

Fernanda Modesto Tolentino

Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos
em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo
KPC em hospitais do estado de São Paulo.

São José do Rio Preto
2015

Fernanda Modesto Tolentino

Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em hospitais do estado de São Paulo.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Mara Correa Lelles Nogueira

Co-orientadora: Dr^a. Doroti de Oliveira Garcia

São José do Rio Preto
2015

Tolentino, Fernanda Modesto.

Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em hospitais do estado de São Paulo / Fernanda Modesto Tolentino. – São José do Rio Preto, 2015

151 f. : il., tabs.

Orientador: Mara Correa Lelles Nogueira

Coorientador: Doroti de Oliveira Garcia

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Microbiologia médica. 2. *Klebsiella pneumoniae*. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Drogas - Resistência. 5. Quinolonas. 6. Aminoglicosídeos. 7. Hospitais - São Paulo (Estado) I. Nogueira, Mara Correa Lelles. II. Garcia, Doroti de Oliveira. III. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. IV. Título.

CDU – 576.8

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Fernanda Modesto Tolentino

Investigação de genes de resistência às quinolonas e aminoglicosídeos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC em hospitais do estado de São Paulo.

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a. Dr.^a. Mara Correa Lelles Nogueira
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof. Dr.^a. Ana Cristina Gales
UNIFESP/EPM

Prof. Dr. Afonso Luis Barth
UFRGS/Porto Alegre

Prof. Dr. Aripuanã Sakura Aranha Watanabe
FAMERP – Rio Preto

Prof. Dr.^a. Margarete Teresa Gottardo de Almeida
FAMERP – Rio Preto

São José do Rio Preto
04 de março de 2015

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito nos aproxima.”

Louis Pasteur

DEDICATÓRIA

Dedicado àqueles que amo e sem os quais nenhuma conquista ou realização teriam valor:

Ao Bruno, meu marido e eterno namorado, com amor, admiração e gratidão, por sua compreensão, carinho, presença e incentivo constante. E acima de tudo, por seu incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

E à minha família, o alicerce de minha vida, por acreditar em meus sonhos e em minha capacidade. Por sempre me apoiar e incentivar. Pelo eterno cuidado, dedicação e amor. Meu grande exemplo de integridade, dignidade e fé.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela minha vida, por me fortalecer nos momentos de fraqueza, por me capacitar nos momentos de necessidade, pelas imensuráveis bênçãos, paz e alegria sempre presente.

À minha orientadora Profa. Dra Mara Correa Lelles Nogueira pela paciência, dedicação e ensinamentos tão importantes e valiosos que seguirão comigo por toda minha vida. Agradeço pela oportunidade, incentivo e confiança no meu trabalho que tanto me estimularam. A você minha eterna gratidão, amizade, respeito e admiração.

À minha co-orientadora Profa Dra Doroti de Oliveira Garcia, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz, pelas indescritíveis contribuições, oportunidades e orientação durante a realização deste trabalho e por permitir treinamento em seu laboratório. Agradeço também às alunas Maria Fernanda e Gabriela por toda a ajuda na execução das análises por MLST deste trabalho.

À minha diretora do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto, Margarida Georgina Bassi, por sua amizade e imensurável disposição para que este trabalho pudesse ser realizado.

Aos meus grandes amigos e companheiros de pesquisa, Milena e Tiago, pela amizade sincera, apoio e indescritível ajuda na realização deste trabalho. Meu eterno agradecimento e amizade.

Aos todos os meus amigos da FAMERP e do Instituto Adolfo Lutz de São José do Rio Preto pelo companheirismo, amizade, incentivo e incontáveis momentos de alegria e descontração.

Ao Laboratório Central do Hospital de Base e ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Instituto Adolfo Lutz por ter gentilmente cedido o isolado de *K. pneumoniae* utilizadas neste estudo;

Ao Laboratório de Pesquisas em Virologia – FAMERP, pela infra-estrutura de ensino e pesquisa, essenciais para a realização desse trabalho.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Ensaio PCR-Triplex-1 e PCR-Triplex-2 para investigação de genes de AMEs...	55
Quadro 2. Ensaio PCR-Duplex para investigação de genes de AMEs	56
Quadro 3. <i>Primers</i> utilizados para a investigação de genes de AMEs.....	56
Quadro 4. Ensaio para investigação dos genes <i>rmtG</i> e <i>rmtH</i> de metiltransferase 16S rRNA	57
Quadro 5. PCR-Triplex e PCR-Duplex para investigação de genes metiltransferase 16S rRNA	58
Quadro 6. <i>Primers</i> utilizados para a investigação dos genes de metiltransferase 16S rRNA.	58
Quadro 7. Protocolo dos ensaios utilizados para investigação de genes <i>qnr</i>	59
Quadro 8. <i>Primers</i> utilizados nos ensaios para a investigação dos genes <i>qnr</i>	60
Quadro 9. Protocolo para investigação de genes de bombas de efluxo	61
Quadro 10. <i>Primers</i> utilizados para investigação de genes de bombas de efluxo	61
Quadro 11. Protocolo para investigação de gene <i>bla_{NDM}</i>	62
Quadro 12. Protocolo para investigação de gene <i>bla_{CTX-M}</i>	63
Quadro 13. <i>Primers</i> utilizados para investigação e sequenciamento dos genes <i>bla_{CTX-M}</i>	63
Quadro 14. <i>Primers</i> de PCR e sequenciamento utilizados para MLST	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Novo esquema proposto para classificação das β -lactamases.	26
Figura 2. Perfil de resistência aos antimicrobianos nos isolados de São Paulo (SP) e São José do Rio Preto (KP).	73
Figura 3. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes das <i>bla</i> _{CTX-M} amplificados por PCR.	77
Figura 4. Distribuição dos genes <i>bla</i> _{CTX-M}	78
Figura 5. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes das AMEs.	79
Figura 6. Porcentagem de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). ..	79
Figura 7. Porcentagem de isolados carregando um ou mais genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs).	80
Figura 8. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>rmtB</i> das metiltransferase 16S RNAr 84	84
Figura 9. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene <i>qnrB</i>	86
Figura 10. Diversidade de genes encontrados nos isolados SP (São Paulo) e KP (São José do Rio Preto).	91
Figura 11. Diversidade genética mostrada no dendrograma gerado por ERIC-PCR dos isolados selecionados da coleção de cultura do Laboratório da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto no período de 2011 a 2014.	97

Figura 12. Diversidade genética mostrada no dendrograma gerado por ERIC-PCR dos isolados selecionados da coleção de cultura do Instituto Adolfo Lutz, provenientes de diferentes hospitais da cidade de São Paulo, no período de 2011 a 2014.	100
Figura 13. Correlação entre os ST identificados e a produção de CTX-M detectada nos isolados de São José do Rio Preto (KP) e nos isolados de São Paulo (SP).	104
Figura 14. Ilustração do Complexo Clonal 258. Figura gerada pelo http://eburst.mlst.net/ que demonstra como todos os ST se relacionam dentro do CC258.	105
Figura 15. Ilustração ampliada do Complexo Clonal 258.....	106

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição dos genes AMEs e os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados SP81
- Tabela 2.** Distribuição dos genes AMEs e os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados KP81
- Tabela 3.** Diversidade de genes detectados nos isolados SP e KP carreadores do gene *qnr*...87

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

% - Porcentagem

μM – Micromolar

°C – Graus Celsius

μg – Micrograma

μL – Microlitro

AACs – acetiltransferases

AcCoA - acetil-coenzima A

ADP – Adenosina Difosfato

AK – Amicacina

AME – *aminoglycoside modifying enzyme*

AMP - Ampicilina

ANTs – Nucleotidiltransferases

APHs – Fosfotransferases

Arm – “Aminoglycoside resistance methyltransferase”

ATCC - “American Type Culture Collection”

ATP – Adenosina Trifosfato

CAZ – Ceftazidima

CDC – “Centers for Disease Control and Prevention”

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CIP - Ciprofloxacina

CLSI - “Clinical and Laboratory Standards Institute”

CN – Controle negativo

CoA - coenzima A

CP – Controle positivo

CRO – Ceftriaxona

CTX - Cefotaxima

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTP - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EDTA - Ácido etileno-diamino tetracético

ERIC-PCR - “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR”

ESBL - “Extended-spectrum β -lactamase”

ETP - Ertapenem

EUA - Estados Unidos da América

EUCAST - “European Committee of Antimicrobial Susceptibility Testing”

FAMERP - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto

FEP – Cefepime

FOX - Cefoxitina

GDP - Guanosina Difosfato

GEN - Gentamicina

GTP - Guanosina Trifosfato

HB - Hospital de Base

I – Intermediário

IMI – “Imipenem-hydrolyzing β -lactamase”

IMP – Imipenem

IRAS - Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

IS - Sequência de Inserção

Kb – Quilobases

KPC - “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”

LPS - Lipopolissacarídeo

MBLs - Metallo- β -lactamases

MDR – Multi Droga Resistentes

MEM - Meropenem

mg – Miligrama

Mg²⁺: Magnésio

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

MLST - “Multilocus Sequencing Typing”

NA – Ácido nalidíxico

NaCl – Cloreto de Sódio

NDM - Nova Deli Imipenemase

ng – Nanograma

NmcA - "Not metallo-enzyme carbapenemase"

NpmA – “rRNA adenine N-1-methyltransferase”

NOR – Norfloxacin

NT – Não testado

OXA - Oxacilinase

pb - Pares de bases

PCR - “Polymerase chain reaction”

PFGE - “Pulsed Field Gel Electrophoresis”

pH - Potencial hidrogeniônico

pmol – Picomol

POLB – Polimixina B

PTZ - Piperacilina Tazobactam

q.s.p. – Quantidade suficiente para

Qnr – “Quinolone resistance”

R - Resistente

RFLP - “Restriction fragment length polymorphisms”

Rmt – Ribossomal methyltransferase

RNAr - Ácido ribonucleico ribossomal

S - Sensível

SENTRY - “Antimicrobial Surveillance Program”

SHV - "sulfhydryl variable"

SME – “Serratia marcescens enzyme

Taq – “Thermus aquaticus”

TBE - Tris, EDTA, Ácido bórico

TE - Tris EDTA

TEM - "Temoneira"

TGC - Tigeciclina

TNs – Transposon

TOB - Tobramicina

Tris - Hidroximetilaminometano

TSA - Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos

TSB - “Tryptic Soy Broth”

U - Unidade

UTI - Unidade Terapia Intensiva

V/cm – Volts por centímetro

RESUMO

O aumento nas taxas de infecção por *K. pneumoniae* produtoras de KPC tornou-se um sério problema de saúde pública mundial. Estas enzimas hidrolizam carbapenêmicos, oxyimino-cefalosporinas, cefamicinas e não são inibidas por inibidores das β -lactamases tais como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam. Além disso, em plasmídeos que carregam o gene *bla*_{KPC}, geralmente são encontrados genes de resistência a outros antimicrobianos, como quinolonas e aminoglicosídeos. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar, de forma comparativa, a presença de genes de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas e β -lactâmicos entre *K. pneumoniae* produtoras de KPC, provenientes de diversos hospitais da cidade de São Paulo e de um hospital terciário localizado em São José do Rio Preto, região noroeste do estado de São Paulo. A similaridade genética e a relação clonal entre as cepas isoladas em cada região também foram determinadas. Foram estudadas cem cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, sendo cinquenta de hospitais da cidade de São Paulo, armazenadas na coleção do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, denominadas SP, e cinquenta do Hospital de Base de São José do Rio Preto, denominadas KP. O gene *bla*_{CTX-M} foi detectado em 76% das cepas KP e em 58% das cepas SP. Entre as cepas KP, 68,4% apresentaram *bla*_{CTX-M-15}, 23,7% *bla*_{CTX-M-2}, 2,6% *bla*_{CTX-M-59}, 2,6% *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-59} simultaneamente e 2,6% não identificado. Entre as cepas SP, 51,7% apresentaram *bla*_{CTX-M-2}, 37,9% *bla*_{CTX-M-15}, 2,5% *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-2} simultaneamente e 5% *bla*_{CTX-M-14}. Dos sete genes de AMEs investigados, foram detectados cinco, sendo *aph(3')-VI*, *aph(3')-Ia*, *aac(6')-Ib*, *aac(3)-Ia* e *aac(3)IIa*, distribuídos entre 95% das cepas, sem diferença entre KP e SP. Dos sete genes de metiltransferases 16S RNAr, apenas o gene *rmtB* foi detectado, em duas cepas SP. Quanto aos genes determinantes de resistência às quinolonas, 42% das cepas KP e 14% das SP apresentaram *qnrB*. O gene *oqxAB* foi encontrado em 56% e 2% das cepas SP e KP, respectivamente. Evidenciou-se ampla diversidade genética nos perfis obtidos por ERIC-PCR. A análise das sequências obtidas por MLST mostrou predomínio do ST11 entre as cepas SP e de ST340 entre as cepas KP, com uma maior diversidade de ST encontrada nas cepas KP. A detecção simultânea de um ou mais genes de resistência a diferentes antimicrobianos em um mesmo isolado, enfatiza o impacto que genes transmitidos por plasmídeos causam especialmente no ambiente hospitalar.

Palavras-Chave: *K. pneumoniae*. KPC. Resistência. Quinolonas. Aminoglicosídeos.

ABSTRACT

The increase in infection rates by KPC producing *K. pneumoniae* is a serious global public health problem. These enzymes hydrolyze carbapenems, oxyimino-cephalosporins, cephamycins, and β -lactamase inhibitors such as clavulanic acid, sulbactam and tazobactam. In addition, the plasmids carrying blaKPC genes generally harbor other antimicrobial resistance genes. Thus, the aim of this study was to investigate, in a comparative way, the presence of genes conferring resistance to aminoglycosides, quinolones and β -lactams between KPC producing *K. pneumoniae* from various hospitals in São Paulo City and from a tertiary hospital located in São José do Rio Preto, northwest of São Paulo state. The genetic similarity and the clonal relationship among strains were also determined. One hundred isolates were studied: fifty from different hospitals in São Paulo (named SP), and fifty from the “Hospital de Base de São José do Rio Preto” (named KP). The blaCTX-M gene was detected in 76% of the KP strains and in 58% of the SP strains. Among the KP strains, 68.4% had blaCTX-M-15, 23.7% blaCTX-M-2, 2.6% blaCTX-M-59, 2.6% blaCTX-M-15 and blaCTX-M-59 simultaneously, and 2.6% were unidentified. Among the SP strains, 51.7% presented blaCTX-M-2, 37.9% blaCTX-M-15, 2.5% blaCTX-M-15 and blaCTX-M-2 simultaneously, and 5% blaCTX-M-14.

Regarding the genes for AMEs, among the seven types investigated, five were detected: *aph* (3')-VI, *aph* (3')-Ia, *aac* (6')-Ib, *aac* (3)-Ia and *aac* (3) IIa were detected among 95% of the strains, and no difference was observed between KP and SP strains. Among the seven genes for 16S rRNA methyltransferases, only the *rmtB* was detected, in two SP strains. Concerning genes that determine resistance to quinolones, 42% of the KP and 14% of the SP strains showed *qnrB*. The *oqxAB* gene was detected in 56% and 2% of the SP and KP strains, respectively. Molecular typing by ERIC-PCR revealed that genetically diverse strains cause infections in the studied hospitals, and occurrence of transmission among patients was demonstrated by observation of strains presenting 100% similarity. Analysis by MLST technique indicated that ST11 is prevalent among SP strains, while ST340 is prevalent among KP strains. Higher ST diversity was observed among KP strains. The simultaneous detection of one or more antimicrobial resistance genes in the same isolate shows how mobility may impact the evolution of resistance in the hospital environment.

Keywords: *K. pneumoniae*. KPC. Resistance. Quinolones. Aminoglycosides.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	20
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> e as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS).....	20
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2.1 Características taxonômicas e bioquímicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2.2 Resistência aos β -lactâmicos	24
2.3 Resistência aos carbapenêmicos.....	30
2.4 Carbapenemases tipo KPC	31
2.5 New Delhi metalo- β -lactamases.....	34
2.6 Resistência a outras classes de antimicrobianos em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de KPC.....	35
2.6.1 Resistência às quinolonas	36
2.6.2 Resistência aos aminoglicosídeos.....	38
2.6.3 Resistência às polimixinas e tigeciclina	43
2.7 Importância da tipagem molecular	45
2.7.1 ERIC-PCR	45
2.7.2 MLST	46
3. OBJETIVOS.....	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos.....	49
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.1 Seleção dos isolados <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de carbapenemases do tipo KPC	51
4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	52
4.2 Armazenamento e manutenção dos isolados	52
4.3 Extração de DNA genômico bacteriano	53
4.4 Investigação de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase.....	54
4.4.1 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos.....	54

4.4.2	Investigação de genes de enzimas das metiltransferases 16S rRNA.....	56
4.4.3	Investigação de genes de <i>qnr</i>	58
4.4.4	Investigação de genes de bombas de efluxo <i>oqxAB</i> e <i>qepA</i>	60
4.4.5	Investigação de genes <i>bla</i> _{NDM}	61
4.4.6	Investigação de genes <i>bla</i> _{CTX-M}	62
4.5	Purificação dos produtos de PCR.....	63
4.6	Sequenciamento dos genes	64
4.7	Tipagem molecular por ERIC-PCR.....	65
4.8	Análise da Similaridade Genética	65
4.9	Multilocus Sequence Typing.....	66
4.9.1	Amplificação dos genes “housekeeping”	66
4.9.3	Reação com o Big Dye®	68
4.9.4	Precipitação do produto do Big Dye®	68
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	70
5.2	Determinação do genótipo de resistência aos antimicrobianos	73
5.2.1	Investigação de genes de <i>bla</i> _{CTX-M}	73
5.2.3	Investigação de genes codificadores de metiltransferases 16S RNAr.....	83
5.2.4	Investigação de genes <i>qnr</i>	85
5.2.5	Investigação de genes de bombas de efluxo <i>oqxAB</i> e <i>qepA</i>	88
5.2.6	Investigação de genes de NDM.....	90
5.2.7	Co-existência de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos	91
5.3	Avaliação da relação genética entre os isolados.....	92
5.3.1	Avaliação da relação genética entre os isolados KP por ERIC-PCR	92
5.3.2	Avaliação da relação genética entre os isolados SP	98
5.4	Multilocus Sequence Typing.....	101
6.	CONCLUSÕES	108
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
8.	ANEXOS	142

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae* e as infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS)

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, da família Enterobacteriaceae, ubíquo na natureza, comumente encontrado na água, esgoto, solo, plantas e também como saprófita das mucosas da nasofaringe e trato gastrointestinal de seres humanos e animais (PODSCHUN, ULMANN, 1998; KONEMAN et al, 2001; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Nas últimas décadas, tornou-se um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), e tem se destacado como uma das espécies de Enterobacteriaceae mais frequentemente associadas às infecções oportunistas, principalmente em indivíduos imunossuprimidos ou com doenças de base, tais como infecções de feridas, intra-abdominais, dos tratos urinário e respiratório, além de sepse. É um dos principais agentes de infecções em unidades de terapia intensiva (UTI) (TSAI et al., 2014), destacando-se como importante causa de surtos em UTI neonatal (GISKE et al., 2008; CASSETTARI et al., 2009; GARBATI, AL GODHAIR, 2013; MOAYEDNIA et al., 2014).

Em pacientes colonizados ou com infecção, *K. pneumoniae* atua como reservatório para a transmissão horizontal de genes de resistência. Além disso, a transmissão cruzada entre pacientes, uma importante causa de surtos tanto por um único como por múltiplos clones de *K. pneumoniae*, é intermediada por mãos de profissionais de saúde e fômites, e favorecida pela capacidade de sobrevivência desta bactéria no ambiente (FRENCH et al, 1996; GAILLOT et al., 1998; GNIADKOWSKI et al., 1998; BABINI, LIVERMORE, 2000; MULVEY et al, 2004; BOSZCZOWSKI et al, 2005; MARTINS et al, 2006; CASSETTARI et al, 2006; CASSETTARI et al., 2009).

Um aspecto importante das infecções por *K. pneumoniae* é a resistência a diversos antimicrobianos, que dificulta o tratamento e resulta em altos índices de morbidade e

mortalidade (ARDANUY et al., 1998; GARBATI, AL GODHAIR, 2013; TSAI et al., 2014). Nestas bactérias, a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que confere resistência às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam é um desafio terapêutico desde os anos 80 (BUSH, 2001; PATERSON, BONOMO, 2005; MAVROIDI et al., 2014). Além disso, cepas produtoras de ESBL frequentemente apresentam resistência a outros antimicrobianos (SPANU, 2012). Assim, nas últimas décadas, os carbapenêmicos (principalmente o imipenem) tornaram-se as principais opções para o tratamento (MARCHIARO et al., 2008; BILAVSKY et al., 2010; LEE, BURGUESS, 2012).

Como consequência, em hospitais de todo o mundo, *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos emergiram e se disseminaram com impressionante rapidez. Casos de infecção por estas bactérias tem sido relatados mundialmente, e com crescente frequência no Brasil (Correa et al., 2013), tornando-se um sério problema de saúde pública mundial, pois causam são de difícil tratamento, devido à limitação das opções terapêuticas (NORDMANN et al., 2009; ENDIMIANI et al., 2010; CORREA et al., 2013).

No Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB), a primeira *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tipo KPC foi isolada em abril de 2011. Neste ano, ocorreram 11 casos de infecção em pacientes admitidos na instituição e em 2012, ocorreram 8 casos. Em 2013, observou-se um crescimento importante na frequência de isolamento do patógeno, sendo confirmados 49 casos. Já em 2014, 212 casos, distribuídos entre UTIs e andares clínicos e cirúrgicos foram confirmados, clínica e laboratorialmente.

No presente estudo, *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e produtoras de KPC isoladas no HB foram investigadas para determinação do perfil de resistência aos principais antimicrobianos utilizados como opções terapêutica e para identificação de mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas. Os resultados obtidos com os isolados do HB foram comparados aos resultados de um grupo de isolados provenientes de vários hospitais da cidade de São Paulo. Estas informações são de extrema importância,

porque o HB é um importante hospital-escola de nível terciário, que atende a uma população de 2 milhões de habitantes. Devido à alta complexidade dos procedimentos realizados (cirurgias cardíacas, neurocirurgias, atendimento ao trauma, transplantes de rim, fígado, medula óssea e córnea, entre outros, tratamento de AIDS e fibrose cística) e à gravidade dos quadros clínicos dos pacientes atendidos, são observadas altas taxas de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). As informações geradas por este estudo serão úteis para o entendimento das formas de disseminação de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, para a orientação da antibioticoterapia empírica e para o estabelecimento dos protocolos de prevenção, que resultam na melhoria do prognóstico dos pacientes.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Características taxonômicas e bioquímicas de *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um bacilo gram-negativo, que mede cerca de 2 µm por 0.5 µm. É anaeróbio facultativo, não esporulado e imóvel. As características bioquímicas comuns à espécie são reação de oxidase, indol e ornitina negativas, lisina positiva, fermentação da glicose, redução do nitrato, fermentação da lactose, utilização do citrato como fonte de carbono e hidrólise da uréia, formando gás ou não (KRIEG et al, 1984; KONEMAN et al, 2001; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2012). Pertence à subdivisão gamma da classe *Proteobacteria*. Sua virulência está associada à presença de cápsula polissacarídica, sistema de captação de ferro, adesinas fimbriais e lipopolissarídeo (PODSCHUN, ULMANN, 1998; TRABULSI, ALTERTHUM, 2008; TORTORA et al., 2012).

Em meios de cultura seletivos e diferenciais, como ágar MacConkey, as colônias de *Klebsiella* spp são tipicamente grandes, brilhantes, quase sempre de aspecto mucóide devido à presença de cápsula e rosado pela fermentação da lactose (WINN et al. 2006; TRABULSI ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Klebsiella* foi designado por Trevisan em 1885, em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (KRIEG et al, 1984). Inicialmente, a classificação das espécies de *Klebsiella* baseava-se em sua origem ou em características de patogenicidade. Posteriormente, as espécies foram classificadas de acordo com características bioquímicas, baseadas na utilização de determinados substratos e atividades das enzimas. Porém, com o advento das técnicas moleculares, tornou-se possível a identificação de novas espécies e reclassificação das já existentes. Assim, houve alteração da taxonomia do gênero, definido pelas técnicas de sequenciamento e hibridação de DNA, permitindo a identificação de cinco

espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae* (KRIEG et al, 1984; KONEMAN et al, 2001; MARTÍNEZ et al, 2004). A espécie *K. pneumoniae* foi subclassificada em três subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*, sendo a subespécie *pneumoniae* a mais frequentemente isolada (KRIEG et al, 1984; PODSCHUN, ULLMANN, 1998; MARTÍNEZ et al, 2004).

2.2 Resistência aos β -lactâmicos

Os β -lactâmicos são os antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica em todo o mundo. Sua estrutura química apresenta um anel β -lactâmico, comum em todos os antimicrobianos desta classe, que pode apresentar-se isolado ou conjugado a outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. Neste grupo, encontram-se as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (DRAWZ, BONOMO, 2010).

O alvo dos β -lactâmicos é a parede celular bacteriana, que é composta por camadas de peptideoglicanos formados por N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, unidos em reação catalisada pelas transglicosilases. As camadas de peptideoglicanos são unidas entre si por ligações peptídicas catalisadas por enzimas chamadas transpeptidases. O mecanismo de ação dos β -lactâmicos consiste na inibição das reações de transglicosilação e transpeptidação, resultando na formação de camadas de peptideoglicano fracamente ligadas e instáveis, o que favorece a lise celular (WILKE et. al., 2005; THANBICHLER, SHAPIRO, 2008; SALAHUDDIN, KHAN, 2014).

A resistência aos β -lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, como alterações na afinidade de proteínas ligadoras de penicilina, diminuição da permeabilidade da membrana externa devido à modificação da estrutura ou número de porinas, aumento da atividade de bombas de efluxo e produção de β -lactamases, sendo este último o mais importante (BUSH et al., 2011).

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico, o que resulta na geração de uma molécula sem atividade antimicrobiana (BUSH, FISHER, 2011). Diferentes critérios são utilizados na classificação destas enzimas. As mais amplamente utilizadas baseiam-se em suas características funcionais (BUSH et. al., 1995) ou em sua estrutura primária (AMBLER, 1980).

A classificação mais comumente usada é a de Ambler, na qual as enzimas são distribuídas em quatro classes (A, B, C e D), de acordo com sua sequência de aminoácidos (BUSH et. al., 1995). As enzimas pertencentes às classes A, C e D são denominadas serina- β -lactamases por possuírem um aminoácido serina em seu sítio ativo, enquanto as enzimas da classe B são denominadas metalo- β -lactamases, pois são dependentes de zinco (Zn^{+2}), como cofator enzimático (AMBLER, 1980). De acordo com o esquema de Bush, Jacob e Medeiros (1995), as enzimas são classificadas em quatro grupos (1 a 4) com subdivisões, segundo o substrato de ação da enzima e perfil de inibição por inibidores de β -lactamases.

Um novo esquema de classificação das β -lactamases, baseado na atividade hidrolítica das enzimas frente às cefalosporinas de amplo espectro e carbapenêmicos, foi proposto por Giske e colaboradores (2009) visando facilitar o controle epidemiológico e melhorar o entendimento clínico. Neste esquema, as β -lactamases são divididas em três grupos: $ESBL_A$ que inclui as enzimas da classe A de Ambler e grupo 2be de Bush-Jacob-Medeiros, $ESBL_M$ que inclui as enzimas AmpC e OXA, e $ESBL_{CARBA}$ que inclui as enzimas com atividade hidrolítica contra carbapenêmicos. Subsequentemente, cada grupo é subdividido em diferentes classes, segundo suas características fenotípicas, genotípicas e epidemiológicas. A figura 1, reproduzida de Giske e colaboradores (2009), demonstra o novo esquema de classificação.

	ESBL _A	ESBL _M	ESBL _{CARBA}
Classes de β-lactamases	Alta prevalência	ESBL_{M-C} (AmpC plasmidial)	ESBL_{CARBA-A}
	CTX-M TEM-ESBLs SHV-ESBLs VEB PER	CMY FOX MIR MOX DHA LAT BIL ACT ACC	KPC GES-2,-4, -5, -6, -8 NMC SME IMI-1, -2
	Baixa prevalência	ESBL_{M-D} (OXA-ESBL)	ESBL_{CARBA-B} (MBL)
	GES-1, -3, -7, -9 SFO-1 BES-1 BEL-1 TLA IBC CMT	OXA Grupo 10 OXA Grupo 13 OXA Grupo 2 Oxa-18 Oxa-15	IMP VIM SPM-1 GIM-1 SIM-1 AIM-1 ESBL _{CARBA-D} (OXA-Carbapenemase) OXA Grupo 23 OXA Grupo 24 OXA-48 OXA Grupo 58
Definição operacional	Não susceptível a cefalosporinas de amplo espectro	Não susceptível a cefalosporinas de amplo espectro	Não susceptível a cefalosporinas de amplo espectro e a pelo menos um carbapenêmico
	E Sinergismo com Clavulanato	E Detecção fenotípica (ESBL _{M-C}) Ou Detecção genotípica (ESBL _{M-D})	E Detecção fenotípica e/ou genotípica de ESBL _{CARBA}

Figura 1. Novo esquema proposto para classificação das β -lactamases. ESBLs da classe A-2be classificadas sob a denominação ESBL_A; ESBLs miscelânea de OXA e AmpC sob a denominação ESBL_M, sendo ESBL_{M-C}: AmpC e ESBL_{M-D}: OXA; e ESBLs com atividade hidrolítica contra carbapenêmicos denominadas ESBL_{CARBA}. Reproduzido de Giske et al., 2009.

Dentre as β -lactamases, um dos grupos mais importantes é o grupo das β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Estas enzimas apresentam a capacidade de hidrolisar a maioria dos β -lactâmicos, incluindo-se as cefalosporinas de terceira e quarta gerações e monobactâmicos, com exceção das cefamicinas, carbapenêmicos e inibidores das β -lactamases (BUSH, 2010). As ESBLs pertencem à classe A de Ambler e estão distribuídas no

grupo 2 de Bush (AMBLER, et al., 1991; BUSH et al., 1995; BUSH, 2001). São enzimas muito heterogêneas, com similaridade variando de 20% a 90% entre suas sequências de aminoácidos (BONNET, 2004). As mais frequentemente detectadas são as pertencentes às famílias TEM, SHV e principalmente CTX-M (YONG et al., 2009; DROPA et al., 2010; RAMOS et al., 2014).

A frequência de isolamento de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL varia muito de região para região. Pesquisas mostram que as maiores taxas do mundo são descritas na Índia ($\geq 80\%$) e China ($\geq 60\%$), seguidas pelo leste e sudeste Asiático ($\geq 30\%$) (HSUEH et al., 2010; HOBAN et al., 2011). Nos Estados Unidos, a prevalência de Enterobacteriaceae produtoras de ESBL é de aproximadamente 12% e, especificamente em *K. pneumoniae* chega a 16% (CASTANHEIRA et al., 2014). Já na Argentina e no Chile, de acordo com o grupo de vigilância SENTRY, a prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foi superior a 60% e 59%, respectivamente (GALES et al., 2012). Estudo mais recente, envolvendo países da América Latina, mostrou que 52,4% de *K. pneumoniae* apresentaram fenotipo típico de produção ESBLs (JONES et al., 2013).

No Brasil, a detecção de Enterobacteriaceae produtoras de ESBLs ocorre desde 1993, porém a primeira descrição de sua ocorrência foi em 1997, no Rio de Janeiro e São Paulo (GALES et al., 1997). Desde então, a prevalência tem aumentado em decorrência de sua expansão clonal, localização plasmidial dos genes codificadores, e de repetidos eventos mutacionais (LIVERMORE, WOODFORD, 2006; BROLUND et al., 2014).

Dentre as ESBLs, as enzimas do grupo CTX-M são prevalentes em todo o mundo, tendo sido considerada endêmica em Enterobacteriaceae (MINARINI et al., 2009; YONG et al., 2009; DROPA et al., 2010; RAMOS et al., 2014). O surgimento destas enzimas ocorreu após a introdução da cefotaxima, na década de 80. Os primeiros relatos aconteceram na Alemanha, em 1989, em uma linhagem de *E. coli* que produzia a enzima denominada CTX-M-1 (BAUERNFEIND et al., 1990). Posteriormente, durante uma epidemia de infecção por

Salmonella na Argentina, no final da década de 80, foi identificada a primeira variante, denominada CTX-M-2 (BAUERNFEIND et al., 1990).

As enzimas CTX-M eram inicialmente reconhecidas por hidrolisarem preferencialmente à cefotaxima, quando comparado à ceftazidima, e por isso receberam esta nomenclatura. Entretanto, já foram descritas variantes de CTX-M com alta capacidade hidrolítica sobre a ceftazidima, como CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19, CTX-M-23, CTX-M-27, CTX-M-55 e CTX-M-123 (BONNET et al., 2001; KARIM et al., 2001; POIREL et al., 2001; BONNET et al., 2003; PITOUT et al., 2004; STURENBURG et al., 2004; KIRATISIN et al., 2007; HE et al., 2013).

As ESBLs tipo CTX-M não apresentam relação próxima com as dos tipos TEM e SHV (BRADFORD, 2001). Há evidências de que sua presença em diversas espécies de Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não fermentadores seja decorrente por aquisição de plasmídeos carreando genes que em *Kluyvera spp* são de localização cromossômica, pois alguns enzimas CTX-M apresentam elevada similaridade com β -lactamases cromossômicas de várias espécies deste gênero (BONNET, 2004; RODRIGUEZ et al., 2004; OLSON et al., 2005).

Atualmente, já foram descritos 161 tipos de CTX-M. Porém, dentre estas, as CTX-M-14 e CTX-M-18, CTX-M-55 e CTX-M-57, CTX-M-2 e CTX-M-97, CTX-M-3 e CTX-M-133 são idênticas (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1> – Pesquisado em 14/01/2015).

Estudos filogenéticos mostram que existem cinco grandes grupos distintos de ESBLs tipo CTX-M, com base na similaridade das sequências de aminoácidos. Dentre as enzimas descritas atualmente, temos no grupo CTX-M-1 as enzimas CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15 (UOE-1), CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-29, CTX-M-30, CTX-M-32, CTX-M-33, CTX-M-34, CTX-M-36, CTX-M-37, CTX-M-42, CTX-M-52, CTX-M-53, CTX-M-54, CTX-M-55, CTX-M-57 e FEC-1. O grupo CTX-M-2 é composto pelas enzimas CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-

M-20, CTX-M-31, CTX-M-35, CTX-M-43 e CTX-M-44 (Toho-1). No grupo CTX-M-8 encontram-se CTX-M-8, CTX-M-40 e CTX-M-63. O grupo CTX-M-9 compreende as enzimas CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-17, CTX-M-19, CTX-M-21, CTX-M-24, CTX-M-27, CTX-M-38, CTX-M-45 (Toho-2), CTX-M-46, CTX-M-47, CTX-M-48, CTX-M-49, CTX-M-50 e CTX-M-51. Do grupo CTX-M-25 fazem parte CTX-M-25, CTX-M-26, CTX-M-39 e CTX-M-41 (BONNET, 2004; HOPKINS et al., 2008; DOUBLET et al., 2009; ZHAO, HU, 2013). Os membros do mesmo grupo exibem similaridade maior que 94% entre suas sequencias de aminoácidos, enquanto entre grupos diferentes, a semelhança é menor que 90% (BONNET, 2004; CANTON, COQUE, 2006).

A grande capacidade de disseminação destas enzimas, devido principalmente à transmissão horizontal de elementos genéticos móveis, além da disseminação de clones resistentes, explica seu perfil pandêmico (CANTON, COQUE, 2006; PATERSON, BONOMO, 2005; TALBOT et al., 2006; PITOUT, LAUPLAND et al., 2008) e sua alta prevalência na comunidade (ENSOR et al., 2008). Cassetes de genes contendo *bla*_{CTX-M}, localizados em transposons inseridos em plasmídeos conjugativos se disseminam horizontalmente entre diversas espécies bacterianas. Estudos moleculares demonstram que a mobilização e disseminação destes genes são mediadas por pelo menos duas seqüências de inserção bem caracterizadas, ISEcp1 e ISCR1 (POIREL et al., 2001; CANTON, COQUE, 2006). Entretanto, outros elementos genéticos podem estar relacionados com a mobilização de genes *bla*_{CTX-M}, porém com menor frequência, como IS10 e IS26 associadas aos genes *bla*_{CTX-M-8} e *bla*_{CTX-M-1} ou ainda, IS903 observado próximo aos genes *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{CTX-M-17} (BOYD et al., 2004; TOLEMAN et al., 2006)

2.3 Resistência aos carbapenêmicos

Desde o surgimento de bactérias multirresistentes produtoras de ESBL, os carbapenêmicos representam uma das únicas alternativas terapêuticas, sendo frequentemente utilizados no tratamento de infecções graves, por sua estabilidade frente às ESBLs. Além disso, apresentam amplo espectro de ação e são bem tolerados pelos pacientes (MOHR, 2008; SHAH, 2008; ZHANEL et al., 2008; NORDMAN et al., 2011; SHENG et al., 2012). Entretanto, seu uso intensivo foi acompanhado pela emergência e disseminação da resistência, tornando as opções de tratamento ainda mais restritas (NADKARNI et al., 2009; CHEN et al., 2012).

Os principais mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos são a produção de enzimas dos tipos *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), oxacilinasas (OXA), metalo- β -lactamases (M β L), sendo que dentre estas se destaca a New Delhi metalo- β -lactamases (NDM), ou a associação entre outras β -lactamases (ESBL ou AmpC) e redução da permeabilidade aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2009; QUEENAN, BUSH, 2007; LEE, BURGUESS, 2012; HUDSON et al., 2014).

As carbapenemases representam a família mais versátil das β -lactamases, por sua ampla atividade hidrolítica sobre a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, além de serem fracamente inibidas por alguns inibidores de β -lactamases (LIVERMORE, WOODFORD, 2006; QUEENAN, BUSH, 2007). Inicialmente, foram descritas como β -lactamases codificadas somente por genes cromossômicos em algumas espécies bacterianas, sendo a primeira carbapenemase cromossômica produzida por Enterobacteriaceae denominada NmcA, identificada em 1993 (NAAS et al., 1994; GARAU et al., 2005).

A partir da década de 90, começaram os relatos sobre carbapenemases codificadas por genes localizados em plasmídeos, e estas enzimas, que desempenham importante papel na resistência aos carbapenêmicos, têm sido relatadas com grande frequência em bactérias gram-

negativas (QUEENAN, BUSH, 2007; HUDSON et al., 2014; PORRES-OSANTE et al., 2014). Uma ampla variedade de carbapenemases plasmídeais, com características bioquímicas diversas, foi identificada em Enterobacteriaceae, e incluem membros pertencentes a 3 das 4 classes de Ambler: A, B e D (QUEENAN, BUSH, 2007; HUDSON et al., 2014).

Neste contexto, destacam-se as *K. pneumoniae* produtoras KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases). Estas enzimas são atualmente as carbapenemases predominantes entre as Enterobacteriaceae (LIVERMORE, 2012), e serão discutidas a seguir.

2.4 Carbapenemases tipo KPC

As carbapenemases do tipo KPC são serino-carbapenemases da classe A de Ambler e grupo funcional 2f. São capazes de hidrolizar os carbapenêmicos, oximino-cefalosporinas, cefamicinas e não são inibidas por inibidores das β -lactamases tais como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (YIGIT et al., 2001; QUEENAN, BUSH, 2007; PAPP-WALLACE et al., 2010; SHANMUGAM et al., 2013; DU et al., 2014).

O primeiro membro da família KPC (KPC-1) foi identificado em 1996 em *K. pneumoniae* isolada de um paciente hospitalizado na Carolina do Norte, Estados Unidos. Entretanto, a caracterização da enzima só foi publicada em 2001 (YIGIT et al., 2001). Após a descrição de KPC-1, ocorreram relatos de uma variante (KPC-2) na costa leste dos Estados Unidos. Porém, descobriu-se mais tarde um erro na sequência depositada originalmente, e que as denominações KPC-1 e KPC-2 referiam-se à mesma enzima. Atualmente, prevalece a designação KPC-2 (QUEENAN, BUSH, 2007; YIGIT et al., 2008). Variantes subsequentes, com diferenças em suas propriedades cinéticas e eficiência de hidrólise dos β -lactâmicos, foram denominadas em ordem numérica, de KPC-2 a KPC-22. As variantes KPC-2 e KPC-3 são as mais prevalentes (NORDMANN et al., 2009; CHEN et al., 2012; <http://www.lahey.org/studies/>).

As enzimas KPC são proteínas de 293 aminoácidos, com sequência característica de β -lactamases da classe A, codificadas por variantes do gene *bla*_{KPC-2}, contido em uma região de 879 pb. KPC-1 apresenta similaridade de 45% com a SME-1, 44% com a NMC-A e 43% com a IMI-1, sugerindo que esta enzima é derivada de um ancestral diferente dos originários destas outras β -lactamases (YIGIT et al., 2001). O gene *bla*_{KPC-2} está associado a plasmídeos de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade, e ao transposon Tn4401, um transposon do tipo Tn3 com aproximadamente 10 kb, que possui uma elevada taxa de transposição replicativa (CUZON et al., 2011). No Tn4401, o gene *bla*_{KPC} é flanqueado por duas sequências de inserção, ISKpn7 (*upstream*) e ISKpn6 (*downstream*). Entre ISKpn7 e *bla*_{KPC} pode existir uma deleção de 100 a 200 pares de bases, o que determina as variantes *a*, *b* e *c* do Tn4401 (Tn4401-like). Além destas, outras duas variantes foram descritas, uma com deleção de 68 pb e outra com deleção de 255 pb, as quais foram denominadas variantes *d* e *e*, respectivamente. O Tn4401 também possui genes que codificam uma transposase (*tnpA*) e uma resolvase (*tnpR*) (RICE et al., 2008; NORDMANN et al., 2009; NAAS et al., 2012), e está frequentemente associado ao Tn1331, um transposon contendo *bla*_{OXA} e *bla*_{TEM-1} (RICE et al., 2008; NAAS et al., 2012; CHEN et al., 2013).

Apesar da elevada taxa de mobilidade e transposição, favorecida por sua localização em plasmídeos, até meados de 2001 o gene *bla*_{KPC} foi descrito com baixa frequência. A partir de 2005, diversos surtos de infecção por *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{KPC} foram relatados nos Estados Unidos, em hospitais metropolitanos de Nova York e Nova Jersey. Desde então, cepas produtoras de KPC disseminaram-se por toda costa leste dos EUA e atualmente já foram descritos em praticamente todos os estados americanos (CDC, 2013).

Após a rápida expansão nos Estados Unidos, a detecção de bactérias produtoras da enzima foi documentada em vários outros países, como China (WEI et al., 2007), Israel (NAVON-VENEZIA et al., 2005), Colômbia (VILLEGAS et al., 2006), Reino Unido (WOODFORD et al., 2008), Brasil (MONTEIRO et al., 2009) e Grécia, onde é endêmica,

entre outros. *K. pneumoniae* é a espécie responsável pela grande maioria dos casos relatados, mas *bla_{KPC}* já foi detectado também em *Citrobacter freundii* e *Enterobacter* spp. (MARCHAIM et al., 2008), *Enterobacter cloacae* (ZAVASCKI et al., 2009; RIBEIRO, et al., 2013), *Serratia marcescens* (DEL PELOSO et al., 2010; RIBEIRO, et al., 2013), *Escherichia coli* (CARVALHO-ASSEF et al., 2010; LEÃO et al., 2010), *Pseudomonas aeruginosa* (VILLEGAS et al., 2007), *Pseudomonas putida* (ALMEIDA, et al., 2012), *Klebsiella oxytoca* (ALMEIDA et al., 2013) e *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (RODRIGUES et al., 2014).

No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2009, com a descrição de *K. pneumoniae* carreadoras de *bla_{KPC-2}* isoladas em Recife no ano de 2006 (MONTEIRO et al., 2009). Logo após, Peirano e colaboradores (2009) caracterizaram seis isolados produtores de KPC-2, originados do Rio de Janeiro entre 2007 e 2008. Entretanto, há evidências de que o surgimento de KPC no Brasil tenha ocorrido anteriormente a 2006, pois durante um estudo regional de vigilância de resistência aos carbapenêmicos, realizado em São Paulo no período de 2003 a 2008, foram detectados duas *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, sendo uma delas isolada em 2005 (PAVEZ et al., 2009). Zavaschi e colaboradores (2010) corroboram com estas evidências, com a descrição de um isolado de *K. pneumoniae* produtora de KPC isolada em Florianópolis em outubro de 2005.

Atualmente, bactérias produtoras da enzima KPC encontram-se amplamente disseminadas no Brasil, e diversas publicações relatam a ocorrência de surtos e casos de infecção em vários estados brasileiros, como Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009), Rio Grande do Sul (CARVALHO-ASSEF et al., 2013), Paraíba (FEHLBERG et al., 2012), Mato Grosso do Sul (CHANG et al., 2013), São Paulo (BUENO et al., 2013) e Pernambuco (DE CÁSSIA ANDRADE MELO R, et al., 2014). Esta realidade é preocupante, pois o tratamento é restrito ao uso de polimixinas, tigeciclina e aminoglicosídeos, associadas ou não ao imipenem (PATEL, BONOMO, 2011; CARVALHAES et al., 2013).

2.5 New Delhi metalo- β -lactamases

A New Delhi Metallo- β -lactamase-1 (NDM-1) foi identificada em 2008, em uma *K. pneumoniae* isolada de um paciente originalmente internado em um hospital em Nova Delhi, Índia. Subsequentemente, foi identificada em 143 pacientes em diferentes cidades da Índia e também em 29 pacientes no Reino Unido (YONG et al., 2009; MOLTON et al., 2013).

A NDM-1 é codificada pelo gene *bla*_{NDM-1}, e confere resistência aos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam (YONG et al., 2009). Atualmente, é a carbapenemase da classe das MBL mais comumente encontrada em Enterobacteriaceae, e tem sido detectada em várias espécies tais como *Morganella morganii* (OLAITAN et al., 2014), *Escherichia coli* (TADA et al., 2014), *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* (WANG et al., 2014), *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Proteus mirabilis* (DORTET et al., 2014). *K. pneumoniae* e *E. coli* são as espécies mais frequentemente relatadas como carreadoras deste gene (JOHNSON, WOODFORD, 2013; DORTET et al., 2014).

Desde a primeira descrição de NDM-1, 14 variantes desta enzima já foram descritas (<http://www.lahey.org/studies/other.asp#table1> – Pesquisado em 14/01/2015). Os relatos sobre algumas destas novas variantes ocorreram em diferentes áreas geográficas: NDM-4 na Itália (COPPO et al., 2014), NDM-5 na Algeria e Índia (SASSI et al., 2014; RAHMAN et al., 2014), NDM-6 e NDM-7 na Índia (RAHMAN et al., 2014) e NDM-12 no Nepal (TADA et al., 2014).

No Brasil, o primeiro relato ocorreu em 2013, em Porto Alegre (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Recentemente, novos casos de NDM em Enterobacteriaceae foram novamente identificados em Porto Alegre (ROZALES et al., 2014). Entretanto, recentes estudos demonstram que a introdução de *bla*_{NDM-1} no Brasil tem sido acompanhada de rápida propagação. Em estudo conduzido por pesquisadores brasileiros, foram analisados quatro

isolados de Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos provenientes da cidade do Rio de Janeiro. Três destes isolados produziam simultaneamente NDM-1 e CTX-M-15, e ainda, um destes também era produtor de KPC-2. Estes isolados não apresentaram nenhuma relação genética (QUILES et al., 2014). O gene *bla*_{NDM-1} pode disseminar-se por clones específicos e plasmídeos epidêmicos (BONOMO, 2011; PEIRANO et al., 2011) e a coprodução de diferentes enzimas evidencia a rápida evolução dos microrganismos e a capacidade de adquirir e manter diversos genes de resistência (QUILES et al., 2014).

Embora o gene *bla*_{NDM-1} tenha sido descrito no Brasil recentemente, esta rápida disseminação deve ser cuidadosamente acompanhada. Carvalho-Assef e colaboradores (2014) relataram alarmantes dados sobre clones de Enterobacteriaceae (*Enterobacter hormaechei*) coletados de pacientes assintomáticos em setembro de 2012 e no período de março a maio de 2013 em um hospital do Rio Grande do Sul. Estes isolados carregavam simultaneamente *bla*_{NDM-1}, *bla*_{CTX-M-15}, e *qnrB4*. Estes dados alertaram para a possibilidade da propagação do NDM no Brasil estar sendo subestimada. Por esta razão, a investigação da presença do gene *bla*_{NDM-1} foi incluída neste estudo.

2.6 Resistência a outras classes de antimicrobianos em *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC

Bactérias produtoras de KPC são resistentes a todos os β -lactâmicos. Além disso, genes de resistência a antimicrobianos de outras classes, tais como quinolonas e aminoglicosídeos, são comumente encontrados em plasmídeos que carregam *bla*_{KPC} (PATERSON, 2006; ENDIMIANI et al., 2008; ZACHARCZUK et al., 2011; SHENG et al., 2012; SPANU et al., 2012; WANG, et al., 2012; BUENO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; BROLUND et al., 2014).

2.6.1 Resistência às quinolonas

As quinolonas apresentam potente atividade contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de apresentar conveniência quanto ao seu uso e sua biodisponibilidade (HURST et al., 2002; GUILLARD et al., 2013). Para o tratamento de infecções por Enterobacteriaceae, a ciprofloxacina e a norfloxacina são consideradas as mais eficazes (LOPES et al., 1998; LOCKHART et al., 2007; LUZZARO, 2008).

As quinolonas são moléculas sintéticas, desenvolvidas a partir de modificações da estrutura 4-quinolona (LESCHER et al., 1962). O ácido nalidíxico, a primeira quinolona a ser produzida, foi descoberto durante a síntese e purificação de um agente antimalárico, a cloroquina, sendo introduzido na clínica médica em 1962. Posteriormente, com o objetivo de ampliar o espectro de ação foram realizadas modificações estruturais, o que deu origem às quinolonas de novas gerações. Na década de 80, surgiram as fluoroquinolonas, assim chamadas devido ao acréscimo de uma molécula de flúor, na região do carbono – 6 (BALL, 2000; EMMERSON, JONES, 2003; HAWKEY, 2003).

A atividade antimicrobiana das quinolonas é resultado de sua interferência no processo de replicação do DNA bacteriano, que é inibido na forquilha de replicação após sua ligação às enzimas topoisomerase IV e DNA girase (Topoisomerase do tipo II) (LESCHER et al., 1962; CHENG et. al., 2013). A DNA-girase, formada por duas subunidades A e duas subunidades B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB*, respectivamente, é responsável por diminuir o número de torções durante a replicação do DNA bacteriano, e também por enovelar e superelicoidizar o DNA. Já a Topoisomerase IV, formada por duas subunidades C e duas subunidades E, codificadas respectivamente pelos genes *parC* e *parE*, separa a nova cópia de DNA do antigo cromossomo para permitir a formação de uma célula-filha (HAWKEY, 2003; DRLICA et al., 2009; FALCONER et al., 2011).

O uso indiscriminado e inadequado das quinolonas tem levado a uma evolução nos mecanismos de resistência (HOOVER, 2002; BIEDENBACH et al., 2006; GUILLARD et al., 2013; STRAND et al., 2014). As alterações de nucleotídeos nos genes cromossômicos *gyrA* e *gyrB* que codificam a DNA girase, e *parC* e *parE*, que codificam as topoisomerasas IV. são considerados os principais (RUIZ, 2003; CHMELNITSKY et al., 2009; GUILLARD et al., 2013; STRAND et al., 2014). Essas mutações ocorrem em uma região bem definida, chamada região determinante de resistência à quinolonas (QRDR – *Quinolone-resistance determinig region*) (JACOBY 2005). Em bactérias Gram negativas as mutações ocorrem geralmente no gene *gyrA* (JACOBY 2005; BOLON, 2011), entretanto, mutações em *parC* em diferentes espécies da família Enterobacteriaceae foram descritas no Brasil por Minarini e Darini (2012). Outros mecanismos de resistência codificados por genes cromossômicos são a redução da permeabilidade da membrana e/ou a hiperexpressão de bombas de efluxo, que levam à diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana (VILA et al., 1994; RUIZ, 2003).

Nos últimos anos, vários mecanismos de resistência às quinolonas codificados por genes de localização plasmideal têm ganhado importância. Entre eles, destaca-se a produção dos peptídeos QnrA, QnrB, QnrC, QnrD e QnrS, codificados por variantes do gene *qnr*, que atuam por inibição alostérica, protegendo a região alvo das quinolonas na enzima DNA-girase (STRAHILEVITZ et al., 2009; RUIZ, 2012; GUILLARD et al., 2013; ROCHA et al., 2014; ANDRADE et al., 2014). Os peptídeos Qnr estão subdivididos em grupos de acordo com a similaridade dos aminoácidos, sendo conhecidos os grupos QnrA (QnrA1 – QnrA7); QnrB (QnrB1 – QnrB80); QnrC; QnrD (QnrD1 – QnrD2) e QnrS (QnrS1 – QnrS9) (HATA et al., 2005; CAVACO et al., 2009; WANG et al., 2009; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; POIREL et al., 2012).

Outro mecanismo de resistência às quinolonas codificado por genes plasmideais é a produção de uma variante de proteína modificadora de aminoglicosídeos, codificada pelo

gene *aac(6')-lb-cr*, que promove acetilação dos sítios de ação das fluorquinolonas (PARK et al., 2006). Além deste, a produção de bombas de efluxo, codificada pelos genes *qepA* (CHMELNITSKY et al., 2009; ZHAO et al., 2010; GUILLARD et al., 2013) e *oqxAB* (STRAHILEVITZ et al., 2009) tem sido descritos.

O sistema de efluxo QepA (*quinolone efflux pump*) foi descrito pela primeira vez em 2007 no Japão, em um plasmídeo pHPA da linhagem *E. coli* C316, em um elemento de transposição, entre duas cópias de IS26 (YAMANE et al., 2007; PERICHON et al., 2007). QepA confere redução da sensibilidade às quinolonas hidrofílicas, como ciprofloxacina, norfloxacina e enrofloxacin, mas possui baixa afinidade por quinolonas hidrofóbicas (levofloxacina, moxifloxacina e ácido nalidíxico) (PERICHON et al., 2007; YAMANE et al., 2007; POIREL et al., 2012). Já OqxAB é um sistema de efluxo derivado da expressão de dois genes, *oqxA* e *oqxB*, que fazem parte de um mesmo operon. Conferem multirresistência, incluindo fluoroquinolonas, ácido nalidíxico e cloranfenicol (KIM et al., 2009).

Os genes plasmídeos de resistência as quinolonas são descritos como determinantes de baixo nível de resistência. Entretanto, sua importância consiste no fato de que sua presença é suficiente para facilitar a seleção de mutantes com altos níveis de resistência (JACOBY, 2005; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2011; HUANG et al., 2012). Além disso, geralmente estão associados a outros genes de resistência em plasmídeos, o que facilita a disseminação por co-seleção (MENDES et al., 2008; MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2008; CHMELNITSKY et al., 2009; ZHANG et al., 2011; HU et al., 2012; ANDRADE et al., 2014).

2.6.2 Resistência aos aminoglicosídeos

O uso dos aminoglicosídeos foi preconizado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como alternativa para a terapia empírica no tratamento de infecções por enterobactérias multirresistentes, especialmente as produtoras de KPC (ANVISA, 2013). Os

aminoglicosídeos são utilizados preferencialmente em terapia combinada com a polimixina (B ou E), com ou sem carbapenêmico (imipenem ou meropenem), ou tigeciclina no tratamento de infecções graves, como infecções urinárias associadas à sepse ou ainda, infecções de corrente sanguínea e pneumonia associada à ventilação mecânica (HIRSCH et al., 2010; ANVISA, 2013).

Os aminoglicosídeos são compostos policatiônicos, formados por um derivado de inositol ligado a um aminoaçúcar, contendo grupos hidroxila livres e pelo menos dois grupos amino. A posição do grupo amino divide os aminoglicosídeos em 3 classes estruturais: i) 4,6-*disubstituted 2-deoxystreptamines* (4,6-DOS), composta pela canamicina e pelos aminoglicosídeos de maior importância clínica, como a gentamicina, tobramicina e amicacina; ii) (4,5-DOS), que compreende a neomicina e paromomicina; iii) um último grupo composto por aminoglicosídeos que não se encaixam em nenhuma das 2 classes, como a apramicina e a estreptomicina (SAVIC et al, 2009).

Nas bactérias Gram-negativas, os aminoglicosídeos ligam-se aos resíduos de carga negativa presentes na membrana externa e posteriormente interagem com o RNA da subunidade 30S do ribossomo através de seus grupos hidroxila e amino (BECKER, COOPER, 2013). Após a ligação ao sítio A do RNA ribossômico 16S, induzem uma mudança na conformação que causa uma leitura errônea do RNA mensageiro, resultando na formação de proteínas inativas (MINGEOT-LECLERCQ et al., 1999; AZUCENA, MOBASHERY, 2001; DOI et al., 2007).

A resistência aos aminoglicosídeos pode ser atribuída a vários mecanismos, como modificação do alvo ribossômico, efluxo do antimicrobiano e modificação enzimática (VAKULENKO, MOBASHERY, 2003). Em bactérias Gram-negativas, o principal mecanismo é a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs – *aminoglycoside modifying enzymes*), que alteram a estrutura química do fármaco, impedindo

que este se ligue às subunidades do ribossomo (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010; WACHINO, ARAKAWA, 2012).

Existem dois sistemas de nomenclatura para as AMEs. A primeira consiste de um código de três letras para identificar sua atividade, sendo as fosfotransferases descritas como APH, as nucleotidiltransferases como ANT e as acetiltransferases como AAC. Estas siglas são seguidas por um número entre parênteses (identifica o sítio de modificação do antimicrobiano), um número romano (indica o perfil particular de resistência) e uma letra minúscula como identificação individual. Os parênteses e a subclasse são separados por um hífen, por exemplo, APH(3')-Ia (DOI et al., 2007; NEVES, 2010). O segundo sistema baseia-se em uma perspectiva genética, com três letras minúsculas em itálico para o tipo de atividade da enzima (*aph*, *aac*, *aad*), uma letra maiúscula para o sítio de modificação e um número para identificar cada gene, por exemplo, *aphA-1* (BECKER, COOPER, 2013).

As acetiltransferases (AAC) catalizam um processo de N-acetilação dependente de acetil CoA, e a modificação do aminoglicosídeo ocorre após a transferência de um grupo acetil da acetil-coenzima A (AcCoA) para um grupo amino, produzindo acetilaminoglicosídeo e coenzima A (CoASH) (CALDWELL, BERGHUIS, 2012). Essas enzimas, subdivididas em quatro classes [AAC(1)], 3 [AAC(3)-I], 2' [AAC(2')] ou 6' [AAC(6')], catalisam a acetilação das posições 1 (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010).

As AAC(6') são as AMEs mais frequentes e importantes. Os genes que as codificam já foram descritas em plasmídeos e cromossomos, e estão disseminados entre patógenos Gram-negativos e Gram-positivos. Entre elas, as enzimas AAC(6')-I são as mais comumente encontradas e conferem resistência à amicacina, tobramicina, netilmicina, canamicina, entre outros. As enzimas AAC(3) constituem o segundo grupo mais comum de acetiltransferases e modificam gentamicina, sisomicina e fotimicina (BECKER, COOPER, 2013).

As fosfotransferases (APH) catalizam reações de O-fosforilação e transferem um grupo fosfato do ATP ou GTP, na presença de Mg^{2+} , para um grupo hidroxila do

aminoglicosídeo, resultando em fosfoaminoglicosídeo e ADP ou GDP (WRIGHT, THOMPSON, 1999). As classes e subclasses de fosfotransferases já descritas são: APH(3')-I a VII, APH(2'')I a IV, APH(3'')-I, APH(4)-I, APH(7'')-I, APH(6')-I e APH(9')-I (RAMIREZ, TOMALSKY, 2010). A maior classe, em número de enzimas, é a das fosfotransferases 3' [APH(3')], que modificam os grupos hidroxila na posição 3. Nesta classe, a subclasse mais prevalente em Gram-negativos é a das enzimas APH(3')-I, que conferem resistência a canamicina, neomicina, paramomicina, ribostamicina e lividomicina (VAKULENKO, MOBASHERY, 2003). Outra importante subclasse destas enzimas é APH(3')-VI, codificadas pelo gene *aph(3')-VI*.

As nucleotidiltransferases (ANT) catalizam reações de O-adenilação, também dependentes de ATP, e transferem um grupo adenilato do ATP ao grupo hidroxila, resultando em adenililaminoglicosídeo e pirofosfato. Compreendem cinco classes: ANT(2''), ANT(3''), ANT(4'), ANT(6), ANT(9) (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010). Apesar de ser a menor família de AMESs em número, possuem significativa importância clínica, pois ANT(2'') confere resistência à amicacina, tobramicina e gentamicina, que são os aminoglicosídeos mais frequentemente prescritos (AVENT et. al., 2011). O gene *ant(2'')-Ia* é amplamente distribuído, sendo localizado em plasmídeos e transposons encontrados tanto em patógenos da família Enterobacteriaceae quanto em bacilos Gram-negativos não-fermentadores (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010).

Outro mecanismo de resistência que ganhou importância nos últimos anos é a produção das metiltransferases 16S rRNA. Estas enzimas conferem níveis extremamente altos de resistência aos aminoglicosídeos, exceto streptomicina, por metilação sítio-específica do RNA ribossômico 16S (YOKOYAMA et al., 2003). Em bactérias produtoras de metiltransferases 16S rRNA, são observados valores de MIC $\geq$ 256 µg/ml para a amicacina, tobramicina e gentamicina (DOI et al., 2007).

Até o presente, foram descritos dez tipos de metiltransferase 16S rRNA: ArmA (*aminoglycoside resistance methyltransferase*), descrita por Galimand e colaboradores (2005), Rmt (*ribosomal methyltransferases*) com suas variantes RmtA (YOKOYAMA et al., 2003), RmtB (DOI et al., 2004), RmtC (WACHINO et al., 2006) e RmtD (DOI et al., 2007), RmtE (DAVIS et al., 2010), RmtF (GALIMAND et al., 2012), RmtG (BUENO et al., 2013) e RmtH (O'HARA et al., 2013), e NpmA (WACHINO et al., 2007). A primeira descrição das enzimas RmtD e RmtG ocorreu no Brasil (DOI et al., 2007; BUENO et al., 2013). Todas são codificadas por genes associados com elementos genéticos móveis, o que favorece a disseminação horizontal intra e inter espécie (DOI, ARAKAWA, 2007; DOI et al., 2007; YAMANE et al., 2007).

Em diversos estudos têm sido evidenciada a presença de genes de metiltransferase 16S rRNA associados a outros genes de resistência, especialmente *bla*_{KPC-2} (ZACHARCZUK et al., 2011; HUANG et al., 2012; MEZZATESTA et al., 2013; RAMOS et al., 2014). Jiang e colaboradores (2010) demonstraram, em *K. pneumoniae*, a presença de um plasmídeo carreando simultaneamente os genes *bla*_{KPC-2} e *armA*. Outros estudos, inclusive no Brasil, também demonstraram a produção de metiltransferase 16S rRNA em *K. pneumoniae* produtoras de KPC (ZACHARCZURK et al., 2011; SHENG et al., 2012; LI et al., 2012; BUENO et al., 2013; RAMOS et al., 2014).

2.6.3 Resistência às polimixinas e tigeciclina

O tratamento das infecções por bactérias multirresistentes produtoras de KPC é atualmente realizado principalmente com polimixinas e tigeciclina (NORDMANN et al, 2009; HIRSCH, TAM, 2010; PATEL, BONOMO, 2011; MICHAIL et al., 2013; CARVALHAES et al., 2013), apesar de seu uso ser limitado por suas propriedades farmacocinéticas e toxicidade (BEIRÃO et al., 2011; LIVERMORE, 2011). A associação com outros antimicrobianos e ajustes nos protocolos são necessários, pois a monoterapia com polimixinas e tigeciclina geralmente não resulta em boa resposta clínica, (CASTANHEIRA et al, 2008; FALAGAS, NORDMANN, 2011; LEE et al., 2012; QURESHI et al., 2012, MICHAIL et al., 2013).

Contudo, o aumento na utilização destes antimicrobianos tem resultado no aumento da resistência (ZAGARIANOU et al., 2012; NIGO et al., 2013; VILLA et al., 2014). Com relação às polimixinas, a resistência ocorre principalmente por alteração na estrutura dos lipopolissacarídeos (LPS), que são os alvos deste antimicrobiano. Além deste, uso de bombas de efluxo, formação de cápsulas e hiperexpressão de proteínas de membrana também são mecanismos de resistência às polimixinas (OLAITAN et al., 2014). Em *K. pneumoniae*, o principal mecanismo de resistência é baseado na alteração na composição dos grupos fosfato no lipídeo A, com aumento no número de resíduos de L-Ara4N, o que contribui para a reduzir a carga negativa da membrana externa e consequentemente sua interação com as polimixinas (HELANDER et al., 1996; VELKOV et al., 2013). Recentemente, mutações que resultam na produção de uma proteína transmembrana alterada foram identificadas também como importante mecanismo de resistência às polimixinas em *Klebsiella* (CANNATELLI et al., 2013; LÓPEZ-CAMACHO et al., 2013; GAIBANI et al., 2014; OLAITAN et al., 2014; POIREL et al., 2014).

Com relação à tigeciclina, diversos estudos de casos têm demonstrado a detecção de resistência após o tratamento, em cepas que eram inicialmente sensíveis (NEONAKIS et al.,

2011; TSAI et al., 2012; NIGO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; VILLA et al., 2014). Em *K. pneumoniae* a resistência é mediada pela hiperexpressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC (VELEBA et al., 2012). Recentemente, Villa e colaboradores (2014) demonstraram que uma mutação na proteína ribossomal S10, localizada próximo ao ponto de ligação da tigeciclina na subunidade ribossomal 30S pode estar associada à resistência em *K. pneumoniae*.

2.7 Importância da tipagem molecular

O conhecimento do padrão de similaridade entre isolados envolvidos em IRAS permite identificar surtos e avaliar as possíveis fontes e formas de transmissão (OLIVE, BEAN, 1999; HARRIS et al., 1999). Diversos métodos para tipagem molecular de patógenos bacterianos têm sido utilizados. Entre eles, as técnicas de PFGE, RAPD, ERIC-PCR, REP-PCR e MLST têm sido descritas como eficientes para a tipagem molecular de *Enterobacteriaceae* e outros (SINGH et al., 2006; ISHI, SADOWSKI, 2009, TOLLENTINO et al., 2011; POLOTTO et al., 2012, PÉREZ-LOSADA et al., 2013).

A técnica de PFGE (“Pulsed-Field Gel Electrophoresis”) é considerada como padrão ouro para a tipagem, sendo amplamente utilizada em estudos envolvendo epidemiologia molecular (PFALLER et al., 2001). Baseia-se na análise do perfil de restrição do DNA cromossômico através de eletroforese em gel (TENOVER et al., 1995). Porém, alguns isolados bacterianos não podem ser tipados pelo PFGE devido à degradação do DNA (SILBERT et al., 2003). Como alternativa, os métodos baseados em PCR (“Polymerase Chain Reaction”) e sequenciamento são utilizados (SINGH et al., 2006; TOLLENTINO et al., 2011; ANDRADE et al., 2011). Entre eles, destacam-se a técnica denominada ERIC-PCR (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*) e MLST (*Multilocus Sequence Typing*), que foram escolhidos para utilização no presente estudo.

2.7.1 ERIC-PCR

A técnica de ERIC-PCR (“**Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus**”) consiste na análise do padrão de amplificação por PCR de elementos repetidos encontrados no genoma bacteriano. Estes elementos, presentes em uma grande diversidade de genomas

bacterianos, estão localizados em regiões extragênicas e contém repetições invertidas altamente conservadas, que podem ser utilizados como pontos de ligação para *primers* em reações de PCR, gerando padrões específicos para diferentes isolados (VERSALOVIC et al., 1991).

Esta metodologia apresenta boa capacidade discriminatória, reprodutibilidade, fácil interpretação, rapidez, baixo custo e não enfrenta problemas com a degradação do DNA (PUJANA et al., 1999; SYRMIS et al., 2004; SILBERT et al., 2004; DE CÁSSIA ANDRADE MELO R, et al., 2014). Nos últimos anos diversos estudos envolvendo *K. pneumoniae* resistentes a antimicrobianos usaram com sucesso a técnica de ERIC-PCR para a tipagem molecular (NEVES et al., 2010; TOLLENTINO et al., 2011), inclusive para isolados produtores de KPC (CABRAL et al., 2012; RICHTER et al., 2012; DE CÁSSIA ANDRADE MELO R, et al., 2014).

2.7.2 MLST

A tipagem por sequenciamento de multilocus – MLST (“*Multilocus Sequence Typing*”) é uma técnica que nos últimos anos vem sendo usada com crescente frequência, sendo considerada de grande importância em programas de vigilância epidemiológica global (TRINDADE et al., 2003; FEIL et al., 2004; MAIDEN, 2006; WOODFORD et al., 2011). O MLST permite identificar microrganismos geneticamente relacionados (clones) e/ou altamente relacionados (complexos clonais), em populações bacterianas (MAIDEN, 2006; ANDRADE, 2011).

O princípio da técnica é a análise da sequência de fragmentos internos de 450 a 500 pares de bases de sete genes *housekeeping*. O MLST usa a variação na sequência destes genes para definir um tipo de sequência (ST – *Sequence Type*), que é comparado com uma base de

dados para identificar os grupos representativos de complexos clonais (CC) e estabelecer a relação epidemiológica entre as bactérias (ENRIGHT, 1999; DIANCOURT et al., 2005; MAIDEN, 2006; BELEN et al., 2009; WOODFORD et al., 2011).

De acordo com Maiden e colaboradores (1998), o MLST apresenta as vantagens de ser altamente reprodutivo e menos sujeito a erros humanos, em comparação a outras metodologias. Além disso, seus resultados podem ser disponibilizados em bancos de dados específicos e compartilhados, o que possibilita a análise comparativa da diversidade genética de bactérias isoladas em diferentes partes do mundo.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar e comparar a presença dos principais genes de resistência aos aminoglicosídeos, quinolonas, cefalosporinas de terceira geração e aos carbapenêmicos, em *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC, provenientes de diversos hospitais da cidade de São Paulo e do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a presença de genes que codificam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos,
- Investigar a presença de genes que codificam metiltransferases 16S rRNA,
- Investigar a presença de genes *qnr*, *oqxAB* e *qepA*, associados à suscetibilidade reduzida às quinolonas,
- Investigar a presença dos principais genes de ESBL e carbapenemases,
- Comparar os isolados provenientes das duas regiões do estado com relação a diversidade de mecanismos de resistência,
- Avaliar a relação genética entre os isolados.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção dos isolados *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC

Foram selecionadas para o estudo, cem *Klebsiella pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC, resistentes aos antimicrobianos aminoglicosídeos e quinolonas, sendo cinquenta isolados provenientes de diferentes hospitais da cidade de São Paulo e pertencentes à coleção do Instituto Adolfo Lutz, e cinquenta isolados provenientes de pacientes atendidos no Hospital de Base de São José do Rio Preto, localizado na região noroeste do estado de São Paulo, no período de 2011 a 2014. Protocolo previamente padronizado (RASHEED et al., 2008) foi utilizado para confirmação da presença do gene *bla*_{KPC} em todos os isolados selecionados para este estudo.

Os isolados provenientes de São José do Rio Preto foram identificados e avaliados quanto ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos pelo equipamento Vitek[®] 2 Compact System (Biomérieux, France), segundo a técnica de microdiluição em caldo automatizada, de acordo com procedimentos de rotina adotados pelo Setor de Microbiologia do Laboratório Central do HB. Os isolados provenientes de São Paulo foram identificados pelo método manual clássico de série bioquímica e os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos foram determinados por técnica de disco-difusão (método de Kirby-Bauer) e Concentração Inibitória Mínima pelo método epsilométrico (E-test[®], AB Biodisk, Suécia). A interpretação dos resultados dos testes de suscetibilidade foi realizada de acordo com o CLSI (2013) e as recomendações da Anvisa (NT 01/2013).

Os seguintes antimicrobianos foram testados: Piperacilina-tazobactam, Cefepime, Cefotaxima, Cefoxitin, Ceftazidima, Ceftriaxona, Ertapenem, Imipenem, Meropenem, Norfloxacin, Ciprofloxacina, Ácido nalidíxico, Tobramicina, Gentamicina, Amicacina,

Canamicina. A Polimixina B e Tigeciclina foram testados pelo método epsilométrico (E-test®, AB Biodisk, Suécia) em todos os isolados.

4.1.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

Todos os isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram completa ausência de halo de inibição no teste de suscetibilidade aos aminoglicosídeos amicacina, gentamicina e tobramicina foram selecionados para determinação da Concentração Inibitórias Mínimas (CIM) da gentamicina, tobramicina e amicacina, pelo método epsilométrico (E-test®, AB Biodisk, Suécia).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de uma suspensão de colônias isoladas, em solução NaCl 0,85%, com turbidez semelhante ao padrão 0,5 da escala de McFarland (medida pelo 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 E-test® com auxílio de uma pinça esterilizada, de acordo com as instruções do fabricante. As placas foram incubadas a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 16-20 horas. Após, realizou-se a leitura e interpretação de acordo com o CLSI 2013. A determinação da CIM foi dada a partir da intersecção da elipse com a escala da tira de E-test®.

4.2 Armazenamento e manutenção dos isolados

Após a identificação e dos testes de susceptibilidade aos antimicrobianos, os isolados selecionados foram mantidos em coleção de cultura em freezer a -80°C . Para isso, uma colônia isolada obtida da placa foi inoculada em caldo TSB (“Tryptic Soy Broth”, BACTO™,

França) a 37 °C por 16 a 18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferido para criotubos esterilizados previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol 50% esterilizado por autoclavagem a 121°C por 15 minutos. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em duplicata e cada criotubo identificado com uma sigla, sendo os isolados de São Paulo identificados como SP e os isolados de São José do Rio Preto como KP, um número da coleção de cultura e data de armazenamento. Paralelamente, os dados relativos a cada isolado clínico foram armazenados em uma planilha, contendo informações como número de identificação na coleção de cultura, sempre precedido pelo número do prontuário do paciente, data, sítio de isolamento, unidade de internação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.3 Extração de DNA genômico bacteriano

Os isolados armazenados a -80 °C foram reativadas por cultivo em caldo TSB por 16 a 24 horas a 37 °C. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 15000 g por 10 minutos e o sobrenadante descartado, essa massa celular obtida (*pellet*) foi utilizada para a extração do DNA genômico bacteriano. O *pellet* foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q e submetido à nova centrifugação a 15000 x g por 10 minutos, em seguida, após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspendido em 40 µL de água Milli-Q e incubado a 100 °C por 10 minutos.

Após a fase de lise e liberação do DNA, a mistura foi submetida a choque térmico em gelo por 2 minutos e centrifugada a 15000 x g por 10 segundos a 4 °C. O sobrenadante, contendo o DNA, foi acondicionado em outro tubo de polipropileno de 1,5 mL, previamente identificado, onde foram adicionados 500 µl de etanol absoluto a -20 °C e incubado em gelo por 20 minutos. Após a incubação, esta amostra de DNA foi centrifugada a 16000 x g por 10

minutos, o sobrenadante descartado e 300 µl de etanol 70% (-20 °C) foram adicionados à amostra de DNA, em seguida, as etapas de homogeneização e centrifugação foram repetidas. O sobrenadante foi descartado e, após a secagem, o DNA foi ressuscitado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) (Kit comercial Invitrogen®) e a amostra de DNA incubada por 30 minutos a 37 °C em termobloco Thermomixer Comfort (Eppendorf). O DNA foi quantificado em espectrofotômetro Biophotometer (Eppendorf) armazenado em freezer - 20 °C para posterior utilização.

4.4 Investigação de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase

4.4.1 Investigação de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Foram realizados três ensaios de PCR-Multiplex segundo protocolo descrito por Akers e colaboradores (2010) para pesquisar sequências específicas dos genes codificadores das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: AACs, ANTs e APHs.

À reação PCR-Triplex-1 foram adicionados *primers* específicos para amplificação dos genes *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa* e *aac(6')-Ih*; à reação PCR-Triplex-2 foram inclusos os *primers* para a amplificação de *aph(3')-VI*, *ant(2')-Ia* e *rrn*, e, à reação PCR-Duplex, foram utilizados os *primers* para a amplificação de *aph(3')-Ia* e *aac(6')-Ib*. O *primer rrn*, cujo alvo é um fragmento do gene 16S do RNA ribossômico altamente conservado em espécies bacterianas, foi adicionado como controle interno da reação.

Parâmetros utilizados para os três ensaios: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 49°C por 1 minuto (reações triplex 1 e 2) e a 54°C (reação duplex) e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma extensão final por 5 minutos a 72°C completou a reação. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em

gel de agarose (1%) acrescido de 0,8 μ L de brometo de etídio (10mg/mL). A corrida de eletroforese foi programada por 60 minutos a 6 V/cm, o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (*Thermo Scientific*). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*). Os protocolos dos PCR-Triplex-1 e PCR-Triplex-2; e do PCR-Duplex estão descritos nos quadros 1 e 2, respectivamente. Os *primers* utilizados, no quadro 3.

Em todos os ensaios de PCR, uma reação sem amostra de DNA foi utilizada como controle negativo e uma amostra de DNA positiva para o gene pesquisado pré-caracterizado e confirmado por sequenciamento, foi utilizada como controle positivo.

Quadro 1. Ensaios PCR-Triplex-1 e PCR-Triplex-2 para investigação de genes de AMEs

Componentes Triplex 1	Componentes Triplex 2	Volume
Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	2,5 μ l
MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	3,0 μ l
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 μ l
Primer aac(3)Ia-F (10 μ M)	Primer aph(3)VI-F (10 μ M)	0,3 μ l
Primer aac(3)Ia-R (10 μ M)	Primer aph(3)VI-R (10 μ M)	0,3 μ l
Primer aac(3)IIa-F (10 μ M)	Primer ant(2)Ia-F (10 μ M)	0,3 μ l
Primer aac(3)IIa-R (10 μ M)	Primer ant(2)Ia-R (10 μ M)	0,3 μ l
Primer aac(6)Ih-F (10 μ M)	Primer rrm-F (10 μ M)	0,3 μ l
Primer aac(6)Ih-R (10 μ M)	Primer rrm-R (10 μ M)	0,3 μ l
Taq-DNA polimerase (5U/ μ l)	Taq-DNA polimerase (5U/ μ l)	0,2 μ l
Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 μ l
DNA (100 ng/ μ l)	DNA (100 ng/ μ l)	1,0 μ l

Quadro 2. Ensaio PCR-Duplex para investigação de genes de AMEs

Componentes Duplex	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer aph(3)Ia-F(10 µM)	0,3 µl
Primer aph(3)Ia-R (10 µM)	0,3 µl
Primer aac(6)Ib-F(10 µM)	0,3 µl
Primer aac(6)Ib-R(10 µM)	0,3 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	1,0 µl

Quadro 3. Primers utilizados para a investigação de genes de AMEs

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
N-Acetiltransferases					
gene <i>aac(6')-Ib</i> (Triplex 1)	aac(6)Ib-F	TGCCGATATCTGAATC	49	407	AKERS et al, 2010
	aac(6)Ib-R	ACACCACACGTTTCAG			
gene <i>aac(3)-Ia</i> (Triplex 1)	aac(3)Ia-F	GACATAAGCCTGTTTCGGTT	49	372	
	aac(3)Ia-R	CCCGCTTTCTCGTAGCA			
gene <i>aac(3)-IIa</i> (Triplex 1)	aac(3)IIa-F	ATGCATACGCGGAAGGC	49	822	
	aac(3)IIa-R	TGCTGGCACGATCGGAG			
gene <i>aac(6')-Ib</i> (Duplex)	aac(6)Ib-F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	54	395	
	aac(6)Ib-R	CCCGCTTTCTCGTAGCA			
O-Fosforotransferases					
gene <i>aph(3')-VI</i> (Triplex 2)	aph(3)VI-F	CGGAAACAGCGTTTTAGA	49	716	AKERS et al, 2010
	aph(3)VI-R	TTCTTTTGTGTCAGGTC			
gene <i>aph(3')-Ia</i> (Duplex)	aph(3)Ia-F	CGAGCATCAAATGAAACTGC	54	623	
	aph(3)Ia-R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG			
O-Nucleotidiltransferases					
gene <i>ant(2')-Ia</i> (Triplex 2)	ant(2)Ia-F	ATCTGCCGCTCTGGAT	49	404	AKERS et al, 2010
	ant(2)Ia-R	CGAGCCTGTAGGACT			
Controle interno reação					
gene <i>rnm</i> (16S rRNA) (Triplex 2)	rnm-F	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	49	216	AKERS et al, 2010
	rnm-R	AGGCCCGGGAACGTATTAC			

4.4.2 Investigação de genes de enzimas das metiltransferases 16S rRNA

A investigação da presença dos genes *ribosomal methyltransferase* (*rmt*) e *aminoglycoside resistance methyltransferase* (*arm*) das metiltransferases 16S RNAr foi realizada segundo protocolos e *primers* previamente descritos (Quadro 6). Para a investigação de *rmtG* foram utilizados *primers* e protocolos descritos por Bueno e colaboradores (2013); a

investigação dos genes *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD* e *armA*, foi realizada segundo protocolos e *primers* descritos por Doi e Arakawa (2007) e por fim *rmtH* seguindo O'Hara e colaboradores (2013). Os protocolos encontram-se descritos nos quadros 4 e 5 e *primers* no quadro 6. Controles do ensaio conforme descritos no item 4.4.1.

Parâmetros utilizados para PCR-Triplex e PCR-Duplex: desnaturação inicial a 96°C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma extensão final por 5 minutos a 72°C completou a reação.

Parâmetros utilizados para o PCR-Single: desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 94°C por 15 segundos, anelamento a 55°C por 15 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma extensão final por 7 minutos a 72°C completou a reação. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.4.1.

Quadro 4. Ensaio para investigação dos genes *rmtG* e *rmtH* de metiltransferase 16S rRNA

Componentes <i>rmtG</i>	Componentes <i>rmtH</i>	Volume
Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer <i>rmtG</i> -F (10 µM)	Primer <i>rmtH</i> -F (10 µM)	1,0 µl
Primer <i>rmtG</i> -R (10 µM)	Primer <i>rmtH</i> -R (10 µM)	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

Quadro 5. PCR-Triplex e PCR-Duplex para investigação de genes metiltransferase 16S rRNA

Componentes Triplex	Componentes Duplex	Volume
Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer rmtB-F (10 mM)	Primer rmtA-F (10 mM)	1,0 µl
Primer rmtB-R (10 mM)	Primer rmtA-R (10 mM)	1,0 µl
Primer rmtC-F (10 mM)	Primer rmtD-F (10 mM)	1,0 µl
Primer rmtC-R (10 mM)	Primer rmtD-R (10 mM)	1,0 µl
Primer armA-F (10 mM)	-	1,0 µl
Primer armA-R (10 mM)	-	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U µl)	Taq-DNA polimerase (5U µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng µl)	DNA (100 ng µl)	2,0 µl

Quadro 6. Primers utilizados para a investigação dos genes de metiltransferase 16S rRNA

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
Ribosomal methyltransferase					
gene rmtG	rmtG-F	AAATACAGCGATGTGTGTCC	55	250	BUENO et al, 2013
	rmtG-R	ACACGGCATCTGTTTCTTCC			
gene rmtH	rmtH-F	ATGACCAITGAACAGGCAGC	55	758	O'HARA et al, 2013
	rmtH-R	TCAAGCTGGGTTTGGCTGGA			
gene rmtB (Triplex)	rmtB-F	GCTTCTGCGGGCGATGTAA	55	173	
	rmtB-R	ATGCAATGCCGCGCTAT			
gene rmtC (Triplex)	rmtC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG	55	711	DOI et al, 2007
	rmtC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT			
gene rmtD (Duplex)	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCCCTC	55	635	
	rmtA-R	TTGCTTCCATGCCCTTGCC			
	rmtD-F	CGGCACGCGATTGGGAAGC	55	401	
	rmtD-R	CGGAAACGATGCGACGAT			
Methyltransferase					
gene armA (Triplex)	armA-F	ATTCTGCCTATCCIAATTGG	55	315	DOI et al, 2007
	armA-R	ACCTATACTTTATCGTCGTC			

4.4.3 Investigação de genes de *qnr*

Para investigar a presença de genes *qnr*, foram realizados ensaios de PCR-Triplex para os genes *qnrA*, *qnrB* e *qnrS* e ensaios de PCR-Single para os genes *qnrC* e *qnrD*, de acordo com metodologia previamente padronizada (CATTOIR et. al., 2007; ZHAO et. al., 2010;

WANG et. al., 2009). Os protocolos e *primers* utilizados estão descritos nos quadros 7 e 8, respectivamente. Controles do ensaio conforme descritos no item 4.4.1.

Parâmetros empregados no ensaio PCR-Triplex: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 54°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Uma extensão final por 10 minutos a 72°C completou a reação.

Parâmetros empregados nos ensaios PCR-single: desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 94 °C por 30 segundos, anelamento a 50°C (*qnrC*) e 48°C (*qnrD*) por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos (*qnrC*) e 90 segundos (*qnrD*). Uma extensão final por 7 minutos a 72 °C completou a reação.

Os produtos amplificados nos ensaios PCR-Triplex e PCR-Single para *qnrC* foram visualizados de acordo com o item 4.4.1. Para a visualização dos produtos amplificados no ensaio PCR-single para *qnrD*, realizou-se a eletroforese em gel de agarose a 1% acrescida de 0,8 µL de brometo de etídio (10mg/mL), corrida de eletroforese programada por 60 minutos a 6 V/cm e marcador de peso molecular de 1 Kb (*Thermo Scientific*). O gel foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*).

Quadro 7. Protocolo dos ensaios utilizados para investigação de genes *qnr*

Componentes Multiplex	Componentes QnrC	Componentes QnrD	Volume
Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
dNTP (2,5 mM)	dNTP (2,5 mM)	dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer <i>qnrA</i> F (10 µM)	Primer <i>qnrC</i> F (10 µM)	Primer <i>qnrD</i> F (10 µM)	1,0 µl
Primer <i>qnrA</i> R (10 µM)	Primer <i>qnrC</i> R (10 µM)	Primer <i>qnrD</i> R (10 µM)	1,0 µl
Primer <i>qnrB</i> F (10 µM)	-	-	1,0 µl
Primer <i>qnrB</i> R (10 µM)	-	-	1,0 µl
Primer <i>qnrS</i> F (10 µM)	-	-	1,0 µl
Primer <i>qnrS</i> R (10 µM)	-	-	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U/µl)	Taq-DNA polimerase (5U/µl)	Taq-DNA polimerase (5U/µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	Água Ultrapura	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	DNA (100 ng/µl)	DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

Quadro 8. *Primers* utilizados nos ensaios para a investigação dos genes *qnr*

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5´ a 3´	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
qnr					
qnrA	qnrA-F	AGAGGATTTCTCACGCCAGG	54	580	CATTOIR et al, 2007
	qnrA-R	TGCCAGGCACAGATCTTGAC			
qnrB	qnrB-F	GGMATHGAAATTCGCCACTG		264	
	qnrB-R	TTTGCYGYTCGCCAGTCGAA			
qnrS	qnrS-F	GCAAGTTCATTGAACAGGGT	428	WANG et al, 2009	
	qnrS-R	TCTAAACCGTCGAGTTCGGCG			
qnrC	qnrC-F	GGGTTGTACATTATTGAATC	50		447
	qnrC-R	T TCCACTTTACGAGGTTCT			
qnrD	qnrD-F	TTTTCGCTAACTAACTCGC	48	1084	ZHAO et al, 2010
	qnrD-R	GAAAGGATAAACAGGCAAAT			

4.4.4 Investigação de genes de bombas de efluxo *oqxAB* e *qepA*

Ensaios com metodologias previamente padronizadas foram empregados para investigar a presença de genes de bombas de efluxo *oqxAB* (KIM et. al., 2009) e *qepA* (MA et. al., 2019). Os protocolos e *primers* utilizados estão descritos nos quadros 9 e 10, respectivamente. Controles do ensaio conforme descritos no item 4.4.1.

Parâmetros utilizados no ensaio de PCR para investigação do gene *oqxAB*: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 58°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 5:30 minuto. Uma extensão final por 7 minutos a 72 °C completou a reação. O produto amplificado foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% acrescida de 0,8 µL de brometo de etídio (10mg/mL). A corrida de eletroforese foi programada por 90 minutos a 6 V/cm, o marcador de peso molecular utilizado foi de 1 Kb (*Thermo Scientific*). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (*Loccus Biothechnology*).

Parâmetros utilizados no ensaio de PCR para investigação do gene *qepA*: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos de

amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 95°C por 45 segundos, anelamento a 68°C por 45 segundos e extensão a 72 °C por 45 segundos. Uma extensão final por 7 minutos a 72 °C completou a reação. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.4.1.

Quadro 9. Protocolo para investigação de genes de bombas de efluxo

Componentes QepA	Volume	Componentes QqxAB	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl	Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	0,5 µl	MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	1,0 µl	Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,5 µl
Primer qepA-F(10 µM)	1,0 µl	Primer oqxAB-F(10 µM)	1,0 µl
Primer qepA-R (10 µM)	1,0 µl	Primer oqxAB-R (10 µM)	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl	Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,5 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl	Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl	DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

Quadro 10. Primers utilizados para investigação de genes de bombas de efluxo

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
<i>qepA</i>	qepA-F	CGGCGGCGTGTGCTGGAGTTCTT	68	552	MA et al, 2009
	qepA-R	CCGACAGGCCACGACGAGGATGC			
<i>oxxAB</i>	oxxAB-F	CCCTGGACCGCACATAAAG	58	5140	ZHAO et al, 2010
	oxxAB-R	AAAGAACAGATTACCGCAAC			

4.4.5 Investigação de genes *bla*_{NDM}

A investigação da presença do gene que codifica a carbapenemase do tipo NDM foi realizada segundo Poirel e colaboradores (2011). O protocolo utilizado está descrito no quadro 11. Controles do ensaio conforme descritos no item 4.4.1. Parâmetro utilizado: desnaturação inicial a 96°C por 10 minutos, seguida de 36 ciclos de 96°C por 30 segundos, 54°C por 40 segundos, 72°C por 50 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.4.1.

Quadro 11. Protocolo para investigação de gene *bla_{NDM}*

Componentes NDM	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer NDM-F(10 µM)	1,0 µl
Primer NDM-R (10 µM)	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

4.4.6 Investigação de genes *bla_{CTX-M}*

Para investigar a presença de genes *bla_{CTX-M}*, foi utilizado protocolo descrito por Edelstein e colaboradores (2003). O protocolo encontra-se descrito no quadro 12 e os *primers* utilizados estão descritos no quadro 13. Controles do ensaio conforme descritos no item 4.4.1.

Parâmetros utilizados: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 95 °C por 20 segundos, anelamento a 51°C por 30 segundos e extensão a 72 °C por 30 segundos. Uma extensão final por 3 minutos a 72 °C completou a reação. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.4.1.

Quadro 12. Protocolo para investigação de gene *bla*_{CTX-M}

Componentes	Volume
Tampão para PCR (10X)	2,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	2,0 µl
Mistura de nucleotídeos dNTP (2,5 mM)	2,0 µl
Primer CTX-M-F(10 µM)	1,0 µl
Primer CTX-M-R (10 µM)	1,0 µl
Taq-DNA polimerase (5U/ µl)	0,2 µl
Água Ultrapura	q.s.p. 25 µl
DNA (100 ng/µl)	2,0 µl

Quadro 13. Primers utilizados para investigação e sequenciamento dos genes *bla*_{CTX-M}

Alvo de amplificação	Primers	Sequências 5' a 3'	Temperatura de anelamento	Tamanho Amplicon (pb)	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F	TTTGGCATGTGCAGTACCACTAA	51	544	EDELSTEIN et al, 2003
	CTX-M-R	CGATATCGTGTGGTGGCCATA			
	CTX-M-15-F	CACACGTGGAAATTAGGGACT	51	1001	MUZAHEED et al, 2008
	CTX-M-15-R	GCCGTCTAAGGCGATAAACA			
	CTX-M-2-F	AAATGTGCTGCTCTTTCGTGAGC	60	1122	DE OLIVEIRA GARCIA et al, 2008
	CTX-M-2R	AGGGTTCGTGCAAGACAAGA CTG			

4.5 Purificação dos produtos de PCR

Os produtos amplificados obtidos nos ensaios de PCR para detecção dos genes investigados foram purificados com etanol, de acordo com protocolo adaptado de Sambrook e Russel (2001). Os “*amplicons*” foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio 3 M seguido de três vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos foram incubados em freezer - 80 °C por uma hora para que o DNA fosse precipitado, em seguida foram centrifugados a 16100 g por 20 minutos a 4 °C e o sobrenadante descartado. Ao DNA precipitado foram adicionados três vezes o volume de etanol a 70% (*Merck Chemicals*) e, em seguida, este foi centrifugado por 20 minutos a 16100 g, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o tubo

deixado aberto até secagem completa do etanol. O DNA foi ressuspensionado em 20 µl de água ultra-pura (Invitrogen) e armazenado em freezer -20°C.

4.6 Sequenciamento dos genes

O sequenciamento dos genes detectados foi realizado com o kit *Big Dye Terminator* v3.1 (*Applied Biosystems, USA*), segundo recomendações do fabricante e teve como finalidade confirmar se os “*amplicons*” obtidos na PCR correspondiam aos genes investigados. Os *primers* utilizados no seqüenciamento foram os mesmos das reações de PCR, exceto para *bla*_{CTX-M}, para os quais foram utilizados *primers* específicos de CTX-M-2 e CTX-M-15, descritos no quadro 13. A reação de sequenciamento foi realizada com 2,0 µL de “Big Dye Terminator”, 4,0 µL de solução tamponante (5X), 1,0 µL de *primer* específico (3,2 µM), 1,0 µL de DNA purificado com concentração aproximada de 200 ng/mL e água q.s.p. 20 µL. A ciclagem empregada foi de 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 30 segundos, anelamento a 50°C por 15 segundos, extensão a 60°C por 4 minutos.

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 Genetic Analyzer (*Applied Biosystems Foster City, CA*) e as sequências obtidas foram pré-processadas pelo software “Seqman” e os *contigs* das sequências *forward* e *reverse* foram comparados 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 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

4.7 Tipagem molecular por ERIC-PCR

A tipagem por ERIC-PCR foi realizada segundo método e *primer* previamente descrito (CARTELLE et al., 2004). Foram utilizados 2,5 µl de tampão (10X), 3,0 µl de MgCl₂ (25mM), 2,0 µl de dNTP (2,5 mM), 1,5 µl do *primer* (10 pmol/ µl), 0,2 ul de Taq (5U/ul), 1,5 µl de DNA (300ng) e água q.s.p. 25 µl. O DNA foi inicialmente desnaturado a 94°C por 10 minutos e submetido a 30 ciclos com as etapas de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 52°C por 1 minuto, extensão a 72°C por 8 minutos e extensão final a 72°C por 16 minutos.

Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,5%, previamente adicionado de brometo de etídio (0,08 µL/ 100 mL). A eletroforese foi realizada a 6 V/cm, por 120 minutos. Foram adicionados 2 µL de solução de azul de bromofenol à amostra para aplicação no gel. O marcador de peso molecular de 1Kb (Invitrogen) foi utilizado para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. Todos os géis foram fotografados com a mesma abertura de lente, foco e zoom óptico.

4.8 Análise da Similaridade Genética

Para a avaliação da similaridade genética entre os isolados, os padrões de identidade genética gerados por ERIC-PCR foram analisados com auxílio do programa Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica) e usados na construção de dendrogramas, empregando-se um coeficiente de correlação de Dice de 5%, com tolerância 2,0% e otimização de 1,0% (AGUILAR, 2009).

4.9 *Multilocus Sequence Typing*

O protocolo utilizado para a tipagem por *Multilocus Sequence Typing* (MLST) foi o descrito por Diancourt e colaboradores (2005). Neste método são utilizadas a sequência de 7 genes *housekeeping* (*tonB*, *rpoB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *gapA*) para a determinação do *Sequence type* (ST).

4.9.1 Amplificação dos genes “housekeeping”

A primeira etapa da técnica consiste em amplificar os genes *housekeeping* por PCR. Para cada gene, utilizou-se uma mistura de 30µL contendo 3,3µL de máster mix, 1,5µL de cada *primer* F e R (concentração inicial 10µM), 1,5µL de taq polimerase, 20,2µL de água e 2µL de DNA. A ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 94 °C por 2 minutos, em seguida, o material foi submetido a 35 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo composto por desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento a 45°C por 1 minuto e extensão a 72 °C por 2 minutos. Uma extensão final por 2 minutos a 72 °C completou a reação. Os produtos amplificados foram visualizados de acordo com o item 4.4.1. Os *primers* utilizados estão descritos no quadro 14.

Quadro 14. Primers de PCR e sequenciamento utilizados para MLST

Gene	Função do gene	Sequência dos <i>primers</i>	Fragmento (pb)
<i>rpoB</i>	sub-unidade beta do RNA polimerase B	VIC3: GGC GAA ATG GCW GAG AAC CA VIC2: GAG TCT TCG AAG TTG TAA CC	980
<i>gapA</i>	Glyceraldeído 3-fosfato Desidrogenase	gapA173: TGA AT ATG AT CCA CTC ACG G gapA181: CTT CAG AAG CGG CTT TGA TGG CTT	467
<i>mdh</i>	Malato Desidrogenase	mdh130: CCC AAC TCG CTT CAG GTT CAG mdh867: CCG TTT TTC CCC AGC AGC AG	758
<i>Pgi</i>	Fosfoglicose Isomerase	pgi1.F: GAG AAA AAC CTG CCT GTA CTG CTG GC pgi1.R: CGC GCC ACG CTT TAT AGC GGT TAA T pgi2.F (seq): CTG CTG GCG CTG ATC GGC AT pgi2.R (seq): TTA TAG CGG TTA ATC AGG CCG T	650
<i>phoE</i>	Fosfoporina B	PhoE604.1: ACC TAC CGC AAC ACC GAC TTC TTC GG PhoE604.2: TGA TCA GAA CTG GTA GGT GAT	420
<i>infB</i>	Fator 2 de início da Tradução	infB1F: CTC GCT GCT GGA CTA TAT TCG infB1R: CGC TTT CAG CTC AAG AAC TTC infB2F (seq): ACT AAG GTT GCC TCC GGC GAA GC	450
<i>tonB</i>	Transdutor de energia Periplasmática	tonB1F: CTT TTT CAG CTC AAG AAC TTC tonB1R: ATT CGC CGG CTG RGC RGA GAG	515

4.9.2 Purificação do produto de PCR

A purificação do produto amplificado foi realizada com ExoSAP-IT, misturando-se 2µL de ExoSAP-IT com 5µL do produto amplificado, com incubação a 37°C por 15min seguido por 80°C por 15min e armazenou-se a 4°C até o momento do uso.

4.9.3 Reação com o Big Dye[®]

Nesta etapa, foram feitos 2 mix para cada gene, contendo 0,875µL de água ultra pura estéril, 0,875µL do tampão do Big Dye[®], 0,25µL de Big Dye[®] e 2µL de *primer* F ou R (concentração inicial 0,67µM) e 1µL da amostra purificada. A ciclagem utilizada foi: desnaturação inicial a 96°C por 1minuto, seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos e armazenado a 4°C até a purificação. Sendo que no programa do termociclador a variação de temperatura foi de 1°C por segundo em cada uma das etapas.

4.9.4 Precipitação do produto do Big Dye[®]

Na placa onde foi realizada a reação, foram adicionados 80µL da solução contendo 0,3mL 3M NaOAc (pH 5,3), 6,25 mL Etanol 95% e 1,45 mL Água Mili-Q estéril. A placa foi incubada em temperatura ambiente por 15min e posteriormente centrifugada a 4°C e 2000g por 45min. Em seguida, o excesso de sobrenadante foi retirado e uma nova centrifugação, com a placa invertida em papel filtro por 1min a 4°C e 500g foi realizada, para retirada total da solução. Foram então adicionados 150µL de etanol 70% à placa e a mesma foi centrifugada por 10min a 4°C e 2000g. Repetiu-se a retirada do sobrenadante e centrifugação invertida. Após, permanecer aberta por 5min para secagem total, a placa foi coberta com alumínio e armazenada a -20°C até o momento do sequenciamento.

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Foster City, CA) e as sequências obtidas pré-processadas pelo software *Seqman* e os *contigs* das sequências *forward* e *reverse* foram comparados com as sequências depositadas no BLAST. Para confirmação e comparação dos alelos encontrados no BLAST, foi feito alinhamento pelo ClustalW.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

No anexo 1 é apresentado o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos e os dados relativos a cada *K. pneumoniae* produtora de KPC estudada.

A resistência aos β -lactâmicos imipenem, meropenem, ertapenem e piperacilina/tazobactam foi observada em todos os cem isolados. Com relação à resistência aos outros antimicrobianos desta classe, os resultados foram variáveis, sendo observadas diferentes porcentagens de resistência ao cefepime, cefoxitina, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona, embora todas acima de 88%. Todos os isolados provenientes de São Paulo, denominados SP, apresentaram resistência à cefotaxima, 94% apresentaram resistência à cefoxitina e ceftazidima, 90% à cefepima e 88% à ceftriaxona. Dentre os isolados provenientes de São José do Rio Preto, denominados KP, todos apresentaram resistência à cefepima, ceftazidima e ceftriaxona, e apenas 11% dos isolados apresentaram-se sensíveis à cefotaxima e cefoxitina. A figura 2 ilustra a susceptibilidade encontrada nos isolados produtores de KPC incluídos neste estudo.

A enzima KPC hidrolisa todos os β -lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. Porém, as cefamicinas e a ceftazidima são fracamente hidrolizadas, e os carbapenêmicos, a cefotaxima e o aztreonam são hidrolisados com menor eficiência que as penicilinas e as cefalosporina de espectro restrito (LIVERMORE, 2012). Esta afirmativa corrobora com o perfil observado em alguns isolados estudados, como a sensibilidade à ceftazidima em 6% dos isolados SP e a sensibilidade à cefotaxima em 11% dos isolados KP. Foi interessante observar também sensibilidade a alguns β -lactâmicos em isolados onde o gene de β -lactamase *bla*_{CTX-M}, investigado neste estudo, não foi detectado

(quatro dos cinco isolados KP sensíveis a cefotaxima, todos os três isolados SP sensíveis a ceftazidima e nos cinco isolados SP sensíveis a cefepima).

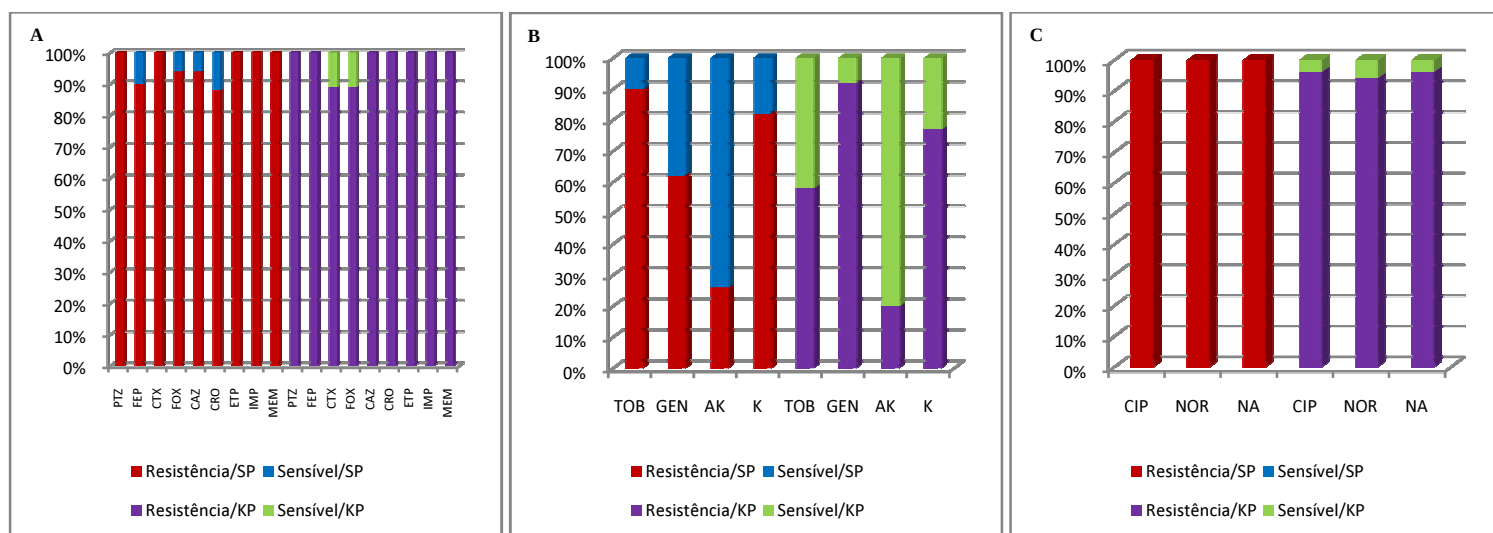
Há diferença entre os perfis de resistência apresentados pelos isolados KP e SP. A presença de outros mecanismos de resistência associados com a produção de KPC nestes isolados foi investigada neste estudo e os resultados obtidos serão discutidos posteriormente.

Com relação aos aminoglicosídeos, foram observadas diferentes porcentagens de resistência entre os isolados KP e os isolados SP, com destaque para gentamicina e tobramicina, sendo 20,4% para amicacina, 92% para gentamicina, 58% para tobramicina e 77% para canamicina nos isolados KP. Nos isolados SP as porcentagens de resistência foram 26% para amicacina, 62% para gentamicina, 90% para tobramicina e 82% para canamicina (Figura 2). A alta resistência à tobramicina encontrada nos isolados SP é compatível com estudo realizado recentemente nos Estados Unidos com *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, as quais exibiram 98% de resistência a este aminoglicosídeo (ALMAGHRABI et al., 2014). É interessante notar uma grande diferença na porcentagem de resistência à tobramicina ao compararmos os isolados KP e SP. Este resultado pode ser explicado pela ausência de utilização deste aminoglicosídeo na Instituição na qual os isolados KP foram obtidos (CCIH/HB, comunicação pessoal).

Observou-se ainda, altas taxas de resistência às quinolonas. Entre os isolados KP, 94% nos 48 isolados testados para norfloxacin, 96% nos 50 isolados testados para ciprofloxacina e 96% nos 47 isolados testados para o ácido nalidíxico. Entre os isolados SP, observou-se 100% de resistência às quinolonas (Figura 2). Esta alta porcentagem de resistência também foi detectada em *K. pneumoniae* isoladas em centros médicos de Taiwan, dentre as quais 93% foram resistentes à ciprofloxacina (CHIU et al., 2013). Em outro estudo, conduzido na China com 11 *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, aproximadamente 73% e 64% foram resistentes à ciprofloxacina e a amicacina, respectivamente (SHENG et al., 2012).

Com relação à tigeciclina, 73 isolados foram testados, sendo 36 KP e 37 SP. Não foi observada diferença entre os isolados KP e SP, que foi de aproximadamente 14% de resistência. Já a resistência intermediária foi de 41,7% e 51% para os isolados KP e SP respectivamente. Esta porcentagem de resistência é maior do que a relatada em outros estudos, os quais mostram uma variação de até 11,5% (ARYA, AGARWAL, 2010; NEONAKIS et al., 2011; SADER et al., 2013). De fato, a resistência à Tigeciclina tem crescido sistematicamente nos últimos anos devido ao aumento de sua utilização (TSAI et al., 2012; SPANU et al., 2012; NIGO et al., 2013). Este aumento foi evidenciado em estudo conduzido por Nigo e colaboradores (2013), o qual mostra a emergência de resistência à tigeciclina em *K. pneumoniae* multirresistentes isoladas de pacientes internados em um centro médico de Nova York.

Quatro dos dez isolados SP e dois dos dezenove isolados KP testados frente à polimixina B, apresentaram resistência. Andrade e colaboradores (2014), em estudo realizado no interior do estado de São Paulo, também encontraram resistência à polimixina nos isolados analisados. Neste estudo, os pesquisadores evidenciaram que dentre as sete *K. pneumoniae* analisadas, três apresentaram alta resistência à Polimixina B. Outros estudos também relatam a redução da sensibilidade a tigeciclina e polimixina B em bactérias produtoras de KPC (LIVERMORE et al., 2011; ZAGARIANOU et al., 2012; VILLA et al., 2014). A resistência observada enfatiza a importância do uso racional destes antimicrobianos como medida necessária para preservar sua utilidade. No presente estudo, a investigação dos mecanismos de resistência às polimixinas e a tigeciclina não foi realizada. Entretanto, acreditamos que a vigilância da evolução da resistência a estes antimicrobianos deve ser realizada, considerando-se sua importância para o tratamento das infecções por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.



5.2 Determinação do genótipo de resistência aos antimicrobianos

Em bactérias produtoras de KPC, podem ser encontrados diferentes genes que determinam resistência a outros antimicrobianos, como aminoglicosídeos, quinolonas e cefalosporinas, localizados em plasmídeos em associação com *bla*_{KPC} (PATERSON, 2006; ENDIMIANI et al., 2008; SACHA et al., 2009; ZACHARCZUK et. al., 2011; SHENG et al., 2012; SPANU et. al., 2012; WANG, et al., 2012; BUENO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014). Abaixo serão discutidos os diversos genes de resistência às diferentes classes de antimicrobianos encontrados nos isolados do presente estudo.

5.2.1 Investigação de genes de *bla*_{CTX-M}

Apesar da crescente disseminação de isolados produtores de KPC, *K. pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) continuam sendo um importante agente de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Na América do Sul, a

frequência de detecção de ESBLs em Enterobacteriaceae está entre as maiores do mundo. Dentre todas as ESBLs, destacam-se as enzimas do grupo CTX-M, que são consideradas endêmicas (MINARINI et al., 2009; YONG et al., 2009; DROPA et al., 2010; RAMOS et al., 2014).

A CTX-M é a ESBL prevalente no Brasil, e as variantes CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-14, CTX-M-15 e CTX-M-16 são as mais encontradas (ROSSI, 2011). Além disso, a presença de *bla*_{CTX-M} em *K. pneumoniae* produtoras de KPC tem sido relatada com frequência no país (PEIRANO et al., 2009; SEKI et al., 2011; CABRAL et al., 2012; BUENO et al., 2013; ANDRADE et al., 2014; RAMOS et al., 2014). Dados recentes publicados pelo Centro de Vigilância Epidemiológica do estado de São Paulo (CVE, 2013), mostraram que no estado as porcentagens de IRAS por *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs em UTIs neonatal e adulto foram de 33,4% e 71,6%, respectivamente.

Neste estudo, genes que codificam enzimas CTX-M de diferentes grupos foram encontrados em 76% (38/50) dos isolados KP sendo que 68,4% (26/38) foram *bla*_{CTX-M-15}, 23,7% (9/38) *bla*_{CTX-M-2}, 2,6% (1/38) *bla*_{CTX-M-59}. Em um isolado (1/38), *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-15} ocorreram simultaneamente. Em um isolado (1/38), não foi possível identificar o gene *bla*_{CTX-M}. A alta porcentagem de produtores de CTX-M encontrada nos isolados KP corrobora com estudo realizado por Seki e colaboradores (2013), os quais detectaram *bla*_{CTX-M} em 49% das 121 *K. pneumoniae* estudadas, e destas, 64% carregavam o gene *bla*_{CTX-M-15}. Ainda neste estudo, os pesquisadores evidenciaram que 17% das *K. pneumoniae* produtoras de CTX-M co-produziam KPC, sendo 80% destas com KPC e CTX-M-15.

A enzima CTX-M-15 é a ESBL mais amplamente distribuída em Enterobacteriaceae, sendo frequentemente descrita como dominante em *K. pneumoniae* e *E. coli* (PEIRANO et al., 2010; SEKI et al., 2013). Foi primeiramente detectada em *K. pneumoniae* no Brasil em estudo conduzido por nosso grupo de pesquisa (TOLLENTINO et al., 2011), em cepas isoladas entre 2005 e 2007, no mesmo hospital onde o presente estudo foi conduzido. Desde então, muitos

outros estudos relataram a presença de CTX-M-15 em vários membros da família Enterobacteriaceae (CERGOLE-NOVELLA et al., 2010; PEIRANO et al, 2011; NOGUEIRA et al., 2014).

Foi interessante observar que ocorreu uma mudança no perfil de tipos de CTX-M produzidas por *K. pneumoniae* isoladas na Instituição onde CTX-M-15 foi descrita nesta espécie pela primeira vez no Brasil. Em um estudo realizado com *K. pneumoniae* isoladas entre 2005 a 2007, genes do grupo CTX-M-2 foram predominantes, presentes em aproximadamente 75% dos isolados. O gene *bla*_{CTX-M-15} foi detectado em 25% dos isolados. Outra diferença observada foi com relação aos genes do grupo CTX-M-2, pois ocorria discreto predomínio de *bla*_{CTX-M-2} (19 isolados) sobre *bla*_{CTX-M-59} (15 isolados) (TOLENTINO, 2009). No atual estudo, predominou *bla*_{CTX-M-2}.

Clímaco e colaboradores, em 2010, realizaram um estudo comparativo avaliando a produção de ESBL por *Klebsiella* spp isoladas em 2000 e 2006. Neste estudo, também foi observado uma mudança nos tipos de CTX-M detectados. Todos os isolados de 2000 apresentaram CTX-M-2, enquanto os isolados de 2006, apesar da predominância de CTX-M-2, apresentaram uma maior diversidade de variantes, incluindo CTX-M-59 e CTX-M-9.

Apesar da ampla disseminação de CTX-M-15, isolados produtores de CTX-M-2 têm sido os mais frequentemente detectados em países da América do Sul, incluindo Brasil (VILLEGAS et al., 2008; MINARINI et al., 2009; CLÍMACO et al., 2010; CABRAL et al., 2012; JJASKULSKI et al., 2013). A variante CTX-M-2 foi detectada na Argentina em 1989 e, desde então, se disseminou pelos países vizinhos (VILLEGAS et al, 2008, CLIMACO et al., 2010). Nos últimos anos, foi demonstrada a co-existência de genes *bla*_{KPC} com genes que codificam CTX-M do grupo 2 (CABRAL et al., 2012; ANDRADE et al., 2014).

Dentre os isolados SP, 58% (29/50) apresentaram genes *bla*_{CTX-M}, sendo 51,7% (15/29) *bla*_{CTX-M-2}, 37,9% (11/29) *bla*_{CTX-M-15}, 3,4% (1/29) *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15} simultaneamente e 6,9% (2/29) *bla*_{CTX-M-14} (Figuras 3 e 4).

A predominância de CTX-M-2 encontrada nos isolados SP corrobora com estudos realizados no Brasil, os quais mostram que esta enzima é endêmica no país e disseminada em diversas cidades além de São Paulo (dO CARMO FILHO et al., 2008; TOLLENTINO et al., 2011), como em Curitiba (NOGUEIRA, et al., 2011; NOGUEIRA, et al., 2014), Rio de Janeiro (CHAGAS et al., 2011; QUEIROZ et al., 2012), Minas Gerais (MINARINI et al., 2009) e Recife (LOPES et al., 2010; CABRAL et al., 2012). Durante um surto em uma UTI neonatal em 2003, entre as 10 cepas de *K. pneumoniae* resistentes às cefalosporinas envolvidas, 6 eram produtores de CTX-M-2 e em 4, uma nova variante da CTX-M-2, denominada CTX-M-5, foi descrita pela primeira vez (dE OLIVEIRA GARCIA et al., 2008). Desde a sua descrição, o gene *bla*_{CTX-M-59} 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). Neste estudo, a CTX-M-59 foi detectada em 2 isolados KP, sendo um deles, o isolado KP10 que carrega simultaneamente CTX-M-15 e CTX-M-59. Além do isolado KP10, o isolado SP22 carregou simultaneamente dois genes codificadores de CTX-M (*bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-2}). A presença simultânea dos genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-2} em *K. pneumoniae* foi relatada em estudo de vigilância realizado com enterobactérias isoladas em 15 hospitais argentinos. Um isolado apresentou simultânea dos genes *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-2}, *qnrB19* e *aac(6')-Ib* (CRUZ et al., 2013). Na atual pesquisa, no isolado SP22 foram detectados *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-2} e *aac(6')-Ib* e também *aph(3)-Ia*. Em nosso conhecimento, este é o primeiro relato da presença simultânea de genes que codificam CTX-M dos grupos 1 e 2 em *K. pneumoniae* produtoras de KPC no Brasil.

O gene *bla*_{CTX-M-14}, pertencente ao grupo CTX-M-9, foi detectado nos isolados SP28 e SP36. No Brasil, enzimas pertencentes ao grupo CTX-M-9 já foram detectadas durante estudos conduzidos no Rio de Janeiro (BONNET et al., 2001; QUEIROZ et al., 2012) e interior de São Paulo (MINARINI et al., 2009; CLÍMACO et al., 2010), porém em todos estes estudos, o gene detectado foi o *bla*_{CTX-M-9}. Dados da literatura sugerem uma baixa prevalência

do gene *bla*_{CTX-M-14} no Brasil. Em um estudo realizado em São Paulo, a produção de CTX-M-14 foi evidenciada em *E. coli*. (CERGOLE-NOVELLA et al., 2010). Em outro estudo, realizado em Salvador, dentre as 36 *E. coli* isoladas de pacientes com meningite no período de 1996 a 2011, o gene *bla*_{CTX-M-14} foi detectado em apenas um isolado (BERMAN et al., 2014).

Aqui, foi interessante observar que os isolados SP28 e SP36, que apresentaram *bla*_{CTX-M-1}, também apresentaram o gene que codifica a metiltransferase RmtB. A co-existência de genes de CTX-M-14 com KPC e RmtB já foi descrita anteriormente por Cao e colaboradores (2014). Não foi possível determinar a qual grupo pertence o gene *bla*_{CTX-M} detectado no isolado KP64.

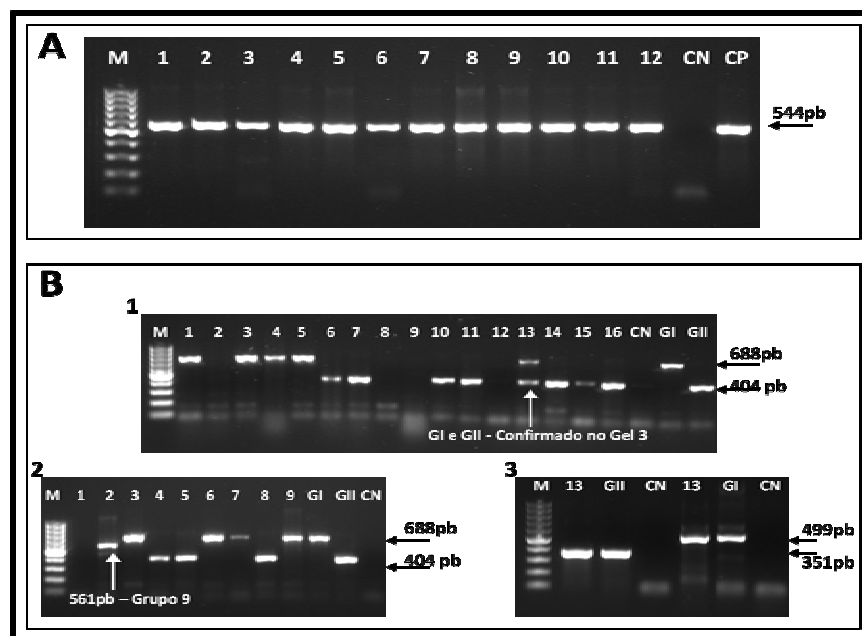


Figura 3. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes das *bla*_{CTX-M} amplificados por PCR. A: Reação para triagem - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 12; CN: Controle Negativo; CP: Controle positivo (544pb). B1: Reação Multiplex - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 16. A seta indica a amplificação simultânea de dois fragmentos correspondentes ao grupo I e grupo II; GI: Controle positivo CTX-M grupo I; GII: Controle positivo CTX-M grupo II; CN: Controle Negativo. B2: Reação Multiplex - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 9. A seta indica a amplificação de um fragmentos de 561pb correspondente ao grupo 9; GI: Controle positivo CTX-M grupo I; GII: Controle positivo CTX-M grupo II; CN: Controle Negativo. B3: Reação com *primers* específicos para os grupos I e II realizada para confirmação da amostra 13 - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 13; GII: Controle positivo CTX-M grupo II; CN: Controle Negativo; Amostras 13; GI: Controle positivo CTX-M grupo I; CN: Controle Negativo.

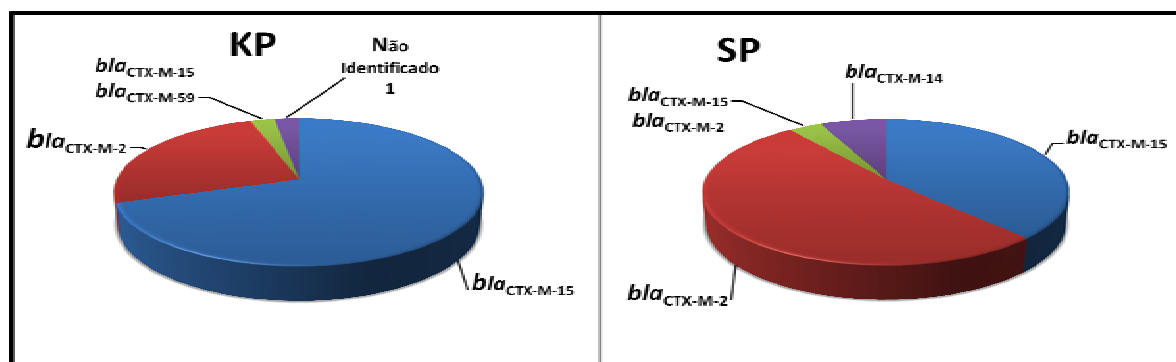


Figura 4. Distribuição dos genes *bla*_{CTX-M}. SP: isolados de São Paulo; KP: isolados de São José do Rio Preto.

5.2.2 Investigação de genes codificadores das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos

Dentre os sete genes de AMEs investigados, foram detectados cinco: os genes das fosfotransferases *aph*(3')-VI e *aph*(3')-Ia e das acetiltransferases *aac*(6')-Ib, *aac*(3)-Ia e *aac*(3)-IIa, distribuídos entre 95% do total de isolados incluídos neste estudo, sem diferença entre os isolados KP e SP. Os genes de acetiltransferases *aac*(6')-Ih e de nucleotidiltransferases *ant*(2')-Ia não foram detectados.

As AMES são consideradas os mais importantes determinantes de resistência aos aminoglicosídeos em *K. pneumoniae* (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010; ALMAGHRABI et al., 2014). Dados recentes de um estudo da Universidade de Pittsburgh nos EUA, que incluiu 50 *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, mostraram uma ocorrência de genes de AMEs em 98% dos isolados (ALMAGHRABI et al., 2014). A figura 5 ilustra a detecção dos genes de AMES por PCR.

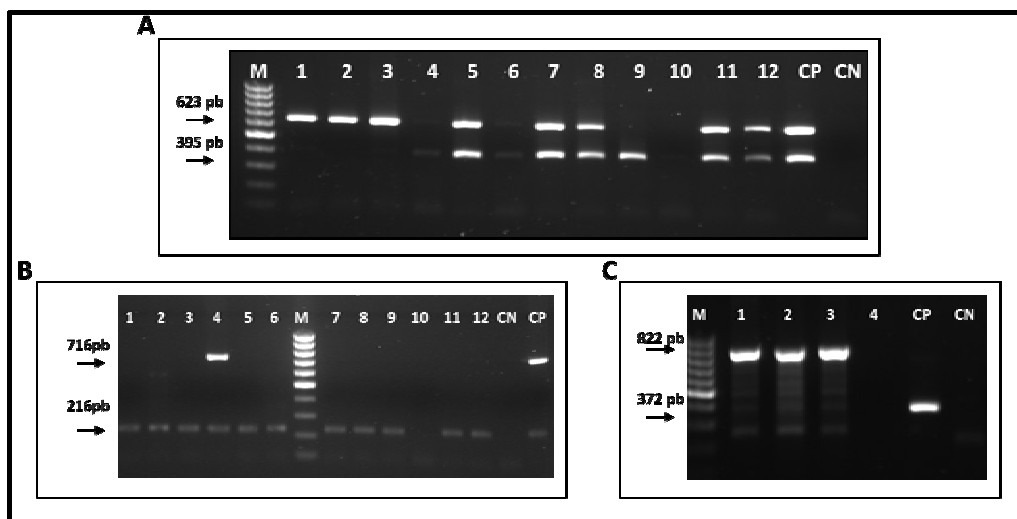


Figura 5. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação dos genes das AMEs. A: Reação Duplex – M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 12; CP: Controle positivo de *aph(3')-Ia* (623pb) e *aac(6')-Ib* (395pb); CN: Controle Negativo. B: Reação Triplex 2 - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 12; CP: Controle positivo de *aph(3')-VI* (716pb) e *rrn* (216pb); CN: Controle Negativo. C: Reação Triplex 1 - M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 4; CP: Controle positivo de *aac(3)-Ia* (372pb); As amostras 1, 2 e 3 com amplificação de 822pb correspondem as amostras positivas para *aac(3)-IIa*; CN: Controle Negativo.

Dentre os genes de AMEs detectados, o prevalente nos isolados SP foi *aac(6')-Ib* (78%), seguido por *aph(3')-Ia* (72%), *aac(3)-IIa* (54%), *aph(3')-VI* e *aac(3)-Ia* (2%). Entre os isolados KP o gene mais comum foi *aph(3')-Ia* (64%), seguido por *aac(6')-Ib* (52%), *aac(3)-IIa* (34%) e *aph(3')-VI* (6%) (Figura 6). O gene *aac(3)-Ia* não foi detectado nos isolados KP.

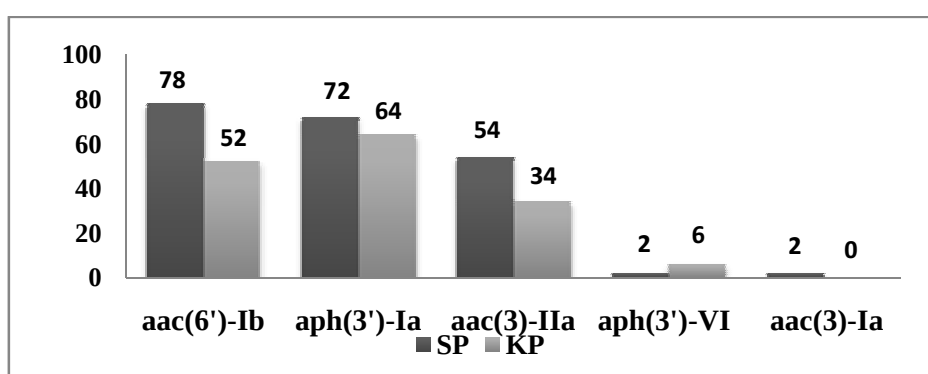


Figura 6. Porcentagem de genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos dos tipos *aac(6')-Ib*, *aph(3')-Ia*, *aac(3)-IIa*, *aph(3')-VI* e *aac(3)-Ia*. SP: isolados de São Paulo; KP: isolados de São José do Rio Preto.

Dentre os isolados SP nos quais foram detectados genes de AMEs, 25% (12/48) apresentaram apenas um gene, 43,7% (21/48) apresentaram dois e 31,3% (15/48)

apresentaram três simultaneamente. Entre os isolados KP, 40,4% (19/47) apresentaram apenas um gene, 53,2% (25/47) dois e 6,4% (3/47) três genes simultaneamente (Figura 7). A mais frequente associação observada nos isolados SP foi de três genes simultâneos, sendo *aac(3)-IIa + aph(3')-Ia + aac(6')-Ib*, enquanto que nos isolados KP a associação frequente foi de dois genes, sendo *aph(3')-Ia + aac(6')-Ib*.

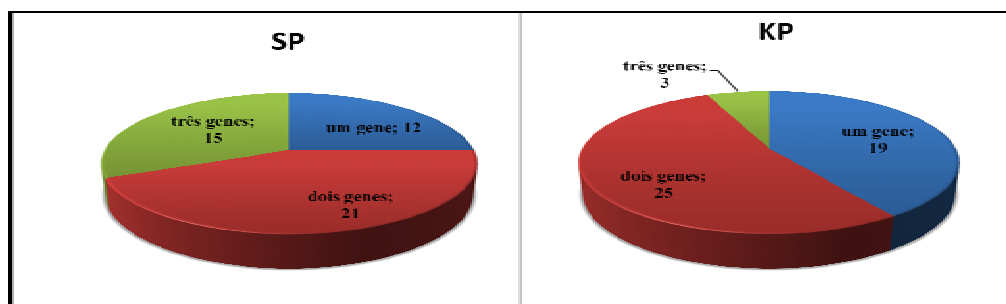


Figura 7. Distribuição de isolados carreando um ou mais genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs). SP: isolados de São Paulo; KP: isolados de S. J. do Rio Preto.

Nas Tabelas 1 e 2, encontram-se destacados em vermelho os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos, de acordo com o perfil dos genes de resistência. A concordância entre fenótipo e genótipo de resistência foi de aproximadamente 92% para os isolados SP e 70% para os isolados KP.

Tabela 1. Distribuição dos genes AMEs e os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados SP

Genótipo	Isolados SP	Substrato da Enzima	Resistência aos Aminoglicosídeos		
			TOB	GEN	AK
<i>aph(3')-Ia</i>	2	Canamicina	1	-	2
<i>aac(6')-Ib</i>	8	Amicacina e Tobramicina	6	2	1
<i>aac(3)-IIa</i>	2	Gentamicina	2	2	-
<i>aph(3')-Ia + aac(6')-Ib</i>	9	Canamicina+ Amicacina/ Tobramicina	8	-	7
<i>aac(3)-Ia + aph(3')-Ia</i>	1	Gentamicina+Canamicina	1	1	1
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia</i>	4	Gentamicina+Canamicina	4	4	4
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	7	Gentamicina+Amicacina/ Tobramicina	7	7	6
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia+ aac(6')-Ib</i>	14	Gentamicina+Canamicina+Amicacina/ Tobramicina	14	14	13
<i>aph(3')-VI+ aph(3')-Ia + aac(6')-Ib</i>	1	Amicacina+Canamicina+ Amicacina/ Tobramicina	1	-	1

Tabela 2. Distribuição dos genes AMEs e os fenótipos de resistência aos aminoglicosídeos nos isolados KP

Genótipo	Isolados KP	Substrato da Enzima	Resistência aos Aminoglicosídeos		
			TOB	GEN	AK
<i>aph(3')-Ia</i>	10	Canamicina	3	9	8
<i>aac(6')-Ib</i>	3	Amicacina e Tobramicina	1	2	1
<i>aac(3)-IIa</i>	5	Gentamicina	1	5	1
<i>aph(3')-VI</i>	1	Amicacina	-	-	-
<i>aph(3')-Ia + aac(6')-Ib</i>	16	Canamicina+ Amicacina/ Tobramicina	15	16	16
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia</i>	4	Gentamicina+Canamicina	-	4	4
<i>aac(3)-IIa + aac(6')-Ib</i>	5	Gentamicina+Amicacina/ Tobramicina	3	5	4
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia+ aac(6')-Ib</i>	1	Gentamicina+Canamicina+Amicacina/ Tobramicina	1	1	1
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-VI+ aac(6')-Ib</i>	1	Gentamicina+Amicacina/ Tobramicina	1	1	1
<i>aac(3)-IIa + aph(3')-Ia+ aph(3')-VI</i>	1	Gentamicina+Canamicina+Amicacina	1	1	1

O gene *aph(3')-Ia* confere resistência à canamicina, neomicina, lividomicina, paromocina e ribostamicina (RAMIREZ, TOMALSKY, 2010) e foi detectado em aproximadamente 62% dos isolados KP e SP. A concordância entre fenótipo e genótipo foi de aproximadamente 92%. Em estudo realizado recentemente nos Estados Unidos com *K. pneumoniae* produtoras de KPC, 56% dos isolados apresentaram o gene *aph(3')-Ia*, sendo que 49 dos 50 isolados estudados foram resistentes à canamicina, o que corrobora com nossos resultados (ALMAGHRABI et al., 2014). A importância clínica do uso de canamicina na terapêutica e consequente aumento na resistência a este aminoglicosídeo codificada pelo gene *aph(3')-Ia* foi evidenciada em estudo de Miro e colaboradores (2013), com 330 Enterobacteriaceae isoladas em um Hospital na Espanha. Neste estudo, a porcentagem de resistência à canamicina foi de 26,3% e *aph(3')-Ia* foi o gene mais frequentemente detectado, presente em 13,9% dos isolados. É interessante observar que na mesma instituição, em 1993, o gene *aph(3')-Ia* havia sido detectado em 46% dos isolados estudados, tornando a canamicina obsoleta para uso clínico. O declínio na frequência de detecção de *aph(3')-Ia* foi considerado resultado da interrupção do uso da canamicina.

A enzima *aac(3)-IIa*, responsável por resistência à gentamicina (RAMIREZ, TOMALSKY, 2010), foi detectada em 54% dos isolados SP e 34% dos isolados KP. Os dados sugerem que o gene *aac(3)-IIa* é expresso em todos os isolados onde foi detectado, pois todos apresentaram resistência à gentamicina. Dados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Lindeman e colaboradores (2011).

O gene *aac(6')-Ib* foi detectado em 65% do total dos isolados estudados, sendo 39 isolados SP e 26 isolados KP. Destes, aproximadamente 88% apresentaram concordância entre fenótipo e genótipo, visto que a enzima *aac(6')-Ib* confere resistência principalmente à amicacina e tobramicina (RAMIREZ, TOMALSKY, 2010). Estes dados corroboram com estudo recente realizado por Almaghrabi e colaboradores (2014), no qual todos os isolados que carregavam o gene *aac(6')-Ib* apresentaram resistência à tobramicina. O gene *aac(6')-Ib* é

descrito como prevalente em Enterobacteriaceae (XIAO et al., 2010; KOSMIDIS et al., 2013; HALDORSEN et al., 2014; ALMAGHRABI et al., 2014).

A maior divergência na correlação fenótipo-genótipo foi observada entre os isolados carreadores do gene *aph(3')-VI*. Os dois isolados carreadores deste gene como único determinante de resistência à amicacina apresentaram sensibilidade a este antibiótico. Os outros dois isolados que carreavam simultaneamente os genes *aph(3')-VI* e *aac(6')-Ib*, ambos determinantes de resistência à amicacina, apresentaram a resistência, o que pode indicar que esta resistência está associada apenas a expressão do gene *aac(6')-Ib* e que o gene *aph(3')-VI* provavelmente não está sendo expresso. Dados semelhantes foram encontrados nos estudos de Vaziri e colaboradores (2011), no qual 11% entre 135 *P. aeruginosa* carreadoras do gene *aph(3')-V* apresentaram sensibilidade à amicacina.

Os isolados SP14, SP44, KP26, KP31, KP35 não apresentaram nenhum dos genes de AMEs pesquisados. Os isolados SP14, SP44 e KP35 foram sensíveis a todos os aminoglicosídeos. Entretanto, KP26 e KP31 apresentaram resistência à gentamicina, sendo possível que nestes isolados, outros genes de AMEs não testados, tais como *aac(2')-Ib*, *aac(6')-II* e *aac(3)-IV* estejam presentes (RAMIREZ, TOLMASKY, 2010; ALMAGHRABI et al., 2014).

Genes de AMEs estão localizados em elementos genéticos móveis, tais como integrons, passíveis de transferência horizontal por plasmídeos conjugativos, o que explica sua ampla disseminação e alta frequência de detecção neste estudo (NEMEC et. al., 2004; RIBERA et. al., 2004; MONIRI et. al., 2010; KARAH, 2011, MIRO et al., 2013).

5.2.3 Investigação de genes codificadores de metiltransferases 16S RNAr

As metiltransferases 16S RNAr emergiram como um importante mecanismo responsável por altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos em Enterobacteriaceae

(WASHINO, ARAKAWA, 2012). Assim, neste estudo, os quatro isolados que apresentaram resistência em nível elevado ($\text{CIM} \geq 256 \mu\text{g/mL}$) aos aminoglicosídeos amicacina, tobramicina e gentamicina (SP16, SP28, SP36 e SP48) foram investigados quanto à presença de genes que codificam estas enzimas. Os isolados SP28, SP36 e SP48 apresentaram *rmtB* (Figura 8). No isolado SP16, nenhuma das metiltransferases testadas foi detectada, apesar de seu perfil de resistência.

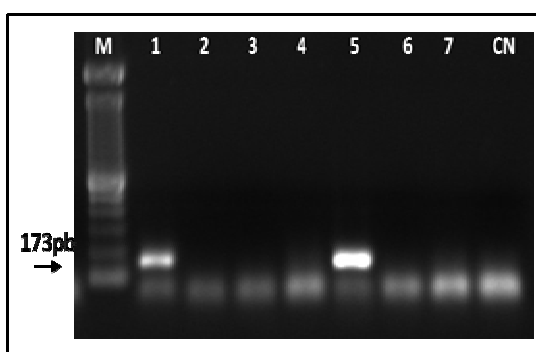


Figura 8. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *rmtB* das metiltransferase 16S RNAr. M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 7; CN: Controle Negativo. As amostras 1 e 5 com amplificação de 173pb correspondem as amostras positivas para *rmtB*.

As enzimas ArmA e RmtB são as metiltransferases 16S RNAr predominantes no mundo, com relatos de ocorrência na Ásia, Europa, América do Norte e Sul e Oceania (BOGAERTS et al., 2007; YAMANE et al, 2007; FRITSCHÉ et al., 2008; KANG et al., 2008; WU et al., 2009; POIREL et al., 2011; TIAN et al., 2011). Especialmente *rmtB* tem sido descrito como um o gene de metiltransferase 16S RNAr prevalente em Enterobacteriaceae (POIREL et al., 2014). A enzima RmtB foi inicialmente detectada no Japão, em 2002, em *Serratia marcescens* com alto nível de resistência aos aminoglicosídeos (DOI et al., 2004). Desde então, já foi encontrado em diversos países, como China (CAO et al., 2014), Índia (HIDALGO et al., 2013), Arábia Saudita (AL SHEIKH et al., 2014), Estados Unidos, México, Brasil (FRITSCHÉ et al., 2008) e Bélgica (BOGAERTS et al., 2011).

Os isolados SP28 e SP36, apresentaram simultaneamente os genes *rmtB*, *aac(3)-IIa*, *aph(3')-Ia*, além de *bla_{CTX-M-14}*, discutido anteriormente. O isolado SP48, apresentou *rmtB*,

aac(3)-IIa e *aph(3')-Ia*. Isolados produtores de metilases 16S rRNA, são geralmente co-produtores de carbapenemases (ZACHARCZUK et al 2011; GALANI et al 2012) ou ESBLs (DOI et al, 2008; NAAS et al., 2011; BUENO et al, 2013; HABEEB et al, 2014). Li e colaboradores (2012) descreveram a co-existência de *rmtB* e *bla_{KPC-2}* em *K. pneumoniae*, isolada em um Hospital Universitário na China. Em outro estudo, conduzido por Hidalgo e colaboradores (2013), *rmtB* foi descrito em isolados que carregavam simultaneamente genes que codificam as enzimas NDM, CTX-M e RmtF, sendo esta última descrita pela primeira vez. A co-existência de genes *rmtB*, *bla_{NDM-1}* e *bla_{CTX-M-15}* também foi descrita em outro estudo conduzido na Bélgica (BOGAERTS et al., 2011). No estudo de Cao e colaboradores (2014), conduzido na China, a enzima RmtB foi encontrada em diversos isolados que carregam simultaneamente genes que codificam as enzimas KPC-2, KPC-3, CTX-M-14 e SHV-12, OXA-10, entre outras. Em nosso conhecimento, esta é a primeira detecção simultânea dos genes *rmtB* e *bla_{KPC}* no Brasil.

A presença de simultânea de genes de AMES e metiltransferases 16S RNAr também foi previamente descrita. Hu e colaboradores (2013) relataram a detecção de *aac(3)-Ib* e *aac(6')-Ib*, *aph(3')-VI* e *ant(3'')-I* em *K. pneumoniae* que carregavam simultaneamente os genes *armA* e *rmtB*.

5.2.4 Investigação de genes *qnr*

Entre os cem isolados estudados, 28% apresentaram o gene *qnrB* (Figura 9). Foi observada diferença na frequência de detecção de *qnrB* entre *K. pneumoniae* isoladas em São José do Rio Preto, quando comparada aos isolados de São Paulo: 42% dos isolados KP (21/50), e 14% (7/50) dos isolados SP. Os genes *qnrA*, *qnrC*, *qnrD* e *qnrS* não foram detectados.

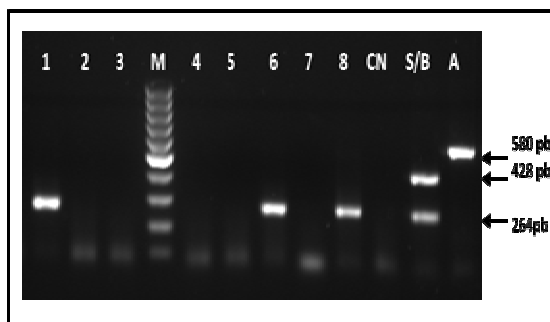


Figura 9. Eletroforese em gel de agarose mostrando o produto de amplificação do gene *qnrB*. M: marcador de peso molecular 100 pb; Amostras 1 a 8; CN: Controle Negativo; S/B: Controle positivo de *qnrS* (428pb) e *qnrB* (264pb); A: Controle positivo de *qnrA* (580pb).

O primeiro relato da identificação de determinantes plasmídeos de resistência à quinolonas no Brasil foi publicado por Castanheira e colaboradores (2007), que descreveram o gene *qnrA*. Subsequentemente, a detecção de *qnrB* foi relatada por Minarini e colaboradores (2008), sendo este gene descrito como a variante de *qnr* prevalente no Brasil (MINARINI et al., 2008; PEIRANO et al., 2011).

A frequência de genes *qnr* em bactérias isoladas em diferentes hospitais é variável, como pode ser observado em dados de estudos conduzidos tanto no Brasil como em outros países. Recentemente, Andrade e colaboradores (2014) relataram a ocorrência do gene *qnrS*, em sete *K. pneumoniae* multirresistentes isoladas no período de dezembro de 2012 e fevereiro de 2013, em um hospital universitário do interior do estado de São Paulo. Em outro estudo, conduzido por Peirano e colaboradores (2011) no Rio de Janeiro, o gene *qnrB* foi detectado em 20% dos isolados.

Cattoir e colaboradores (2007), em estudo conduzido na França com Enterobacteriaceae provenientes de um hospital universitário no Kuwait, detectaram o gene *qnrB* em apenas 3 de 64 isolados estudados. Em estudo mais recente, o gene *qnrB* foi detectado em apenas 10,8% das 102 Enterobacteriaceae analisadas em hospital da Coreia (YANG et al., 2014). Ferjani e colaboradores (2014), em um hospital na Tunísia, detectaram *qnrB*, em aproximadamente 26% das 120 Enterobacteriaceae estudadas.

Nos isolados onde foram detectados o gene *qnrB*, foram encontrados uma ampla diversidade de genes de resistência como demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Diversidade de genes detectados nos isolados SP e KP carreadores do gene *qnr*

Cepas SP	Genótipo encontrado		
	Genes <i>bla</i>	Genes <i>qnr</i>	Genes AMEs
SP06	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(6)Ib</i>
SP11	-	<i>qnrB</i>	<i>aac(6)Ib</i>
SP29	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>
SP42	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)VI, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>
SP47	<i>CTX-M-2</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa</i>
SP12 e SP49	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>
Cepas KP	Genótipo encontrado		
	Genes <i>bla</i>	Genes <i>qnr</i>	Genes AMEs
KP1 e KP30	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>
KP2	-	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)Ia</i>
KP3 e KP6	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(6)Ib</i>
KP5, KP7, KP27 e KP36	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)Ia</i>
KP9, KP14, KP15 e KP80	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa</i>
KP10	<i>CTX-M-I5 e CTX-M-59</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>
KP23	-	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)VI, aac(6)Ib</i>
KP29	-	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)VI</i>
KP31	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	-
KP35	-	<i>qnrB</i>	-
KP43	-	<i>qnrB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>
KP57	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>
KP71	<i>CTX-M-I5</i>	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>

A co-existência de genes *qnr* com outros genes de resistência tem sido descrita em isolados produtores ou não de KPC. Recentemente, um surto de infecção por *K. pneumoniae* carregando simultaneamente os genes *qnrB1*, *bla_{CTX-M-15}* e *aac(6')Ib-cr* foi descrito na França (FILIPPA et al., 2013). A presença simultânea de genes que codificam QnrB e KPC já foi

descrita na China, Estados Unidos (MARTINEZ-MARTINEZ et al., 2008) e Israel (CHMELNITSKY et al., 2009). No Brasil, a presença simultânea de genes que codificam QnrS1, QnrB19 e aac(6')-Ib-cr foi descrita por Paiva e colaboradores (2012). Mais recentemente, Andrade e colaboradores (2014) detectaram simultaneamente QnrS1, CTX-M-2 e KPC-2 em um isolado de *K. pneumoniae*.

Foi interessante observar que 22 dos 28 isolados nos quais o gene *qnrB* foi detectado apresentaram simultaneamente o gene *bla*_{CTX-M}, e dentre estes, 95% era *bla*_{CTX-M-15}. Esta alta porcentagem de detecção simultânea de *qnrB* e *bla*_{CTX-M-15} também foi encontrada nos estudos de Cruz e colaboradores (2013). Em outro estudo, realizado com 48 *K. pneumoniae* isoladas de janeiro a julho de 2011 em um hospital universitário na Tunísia, o gene *bla*_{CTX-M-15} foi detectado em 100%. Dentre estas, aproximadamente 94% apresentaram simultaneamente o gene *qnrB1* em um plasmídeo conjugativo IncFII (LAHLAOUI et al., 2015). Silva-Sanchez e colaboradores (2013) conduziram um estudo com 112 Enterobacteriaceae produtoras de ESBL, e dentre estas 51 eram *K. pneumoniae*. A produção de Qnr foi detectada em 13,7% das *K. pneumoniae*, sendo o gene *qnrB* o mais prevalente. Neste estudo, foram extraídos plasmídeos conjugativos (IncFII) de oito isolados produtores de QnrB, e destes, cinco transferiram os genes *qnrB* e *bla*_{CTX-M-15} simultaneamente. Estes dados sugerem uma possível explicação para a alta porcentagem simultânea de CTX-M-15 e QnrB nos isolados KP e SP, visto que a ampla disseminação do gene *bla*_{CTX-M-15} tem sido relacionada ao plasmídeo IncFII (BOYD et al., 2004; NICOLAS-CHANOINE et al., 2008; ZHUO et al., 2013; LAHLAOUI et al., 2015).

5.2.5 Investigação de genes de bombas de efluxo *oqxAB* e *qepA*

O gene *oqxAB* codifica bomba de efluxo e induz resistência a múltiplos agentes, incluindo o ácido nalidíxico, ciprofloxacina e norfloxacina (HANSEN et al., 2007; NORMAN

et al., 2008). Foi inicialmente detectado em um plasmídeo conjugativo de 52 kb, designado pOLA52, encontrado em *E. coli* isolada de dejetos suínos (SORENSEN et al., 2003). Em isolados clínicos foi detectado pela primeira vez em 2009, em um plasmídeo de *E. coli*, flanqueado pela sequência de inserção *IS26-like*, sugerindo sua mobilização (KIM et al., 2009).

Diversos estudos relatam a presença de *oqxAB* em *K. pneumoniae* produtoras de KPC e ESBL (PEREZ et al., 2013; RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2013; CAO et al., 2014). De fato, o cromossomo de *K. pneumoniae* é descrito como reservatório genético original deste gene (NORMAN et al., 2008; WONG, CHEN, 2013). Entretanto, entre os 100 isolados do presente estudo, 29% apresentaram *oqxAB*, e uma diferença na frequência deste gene foi observada entre os isolados SP e KP. Entre os isolados SP, 56% (28/50) apresentaram *oqxAB* e nos isolados KP apenas 2% (1/50).

No estudo realizado por Perez e colaboradores (2013), 100% das *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{KPC} e 87,5% das *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs apresentaram *oqxAB*. Rodrigues-Martinez e colaboradores (2013) também relataram uma alta frequência de *oqxAB* em seus estudos, realizados com 27 *K. pneumoniae* multirresistentes, no qual evidenciaram que 70,4% dos isolados estudados carregavam o gene *oqxAB*. Estes dados corroboram com os resultados encontrados com os isolados SP, porém a baixa frequência para o gene *oqxAB* encontrada nos isolados KP é divergente da literatura.

Aproximadamente 14% (4/28) dos isolados SP resistentes às quinolonas carregam simultaneamente os genes *qnrB* e *oqxAB*. Dados semelhantes foram encontrados em estudo realizado por Rodriguez-Martinez e colaboradores (2013), no qual aproximadamente 62% das *K. pneumoniae* MDR foram resistentes à ciprofloxacina e destas, 10% carregavam simultaneamente genes *qnrB* e *oqxAB*. O isolado KP26, no qual o gene *oqxAB* foi detectado, não carregava nenhum dos outros genes pesquisados neste estudo. A presença do gene *oqxAB* pode ter contribuído para a resistência à ciprofloxacina neste isolado, considerando que este

gene contribui para a redução da sensibilidade a quinolonas em *K. pneumoniae* (RODRIGUEZ-MARTÍNEZ et al., 2013).

O gene *qepA* codifica uma proteína que participa da regulação do sistema de efluxo e é responsável por um aumento da resistência a norfloxacin, ciprofloxacina e enrofloxacin. Geralmente está associado com plasmídeos que carregam outros determinantes de resistência, como genes de ESBLs e metiltransferases (TIAN et al., 2011; DENG et al., 2011; SILVA-SANCHEZ et al., 2013; HABEEB et al., 2014). Entretanto, em nossos isolados este gene não foi detectado.

Todos os isolados selecionados para este estudo apresentaram resistência a pelo menos uma quinolona testada, porém em apenas 44% dos isolados KP e em 62% dos isolados SP foi detectado algum gene plasmidial responsável por resistência a esta classe de antimicrobianos. Entretanto, as mutações nos genes cromossômicos *gyrA* e *gyrB*, que codificam a DNA girase ((RUIZ, 2003; CHMELNITSKY et al., 2009; GUILLARD et al., 2013; STRAND et al., 2014), e *parC*, que codificam as topoisomerasas IV (MINARINI, DARINI, 2012), são os principais mecanismos de resistência às quinolonas em bactérias Gram negativas (JACOBY 2005; BOLON, 2011). Além destes, a redução da permeabilidade da membrana e/ou a hiperexpressão de bombas de efluxo codificados por genes cromossômicos, que levam à diminuição da concentração do antimicrobiano no interior da célula bacteriana (VILA et al., 1994; RUIZ, 2003), podem estar presentes.

5.2.6 Investigação de genes de NDM

O gene que codifica a New Delhi metallo- β -lactamase (*bla*_{NDM}) não foi detectado neste estudo, apesar de já ter sido descrita no Brasil (ROZALES et al., 2014) e ser uma carbapenemase emergente em bactérias Gram-negativas (VILLA et al., 2012; DORTET et al., 2014).

5.2.7 Co-existência de genes de resistência a diferentes classes de antimicrobianos

Neste estudo, observou-se em *K. pneumoniae* produtoras de KPC, uma diversidade de genes de resistência às mais importantes classes de antimicrobianos utilizadas na prática clínica (Anexo 2). A detecção simultânea de um ou mais genes de resistência a diferentes antimicrobianos em um mesmo isolado evidencia o impacto que genes transmitidos por plasmídeos causam no ambiente hospitalar. A Figura 10 mostra a diversidade de genes encontrados nos isolados KP e SP.

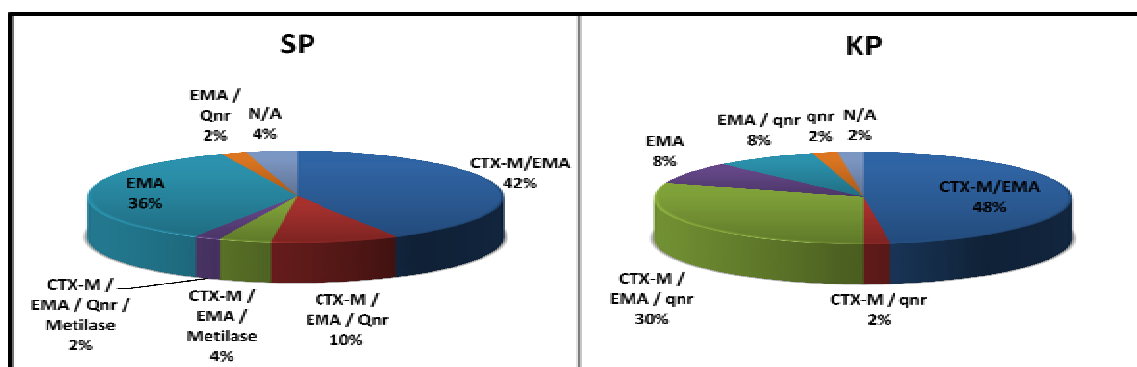


Figura 10. Diversidade de genes encontrados nos isolados SP (isolados de São Paulo) e KP (isolados de São José do Rio Preto). AME: Enzimas Modificadoras de Aminoglicosídeos. N/A: Nenhum gene detectado.

Em estudo realizado no Brasil, Bueno e colaboradores (2013), detectaram a presença simultânea dos genes *bla*_{KPC-2}, *rmtD1* e *rmtD2*, além de encontrar pela primeira vez o gene *rmtG* em *K. pneumoniae* resistentes a diversos β -lactâmicos e com altas porcentagens de resistência aos aminoglicosídeos. Neste mesmo contexto, em estudo realizado no Chile, Poirel e colaboradores (2014) descrevem um isolado de *K. pneumoniae* com resistência aos β -lactâmicos de amplo espectro e a todos os aminoglicosídeos testados. Neste isolado observou-se a co-existência dos genes *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-11} e também *rmtG*.

Em outro estudo, também realizado com *K. pneumoniae* resistentes à β -lactâmicos e aminoglicosídeos, foi identificada a co-existência dos genes *bla*_{KPC-2} e *armA*

(ZACHARCZUK et al., 2011). Estudo conduzido por Seki e colaboradores (2011), mostrou que 17% dos isolados de *K. pneumoniae* produziam simultaneamente KPC e CTX-M. Estes isolados apresentavam resistência a diversos β -lactâmicos e também à quinolonas e aminoglicosídeos. No Brasil, estudo realizado com *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, quinolonas e polimixina B, detectou a co-existência de genes que codificam QnrS1, CTX-M-2 e KPC-2 (ANDRADE et al., 2014).

Apesar da ampla diversidade de genes de resistência encontrada nos isolados estudados, dentre os isolados SP, dois não apresentaram nenhum dos genes responsáveis por resistência aos aminoglicosídeos (AMEs e metiltransferase 16S RNAr), às quinolonas (*qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD*, *qnrS*, *oqxAB* e *qepA*), *bla*_{CTX-M} e *bla*_{NDM} pesquisados neste estudo, sendo eles SP14 e SP44. A resistência aos β -lactâmicos apresentada por estes isolados, justifica-se pela presença do gene *bla*_{KPC}. No entanto, o isolado SP14 também apresentou resistência as três quinolonas testadas neste estudo. Esta resistência provavelmente ocorre devido a presença de alterações de nucleotídeos nos genes cromossômicos *gyrA* e *gyrB*, que codificam a DNA girase, e *parC* e *parE*, que codificam as topoisomerasas IV, que são os genes alvos de ação das quinolonas, especialmente em membros da família das Enterobacteriaceae (RUIZ, 2003; CHMELNITSKY et al., 2009; GUILLARD et al., 2013; STRAND et al., 2014). O isolado SP44 não apresentou resistência a nenhuma outra classe de antimicrobianos testados neste estudo.

5.3 Avaliação da relação genética entre os isolados

5.3.1 Avaliação da relação genética entre os isolados KP por ERIC-PCR

A partir de agora, os isolados já caracterizados com relação ao seu perfil de ERIC-PCR e diversidade de genes de resistência serão denominados pelo termo cepa.

A figura 11 mostra o dendograma construído após a análise dos perfis de ERIC-PCR das cepas KP. Observa-se que as cepas estão distribuídas em cinco diferentes grupos, com similaridade $\geq 80\%$. Dentro de cada grupo, cepas com similaridade $\geq 90\%$ foram alocadas em *clusters*.

No primeiro grupo, destacado em vermelho, observa-se a formação de 3 *clusters*; no segundo grupo, destacado em verde, observa-se a formação de 2 *clusters* e a alocação de uma cepa individualmente; no terceiro grupo, destacado em azul, observa-se a formação de 2 *clusters*; no quarto grupo, destacado em preto, observa-se a formação de 1 *cluster* e no quinto grupo, destacado em alaranjado, também observa-se a formação de 1 único *cluster*. Os resultados serão discutidos por *clusters* dentro de cada grupo, visando facilitar o entendimento da distribuição temporal e geográfica das cepas dentro da instituição estudada.

Dentro do primeiro grupo, no *cluster* 1, encontram-se 12 cepas isoladas no Hospital de Base no período entre abril de 2011 e outubro de 2013. Entre estas, 8 foram isoladas em 2011, e apenas 2 em 2012 e 2 em 2013. Similaridade de 100% foi observada entre KP5 e KP7, isoladas em 2011 de pacientes distintos, com aproximadamente um mês de diferença (junho e julho). Estas cepas apresentaram os mesmos genes de resistência, *bla*_{CTX-M-15}, *aph(3)-Ia* e *qnrB*, o que sugere a transmissão horizontal, apesar, de os pacientes estarem em diferentes alas do hospital no momento do isolamento. As cepas KP9, KP10, KP14 e KP15 também apresentaram 100% de similaridade, e foram isoladas entre outubro e novembro de 2011 e junho de 2012, de pacientes admitidos em diferentes alas do hospital. Foi interessante observar que em KP9, KP14 e KP15 foram detectados os mesmos genes (*bla*_{CTX-M-15}, *aac(3')-IIa* e *qnrB*). Entretanto, o período de coleta variou de 1 mês a aproximadamente 8 meses, sugerindo que além da transmissão horizontal, ocorre a manutenção de clones resistentes por um período extenso dentro da instituição.

A cepa KP10 apresentou simultaneamente *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-59}, além de *aac(3')-IIa*, *aac(6')-Ib* e *qnrB*, o que ilustra a grande mobilidade apresentada pelos genes de

resistência detectados. Em nosso conhecimento, não existem relatos da co-existência de diferentes variantes de *bla*_{CTX-M} em uma mesma cepa. Entretanto, sabe-se que *bla*_{CTX-M-15} encontra-se normalmente localizado em plasmídeos IncFII (ZHUO et al., 2013), e o gene *bla*_{CTX-M-59} é uma variante de *bla*_{CTX-M-2}, que costuma ser encontrado em IncFIIA (MILLÁN et al., 2013). De acordo com Huang e colaboradores (2012), IncFII e plasmídeos relacionados podem co-existir com outros plasmídeos tipo Inc, e também com outros tipos, graças a diferenças na sequência *inc* que controla a incompatibilidade no mesmo hospedeiro. Plasmídeos carreadores de genes de resistência podem ser selecionados e induzidos a transmissão horizontal para bactérias susceptíveis durante o tratamento com antibióticos (VAN HAL et al., 2009), e a aquisição de *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-59} por esta cepa pode ter ocorrido em diferentes períodos.

No *cluster* 2 estão as cepas KP55, KP56 e KP57, que também apresentaram 100% de similaridade, porém diferentes combinações de genes de resistência. As cepas KP55 e KP57, carreadores de *bla*_{CTX-M-15}, *aac*(3')-IIa e *aac*(6')-Ib; e *bla*_{CTX-M-15}, *aac*(3')-IIa, *aph*(3)-Ia e *qnrB*, respectivamente, foram isolados em novembro de 2013, de pacientes admitidos na mesma UTI, com aproximadamente uma semana de diferença. Já KP56, carreador de *aac*(3')-IIa e *aac*(6')-Ib, foi isolado de paciente admitido em uma ala clínica, localizada seis andares acima da referida UTI, no mesmo dia em que KP57. Os dados observados nestas três cepas reforçam a grande mobilidade dos genes de resistência detectados. As duas outras cepas deste “cluster”, KP43 e KP62, com similaridade >90% também apresentaram variação na combinação de genes de resistência.

No *cluster* 3 estão as cepas KP74 e KP81 que apresentaram similaridade >90% e a mesma combinação de genes de resistência, *bla*_{CTX-M-15}, *aph*(3)-Ia e *aac*(6)-Ib. Estas cepas foram isoladas com uma diferença de aproximadamente dez dias e de pacientes admitidos em alas diferentes do hospital.

O segundo grupo possui 2 *clusters* e uma cepa alocada individualmente. As cepas KP39 e KP42, alocadas no primeiro *cluster*, apresentaram 100% de similaridade, mas uma diferente combinação de genes de resistência. Estas cepas foram isoladas de pacientes em diferentes alas do hospital, porém com uma diferença de apenas dez dias. KP31 e KP65; KP68 e KP35 alocados no segundo *cluster* apresentaram 100% de similaridade. Nestas cepas também se observou variedade de combinações de genes de resistência e diferença entre suas respectivas datas de coleta.

Com relação ao terceiro grupo, as cepas KP46 e KP58, alocadas no primeiro *cluster* apresentaram 100% de similaridade, e novamente observaram-se diferentes combinações de genes de resistência. As demais cepas deste grupo, também apresentaram distintas combinações de genes de resistência.

No quarto grupo foram alocados apenas duas cepas, KP16 e KP19, apresentando 90% de similaridade e os mesmo genes de resistência *bla*_{CTX-M-2}, *aac*(6')-Ib e *aph*(3)-Ia.

No quinto grupo também foram alocados duas cepas, KP72 e KP82, as quais apresentaram 92.3% de similaridade. Em KP72 foram detectados os genes *bla*_{CTX-M-2}, *aac*(6')-Ib e *aph*(3)-Ia e em KP82 foram detectados os genes *bla*_{CTX-M-15}, *aac*(6')-Ib e *aph*(3)-Ia.

A cepa KP67, não foi alocada a nenhum dos grupos formados, pois sua similaridade foi de apenas 79% com as demais *K. pneumoniae* deste estudo. Esta cepa apresentou os genes *bla*_{CTX-M-15} e *aph*(3)-Ia. A cepa KP6, isolada de um paciente durante assistência no Pronto Atendimento, apresentou apenas 72,5% de similaridade com as demais *K. pneumoniae* deste estudo e também não foi alocada em nenhum dos grupos formados. Esta cepa, carrega os genes *bla*_{CTX-M-15}, *aac*(6')-Ib e *qnrB*.

Foi interessante observar que, assim como a cepa KP6, a cepa KP72, alocada no quinto grupo, que apresentou apenas 52,2% de similaridade com os demais grupos, também foi isolada durante o atendimento inicial dos pacientes, ou seja, são cepas provenientes do Pronto Atendimento do hospital. Além destas, destacamos a cepa KP82, que também

pertence ao quinto grupo e foi isolada de um paciente submetido a transplante hepático. Estes dados mostram que novas cepas são introduzidas na instituição durante a entrada de pacientes previamente colonizados ou com infecção adquirida antes da admissão hospitalar.

5.3.2 Avaliação da relação genética entre os isolados SP

As cepas SP foram divididas em 3 grupos (Figura 12). Dentro do primeiro grupo, destacado em verde, observa-se a formação de 5 *clusters* e a alocação de uma cepa individualmente. No segundo grupo, destacado em vermelho, observa-se a formação de 1 *cluster*, e no terceiro grupo, destacado em azul, observa-se também a formação de 1 *cluster*. Observou-se ainda a existência de uma cepa com similaridade de apenas 79,1% com as demais *K. pneumoniae* deste estudo e não alocada em nenhum dos grupos formados.

No primeiro grupo, com 44 cepas, observou-se 100% de similaridade entre SP18 e SP49; SP1, SP13 e SP21; SP6, SP12 e SP36; SP10 e SP20; SP5, SP7, SP29 e SP45; SP14 e SP42. Entretanto, a maioria apresentou diferentes combinações de genes de resistência, e são originadas de diferentes hospitais da cidade de São Paulo. Além disso, foram coletadas em diferentes datas, dentro de um período entre janeiro de 2011 a fevereiro de 2014. Apenas SP13 e SP21 foram isoladas no mesmo hospital, mas com uma diferença de aproximadamente seis meses entre as coletas, e assim como as demais, apresentaram diferentes combinações de genes de resistência.

Foi interessante observar que entre as cepas do primeiro grupo se encontram as duas *K. pneumoniae* carreadoras de *bla*_{CTX-M-14}, detectadas neste estudo. Estas duas cepas (SP28 e SP36), com similaridade de 89,8% apresentaram a mesma combinação de genes (*bla*_{CTX-M-14}, *aac(3)-IIa*, *aph(3)-Ia* e *rmtB*), mas foram isoladas em diferentes hospitais com aproximadamente seis meses de diferença (janeiro de 2013 e julho de 2013), respectivamente.

No primeiro grupo também foram incluídas todas as cepas carreadoras de *rmtB*, também detectado em SP49, que apresentou 100% de similaridade com SP18. Entretanto, SP49 e SP18 são provenientes de diferentes hospitais, foram isoladas com diferença de aproximadamente 17 meses, e apresentam diferente combinação de genes (SP18 não apresenta *rmtB*).

No segundo grupo, estão alocadas três cepas (SP32, SP33 e SP2), isoladas de diferentes hospitais e que apresentaram diferentes combinações de genes de resistência. O terceiro grupo possui duas cepas (SP11 e SP27), com 90% de similaridade; e assim como observado no segundo grupo, estas cepas também apresentaram diferentes combinações de genes. A cepa SP43, não foi alocada em nenhum grupo, apresentando uma similaridade de 79% com as demais *K. pneumoniae* deste estudo, como já citado. Esta cepa apresentou apenas o gene *aac(6')-Ib*.

A diversidade de genes encontrada em uma mesma cepa deve-se à dinâmica de mobilização de genes de resistência, que pode ocorrer por transmissão horizontal, através de transposons ou cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção, inseridos em plasmídeos conjugativos (BOERLIN, REID-SMITH, et al., 2008).

A similaridade de 100% entre cepas SP provenientes de diferentes instituições possivelmente deve-se ao fato de que grande parte dos profissionais de saúde responsáveis pelo cuidado dos pacientes trabalha em diferentes hospitais na grande São Paulo. Esta movimentação favorece a disseminação de clones entre as instituições. Além disso, novas cepas podem ser introduzidas na instituição durante a entrada de pacientes previamente colonizados ou com infecção adquirida antes da admissão hospitalar, como já sugerido anteriormente.

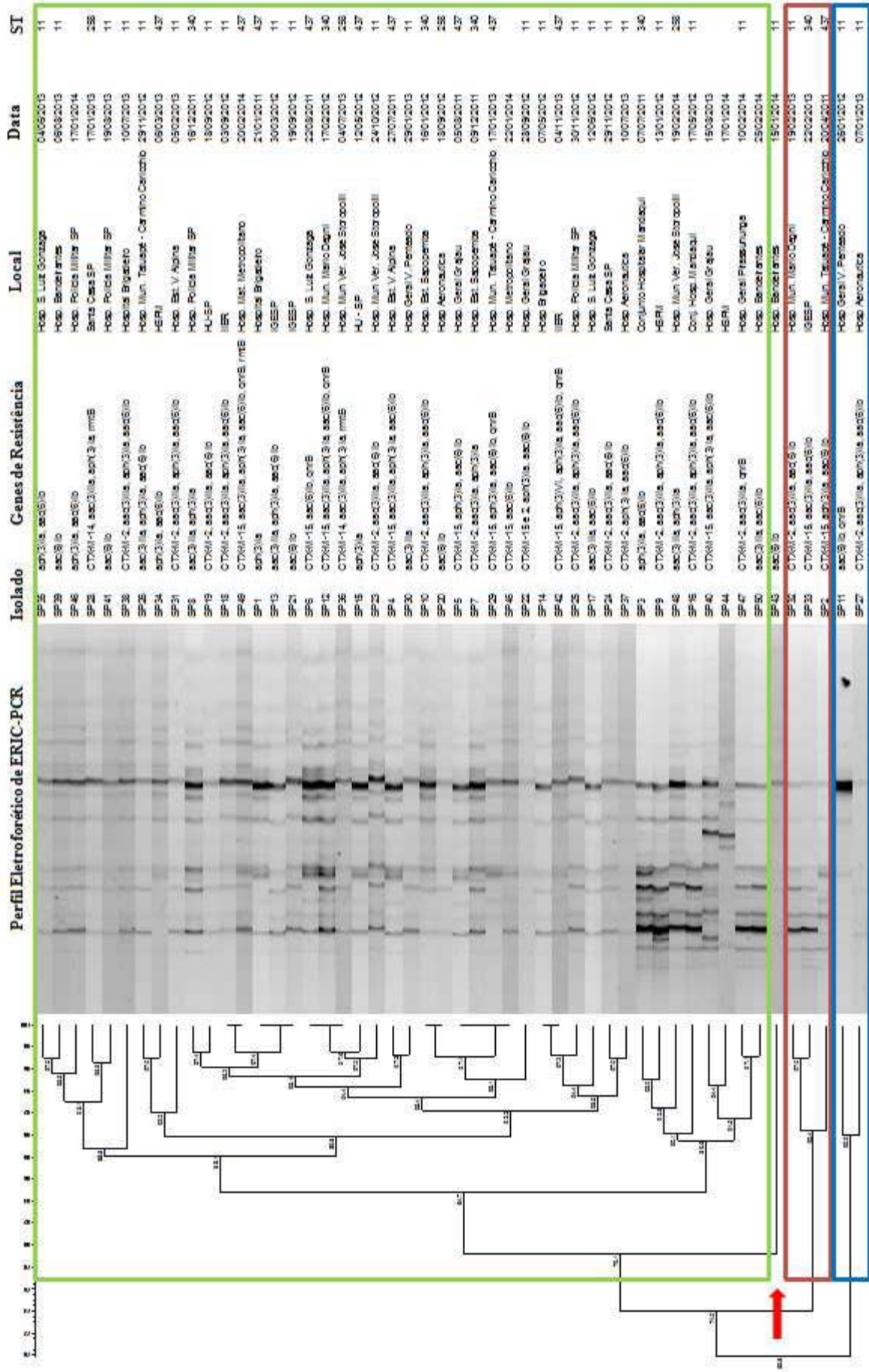


Figura 12. Diversidade genética mostrada no dendrograma gerado por ERIC-PCR dos isolados selecionados da coleção de cultura de Instituto Adolfo Lutz, provenientes de diferentes hospitais da cidade de São Paulo, no período de 2011 a 2014.

5.4 Multilocus Sequence Typing

Estudos têm apontado alguns clones bacterianos como responsáveis pela disseminação mundial de importantes genes de resistência. Atenção especial é dada ao complexo clonal 258 (CC258) de *K. pneumoniae*, que inclui o ST258, ST11 e ST340, mundialmente distribuídos e relacionados com a produção de KPC-2 ou KPC-3 (CASTANHEIRA et al., 2012).

Entre as cinquenta cepas SP, 45 foram submetidas à tipagem por MLST. Destas, vinte e cinco foram identificadas como ST11, dez como ST437, seis como ST340 e quatro como ST258. Todos os quatro diferentes STs identificados nos isolados SP estão compreendidos dentro do complexo clonal 258 (CC258), como demonstrado na figura 14, gerada pelo <http://eburst.mlst.net/>, que ilustra como todos os ST se relacionam dentro do CC258. Os STs ST437, ST11 e ST340 são *Single Locus Variants* (SLV) do ST258, como demonstrado na figura 15.

Com relação às cepas KP, 49 foram submetidos ao MLST, e observou-se um padrão diferente de STs quando comparado com as cepas SP. Foi observado o predomínio de ST340 (vinte e nove cepas), seguido por ST11 (sete), ST42 (cinco) e ST437 (três). Outros ST foram também identificados, com apenas um representante, sendo ST37, ST76 e ST705. Outros dois isolados KP apresentaram uma nova combinação de alelos, e sua identificação numérica foi solicitada ao <http://bigsdh.web.pasteur.fr>. Foi interessante observar que apesar dos isolados KP pertencerem a um único hospital, a variedade de STs encontrada foi maior quando comparada com os isolados SP. Sete STs identificados nos isolados KP fazem parte do CC258, exceto ST42 e ST705. Além disso, os ST37 e ST76, pertencentes ao CC258, não são SLV do ST258, como ilustrado nas figuras 14 e 15.

Nossos resultados corroboram com os dados da literatura em relação à predominância de STs pertencentes ao CC258 no Brasil. Andrade e colaboradores (2011) relataram o ST258 como clone mais frequente quando avaliaram *K. pneumoniae* coletadas nos estados de São

Paulo e Rio de Janeiro, no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013. Em outro estudo, a linhagem *K. pneumoniae* ST437, foi reportada como predominante em estudo conduzido com 57 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, provenientes de cinco estados brasileiros e coletadas no período de 2006 a 2009 (SEKI et al., 2011).

Nicoletti e colaboradores (2012) realizaram um estudo com 34 *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas em 13 hospitais de sete estados brasileiros, no período de 2008 a 2010. Neste estudo o ST437 foi o mais prevalente, sendo identificado em 52,9% das *K. pneumoniae*, isoladas em sete hospitais dos estados de São Paulo e Paraíba, enquanto o ST11 foi considerado o ST mais amplamente distribuído, identificado em 29,4% das cepas coletadas em oito hospitais provenientes de cinco estados diferentes (São Paulo, Pernambuco, Rio Grande do sul, Minas Gerais e Distrito Federal).

Em estudo realizado por Castanheira (2012), com 35 *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas em três hospitais brasileiros localizados em Brasília (DF), São Luís (MA) e São Paulo (SP), todos os ST identificados também pertenciam ao CC258, com predominância do ST11 em Brasília e ST437 em São Paulo.

O ST437 está concentrado no Brasil (ANDRADE et al., 2011; SEKI et al., 2011; PEREIRA et al., 2013; OLIVEIRA et al, 2014), com apenas um relato em *K. pneumoniae* produtora de OXA-48 isolada na Espanha (OTEO et al., 2013). De fato, diversos estudos abrangentes, que analisaram cepas provenientes de diversos estados brasileiros, indicaram a predominância do ST437, exceto no estudo conduzido por Andrade e colaboradores (2011), no qual houve predomínio do ST258, mas apenas dois estados foram incluídos.

No presente estudo as cepas foram isoladas em hospitais de duas importantes regiões, a região da cidade de São Paulo e região noroeste do estado de São Paulo. É interessante observar a predominância de cepas do CC258, porém com diferença entre os ST identificados como dominantes em cada região. Nos hospitais da cidade de São Paulo observou-se o

predomínio do ST11 (aproximadamente 53% das cepas), enquanto no HB entre as cepas predominou o ST340 (59% das cepas).

O ST340, predominante entre as cepas KP, tem sido relacionado com a produção de CTX-M-15, o que explica o predomínio de *bla*_{CTX-M-15} entre estas cepas (BUENO et al., 2013; PEIRANO et al., 2014; GHAROUT-SAIT et al., 2014).

A diferença entre os ST identificados em cada região também pode explicar o predomínio de *bla*_{CTX-M-2} em São Paulo, visto que o ST11 foi relacionado com a coexistência de *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-2} em *K. pneumoniae* isoladas em um hospital terciário no interior do estado de São Paulo (ANDRADE et al., 2014). Além disso, estas cepas eram resistentes à Polimixina B, o que também apresenta relação com as cepas SP, pois entre as quatro destas, resistentes à Polimixina, três foram identificadas como ST11. Outros estudos também têm relacionado a linhagem *K. pneumoniae* ST11 com a resistência à Polimixina (PEREIRA et al., 2013; PENA et al., 2014).

Apenas cepas SP (SP20, SP28, SP36 e SP48) foram identificadas como ST258. Este ST é mundialmente disseminado, e está associado com a produção das carbapenemases dos tipos KPC e OXA-48 (BUSH, JACOBY 2010; SEKI et al., 2011; GOMES et al., 2011; WOODFORD et al., 2011). Foi interessante observar que, exceto por SP20, as outras cepas ST258 apresentam o gene *rmtB*, e além disso, SP28 e SP36 carregam o gene *bla*_{CTX-M-14}. *K. pneumoniae* ST258 tem sido comumente descrita em surtos em diversos países (WOODFORD et al., 2011; CASTANHEIRA et al., 2013; ANDRADE et al., 2014), sendo considerada de alto risco por carrear plasmídeos com alta capacidade de disseminação (BAQUERO, COQUE, 2011; WOODFORD et al., 2011; CARATTOLI, 2013). Em nosso conhecimento este é o primeiro relato da coexistência de *rmtB* e *bla*_{CTX-M-14} em *K. pneumoniae* ST258.

A figura 13 ilustra a correlação entre os ST identificados e a produção de CTX-M detectada nos isolados estudados.

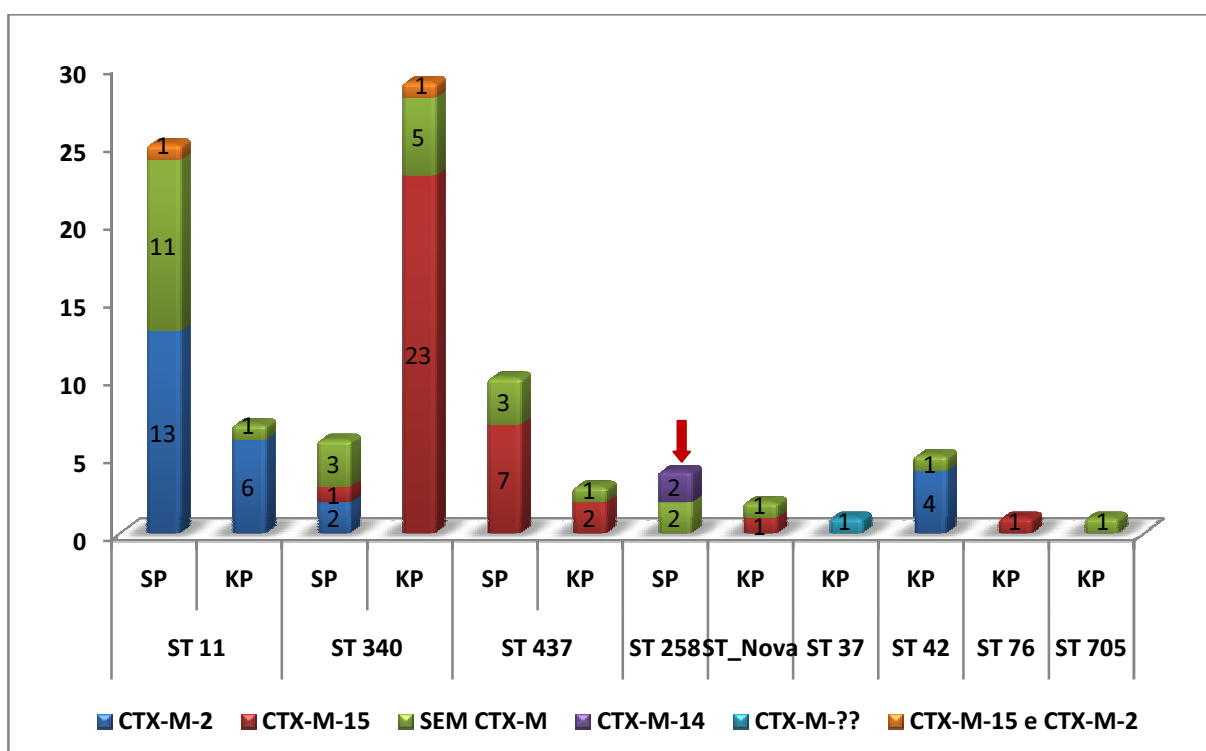


Figura 13. Correlação entre os ST identificados e a produção de CTX-M detectada nos isolados de São José do Rio Preto (KP) e nos isolados de São Paulo (SP). A seta destaca os quatro isolados de São Paulo identificados como ST258, dentre os quais três também apresentaram os genes *rmtB* e *bla*_{CTX-M-14}.

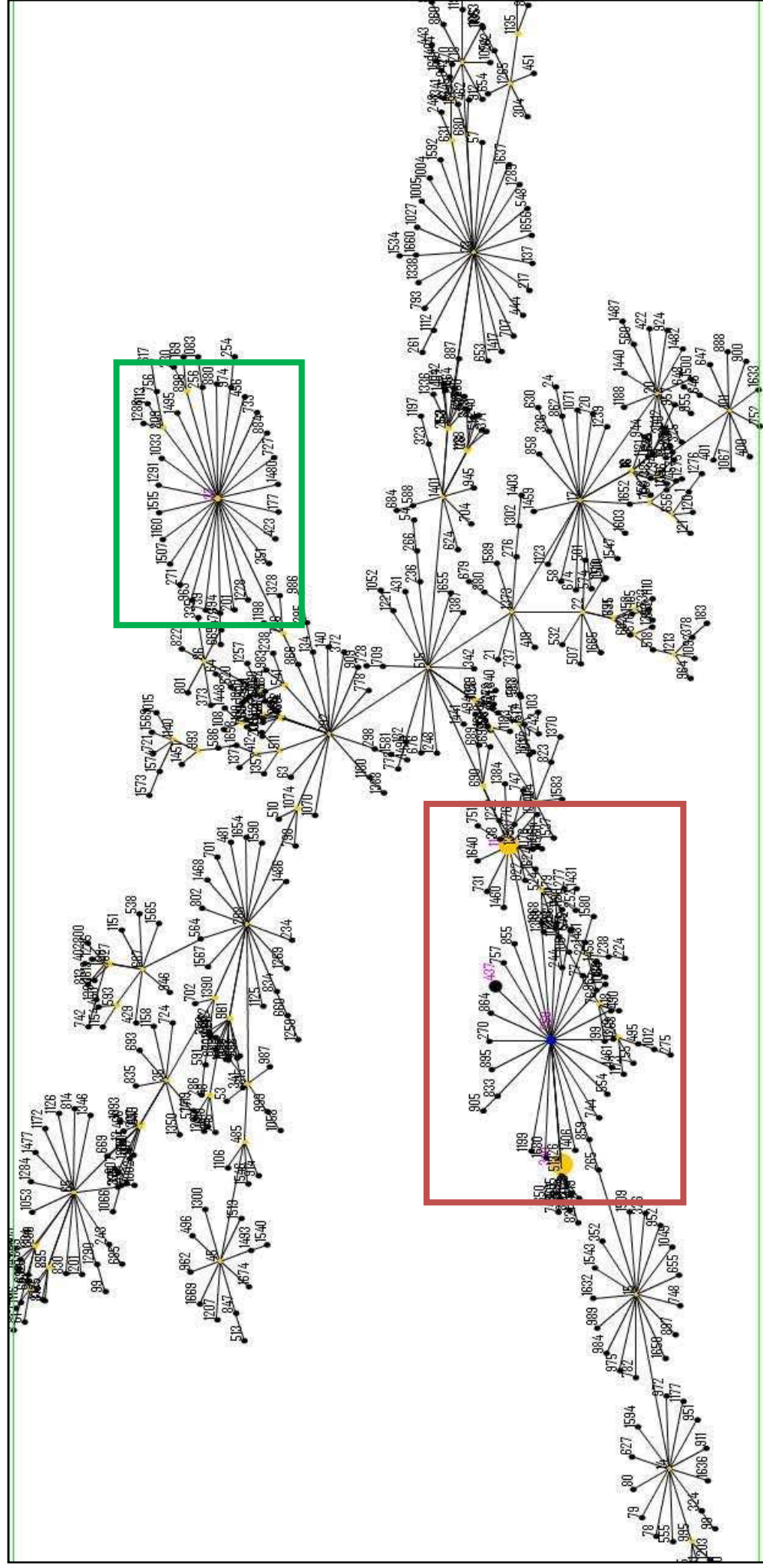


Figura 14. Ilustração do Complexo Clonal 258. Figura gerada pelo <http://eburst.mlst.net/> que demonstra como todos os ST se relacionam dentro do CC258. Dentro do quadro vermelho temos o ST258 no centro e a partir dele podemos visualizar seus *Single Locus Variants* (SLV) ST437, ST340 e ST11. Logo abaixo do ST258, podemos também visualizar o ST76 e notar que este não se trata de um SLV do ST258. No quadro verde está localizado o ST37 no centro da imagem ilustrando claramente sua relação mais distante com o ST258.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Com relação às *K. pneumoniae* produtoras de KPC incluídas neste estudo, conclui-se que:

- o A maioria carrega simultaneamente mais de um gene, associados à resistência a diferentes classes de antimicrobianos;
- o Em 95% das cepas a resistência aos aminoglicosídeos está associada à produção de AMEs, especificamente fosfotransferases e acetiltransferases, codificadas pelos genes *aph(3')-VI*, *aph(3')-Ia*, *aac(6')-Ib* e *aac(3)-Ia* e *aac(3)IIa*. O gene *aac(6')-Ib* é frequente nas cepas SP, enquanto nas cepas KP o *aph(3')-Ia*;
- o A produção de metiltransferases tipo ArmA e RmtB não é um mecanismo de resistência aos aminoglicosídeos disseminado;
- o A resistência às quinolonas é provavelmente decorrente de mutações em genes cromossômicos, tendo em vista que produção de bombas de efluxo codificadas por *qepA* não ocorre, e que os genes *qnrB* e *oqxAB* estão presentes na minoria das cepas.
- o Nas cepas KP, *qnrB* é mais comum, enquanto *oqxAB* é mais comum nas cepas SP;

- o Não são produtoras de carbapenemase tipo NDM;
- o Variantes do gene *bla*_{CTX-M} estão amplamente disseminados, sendo encontrados genes que codificam CTX-M-15, CTX-M-2, CTX-M-59 e CTX-M-14. Nas cepas KP, o gene *bla*_{CTX-M-15} é o mais freqüente, enquanto *bla*_{CTX-M-2} predomina nas cepas SP;
- o Diferentes variantes de *bla*_{CTX-M} co-existem na mesma cepa, como evidenciado pela detecção de uma cepa SP carreando *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-15}, e uma cepa KP carreando *bla*_{CTX-M-59} e *bla*_{CTX-M-15};
- o Existe uma ampla diversidade genética, como evidenciado pela identificação de 9 clusters entre as cepas KP e 7 clusters entre as cepas SP;
- o Predomina o CC258, porém com distinta distribuição e diversidade de STs nas diferentes regiões. No Hospital de Base de São José do Rio Preto, existe maior diversidade de STs e predomina a ST340. Nos hospitais da cidade de São Paulo existe menor diversidade de STs e predomina a ST11.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKERS, K. S.; CHANEY, C.; BARSOUMIAN, A. et al. Aminoglycoside resistance and susceptibility testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. **J Clin Microbiol.** v.48, n.4, p.1132-1138, 2010.
- AL SHEIKH, Y. A.; MARIE, M. A.; JOHN, J. et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes among β -lactamase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates in Saudi Arabia. **Libyan J Med.** Jul 7;9:24432, 2014.
- ALMAGHRABI, R.; CLANCY, C. J.; DOI, Y. et al. Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Strains Exhibit Diversity in Aminoglycoside-Modifying Enzymes, Which Exert Differing Effects on Plazomicin and Other Agents. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;58(8):4443-51, 2014.
- ALMEIDA, A. C.; CAVALCANTI, F. L.; MARTINS, W. M. et al. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;57(8):4077-8, 2013.
- ALMEIDA, A. C.; VILELA, M. A.; CAVALCANTI, F. L. et al. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;56(4):2205-6, 2012.
- AMBLER, R. P.; COULSON, A. F.; FRÈRE, J. M. et al. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. **Biochem J.** May 15; 276(Pt 1): 269–270, 1991
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** May 16;289(1036):321-31, 1980 .
- ANDERSON, K.F.; LONSWAY, D.R.; RASHEED, L.K. et al. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723–2725, 2007.
- ANDRADE, L.N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J.C. et al. Dissemination of *bla*KPC-2 by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- ANDRADE, L. N.; VITALI, L.; GASPAR, G. G. et al. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **J Clin Microbiol.** Jul;52(7):2530-5, 2014.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica nº 01/2013. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. 2013.

- ARDANUY C.; LINÃRES J.; DOMÍNGUEZ M. A. et al. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 42, n.1, p.1636-1640, 1998.
- ARYA, S. C.; AGARWAL, N. Emergence of tigecycline resistance amongst multi-drug resistant gram negative isolates in a multi-disciplinary hospital. **J Infect.** Oct;61(4):358-9, 2010.
- AVENT, M. L.; ROGERS, B. A.; CHENG, A. C. et al. Current use of aminoglycosides: indications, pharmacokinetics and monitoring for toxicity. **Intern Med J.** v.41, n.6, p.441-449, 2011.
- AZUCENA, E.; MOBASHERY, S. Aminoglycoside-modifying enzymes: mechanisms of catalytic processes and inhibition. **Drug Resistance Updates.** v.4, p.106–117, 2001.
- BABINI, G. S.; LIVERMORE, D. M. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrob Agents Chemother.** v.44, p.2230, 2000.
- BALL, P. Quinolone generations: natural history or natural selection? **J Antimicrob Chemother.** Jul;46 Suppl T1:17-24, 2000.
- BARANIAK, A.; IZDEBSKI, R.; HERDA, M. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4565-4567, 2009.
- BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection.** Sep-Oct;18(5):294-8, 1990.
- BECKER, B.; COOPER, M.A. Aminoglycoside Antibiotics in the 21st Century. **ACS Chem. Biol.** v.8, p.105–115, 2013.
- BEIRÃO, E. M.; FURTADO, J. J.; GIRARDELLO, R. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Braz J Infect Dis.** Jan-Feb;15(1):69-73, 2011.
- BELBEL, Z.; CHETTIBI, H.; DEKHIL, M. et al. Outbreak of an armA Methyltransferase-Producing ST39 *Klebsiella pneumoniae* Clone in a Pediatric Algerian Hospital. **Microb Drug Resist.** Aug;20(4):310-5, 2014.
- BERMAN, H.; BARBERINO, M. G.; MOREIRA, E. D. JR. et al. Distribution of strain type and antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates causing meningitis in a large urban setting in Brazil. **J Clin Microbiol.** May;52(5):1418-22. 2014

BIEDENBACH, D. J.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. et al. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004). **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jun;55(2):119-27, 2006.

BILAVSKY, E.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. How to stem the tide of carbapenemase-producing enterobacteriaceae?: proactive versus reactive strategies. **Curr Opin Infect Dis.** Aug;23(4):327-31, 2010.

BOERLIN, P.; REID-SMITH, R. J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Anim Health Res Rev.** Dec;9(2):115-26, 2008.

BOGAERTS, P.; BOUCHAHROUF, W.; DE CASTRO, R. R. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Belgium. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;55(6):3036-8, 2011.

BOGAERTS, P.; GALIMAND, M.; BAURAING, C. et al. Emergence of ArmA and RmtB aminoglycoside resistance 16S rRNA methylases in Belgium. **J Antimicrob Chemother.** Mar;59(3):459-64, 2007

BOLON, M. K. The newer fluoroquinolones. **Med Clin North Am.** Jul;95(4):793-817, 2011.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48, n.1, p.1-14, 2004.

BONNET, R.; DUTOIR, C.; SAMPAIO, J. L. et al. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;45(8):2269-75, 2001.

BONNET, R.; RECULE, C.; BARADUC, R. et al. Effect of D240G substitution in a novel ESBL CTX-M-27. **J Antimicrob Chemother.** Jul;52(1):29-35, 2003.

BONOMO, R. A. New Delhi metallo- β -lactamase and multidrug resistance: a global SOS? **Clin Infect Dis.** Feb 15;52(4):485-7, 2011.

BOSZCZOWSKI, I.; NICOLETTI, C.; PUCCINI, D. M. et al. Outbreak of extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in a neonatal intensive care unit related to onychomycosis in a health care worker. **Pediatr Infect Dis J.** Jul;24(7):648-50, 2005.

BOYD, D. A.; TYLER S.; CHRISTIANSON, S. et al. Complete nucleotide sequence of a 92-kilobase plasmid harboring the CTX-M-15 extended-spectrum beta-lactamase involved in an outbreak in long-term-care facilities in Toronto, Canada. **Antimicrob Agents Chemother.** Oct;48(10):3758-64, 2004.

- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev.** Oct;14(4):933-51, 2001.
- BRATU, S.; TOLANEY, P.; KARUMUDI, U. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and *in vitro* activity of polymyxin B and other agents. **J Antimicrob Chemother** 56: 128-32, 2005.
- BROLUND, A.; EDQUIST, P. J.; MÄKITALO, B. et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007-2011. **Clin Microbiol Infect.** Jun;20(6):O344-52, 2014.
- BUENO, M. F.; FRANCISCO, G. R.; O'HARA, J. A. et al. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** May;57(5):2397-400, 2013 .
- BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, n. 224, p. 1-8, 2010.
- BUSH, K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis.** Apr 1;32(7):1085-9, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS A. A functional classification scheme for Beta-lactamases and correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Jun;39(6):1211-33., 1995.
- BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G. et al. Tackling antibiotic resistance. **Nat Rev Microbiol.** Nov 2;9(12):894-6, 2011.
- BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. **Annu Rev Microbiol.** 65:455-78, 2011
- BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** Mar;54(3):969-76, 2010.
- CABRAL, A. B.; MELO, R. C.; MACIEL, M. A. et al. Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** Oct;45(5):572-8. 2012.
- CALDWELL, S. J.; BERGHUISA, A.M. Small-angle x-ray scattering analysis of the bifunctional antibiotic resistance enzyme aminoglycoside (6') acetyltransferase-Ie aminoglycoside (2') phosphotransferase-Ia reveals a rigid solution structure. **Antimicrob Agents Chemother**, p. 1899 –1906, 2012.

CANNATELLI, A.; D'ANDREA, M. M.; GIANI, T. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemases mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob Agents Chemother.** Nov;57(11):5521-6, 2013.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol.** Oct;9(5):466-75, 2006.

CAO, X.; XU, X.; ZHANG, Z. et al. Molecular characterization of clinical multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.** May 1;13:16, 2014.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n. 6, p. 2227-2238, 2009.

CARTELLE, M.; DEL MAR TOMAS, M.; PERTEGA, S. et al. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. **J Clin Microbiol.** v. 42, n. 9, p. 4242-9, 2004.

CARVALHAES C. G.; PICÃO R. C.; NICOLETTI A. G. et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.2, p. 249-251, 2010.

CARVALHAES, C. G.; CAYÔ, R.; GALES, A. C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the intensive care unit: a real challenge to physicians, scientific community, and society. **Shock.** May;39 Suppl 1:32-7, 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D'A.; LEÃO, R. S.; SILVA, R. V. et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 68, p. 337–338, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(4):2475-6, 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; et al. Isolation of ndm-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J antimicrob chemother.** Dec;68(12):2956-7, 2013.

CASSETTARI, V. C.; DA SILVEIRA, I. R.; DROPA, M. et al. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. **J Hosp Infect.** 2009.

CASSETTARI, V. C.; SILVEIRA, I. R.; BALSAMO, A. C. et al. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **J Pediatr (Rio J)**, v. 82, n. 4, p. 313-6, 2006.

CASTANHEIRA, M.; FRITSCH, T. R.; SADER, H. S.; et al. RmtD 16S RNA methylase in epidemiologically unrelated *spm-1*-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;52(4):1587-8, 2008.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; DESHPANDE, L. M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;52(2):570-3, 2008.

CASTANHEIRA, M.; COSTELLO, A. J.; DESHPANDE, L. M. et al. Expansion of clonal complex 258 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American hospitals: report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrob Agents Chemother.** Mar;56(3):1668-9, 2012.

CASTANHEIRA, M.; PEREIRA, A. S.; NICOLETTI, A. G. et al. First report of plasmid-mediated *qnrA1* in a ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strain in Latin America. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;51(4):1527-9, 2007.

CASTANHEIRA, M.; WILLIAMS, G.; JONES, R. N. et al. Activity of ceftaroline-avibactam tested against contemporary Enterobacteriaceae isolates carrying β -lactamases prevalent in the United States. **Microb Drug Resist.** Oct;20(5):436-40, 2014.

CATTOIR, V.; POIREL, L.; ROTIMI, V. et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. **J. Antimicrob Chemother.**, v.60, p.394-397, 9p, 2007.

CAVACO, L. M.; HASMAN, H.; XIA, S. et al. *qnrD*, a novel gene conferring transferable quinolone resistance in *Salmonella enterica* serovar Kentucky and *Bovismorbificans* strains of human origin. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;53(2):603-8, 2009.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B. E.; CASTANHEIRA, M. et al. First description of *bla*(CTX-M-14)- and *bla*(CTX-M-15)-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Microb Drug Resist.** Sep;16(3):177-84, 2010.

CHAGAS, T. P.; ALVES, R. M.; VALLIM, D. C. et al. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Braz J Infect Dis.** Sep-Oct;15(5):420-5, 2011.

- CHANG, M. R.; BIBERG, C. A.; LOPES, F. A. et al. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(kpc) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.** Jan-Feb;46(1):114-5, 2013.
- CHEN, L. F.; ANDERSON, D. J.; PATERSON, D. L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infect Drug Resist.** v. 5:133-41, 2012.
- CHEN, L.; CHAVDA, K. D.; AL LAHAM, N. et al. Complete nucleotide sequence of a blaKPC-harboring IncI2 plasmid and its dissemination in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** Oct;57(10):5019-25, 2013.
- CHENG, G.; HAO, H.; DAI, M. et al. Antibacterial action of quinolones: from target to network. **Eur J Med Chem.** Aug;66:555-62, 2013
- CHIU SK¹, WU TL, CHUANG YC, et al. National surveillance study on carbapenem non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: the emergence and rapid dissemination of KPC-2 carbapenemase. **PLoS One.** Jul 24;8(7):e69428, 2013.
- CHMELNITSKY, I.; HERMESH, O.; NAVON-VENEZIA, S. et al. Detection of aac(60)-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 64, 718–722, 2009.
- CLÍMACO, E. C.; MINARINI, L. A.; DA COSTA DARINI, A. L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn Microbiol Infect Dis.** Oct;68(2):186-9, 2010. *Clin Microbiol Infect.* 2008 Jan;14 Suppl 1:111-6.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE- CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Wayne, USA, 2013.
- COPPO, E.; DEL BONO, V.; VENTURA, F. et al. Identification of a New Delhi metallo- β -lactamase-4 (NDM-4)-producing *Escherichia coli* in Italy. **BMC Microbiol.** Jun 7;14:148, 2014.
- CRUZ, G. R.; RADICE, M.; SENNATI, S. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants among oxyiminocephalosporin-resistant Enterobacteriaceae in Argentina. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Nov;108(7):924-7. 2013
- CUZON, G.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in bla_{KPC} Gene Mobilization. **Antimicrob Agents Chemother.** November; 55(11): 5370–5373, 2011.
- DALLENNE, C.; DA COSTA, A.; DECRÉ, D. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother.** Mar;65(3):490-5, 2010.

DAVIS, M. A.; BAKER, K. N.; ORFE, L. H. et al. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;54(6):2666-9, 2010.

DE CÁSSIA ANDRADE MELO R.; DE BARROS, E. M.; LOUREIRO, N. G. et al. Presence of fimH, mrkD, and irp2 Virulence Genes in KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Recife-PE, Brazil. **Curr Microbiol.** Aug 2, 2014.

DE OLIVEIRA GARCIA, D.; DOI, Y.; SZABO, 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.** May;52(5):1790-. 2008.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro Patologia Med Lab.**, v. 46, p. 365-367, 2010.

DENG, Y.; HE, L.; CHEN, S. et al. F33:A-B- and F2:A-B- plasmids mediate dissemination of rmtB-blaCTX-M-9 group genes and rmtB-qepA in Enterobacteriaceae isolates from pets in China. **Antimicrob Agents Chemother.** Oct;55(10):4926-9, 2011.

DIANCOURT L.; PASSET, V.; VERHOEF, J. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4178-4182, 2005.

DO CARMO FILHO, J. R.; SILVA, R. M.; CASTANHEIRA, M. et al. Prevalence and genetic characterization of blaCTX-M among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. **J Chemother.** Oct;20(5):600-3. 2008.

DOI Y.; DE OLIVEIRA GARCIA, D.; ADAMS, J. et al. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo-beta-lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.** Mar;51(3):852-6, 2007.

DOI, Y.; ARAKAWA, Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. **Clin Infect Dis.** Jul 1;45(1):88-94, 2007.

DOI, Y.; YOKOYAMA, K.; YAMANE, K. et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylase in *Serratia marcescens* conferring high-level resistance to aminoglycosides. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;48(2):491-6, 2004.

DOI, Y.; ADAMS-HADUCH, J. M.; PATERSON, D. L. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene rmtD. **Antimicrob Agents Chemother.** Jun;52(6):2270-2. 2008

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **Biomed Res Int.** 2014:249856, 2014.

DOUBLET, B.; GRANIER, S. A.; ROBIN, F. et al. Novel plasmid-encoded ceftazidime-hydrolyzing CTX-M-53 extended-spectrum beta-lactamase from *Salmonella enterica* serotypes Westhampton and Senftenberg. **Antimicrob Agents Chemother.** May;53(5):1944-51, 2009.

DRAWZ, S. M.; BONOMO, R. A. Three decades of beta-lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev.** Jan;23(1):160-201, 2010.

DRLICA, K.; HIASA, H.; KERNS, R. et al. Quinolones: action and resistance updated. **Curr Top Med Chem.** 9(11):981-98, 2009.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. **Clin Microbiol Infect.** Jun;16(6):630-2, 2010.

DU, J.; LI, P.; LIU, H. et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a university teaching hospital, China. **PLoS One.** Apr 16;9(4):e95181, 2014.

EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I., et al. Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** v.47, n. 12, p.3724-3732, 2003.

EMMERSON, A. M.; JONES, A. M. The quinolones: decades of development and use. **J Antimicrob Chemother.** May;51 Suppl 1:13-20, 2003.

ENDIMIANI, A.; CARIAS, L. L.; HUJER, A. M. et al. Presence of plasmid-mediated quinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing blaKPC in the United States. **Antimicrob Agents Chemother** 52, 2680-2, 2008.

ENDIMIANI, A.; PEREZ, F.; BAJAKSOUZIAN, S. et al. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. **J Clin Microbiol.** Dec;48(12):4417-25, 2010

ENRIGHT M. C.; SPRATT, B. G. Multilocus sequence typing. **Trends Microbiol.** Dec;7(12):482-7, 1999.

FALAGAS, M.E; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiology**, v. 6, p. 653-666, 2011.

FALCONER, S. B.; CZARNY, T. L.; BROWN, E. D. Antibiotics as probes of biological complexity. **Nat Chem Biol.** Jul;7(7):415-23, 2011.

- FEDLER, K. A.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Dec;56(4):427-36, 2006
- FEHLBERG, L. C.; CARVALHO, A. M.; CAMPANA, E. H. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* - producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis.** Nov-Dec;16(6):577-80, 2012.
- FEIL, E. J.; LI, B. C.; AANENSEN, D. M. et al. eBURST: inferring patterns of evolutionary descent among clusters of related bacterial genotypes from multilocus sequence typing data. **J Bacteriol.** Mar;186(5):1518-30, 2004.
- FERJANI, S.; SAIDANI, M.; AMINE, F. S. et al. Prevalence and Characterization of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Genes in Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae in a Tunisian Hospital. **Microb Drug Resist.** 2014 Sep 23. [Epub ahead of print]
- FILIPPA, N.; CARRICAJÓ, A.; GRATTA, F. et al. Outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying qnrB1 and blaCTX-M15 in a French intensive care unit. **Ann Intensive Care.** Jul 1;3(1):18, 2013.
- FIROOZEH, F.; ZIBAEI, M.; SOLEIMANI-ASL, Y. Detection of plasmid-mediated qnr genes among the quinolone-resistant *Escherichia coli* isolates in Iran. **J Infect Dev Ctries.** Jul 14;8(7):818-22, 2014.
- FRENCH, G. L.; SHANNON, K. P.; SIMMONS, N. Hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* resistant to broad-spectrum cephalosporins and beta-lactam-beta-lactamase inhibitor combinations by hyperproduction of SHV-5 beta-lactamase. **J Clin Microbiol.** v. 34, n. 2, p. 358-63, 1996.
- FRITSCH, T. R.; CASTANHEIRA, M.; MILLER, G. H. et al. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. **Antimicrob Agents Chemother** 52: 1843-5, 2008
- GAIBANI, P.; LOMBARDO, D.; LEWIS, R. E. et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. **J Antimicrob Chemother.** Jul;69(7):1856-65, 2014.
- GAILLOT, O.; MARUÉJOULS, C.; ABACHIN, E. et al. Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase, originating from a contaminated ultrasonography coupling gel. **J Clin Microbiol.** v.36, n.5, p.1357-1360, 1998.
- GALANI, I.; SOULI, M.; PANAGEA, T. et al. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in Enterobacteriaceae isolates from a Greek university hospital. **Clin Microbiol Infect.** Mar;18(3):E52-4. 2012.

- GALES, A. C.; BOLMSTROM, A.; SAMPAIO, J. et al. Antimicrobial Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum betalactamase (ESBL) Isolated in Hospitals in Brazil. **Braz J Infect Dis.** 1: 196-203, 1997.
- GALES, A. C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R. N.; SADER, H. S.. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from Sentry Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. Plasmid-mediated high-level resistance to aminoglycosides in Enterobacteriaceae due to 16S rRNA methylation. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;47(8):2565-71, 2003.
- GALIMAND, M.; COURVALIN, P.; LAMBERT, T. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. **Antimicrob Agents Chemother.** Jul;56(7):3960-2, 2012.
- GALIMAND, M.; SABCHEVA, S.; COURVALIN, P. et al. Worldwide disseminated armA aminoglycoside resistance methylase gene is borne by composite transposon Tn1548. **Antimicrob Agents Chemother.** Jul;49(7):2949-53, 2005.
- GARAU, G.; DI GUILLI, A. M.; HALL, B. G. Structure-based phylogeny of the metallo-beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.** Jul;49(7):2778-84, 2005.
- GARBATI, M. A.; AL GODHAIR, A. I. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. **Afr J Infect Dis.** 7(1):8-10, 2013
- GISKE, C. G.; MONNET, D. L.; CARS, O. et al. Clinical and Economic Impact of Common Multidrug-Resistant Gram Negative Bacilli. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n. 3, p. 813-821, 2008.
- GISKE, C. G.; SUNDSFJORD, A. S.; KAHLMEYER, G. et al. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **J Antimicrob Chemother.** Jan;63(1):1-4, 2009.
- GNIADKOWSKI, M.; PALUCHA, A.; GRZESIOWSKI, P. et al. Outbreak of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a pediatric hospital in Warsaw, Poland: clonal spread of the TEM-47 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strain and transfer of a plasmid carrying the SHV-5-like ESBL-encoding gene. **Antimicrob Agents Chemother.** v.42, n.12, p.3079-3085, 1998.
- GOOTZ, T.D. The Global Problem of Antibiotic Resistance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 79-93, 2010.

GUILLARD, T.; CAMBAU, E.; CHAU, F. et al. Ciprofloxacin treatment failure in a murine model of pyelonephritis due to an AAC(6')-Ib-cr-producing *Escherichia coli* strain susceptible to ciprofloxacin in vitro. **Antimicrob Agents Chemother.** Dec;57(12):5830-5, 2013.

HABEEB, M. A.; HAQUE, A.; IVERSEN, A. et al. Occurrence of virulence genes, 16S rRNA methylases, and plasmid-mediated quinolone resistance genes in CTX-M-producing *Escherichia coli* from Pakistan. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** Mar;33(3):399-409. 2014

HALDORSEN, B. C.; SIMONSEN, G. S.; SUNDSFJORD, A. et al. Increased prevalence of aminoglycoside resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Norway is associated with the acquisition of AAC(3)-II and AAC(6')-Ib. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jan;78(1):66-9, 2014.

HANSEN, L. H.; JENSEN, L. B.; SORENSEN, H. I. et al. Substrate specificity of the OqxAB multidrug resistance pump in *Escherichia coli* and selected enteric bacteria. **J Antimicrob Chemother.** Jul;60(1):145-7, 2007.

HATA, M.; SUZUKI, M.; MATSUMOTO, M. et al. Cloning of a novel gene for quinolone resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;49(2):801-3, 2005.

HAWKEY, P. M. Mechanisms of quinolone action and microbial response. **J Antimicrob Chemother.** May;51 Suppl 1:29-35, 2003.

HELANDER, I. M.; KATO, Y.; KILPELÄINEN, I. et al. Characterization of lipopolysaccharides of polymyxin-resistant and polymyxin-sensitive *Klebsiella pneumoniae* O3. **Eur J Biochem.** Apr 1;237(1):272-8, 1996.

HIDALGO, L.; HOPKINS, K. L.; GUTIERREZ, B. et al. Association of the novel aminoglycoside resistance determinant RmtF with NDM carbapenemase in Enterobacteriaceae isolated in India and the UK. **J Antimicrob Chemother.** Jul;68(7):1543-50, 2013.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **J Antimicrob Chemother.** Jun;65(6):1119-25, 2010

HOBAN, D. J.; NICOLLE, L. E.; HAWSER, S. et al. Antimicrobial susceptibility of global inpatient urinary tract isolates of *Escherichia coli*: results from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) program: 2009-2010. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Aug;70(4):507-11, 2011.

HOOVER, D.C. Fluoroquinolones resistance among Gram-positive cocci. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 530-538, 2002

- HOPKINS, K. L.; THRELFALL, E. J.; KARISIK, E. et al. Identification of novel plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-57 in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Int J Antimicrob Agents**. Jan;31(1):85-6, 2008.
- HSUEH, P. R.; BADAL, R. E.; HAWSER, S. P. et al. Epidemiology and antimicrobial susceptibility profiles of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: 2008 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). **Int J Antimicrob Agents**. Nov;36(5):408-14, 2010.
- HU, Y. Y.; CAI, J. C.; ZHANG, R. et al. Emergence of *Proteus mirabilis* harboring blaKPC-2 and qnrD in a Chinese Hospital. **Antimicrob Agents Chemother**. May;56(5):2278-82, 2012.
- HU, X.; XU, B.; YANG, Y. et al. A high throughput multiplex PCR assay for simultaneous detection of seven aminoglycoside-resistance genes in Enterobacteriaceae. **BMC Microbiol**. Mar 14;13:58, 2013.
- HUANG, S.; DAI, W.; SUN, S. et al. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance and Aminoglycoside Resistance Determinants among Carbapenem Non-Susceptible *Enterobacter cloacae*. **PLoS One**. v.7, 2012
- HUANG, S.; DAI, W.; SUN, S. et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible *Enterobacter cloacae*. **PLoS One**.7(10):e47636, 2012.
- HUDSON, C. M.; BENT, Z.W.; MEAGHER, R. J. et al. Resistance determinants and mobile genetic elements of an NDM-1-encoding *Klebsiella pneumoniae* strain. **PLoS One**. Jun 6;9(6):e99209, 2014.
- HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; HULTEN, E. A. et al. Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. **Antimicrob Agents Chemother**; 50:4114–23, 2006.
- HURST, M.; LAMB, H. M.; SCOTT, L. J. et al. Levofloxacin: an updated review of its use in the treatment of bacterial infections. **Drugs**. 62(14):2127-67, 2002.
- JACOBY, G.A. Mechanisms of resistance to quinolones. **Clinical Infectious Diseases**, 41(Suppl2), S120–S126, 2005.
- JENSEN, V. F.; JAKOBSEN, L.; EMBORG, H. D. et al. Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*. **J Antimicrob Chemother**. 58:101–7, 2006.
- JIANG, Y.; YU, D.; WEI, Z. et al. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multidrug resistance plasmid pKP048, carrying blaKPC-2, blaDHA-1, qnrB4, and armA. **Antimicrob Agents Chemother**. Sep;54(9):3967-9, 2010.

- JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol.** Apr;62(Pt 4):499-513, 2013.
- JONES, R. N.; PFALLER, M. A. Antimicrobial activity against strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. with resistance phenotypes consistent with an extended-spectrum β -lactamase in Europe. **Clin Microbiol Infect.**, v.9, n.7, p.708-712, 2003.
- JONES, R. N.; GUZMAN-BLANCO, M.; GALES, A. C.; et al. Susceptibility rates in Latin American nations: report from a regional resistance surveillance program (2011). **Braz J Infect Dis.** Nov-Dec;17(6):672-81, 2013.
- KANG, H. Y.; KIM, K. Y.; KIM, J. 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.** Feb;46(2):700-6. 2008
- KARAH, N. Identification, molecular epidemiology, and antibiotic resistance characterization of *Acinetobacter* spp. clinical isolates. A dissertation for the degree of Philosophiae Doctor, University Hospital Of North Norway, 2011.
- KARIM, A.; POIREL, L.; NAGARAJAN, S. et al. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. **FEMS Microbiol Lett.** Jul 24;201(2):237-41, 2001.
- KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C. et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram Negative Bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis** Jun;9(3):216-24 , 2005.
- KIM, E. S.; JEONG, J. Y.; CHOI, S. H. et al. Plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump gene, *qepA*, in *Escherichia coli* clinical isolates in Korea. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, 65(3), 335–338, 2009.
- KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; SAIFON, P. et al. The emergence of a novel ceftazidime-resistant CTX-M extended-spectrum beta-lactamase, CTX-M-55, in both community-onset and hospital-acquired infections in Thailand. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jul;58(3):349-55, 2007.
- KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; ENDIMIANI, A. et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother** 54, 4201-7, 2010.
- KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA. et al. Diagnóstico microbiológico – texto e atlas colorido. **5.ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica**, 1465p. 2001.
- KOSMIDIS, C.; GIANNOPOULOU, M.; FLOUNTZI, A. et al. Genetic basis of aminoglycoside resistance following changes in aminoglycoside prescription patterns. **J Chemother.** Aug;25(4):217-21, 2013.

KRIEG, N. R. (1984) in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, eds. Krieg, N. R. & Holt, J. G. (Williams & Williams, Baltimore), Vol 1.

KRISTÓF, K.; TÓTH, A.; DAMJANOVA, I. et al. Identification of a *bla*VIM-4 gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1303-1305, 2010.

LAHLAOUI, H.; DE LUCA, F.; MARADEL, S. et al. Occurrence of conjugative IncF-type plasmids harboring the *bla*CTX-M-15 gene in Enterobacteriaceae isolates from newborns in Tunisia. **Pediatr Res.** Jan;77(1-1):107-10. 2015

LEÃO, R. S.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D'A.; CORREAL, J. C. et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter related infection. **Clinical Microbiology Infection**, v. 17, p. 380-382, 2010.

LEÃO, R.S.; PEREIRA, R.H.; FOLESCU, T.W. et al. KPC-2 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. **Journal Cystic Fibrosis**, v. 10, n. 2, 40-42, 2011.

LEE G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, Dec 13;11:32, 2012

LEE, H.; YONG, D.; YUM, J. H. et al. Dissemination of 16S rRNA methylase-mediated highly amikacin-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Acinetobacter baumannii* in Korea. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Nov;56(3):305-12, 2006.

LESCHER, G. Y.; FROELICH, E. J.; GRUETT, M. D. et al. 1,8-Naphthyridine derivatives: a new class of chemotherapy agents. **Journal of Medicinal and Pharmaceutical Chemistry**, v5, p. 1063-1068, 1962.

LEWIS, J.S.; HERRERA, M.; WICKES, B. et al. First report of the emergence of CTX-M type ESBLs as the predominant ESBL isolated in a U.S. healthcare system. **Antimicrob Agents Chemother.** v.51, Nov n.11, p. 4015-21, 2007.

LI, J. J.; SHENG, Z. K.; DENG, M. et al. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase RmtB in a Chinese University Hospital. **BMC Infectious Diseases.** Dec 23;12:373, 2012.

LIVERMORE, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **JAC.** v.64, n.1, p.29-36, 2009.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The β -lactamase threat in Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413-420, 2006.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of gram-negative pathogens. **Korean J Intern Med**, Jun;27(2):128-42, 2012

LIVERMORE, D. M.; WARNER, M.; MUSHTAQ, S. et al. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **Int J Antimicrob Agents**. May;37(5):415-9, 2011.

LIVERMORE, D.M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**. Oct;8(4):557-84, 1995.

LOCKHART, S. R.; ABRAMSON, M. A.; BEEKMANN, S. E. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. **J Clin Microbiol**. Oct;45(10):3352-9, 2007.

LOPES, A. A.; SALGADO, K.; MARTINELLI, R. et al. Increase in the frequency of norfloxacin and ciprofloxacin resistance of bacteria isolated from urine culture. **Rev Assoc Med Bras**. Jul-Sep;44(3):196-200, 1998.

LOPES, A. C.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M. et al. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. Mar;105(2):163-7, 2010

LÓPEZ-CAMACHO, E.; GÓMEZ-GIL, R.; TOBES, R. et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. **J Antimicrob Chemother**. Mar;69(3):632-6, 2014.

LUZZARO, F. Fluoroquinolones and Gram-negative bacteria: antimicrobial activity and mechanisms of resistance. **Infez Med**. Apr;16 Suppl2:5-11, 2008.

MA, J.; ZENG, Z.; CHEN, Z. et al. High prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants qnr, aac(6')-Ib-cr, and qepA among ceftiofur-resistant Enterobacteriaceae isolates from companion and food-producing animals. **Antimicrob Agents Chemother**. Feb;53(2):519-24, 2009.

MAGNET, S.; BLANCHARD, J. S. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. **Chem Rev**. Feb;105(2):477-98, 2005.

MAIDEN, M. C. Multilocus sequence typing of bacteria. **Annu Rev Microbiol**. 60:561-88, 2006.

MAIDEN, M. C.; BYGRAVES, J. A.; FEIL, E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**. Mar 17;95(6):3140-5, 1998.

MARCHAIM, D.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWABER, M. J. et al. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.52, n.4, p.1413-1418, 2008.

MARCHIARO, P.; BALLERINI, V.; SPALDING, T. et al. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **J Antimicrob Chemother**, Aug;62(2):336-44, 2008

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M. et al. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int Microbiol.** Dec;7(4):261-8, 2004.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; CANO, M. E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance. **Expert Rev Anti Infect Ther.** Oct;6(5):685-711. 2008.

MARTINS, I. S.; PESSOA-SILVA, C. L.; NOUER, S. A. et al. Endemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection. **Microb Drug Resist.** v. 12, n. 1, p. 50-8, 2006.

MAVROIDI, A. LIAKOPOULOS, A.; GOUNARIS, A. et al. Successful control of a neonatal outbreak caused mainly by ST20 multidrug-resistant SHV-5-producing *Klebsiella pneumoniae*, Greece. **BMC Pediatr.** Apr 17;14:105, 2014.

MAVROIDI, A.; MIRIAGOU, V.; LIAKOPOULOS, A. et al. Ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Central Greece: mechanisms of resistance and molecular identification. **BMC Infect Dis.** Dec 23;12:371, 2012.

MENDES, R. E.; BELL, J. M.; TURNIDGE, J. D. et al. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (blaKPC-2 plus qnrB4) and a blaIMP-4 gene. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;52(2):798-9, 2008.

MEZZATESTA, M. L.; GONA, F.; CAIO, C. et al. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. **J Antimicrob Chemother.** Aug;68(8):1932-4, 2013.

MICHAIL, G.; LABROU, M.; PITIRIGA, V. et al. Activity of Tigecycline in combination with Colistin, Meropenem, Rifampin, or Gentamicin against KPC-producing Enterobacteriaceae in a murine thigh infection model. **Antimicrob Agents Chemother.** Dec;57(12):6028-33, 2013.

MINARINI, L. A.; DARINI, A. L. Mutations in the quinolone resistance-determining regions of *gyrA* and *parC* in Enterobacteriaceae isolates from Brazil. **Braz J Microbiol.** Oct;43(4):1309-14, 2012.

MINARINI, L. A.; POIREL, L.; CATTOIR, V. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **J Antimicrob Chemother.** Sep;62(3):474-8, 2008.

- MINARINI, L. A.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A. et al. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Oct;65(2):202-6, 2009.
- MINGEOT-LECLERCQ, M. P.; GLUPCZYNSKI, Y.; TULKENS, P. M. Aminoglycosides: activity and resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;43(4):727-37, 1999.
- MIRÓ, E.; GRÜNBAUM, F.; GÓMEZ, L. et al. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. **Microb Drug Resist.** Apr;19(2):94-9. 2013
- MOAYEDNIA, R.; SHOKRI, D.; MOBASHERIZADEH, S. et al. Frequency assessment of β -lactamase enzymes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates in patients with urinary tract infection. **J Res MedSci.** Mar;19(Suppl 1):S41-5, 2014.
- MOHR, J. F. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clinical Infectious Disease**, v. 15, n. 9, p.41-51, 2008.
- MOLTON, J. S.; TAMBYAH, P. A.; ANG, B. S.; et al. The global spread of healthcare-associated multidrug-resistant bacteria: a perspective from Asia. **Clin Infect Dis.** May;56(9):1310-8, 2013.
- MONIRI, R.; FARAHANI, R.K.; SHAJARI, G.; et al. Molecular Epidemiology of Aminoglycosides Resistance in *Acinetobacter* spp. with Emergence of Multidrug-Resistant Strains. **Iran J Public Health.** v.39, n.2, p. 63–68, 2010.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M. D. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.
- MULVEY, M. R.; BRYCE, E.; BOYD, D. et al. Canadian Hospital Epidemiology Committee, Canadian Nosocomial Infection Surveillance Program, Health Canada. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.4, p.204-1214, 2004.
- NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V. et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;52(4):1257-63, 2008.
- NAAS, T.; VANDEL, L.; SOUGAKOFF, W. et al. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1262–1270, 1994.
- NAAS, T.; BENTCHOUALA, C.; CUZON, G. et al. Outbreak of *Salmonella enterica* serotype Infantis producing ArmA 16S RNA methylase and CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamase in a neonatology ward in Constantine, Algeria. **Int J Antimicrob Agents.** Aug;38(2):135-9. 2011

NADKARNI, A. S.; SCHLIEP, T.; KHAN, L.; ZEANA, C. B. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumonia* in Manhattan. **American Journal of Infection Control**, v. 37, n. 2, p.121-126, 2009.

NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; LEAVITT, A. et al. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.50, n.9, p.3098-3101, 2005.

NEMEC, A.; DOLZANI, L.; BRISSE, S.; et al. Diversity of aminoglycoside-resistance genes and their association with class 1 integrons among strains of pan-European *Acinetobacter baumannii* clones. **J Med** v.53, n.12, p.1233-1240, 2004.

NEONAKIS, I. K.; STYLIANOU, K.; DAPHNIS, E. et al. First case of resistance to tigecycline by *Klebsiella pneumoniae* in a European University Hospital. **Indian J Med Microbiol**. Jan-Mar;29(1):78-9, 2011.

NIGO, M.; CEVALLOS, C. S.; WOODS, K. et al. Nested case-control study of the emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. Nov;57(11):5743-6, 2013

NOGUEIRA, K, S.; DAUR, A. V.; REASON, I. T. et al. Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Braz J Infect Dis**. Mar-Apr;15(2):167-9. 2011.

NOGUEIRA, K. S.; PAGANINI, M.C.; CONTE, A. et al. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacter spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. Feb;32(2):87-92. 2014.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T.. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**. 17(10):1791-1798, 2011 .

NORMAN, A.; HANSEN, L. H.; SHE, Q. et al. Nucleotide sequence of pOLA52: a conjugative IncX1 plasmid from *Escherichia coli* which enables biofilm formation and multidrug efflux. **lasmid**. Jul;60(1):59-74, 2008.

O'HARA, J. A.; MC GANN, P.; SNESRUD, E. C. et al. Novel 16S rRNA methyltransferase RmtH produced by *Klebsiella pneumoniae* associated with war-related trauma. **Antimicrob Agents Chemother**.57(5):2413-6,2013.

OLAITAN, A. O.; DIENE, S. M.; GUPTA, S. K. et al. Genome analysis of NDM-1 producing *Morganella morganii* clinical isolate. **Expert Rev Anti Infect Ther**. Oct;12(10):1297-305, 2014.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front Microbiol.** Nov 26;5:643, 2014.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol.** Jun;37(6):1661-9, 1999.

OLIVEIRA, S.; MOURA, R. A.; SILVA, K. C. 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.** Mar;69(3):849-52, 2014.

OLSON, A. B.; SILVERMAN, M.; BOYD, D. A. et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. **Antimicrob Agents Chemother.** May;49(5):2112-5, 2005.

OPLUSTIL, C.; MENDES, C.; SAKAGAMI, E. et al. Antimicrobial Susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. **Braz J Infect Dis.** 9(1): 44-51, 2005.

OTEO, J.; CUEVAS, O.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, I. et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 524-528, 2009.

OTEO, J.; HERNÁNDEZ, J. M.; ESPASA, M. et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. **J Antimicrob Chemother.** Feb;68(2):317-21, 2013.

PAIVA, M. C.; NASCIMENTO, A. M.; CAMARGO, I. L. et al. The first report of the qnrB19, qnrS1 and aac(6')-Ib-cr genes in urinary isolates of ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** Aug;107(5):687-9, 2012.

PAPP-WALLACE K. M.; BETHEL C. R.; DISTLER, A. M. et al Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;54(2):890-7, 2010.

PARK, C. H.; ROBICSEK, A.; JACOBY, G. A. et al. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother** 50:3953–5, 2006.

PASOM, W.; CHANAWONG, A.; LULITANOND, A. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance genes, aac(6')-Ib-cr, qnrS, qnrB, and qnrA, in urinary isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at a teaching hospital, Thailand. **Jpn J Infect Dis.** 66(5):428-32, 2013.

PATEL, G.; BONOMO, R. A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. **Expert Rev Anti Infect Ther.** May;9(5):555-70, 2011.

- PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Infect Control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S20-8; discussion S64-73, 2006.
- PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clin. Microbiol Rev.**, v.18, n.4, p.657-686, 2005.
- PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.6, p.2702, 2009.
- PEACOCK, S. J.; DE SILVA, G. D.; JUSTICE, A. et al. Comparison of multilocus sequence typing and pulsed-field gel electrophoresis as tools for typing *Staphylococcus aureus* isolates in a microepidemiological setting. **J Clin Microbiol**. Oct;40(10):3764-70, 2002.
- PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob Chemother**, v.63, n.2, p.265-268, 2009.
- PEIRANO, G.; RICHARDSON, D NIGRIN, J. et al. High prevalence of ST131 isolates producing CTX-M-15 and CTX-M-14 among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from Canada. **Antimicrob Agents Chemother**. Mar;54(3):1327-30, 2010.
- PEIRANO, G.; PILLAI, D. R.; PITONDO-SILVA, A. et al. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. **Diagn Microbiol Infect Dis**. Oct;71(2):106-9, 2011.
- PENA, I.; PICAZO, J. J.; RODRÍGUEZ-AVIAL, C. et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. **Int J Antimicrob Agents**. May;43(5):460-4, 2014.
- PEREIRA, P. S.; BORGHI, M.; ALBANO, R. M. et al. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microb Drug Resist**. Dec 4, 2014.
- PEREIRA, P. S.; DE ARAUJO, C. F.; SEKI, L. M. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**. Feb;68(2):312-6, 2013.
- PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M. , et al. The continuing challenge of ESBLs. **Curr Opin Pharmacol**. Oct;7(5):459-69, 2007.
- PÉRICHON, B.; COURVALIN, P.; GALIMAND, M. Transferable Resistance to Aminoglycosides by Methylation of G1405 in 16S rRNA and to Hydrophilic Fluoroquinolones by QepA-Mediated Efflux in *Escherichia coli*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.51, n.7, p.2464-2469, 2007.

PFALLER, M. A.; ACAR, J.; JONES, R. N. et al. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin Infect Dis**, 32 Suppl 2, S156-67. 2001.

PFALLER, M. A.; SEGRETÍ, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Infect Dis**. Apr 15;42, 2006.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacteria pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 371-379, 2010.

PITOUT, J. D.; HOSSAIN, A.; HANSON, N. D. Phenotypic and molecular detection of CTX-M-beta-lactamases produced by *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **J Clin Microbiol**. v. 42, n.12, p. 5715-21, 2004.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. extended-spectrum beta-lactamase-producing enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet infect dis**. mar;8(3):159-66, 2008.

PITOUT, J. D.; WEI, Y.; CHURCH, D. L. et al. Surveillance for plasmid-mediated quinolone resistance determinants in Enterobacteriaceae within the Calgary Health Region, Canada: the emergence of aac(6')-Ib-cr. **J Antimicrob Chemother**. May;61(5):999-1002, 2008.

PODSCHUN, R.; ULLMAN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 11, n. 4, p. 589-603, 1998.

POIREL, L.; NAAS, T.; LE THOMAS, I. et al. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamase that hydrolyzes ceftazidime through a single amino acid substitution in the omega loop. **Antimicrob Agents Chemother**. v.45, n.12, p.3355-3361, 2001.

POIREL, L.; CATTOIR, V.; NORDMANN, P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. **Front Microbiol**. Feb 2;3:24, 2012.

POIREL, L.; LABARCA, J.; BELLO, H. et al. Emergence of the 16S rRNA methylase RmtG in an extended-spectrum- β -lactamase-producing and colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate in Chile. **Antimicrob Agents Chemother**. 58(1):618-9, 2014.

POIREL, L.; WALSH, T. R.; CUVILLIER, V. et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**. May;70(1):119-23, 2011.

POLOTTO, M.; CASELLA, T.; DE LUCCA OLIVEIRA, M. G. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect Dis**. Aug 3;12:176, 2012.

PORRES-OSANTE, N.; DE CHAMPS, C.; DUPONT, H. et al. Use of avibactam to detect Ambler class A carbapenemases and OXA-48 β -lactamases in Enterobacteriaceae. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jul;79(3):399-400, 2014.

PUJANA, I.; GALLEGU, L.; MARTÍN, G. et al. Epidemiological analysis of sequential *Pseudomonas aeruginosa* isolates from chronic bronchiectasis patients without cystic fibrosis. **J Clin Microbiol.** Jun;37(6):2071-3, 1999 .

PULCINI, C.; GYSSENS, I. C. How to educate prescribers in antimicrobial stewardship practices. **Virulence.** Feb 15;4(2):192-202, 2013.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clin. Microbiol Rev,** v.20, n.3, p. 440-458, 2007.

QUEIROZ, M. L.; ANTUNES, P.; MOURÃO, J. et al. 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.** Sep;74(1):91-4, 2012.

QUILES, M. G.; ROCCHETTI, T. T.; FEHLBERG, L. C. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Braz J Med Biol Res.** Dec 5;0:0, 2014.

QURESHI, Z. A.; PATERSON, D. L.; POTOSKI, B. A. et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrob Agents Chemother.** Apr;56(4):2108-13, 2012.

RAHMAN, M.; SHUKLA, S. K.; PRASAD, K. N. et al. Prevalence and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamases NDM-1, NDM-5, NDM-6 and NDM-7 in multidrug-resistant Enterobacteriaceae from India. **Int J Antimicrob Agents.** Jul;44(1):30-7, 2014.

RAMIREZ, M.S.; TOLMASKY, M.E. Aminoglycoside Modifying Enzymes. **Drug Resist Updat.** v.13, p.151–171, 2010.

RAMOS, P. I.; PICÃO, R. C.; ALMEIDA, L. G. 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. **MC Genomics.** Jan 22;15:54, 2014.

RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; ANDERSON, K. F. et al. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. **J Clin Microbiol.** Jun;46(6):2066-9, 2008.

- RIBEIRO, V. B.; ANDRADE, L. N.; LINHARES, A. R. et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol.** Nov;62(Pt 11):17217, 2013.
- RIBERA, A.; VILA, J.; FERNÁNDEZ-CUENCA, F. et al. Type 1 integrons in epidemiologically unrelated *Acinetobacter baumannii* isolates collected at Spanish hospitals. **Antimicrob Agents Chemother.** v.48, n.1, p.364–65, 2004.
- RICE, L. B.; CARIAS, L. L.; HUTTON, R. A. et al. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 3427-3429, 2008.
- RICHTER, S. N.; FRASSON, I.; FRANCHIN, E. et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. **Gut Pathog.** Jul 16;4(1):7, 2012.
- ROCHA, L. K.; NETO, R. L.; GUIMARÃES, A. C. et al. Plasmid-mediated qnrA1 in *Klebsiella pneumoniae* ST147 in Recife, Brazil. **Int J Infect Dis.** Sep;26:49-50, 2014.
- RODRÍGUEZ, E.; BAUTISTA, A.; BARRERO, L. First report of a *Salmonella enterica* serovar typhimurium isolate with carbapenemase (KPC-2) in Colombia. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(2):1263-4, 2014.
- RODRÍGUEZ, M. M.; POWER, P.; RADICE, M. et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. **Antimicrob Agents Chemother.** Dec;48(12):4895-7, 2004.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; BRIALES, A.; VELASCO, C. et al. Mutational analysis of quinolone resistance in the plasmid-encoded pentapeptide repeat proteins QnrA, QnrB and QnrS. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 63(6), 1128-1134, 2009.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; CANO, M. E.; VELASCO, C. et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal of Infection and Chemotherapy**, 17(2), 149-182, 2011.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; LÓPEZ-HERNÁNDEZ, I.; PASCUAL, A. Molecular characterization of high-level fluoroquinolone resistance in a clinical isolate of *Haemophilus parainfluenzae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.66, n.3, p.673-675, 2011.
- RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J. M.; DÍAZ DE ALBA, P.; BRIALES, A. et al. Contribution of OqxAB efflux pumps to quinolone resistance in extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.** Jan;68(1):68-73, 2013.

- ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M. et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis.** Aug;25:79-81, 2014.
- RUIZ, J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, p. 1109-1117, 2003.
- RUIZ, E.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M. et al. qnr, aac(6')-Ib-cr and qepA genes in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.: genetic environments and plasmid and chromosomal location. **J Antimicrob Chemother.** Apr;67(4):886-97, 2012.
- SACHA, P.; OSTAS, A.; JAWOROWSKA, J. et al. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. **Folia Histochem Cytobiol.** 47(4):537-43, 2009.
- SADER, H. S.; FLAMM, R. K.; JONES, R. N. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jun;76(2):217-21, 2013.
- SALAHUDDIN, P.; KHAN, A. U. Studies on structure-based sequence alignment and phylogenies of beta-lactamases. **Bioinformation.** May 20;10(5):308-13, 2014
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
- SASSI, A.; LOUCIF, L.; GUPTA, S. K. et al. NDM-5 carbapenemase-encoding gene in multidrug-resistant clinical isolates of *Escherichia coli* from Algeria. **Antimicrob Agents Chemother.** Sep;58(9):5606-8, 2014.
- SAVIC, M.; LOVRIC, J.; TOMIC, T.I. et al. 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 Res.** Sep;37(16):5420-31, 2009.
- SEKI L.M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA CONCEIÇÃO, M. 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.** Nov-Dec;17(6):640-6, 2013.
- SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA, M. D. A. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Jun;70(2):274-7, 2011.
- SEPTIMUS, E. J.; OWENS, R.C. JR. Need and potential of antimicrobial stewardship in community hospitals. **Clin Infect Dis.** Aug;53 Suppl 1:S8-S14, 2011.
- SHAH, P. M. Parenteral carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, S. 1, p. 175-180, 2008.

SHANMUGAM, P.; MEENAKSHISUNDARAM, J.; JAYARAMAN, P. blaKPC gene Detection in Clinical Isolates of Carbapenem Resistant Enterobacteriaceae in a Tertiary Care Hospital. **J Clin Diagn Res.** Dec;7(12):2736-8, 2013.

SHENG, J. F.; LI, J. J.; TU, S. et al. bla_{KPC} and rmtB on a single plasmid in *Enterobacter amnigenus* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from the same patient. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.** July; 31(7): 1585–1591, 2012 .

SILBERT S.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J. et al. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagn Microbiol Infect Dis.** v. 47, n. 4, p. 619-21, 2003.

SILBERT, S.; PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J. et al. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infect Control Hosp Epidemiol.** v. 25, n. 10, p. 847-51, 2004.

SILVA-SÁNCHEZ, J.; CRUZ-TRUJILLO, E.; BARRIOS, H. et al. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. **PLoS One.** Oct 17;8(10):e77968. 2013

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S. et al. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev.** v. 19, n. 3, p. 512-530, 2006.

SMITH MOLAND, E.; HANSON N. D.; HERRERA, V. L. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **J Antimicrob Chemother** 51: 711-4, 2003.

SORENSEN, A. H.; HANSEN, L. H.; JOHANNESSEN, E. et al. Conjugative plasmid conferring resistance to olaquinox. **Antimicrob Agents Chemother.** Feb;47(2):798-9, 2003.

SPANU, T.; DE ANGELIS, G.; CIPRIANI, M. et al. In vivo emergence of tigecycline resistance in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;56(8):4516-8, 2012.

SRINIVASAN, V.; NAM, H. M.; SAWANT, A. A. et al. Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. **Microb Ecol.** Feb;55(2):184-93, 2008.

STRAHILEVITZ, J.; JACOBY, G. A.; HOOPER, D. C.; ROBICSEK, A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clin Microbiol Rev,** 2009

STRAND, L.; JENKINS, A.; HENRIKSEN, I. H. et al. High levels of multiresistance in quinolone resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli* from Norway; a non clonal phenomenon? **BMC Res Notes.** Jun 19;7:376, 2014.

STÜRENBURG, E.; KÜHN, A.; MACK, D. et al. A novel extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-23 with a P167T substitution in the active-site omega loop associated with ceftazidime resistance. **J Antimicrob Chemother.** Aug;54(2):406-9, 2014.

SYRMIS, M. W.; O'CARROLL, M. R.; SLOOTS, T. P. et al. Rapid genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolates harboured by adult and paediatric patients with cystic fibrosis using repetitive-element-based PCR assays. **J Med Microbiol.** Nov;53(Pt 11):1089-96, 2004.

TADA, T.; SHRESTHA, B.; MIYOSHI-AKIYAMA, T. et al. NDM-12, a novel New Delhi metallo- β -lactamase variant from a carbapenem-resistant *Escherichia coli* clinical isolate in Nepal. **Antimicrob Agents Chemother.** Oct;58(10):6302-5, 2014.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; DOERING, R. V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel eletrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

TENOVER, F. C.; KALSI, R. K.; WILLIAMS, P. P. et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerg Infect Dis** v.12, p. 1209–1213, 2006.

THANBICHLER, M.; SHAPIRO, L. Getting organized--how bacterial cells move proteins and DNA. **Nat Rev Microbiol.** Jan;6(1):28-40, 2008.

TIAN, G. B.; RIVERA, J. I.; PARK, Y. S. et al. Sequence type ST405 *Escherichia coli* isolate producing QepA1, CTX-M-15, and RmtB from Detroit, Michigan. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;55(8):3966-7, 2011

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Biol Rev.** Jun;70(2):296-316, 2006.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. Common regions e.g. orf513 and antibiotic resistance: IS91-like elements evolving complex class 1 integrons. **J Antimicrob Chemother.** Jul;58(1):1-6, 2006.

TOLENTINO, F. M. **Detecção e identificação dos genes de beta-lactamases *bla*SHV, *bla*TEM e *bla*CTX-M em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um hospital terciário do Estado de São Paulo.** 2009. 94p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia), Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto, São Paulo, 2009.

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L. et al. High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. **Microb Drug Resist.** Mar;17(1):7-16, 2011.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. Microbiologia. 5ª ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

TRINDADE, P. A.; MCCULLOCH, J. A.; OLIVEIRA, G. A. et al. Molecular techniques for MRSA typing: current issues and perspectives. **Braz J Infect Dis.** Feb;7(1):32-43, 2003.

TSAI, M. H.; CHU, S. M.; HSU, J. F., et al. Risk Factors and Outcomes for Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteremia in the NICU. **Pediatrics.** 2014

VAKULENKO, S. B.; MOBASHER, Y. S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. **Clin Microbiol Rev.** v.16, p. 430–450, 2003.

VAN HAL, S. J.; WIKLENDT, A.; ESPEDIDO, B. et al. Immediate appearance of plasmid-mediated resistance to multiple antibiotics upon antibiotic selection: an argument for systematic resistance epidemiology. **J Clin Microbiol.** Jul;47(7):2325-7. 2009

VAZIRI, F.; PEERAYEH, S. N.; NEJAD, Q. B. et al. The prevalence of aminoglycoside-modifying enzyme genes (aac (6')-I, aac (6')-II, ant (2'')-I, aph (3')-VI) in *Pseudomonas aeruginosa*. **Clinics (Sao Paulo).** 66(9):1519-22. 2011

VELEBA, M.; SCHNEIDERS, T. Tigecycline resistance can occur independently of the ramA gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** Aug;56(8):4466-7, 2012.

VELKOV, T.; ROBERTS, K. D.; NATION, R. L. et al. Pharmacology of polymyxins: new insights into an 'old' class of antibiotics. **Future Microbiol.** Jun;8(6):711-24, 2013.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Res.** v. 19, n. 24, p. 6823-31, 1991.

VILA, J.; RUIZ, J.; MARCO, F. et al. Association between double mutation in *gyrA* gene of ciprofloxacin resistant clinical isolates of *Escherichia coli* and minimal inhibitory concentration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 2477-2479, 1994.

VILLA L.; FEUDI, C.; FORTINI, D. et al. Genomics of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 512 clone highlights the role of RamR and ribosomal S10 protein mutations in conferring tigecycline resistance. **Antimicrob Agents Chemother.** 58(3):1707-12, 2014

VILLA, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. et al. Complete sequencing of an IncH plasmid carrying the blaNDM-1, blaCTX-M-15 and qnrB1 genes. **J Antimicrob Chemother.** Jul;67(7):1645-50, 2012.

VILLEGAS, M. V.; 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**, v.50, n.8, p. 2880-2882, 2006.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.4, p.1553-1555, 2007.

VILLEGAS, M. V.; KATTAN, J. N.; QUINTEROS, M.G. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**. Jan;14 Suppl 1:154-8. 2008.

WACHINO, J.; ARAKAWA, Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. **Drug Resist Updat**, v.15, n.3, p.133-48, 2012.

WACHINO, J.; SHIBAYAMA, K.; KUROKAWA, H. 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**. Dec;51(12):4401-9, 2007.

WACHINO, J.; YAMANE, K.; SHIBAYAMA, K. 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**. Jan;50(1):178-84, 2006.

WANG, D.; WANG, H.; QI, Y. et al. Characteristics of *Klebsiella pneumoniae* harboring QnrB32, Aac(6')-Ib-cr, GyrA and CTX-M-22 genes. **Folia Histochem Cytobiol**. Apr 24;50(1):68-74, 2012.

WANG, M.; GUO, Q.; XU, X. et al. New plasmid-mediated quinolone resistance gene, qnrC, found in a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. **Antimicrob Agents Chemother**. May;53(5):1892-7, 2009.

WANG, X.; LI, H.; ZHAO, C. et al. Novel NDM-9 metallo- β -lactamase identified from a ST107 *Klebsiella pneumoniae* strain isolated in China. **Int J Antimicrob Agents**. Jul;44(1):90-1, 2014.

WEI, Z. Q.; DU, X. X.; YU, Y.S. et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrob Agents Chemother**, v.51, n.2, p.763-5, 2007.

WILKE, M. S.; LOVERING, A. L.; STRYNADKA, N. C. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. **Curr Opin Microbiol**. Oct;8(5):525-33, 2005.

WONG, M. H.; CHEN, S. First detection of oqxAB in *Salmonella* spp. isolated from food. **Antimicrob Agents Chemother**. Jan;57(1):658-60, 2013.

WOODFORD, N.; TIerno, P. M. JR.; YOUNG, K. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrob Agents Chemother**, 2004.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D. Multi-resistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Revs**, v.35, n.5, p. 736-755, 2011.

WOODFORD, N.; ZHANG, J.; WARNER, M. et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **J. Antimicrob Chemother**, v.62, n.6, p.1261-1264, 2008.

WOODFORD, N.; TURTON, J. F.; LIVERMORE, D. M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev.** Sep;35(5):736-55, 2011.

WRIGHT, G. D.; THOMPSON, P. R. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. **Front Biosci.** v.4, p.9–21, 1999.

WU, Q.; LIU, Q.; HAN, L. et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. **Diagn Microbiol Infect Dis.** Mar;66(3):326-8, 2010.

WU, Q.; ZHANG, Y.; HAN, L. et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases in aminoglycoside-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Shanghai, China. **Antimicrob Agents Chemother.** 2009 Jan;53(1):271-2.2009.

YAMANE, K.; WACHINO, J.; SUZUKI, S. et al. 16S rRNA methylase-producing, gram-negative pathogens, Japan. **Emerg Infect Dis.** Apr;13(4):642-6, 2007.

YAN, J. J.; WU, J. J.; KO, W. C. et al. Plasmid-mediated 16S rRNA methylases conferring high-level aminoglycoside resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from two Taiwanese hospitals. **J Antimicrob Chemother.** 54(6):1007-12, 2004.

YANG, H. Y.; NAM, Y. S.; LEE, H. J. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes among ciprofloxacin-nonsusceptible *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from blood cultures in Korea. **Can J Infect Dis Med Microbiol.** May;25(3):163-9. 2014

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 52(2): 809, 2008.

YIGIT, H.; ZHANG, J.; WARNER, M. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.

YOKOYAMA, K.; DOI, Y.; YAMANE, K. et al. Acquisition of 16S rRNA methylase gene in *Pseudomonas aeruginosa*. **Lancet.** 362(9399):1888-93, 2003.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G. et al. Characterization of a New Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*NDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

- YU, F. Y.; YAO, D.; PAN, J. Y. 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.** Jun 23;10:184, 2010.
- ZACHARCZUK, K.; PIEKARSKA, K.; SZYCH, J. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. **Antimicrob Agents Chemother.** Jan;55(1):443-6, 2011.
- ZAGARIANOU, A.; SIANOU, E.; IOSIFIDIS, E. et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. **Euro Surveill.** Feb 16;17(7). pii: 20088, 2012.
- ZAVASCKI, A. P.; MACHADO, A. B.; DE OLIVEIRA, K. R. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents.** 2009.
- ZAVASCKI, A. P.; ZOCCOLI, C. M.; MACHADO, A. B. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **Int J Infect Dis.** Jun;14(6):e539-40, 2010.
- ZHANEL, G. G.; BAUDRY, P.; VASHISHT, V. et al. Pharmacodynamic activity of ertapenem versus multidrug-resistant genotypically characterized extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* using an in vitro model. **J Antimicrob Chemother.** Mar;61(3):643-6, 2008.
- ZHANG, R.; WANG, X. D.; CAI, J. C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high *qnr* prevalence in a Chinese hospital. **J Med Microbiol.** Jul;60(Pt 7):977-82, 2011.
- ZHAO, J.; CHEN, Z.; CHEN, S. et al. Prevalence and dissemination of *oqxAB* in *Escherichia coli* isolates from animals, farmworkers, and the environment. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010.
- ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit Rev Microbiol.** Feb;39(1):79-101, 2013.
- ZHUO, C.; LI, X. Q.; ZONG, Z. Y. et al. Epidemic plasmid carrying *bla*(CTX-M-15) in *Klebsiella pneumoniae* in China. **PLoS One.** 8(1):e52222, 2013.
- ZURFLUH, K.; ABGOTTSPON, H.; HÄCHLER, H. et al. Quinolone resistance mechanisms among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* isolated from rivers and lakes in Switzerland. **PLoS One.** Apr 22;9(4):e95864, 2014.

ANEXOS

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São Paulo e seus respectivos genótipos de resistência.

Isolados SP	Teste de Sensibilidade por Disco Difusão Kirby-Bauer (µg/mL)														E-test®				Genótipo encontrado			
	CIP	NOR	NA	TOB	GEN	AK	K	PTZ	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	ETP	IPM	MEM	TGC	POLB	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>Qnr</i> e <i>oqxAB</i>	AME	<i>rmtB</i>
	S≥21 R≤15	S≥17 R≤12	S≥19 R≤13	S≥15 R≤12	S≥15 R≤12	S≥17 R≤14	S≥18 R≤13	S≥21 R≤17	S≥25 R≤18	S≥26 R≤22	S≥18 R≤14	S≥21 R≤17	S≥23 R≤19	S≥22 R≤18	S≥23 R≤19	S≥23 R≤19	S≤1 R≥4	S≤2 R≥4				
SP01	R	R	R	S	S	S	R	R	S	R	R	S	I	R	R	R	1,5	0,5	-	-	<i>aph</i> (3) <i>Ia</i>	-
SP02	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>oqxAB</i>	<i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP03	R	R	R	R	I	I	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	NT	NT	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i> <i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP04	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>oqxAB</i>	-	-
SP05	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>oqxAB</i>	<i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP06	R	R	R	I	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	I	NT	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i> e <i>oqxAB</i>	<i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP07	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>oqxAB</i>	<i>aac</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i>	-
SP08	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> <i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP09	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	16	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>oqxAB</i>	<i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP10	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	3	0,5	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>oqxAB</i>	-	-
SP11	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	0,5	NT	-	<i>qnrB</i> e <i>oqxAB</i>	<i>aac</i> (6) <i>Ib</i> <i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP12	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	2	4	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i> e <i>oqxAB</i>	-	-
SP13	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	-	-	<i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP14	R	R	R	S	S	S	S	R	S	R	R	I	R	R	I	I	NT	NT	-	-	-	-
SP15	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	I	S	I	R	R	R	2	NT	-	-	<i>aph</i> (3) <i>Ia</i> <i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP16	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,5	0,5	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>oqxAB</i>	-	-
SP17	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	4	0,38	-	-	<i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i> <i>aac</i> (3) <i>Ila</i> , <i>aph</i> (3) <i>Ia</i> , <i>aac</i> (6) <i>Ib</i>	-
SP18	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,75	0,5	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>oqxAB</i>	-	-

CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacin; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Canamicina; PTZ: Piperacilina-Tazobactam; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. - : ausência dos genes pesquisados.

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São Paulo e seus respectivos genótipos de resistência.

Teste de Sensibilidade por Disco Difusão Kirby-Bauer (µg/mL)																				E-test®				Genótipo encontrado			
Isolados SP	CIP	NOR	NA	TOB	GEN	AK	K	PTZ	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	ETP	IPM	MEM	TGC	POLB	rmtB								
	S≥21 R≤15	S≥17 R≤12	S≥19 R≤13	S≥15 R≤12	S≥15 R≤12	S≥17 R≤14	S≥18 R≤13	S≥21 R≤17	S≥25 R≤18	S≥26 R≤22	S≥18 R≤14	S≥21 R≤17	S≥23 R≤19	S≥22 R≤18	S≥23 R≤19	S≥23 R≤19	S≤1 R≥4	S≤2 R≥4									
SP19	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	8	bla _{CTX-M-2}	oqxAB	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-					
SP20	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1,5	0,5	-	oqxAB	aac(6)Ib	-					
SP21	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	1,5	NT	-	-	aac(6)Ib	-					
SP22	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	0,5	NT	bla _{CTX-M-15} ; bla _{CTX-M-2}	oqxAB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP23	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	3	NT	bla _{CTX-M-2}	oqxAB	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-					
SP24	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-					
SP25	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	0,75	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP26	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	I	R	R	R	R	1	NT	-	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP27	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	8	NT	bla _{CTX-M-2}	oqxAB	aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP28	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,38	NT	bla _{CTX-M-14}	oqxAB	aac(3)IIa, aph(3)Ia	rmtB					
SP29	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	1,5	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB e oqxAB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP30	R	R	R	R	R	S	S	R	I	R	I	R	I	R	R	R	1	NT	-	oqxAB	aac(3)IIa	-					
SP31	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	0,5	NT	bla _{CTX-M-2}	oqxAB	aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP32	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	I	R	I	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-					
SP33	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,5	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-					
SP34	R	R	R	R	S	S	R	R	S	R	R	I	I	R	R	R	2	NT	-	oqxAB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP35	R	R	R	R	S	I	S	R	S	R	S	I	S	R	R	R	1	NT	-	oqxAB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-					
SP36	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-14}	oqxAB	aac(3)IIa, aph(3)Ia	rmtB					

CIP: Ciprofloxacin; NOR: Norfloxacin; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Kanamicina; AMP: PTZ: Piperacilina-Tazobactam; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São Paulo e seus respectivos genótipos de resistência.

Teste de Sensibilidade por Disco Difusão Kirby-Bauer (µg/mL)															E-test®				Genótipo encontrado			
Isolados	CIP	NOR	NA	TOB	GEN	AK	K	PTZ	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	ETP	IPM	MEM	TGC	POLB	bla _{CTX-M}	Qnr e oxAB	AME	rmtB
	S≥21	S≥17	S≥19	S≥15	S≥15	S≥17	S≥18	S≥21	S≥25	S≥26	S≥18	S≥21	S≥23	S≥22	S≥23	S≥23	S≤1	S≤2				
	R≤15	R≤12	R≤13	R≤12	R≤12	R≤14	R≤13	R≤17	R≤18	R≤22	R≤14	R≤17	R≤19	R≤18	R≤19	R≤19	R≥4	R≥4				
SP37	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
SP38	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	2	24	bla _{CTX-M-2}	-	aac(6)Ib	-
SP39	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	2	NT	-	oxAB	aac(6)Ib aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
SP40	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	oxAB	aac(6)Ib	-
SP41	R	R	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	NT	-	-	aac(6)Ib aph(3)VI, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
SP42	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aac(6)Ib	-
SP43	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	NT	NT	-	oxAB	aac(6)Ib	-
SP44	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	R	S	S	R	R	R	NT	NT	-	-	-	-
SP45	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	4	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(6)Ib	-
SP46	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	R	R	I	R	R	R	2	NT	-	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
SP47	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	4	NT	bla _{CTX-M-2}	qnrB	aac(3)IIa	-
SP48	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	-	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	rmtB
SP49	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aac(6)Ib	-
SP50	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	-	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-

CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Canamicina; PTZ: Piperacilina-Tazobactan; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. -: ausência dos genes pesquisados.

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São José do Rio Preto e seus respectivos genótipos de resistência.

Isolados SJRP		Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)														E-test®				Genótipo encontrado																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																								
		CIP		NOR		NA		TOB		GEN		AK		K		PTZ		FEP		CTX		FOX		CAZ		CRO		ETP		IPM		MEM		TGC		POLB		bla _{CTX-M}		Qnr e oqxAB		AME		rmtB																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																
		S≤1 R≥4	S≤4 R≥16	S≤16 R≥32	S≤4 R≥16	S≤4 R≥16	S≤16 R≥64	S≤16 R≥64	S≤16 R≥128	S≤2 R≥16	S≤2 R≥16	S≤1 R≥4	S≤8 R≥32	S≤4 R≥16	S≤1 R≥4	S≤0,5 R≥2	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4

CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Canamicina; PTZ: Piperacilina-Tazobactam; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. - : ausência dos genes pesquisados.

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São José do Rio Preto e seus respectivos genótipos de resistência.

Isolados	Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)															E-test®					Genótipo encontrado			
	CIP	NOR	NA	TOB	GEN	AK	K	PTZ	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	ETP	IPM	MEM	TGC	POLB	bla _{CTX-M}	Qnr e oqxAB	AME	rmtB		
SJRP	S≤1 R≥4	S≤4 R≥16	S≤16 R≥32	S≤4 R≥16	S≤4 R≥16	S≤16 R≥64	S≤16 R≥64	S≤16 R≥128	S≤2 R≥16	S≤1 R≥4	S≤8 R≥32	S≤4 R≥16	S≤1 R≥4	S≤0,5 R≥2	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤1 R≥4	S≤2 R≥4						
KP29	R	I	R	S	S	S	S	R	I	R	S	R	R	R	R	R	R	2	NT	-	qnrB	aph(3)VI	-	
KP30	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP31	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	-	-	
KP35	R	R	R	S	S	S	S	R	R	S	I	R	R	R	R	R	R	NT	NT	-	qnrB	-	-	
KP36	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aph(3)Ia aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP39	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	2	0,5	bla _{CTX-M-2}	-		-	
KP42	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	0,5	0,5	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia	-	
KP43	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	2	16	-	qnrB	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP45	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP46	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	-	-	aph(3)Ia	-	
KP49	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia	-	
KP50	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	-	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP55	R	R	NT	S	R	S	NT	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-	
KP56	R	R	R	R	R	S	NT	R	R	S	NT	NT	R	R	R	R	R	NT	NT	-	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP57	R	NT	R	S	R	S	NT	R	R	R	NT	R	NT	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aac(3)IIa, aph(3)Ia	-	
KP58	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-	
KP60	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia	-	
KP61	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia	-	

CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Kanamicina; PTZ: Piperacilina-Tazobactam; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. - : ausência dos genes pesquisados.

Anexo 1 - Resultados do teste de susceptibilidade aos antimicrobianos nos isolados de São José do Rio Preto e seus respectivos genótipos de resistência.

Isolados		Teste de Sensibilidade por Microdiluição (µg/mL)														E-test®				Genótipo encontrado			
		CIP	NOR	NA	TOB	GEN	AK	K	PTZ	FEP	CTX	FOX	CAZ	CRO	ETP	IPM	MEM	TGC	POLB	bla _{CTX-M}	Qnr e oqxAB	AME	rmtB
SJRP	S≤1	S≤4	S≤16	S≤4	S≤4	S≤16	S≤16	S≤16	S≤2	S≤1	S≤8	S≤4	S≤1	S≤0,5	S≤1	S≤1	S≤1	S≤1	S≤2				
	R≥4	R≥16	R≥32	R≥16	R≥16	R≥64	R≥64	R≥128	R≥16	R≥4	R≥32	R≥16	R≥4	R≥2	R≥4	R≥4	R≥4	R≥4	R≥4				
KP62	R	R	NT	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa	-
KP64	I	S	R	R	R	S	NT	R	R	NT	NT	R	R	R	R	R	R	NT	0,5	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
KP65	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	0,38	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aph(3)Ia	-
KP67	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia	-
KP68	S	S	S	R	R	S	NT	R	R	NT	NT	NT	R	R	R	R	R	NT	0,75	bla _{CTX-M-15}	-	aac(3)IIa, aph(3)VI, aph(3)Ia	-
KP71	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-
KP72	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	0,5	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
KP73	S	NT	NT	S	S	S	NT	R	I	R	S	I	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aac(6)Ib	-
KP74	R	R	R	R	R	I	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	4	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
KP75	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	2	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
KP78	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-2}	-	aac(3)IIa, aac(6)Ib	-
KP80	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	NT	NT	bla _{CTX-M-15}	qnrB	aac(3)IIa	-
KP81	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	1	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-
KP82	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	4	NT	bla _{CTX-M-15}	-	aph(3)Ia, aac(6)Ib	-

CIP: Ciprofloxacino; NOR: Norfloxacino; NA: Ácido Nalidixico; TOB: Tobramicina; GEN: Gentamicina; AK: Amicacina; K: Canamicina; PTZ: Piperacilina-Tazobactam; FEP: Cefepima; CTX: Cefotaxima; TIG: Tigeciclina. I: resistência intermediária ao antimicrobiano testado; R: resistência ao antimicrobiano testado; S: sensibilidade ao antimicrobiano testado. NT: antimicrobiano não testado. - : ausência dos genes pesquisados.

Anexo 2 - Genótipos de resistência aos antimicrobianos e sequenciamento por *Multilocus Sequence Typing* de cada isolado proveniente de São Paulo.

Isolados	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>qnr</i>	<i>oqxAB</i>	AME	Metiltransferase
SP1	437	-	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
SP2	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP3	340	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP4	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP5	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP6	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP7	340	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)Ia, aph(3)Ia</i>	-
SP8	340	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	-
SP9	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP10	340	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP11	11	-	<i>qnrB</i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP12	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP13	11	-	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP14	11	-	-	-	-	-
SP15	437	-	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
SP16	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP17	11	-	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP18	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP19	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP20	258	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP21	11	-	-	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP22	11	<i>bla</i> _{CTX-M-15; bla_{CTX-M-2}}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP23	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP24	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP25	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP26	11	-	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP27	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP28	258	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	<i>rmtB</i>
SP29	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP30	11	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa</i>	-
SP31	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP32	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP33	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
SP34	437	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP35	11	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP36	258	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	<i>rmtB</i>
SP37	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP38	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP39	11	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP40	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP41	11	-	-	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP42	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)VI, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP43	11	-	-	<i>oqxAB</i>	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP44	-	-	-	-	-	-
SP45	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
SP46	-	-	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP47	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
SP48	258	-	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	<i>rmtB</i>
SP49	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
SP50	-	-	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-

Anexo 2 - Genótipos de resistência aos antimicrobianos e sequenciamento por *Multilocus Sequence Typing* de cada isolado proveniente de São José do Rio Preto.

Isolados	ST	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>qnr</i>	<i>oqxAB</i>	AME	Metiltransferase
KP1	-	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP2	340	-	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP3	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
KP5	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP6	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
KP7	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP9	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
KP10	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15} ; <i>bla</i> _{CTX-M-59}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
KP14	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
KP15	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
KP16	42	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP18	340	-	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP19	42	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP22	42	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP23	437	-	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)VI, aac(6)Ib</i>	-
KP24	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
KP26	705	-	-	<i>oqxAB</i>	-	-
KP27	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP29	NOVA	-	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)VI</i>	-
KP30	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP31	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	-	-
KP35	340	-	<i>qnrB</i>	-	-	-
KP36	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP39	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP42	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP43	340	-	<i>qnrB</i>	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP45	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP46	42	-	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP49	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	-
KP50	11	-	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP55	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
KP56	340	-	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP57	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	-
KP58	42	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP60	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP61	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	-
KP62	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
KP64	37	<i>bla</i> _{CTX-M-?}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP65	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)Ia</i>	-
KP67	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia</i>	-
KP68	NOVA	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(3)IIa, aph(3)VI, aph(3)Ia</i>	-
KP71	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
KP72	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP73	76	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aac(6)Ib</i>	-
KP74	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP75	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP78	11	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	-	-	<i>aac(3)IIa, aac(6)Ib</i>	-
KP80	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	-	<i>aac(3)IIa</i>	-
KP81	340	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-
KP82	437	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-	<i>aph(3)Ia, aac(6)Ib</i>	-