCTGATAA
Kp492/11      CCGTGCATTGATGGGTGCAAAACATGCAACGTGACGGCCGTTCCGACTCTGCGCGCTGATAA
CP000647      CCGTGCATTGATGGGTGCAAAACATGCAACGTGACGGCCGTTCCGACTCTGCGCGCTGATAA
CBZR01000023 CCGTGCATTGATGGGTGCAAAACATGCAACGTGACGGCCGTTCCGACTCTGCGCGCTGATAA
CCDF01000034 CCGTGCATTGATGGGTGCAAAACATGCAACGTGACGGCCGTTCCGACTCTGCGCGCTGATAA
*****

```

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

GCCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTGGCCGTCGACTCCGGTGTACTGCGGT  
 GCCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTGGCCGTCGACTCCGGTGTACTGCGGT  
 GCCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTGGCCGTCGACTCCGGTGTACTGCGGT  
 GCCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTGGCCGTCGACTCCGGTGTACTGCGGT  
 \*\*\*\*\*

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

GGCTAAACGTGGCGGTACCGTTCAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAA  
 GGCTAAACGTGGCGGTACCGTTCAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAA  
 GGCTAAACGTGGCGGTACCGTTCAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAA  
 GGCTAAACGTGGCGGTACCGTTCAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAA  
 TGCTAAGCGCGCGGTACCGTTCAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAA  
 \*\*\*\*\*

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

CGAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACTAAGTACAC  
 CGAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACTAAGTACAC  
 CGAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACTAAGTACAC  
 CGAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACTAAGTACAC  
 CGAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACTAAGTACAC  
 \*\*\*\*\*

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

CCGTTCTAACAGAACCTGCATCAACAGATGCCTTGCCTGCCCTGGGCGAACCTAT  
 CCGTTCTAACAGAACCTGCATCAACAGATGCCTTGCCTGCCCTGGGCGAACCTAT  
 CCGTTCTAACAGAACCTGCATCAACAGATGCCTTGCCTGCCCTGGGCGAACCTAT  
 CCGTTCTAACAGAACCTGCATCAACAGATGCCTTGCCTGCCCTGGGCGAACCTAT  
 CCGTTCTAACAGAACCTGCATCAACAGATGCCTTGCCTGCCCTGGGCGAACCTAT  
 \*\*\*\*\*

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 TGAGCGGCGACGTGCTGGCCGACGGCCCGTCCACCGACCTCGGTGAGCTGGCGCTGGG  
 \*\*\*\*\*

Kp672/11  
 Kp492/11  
 CP000647  
 CBZR01000023  
 CCDF01000034

TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 TCAGAACATGCGGTAGCGTTCATGCCGTGGAACGGCTAC  
 \*\*\*\*\*

ANEXO 9 - Alinhamento das sequências de nucleotídeo do gene *rpoB* da cepa Kp259/09 com as cepas de *K. variicola* At-22 (CP001891) e *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700721 (CP000647).

```

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment

CP000647      CGTCTGTCTCTTGGCGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCCG
CP001891      CGTCTGTCTCTGCGGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCCG
Kp259/09      CGTCTGTCTCTGCGGATCTGGATACCTGATGCCTCAGGATATGATCAACGCCAAGCCG
*****

CP000647      ATTTCCGACAGCAGTGAAAGAGTTCTTTGGTTCCAGCCAGCTGTCTCAGTTTATGGACCAG
CP001891      ATTTCCGACAGCAGTGAAAGAGTTCTTTGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTATGGACCAG
Kp259/09      ATTTCCGACAGCAGTGAAAGAGTTCTTTGGTTCCAGCCAGCTGTCCAGTTTATGGACCAG
*****

CP000647      AACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGT
CP001891      AACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGT
Kp259/09      AACAAACCCGCTGTCTGAGATTACGCACAAACGTCGTATCTCCGCACTCGGCCAGGGCGT
*****

CP000647      CTGACCCGTGAGCGCGCAGGCTTCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACCACTACGGTCGC
CP001891      CTGACCCGTGAAACGCGCAGGCTTCGAAGTTCGAGATGTACACCCGACCACTACGGTCGC
Kp259/09      CTGACCCGTGAAACGCGCAGGCTTCGAAGTTCGAGACGTACACCCGACCACTACGGTCGC
*****

CP000647      GTATGTCCGATCGAAACGCCCTGAAGTCCAAACATCGGTCTGATTAACCCCTGTCCGTG
CP001891      GTATGTCCAATCGAAACGCCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACCCCTGTCCGTG
Kp259/09      GTATGTCCAATCGAAACGCCCTGAAGTCCGAACATCGGTCTGATCAACCCCTGTCCGTG
*****

CP000647      TACGCGCAGACCAACGAATATGGCTTCCTTGAGACGCCGTATCGTAAAGTGACCGACGGT
CP001891      TACGCACAGACTAACGAATACGGTTCCCTTGAGACCCCGTATCGTAAAGTGACCGACGGT
Kp259/09      TACGCACAGACTAACGAATACGGTTCCCTTGAGACCCCGTATCGTAAAGTGACCGACGGT
*****

CP000647      GTGGTTACTGACGAAATTCAC TACCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTACGTTATCGT
CP001891      GTGGTTACCGATGAAATTCAC TACCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTACGTTATTTGCT
Kp259/09      GTGGTTACCGATGAAATTCAC TACCTGTCTGCTATCGAAGAAGGCAACTACGTTATTTGCT
*****

CP000647      CAGGCGAATCCAACTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGATCTGGTTACCTGCCGT
CP001891      CAGGCGAATCCAACTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTTACCTGCCGT
Kp259/09      CAGGCGAATCCAACTGGATGAAAACGGCCACTTCGTAGAAGACCTGGTTACCTGCCGT
*****

CP000647      AGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGCGACCAAGGTTGACTACATGGACGTATCCACC
CP001891      AGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGCGACCAAGGTTGACTACATGGACGTATCCACC
Kp259/09      AGCAAAGGCGAATCCAGCTTGTTCAGCCGCGACCAAGGTTGACTACATGGACGTATCCACC
*****

CP000647      CAGCAGTGGTATCCGTCGGTGCCTCCCTGATCCCGTTCTTGGAACACGATGACGCCAAC
CP001891      CAGCAGTGGTATCCGTCGGTGCCTCCCTGATCCCGTTCTTGGAACACGATGACGCCAAC
Kp259/09      CAGCAGTGGTATCCGTCGGTGCCTCCCTGATCCCGTTCTTGGAACACGATGACGCCAAC
*****

CP000647      CGTGCAATTGATGGGTGCGAACATGCAACGTCAGGCGGTTCGGACTCTGCGCGCTGATAAG
CP001891      CGTGCAATTGATGGGTGCGAACATGCAACGTCAGGCGGTTCGGACTCTGCGCGCTGATAAG
Kp259/09      CGTGCAATTGATGGGTGCGAACATGCAACGTCAGGCGGTTCGGACTCTGCGCGCTGATAAG
*****

CP000647      CCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTTGCCGTTGACTCCGGTGTACTGCGGTG
CP001891      CCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTTGCCGTTGACTCCGGTGTACTGCGGTG
Kp259/09      CCGCTGGTTGGTACCGGTATGGAACGTGCTGTTGCCGTTGACTCCGGTGTACTGCGGTG
*****

CP000647      GCTAAACGTGGCGGTACCGTT CAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAAC
CP001891      GCTAAACGTGGCGGTACCGTT CAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAAC
Kp259/09      GCTAAACGTGGCGGTACCGTT CAGTACGTGGATGCTTCCCGTATCGTTATCAAAGTTAAC
*****

CP000647      GAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACCAAGTACACC
CP001891      GAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACCAAGTACACC
Kp259/09      GAAGACGAGATGTACCCGGGCGAAGCAGGTATCGACATCTATAACCTGACCAAGTACACC
*****

CP000647      CGTTCTAACGAGAACACCTGCATCAACAGATGCC TTGCGTGTCCCTGGGCGAACCCATT
CP001891      CGTTCTAACGAGAACACCTGCATCAACAGATGCC TTGCGTGTCCCTGGGCGAACCCATT
Kp259/09      CGTTCTAACGAGAACACCTGCATCAACAGATGCC TTGCGTGTCCCTGGGCGAACCCATT
*****

CP000647      GAGCGCGGCGACGTGCTGGCAGACGGCCCGTCCACCACCTCGGTGAGCTGGCGTGGGT
CP001891      GAGCGCGGCGACGTGCTGGCAGACGGCCCGTCCACCACCTCGGTGAGCTGGCGTGGGT
Kp259/09      GAGCGCGGCGACGTGCTGGCAGACGGCCCGTCCACCACCTCGGTGAGCTGGCGTGGGT
*****

CP000647      CAGAACATGCGGTGAGCGTT CATGCCGTGGAACGGTTAC
CP001891      CAGAACATGCGCGT GAGCGTT CATGCCGTGGAACGGTTAC
Kp259/09      CAGAACATGCGCGT GAGCGTT CATGCCGTGGAACGGTTAC
*****

```