



Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

EVELIN RODRIGUES MARTINS

Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético no complexo *Enterobacter cloacae* isolados em um hospital terciário do Estado de São Paulo

São José do Rio Preto
2020

EVELIN RODRIGUES MARTINS

Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético no complexo *Enterobacter cloacae* isolados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto para obtenção do Título de Doutor no Curso de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Eixo Temático: Medicina e Ciência Correlatas

Orientador: Profa. Dra. Mara C. Lelles Nogueira

São José do Rio Preto

2020

Rodrigues Martins, Evelin

Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético no complexo *Enterobacter cloacae* isolados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

São José do Rio Preto, 2020

153 p.

Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP

Eixo Temático: Medicina e Ciências Correlatas Orientadora:

Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira

1. Complexo *E. cloacae*; 2. Resistência aos antimicrobianos; 3. ESBL; 4. Carbapenemases; 5. 16S rRNA Metiltransferases

EVELIN RODRIGUES MARTINS

Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético no complexo *Enterobacter cloacae* isolados em um hospital terciário do Estado de São Paulo.

BANCA EXAMINADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Profa. Dra. Mara C. Lelles Nogueira

2º Examinador: Dr. Leonardo Neves de Andrade

3º Examinador: Dra. Doroti de Oliveira Garcia

4º Examinador: Dra. Fernanda Modesto Tolentino Binhardi

5º Examinador: Dra. Cássia Fernanda Estofolete

Suplentes: Dr. Luiz Carlos de Mattos

Dra. Milena Polotto de Santi

São José do Rio Preto, 16/09/2020.

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
EPÍGRAFE.....	iv
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE QUADROS E TABELAS.....	vii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Objetivo Geral.....	4
1.2 Objetivos Específicos.....	5
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 <i>Enterobacter</i> spp e o complexo <i>Enterobacter cloacae</i> (CEc).....	7
2.2 CEc e a resistência aos antimicrobianos.....	11
2.2.1 Beta-lactâmicos.....	11
2.2.2 ESBL (<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i>).....	13
2.2.3 Carbapenemases.....	15
2.3 Quinolonas e Fluoroquinolonas.....	19
2.3.1 PMQRs (<i>Plasmid Mediated Quinolone Resistance</i>).....	21
2.4 Aminoglicosídeos.....	22
2.4.2 AMEs (<i>Aminoglycoside Modifying Enzymes</i>).....	24
2.4.3 16S rRNA Metiltransferases.....	27
2.5 Elementos genéticos móveis e sua associação com resistência bacteriana.....	29
2.5.1 Plasmídeos.....	29
2.5.2 Transposons, Sequências de inserção e Integrons.....	31
2.5.3 Contexto genético dos genes 16S rRNA metiltransferases, KPC e BKC.....	32
2.6 Sequenciamento do genoma completo dos tipos: segunda e terceira gerações.....	33
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1 Fluxograma da metodologia usada neste estudo.....	40

SUMÁRIO

3.2 Seleção, identificação e determinação do TSA nos isolados bacterianos.....	41
3.3 Armazenamento e manutenção dos isolados bacterianos.....	43
3.4 Extração de DNA bacteriano.....	43
3.5 Investigação de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	44
3.5.1 Genes β -lactamases do tipo ESBL.....	44
3.5.2 Genes β -lactamases do tipo carbapenemases.....	46
3.5.3 Genes PMQRs.....	47
3.5.4 Genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – AMEs.....	48
3.5.5 Genes 16S rRNA Metiltransferases.....	49
3.6 Purificação e Sequenciamento das ESBL e Carbapenemases do tipo <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{BKC}	49
3.7 Sequenciamento do genoma completo de <i>E. cloacae</i> Ec61 e Análise das sequências.....	51
3.8 Purificação e Sequenciamento de <i>rmtD</i> e <i>rmtG</i> Metiltransferases 16S rRNA.....	54
3.9 Transferência dos genes <i>rmtD</i> e <i>rmtG</i> por conjugação bacteriana.....	54
3.10 PCR das transconjugantes, análise dos grupos Inc e extração DNA plasmidial.....	56
3.11 Sequenciamento do genoma completo das <i>E. cloacae</i> - Ec02, Ec09 e Ec13.....	57
3.12 Sequenciamento dos plasmídeos pEc09 e pEc13 contendo <i>rmtG</i>	57
3.13 Análise das sequências e montagem dos pEc09 e pEc13.....	58
4. RESULTADOS.....	59
4.1 Perfil Clínico-epidemiológico.....	60
4.2 Avaliação do Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA).....	61
4.3 Detecção e caracterização dos diversos genes de resistência aos antimicrobianos.....	62
4.3.1 Genes de resistência as cefalosporinas de 3 ^o e 4 ^o gerações.....	62
4.3.2 Genes de resistência aos carbapenêmicos.....	62
4.3.3 Genes de resistência às quinolonas.....	64
4.3.4 Genes de resistência aos aminoglicosídeos.....	64
4.4 Caracterização do Genoma Completo de <i>E. cloacae</i> Ec61.....	66
4.5 Caracterização do Genoma Completo de Ec2.....	74
4.6 Caracterização do Genoma Completo de Ec09 e Ec13.....	74

SUMÁRIO

4.6.1 Genoma de Ec09.....	74
4.6.2 Genoma de Ec13.....	76
5. DISCUSSÃO.....	79
6. CONCLUSÕES.....	91
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
8. ANEXO I (Quadros 8, 9, 10 e 11).....	118
9. ANEXO II (Artigo Científico 01).....	124
10. ANEXO III (Artigo Científico 02).....	132

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais *Nilson Martins da Silva e Adelaide Rodrigues de Sá* por todo, apoio, incentivo e amor incondicional que me proporcionam. Eles que sempre serão presença constante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me manter de pé frente a cada dificuldade me mostrando sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus pais Nilson Martins e Adelaide Rodrigues que nunca mediram esforços para me dar a melhor criação que lhes era possível. Por me ensinarem a ser forte e por acreditarem sempre no meu potencial. A vocês serei eternamente grata e deverei todas as minhas vitórias.

Ao meu irmão Marcelo Rodrigues Martins pela amizade e companheirismo. Obrigada por sempre acreditar em mim.

À Professora Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira, pelos ensinamentos, orientação e compreensão ao longo deste trabalho. Muito obrigada pela confiança.

A CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospital do HB de São José do Rio Preto - SP, em especial a enfermeira Andressa Zequini pela transmissão de informações importantes para a escrita deste trabalho.

Agradeço ao Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, especialmente a Dra. Doroti Garcia de Oliveira, Dra. Maria Fernanda Campagnari Bueno e Dra. Gabriela Rodrigues Francisco que contribuíram imensamente com meu trabalho. Obrigada por toda a atenção, por todos os ensinamentos e constantes conselhos científicos.

Agradeço a Dra. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos e aos pesquisadores Ma. Alexandra L Gerber e Me. Luiz Gonzaga Paula de Almeida do LNCC – Laboratório Nacional de Computação Científica – Petrópolis / RJ, pelo sequenciamento e anotações do genoma completo de algumas bactérias deste estudo.

Agradeço a Dra. Ana Cristina Gales e ao Dr. Willames Brasileiro da Silva Martins do Laboratório ALERTA – EPM/Unifesp – São Paulo e do departamento de microbiologia médica (*Division of Infection and Immunity of Cardiff University - United Kingdom*) que foram de substancial importância para realização dos

experimentos e do quarto manuscrito científico a ser publicado.

Aos funcionários do setor de microbiologia do Laboratório Central do Hospital de Base: Dra. Maria Gabriela de Lucca, Lucy, José Carlos, Adenice, Débora, Rogéria, Dionízia, Rosa, Paulo, Raphael e Rosana, pela triagem e encaminhamento das “bactérias fofas” em meios de cultura, ao laboratório CIM. Saibam que vocês são muito importantes nas pesquisas científicas.

Aos colegas do laboratório CIM- Centro de Investigação de Microrganismos: Carol Rodrigues, Juliana Rodrigues, Kátia Suemi, Luana Tobias, Luciana Moran, Maira Tomaz, Naiady Konno, Valéria Fraga e em especial “Leticinha”- Leticia Kellen de Andrade.

Aos colegas do LPV-Laboratório de Pesquisa em Virologia, em especial ao Me. Rafael Alves Silva pelas gargalhadas, Dra. Tatiana Elias Colombo e Dra. Georgia Guimarães pelos *Happy Hour* nos dias difíceis durante a jornada de pós-graduando.

Aos colegas do Laboratório de Microbiologia/Micologia, em especial a Professora Dra. Margarete Gottardo de Almeida, Nathália Seron, Emília Gianizella, Mariela Ribeiro, Tiago Henrique, Maicon Caetano e Luceli Ferreira. Obrigada pelo carinho que sempre tiveram comigo.

Todos os funcionários e demais colegas que ficaram pelo caminho, do Bloco-U6 de Pesquisa Científica, da FAMERP e da sessão de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

Aos Professores e à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da FAMERP- Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto por contribuírem para o enriquecimento de meu conhecimento.

À agência CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo auxílio financeiro.

EPÍGRAFE

“A diferença entre o possível e o impossível está na vontade humana.”

(Louis Pasteur)

“Nossa maior fraqueza está em desistir. O caminho mais certo de vencer
é tentar mais uma vez.”

(Thomas Edison)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química de diferentes beta-lactâmicos.....	11
Figura 2 - Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos.....	12
Figura 3- Mecanismo de ação das serina beta-lactamases produzidas pelas bactérias resistentes aos beta-lactâmicos.....	13
Figura 4 - Estrutura química do ácido nalidíxico e diferentes fluoroquinolonas.....	20
Figura 5 - Mecanismo de ação das quinolonas.....	20
Figura 6 - Mecanismos de resistência bacteriana as quinolonas.....	21
Figura 7- Estrutura química de dois aminociclitol e alguns derivados dos aminoglicosídeos.....	23
Figura 8 - Mecanismo ação dos Aminoglicosídeos.....	24
Figura 9 - Sítio de Ação das principais Aminoglicosídeos Acetiltransferases (AACs).....	25
Figura 10 - Sítio de Ação de alguns Aminoglicosídeos fosfotransferases (APHs)..	26
Figura 11 - Sítio de Ação de alguns Aminoglicosídeos nucleotidiltransferases (ANTs).....	27
Figura 12 - Sítios de metilação no 16S rRNA, que levam a diferentes fenótipos de resistência.....	28
Figura 13 - Esquema da constituição genética de plasmídeos transmissíveis.....	30
Figura 14 - Esquema representativo do Integron dentro de transposons (Tn) contendo genes de resistência.....	32
Figura 15 - Amplificação da fase sólida por MiSeq.....	34
Figura 16 - Sequenciamento por síntese utilizando fluorescência.....	35
Figura 17 - Dispositivo MinION para sequenciamento.....	37
Figura 18 - Sequenciamento por nanoporos.....	38
Figura 19 - Distribuição dos setenta e quatro pacientes presentes nas diferentes unidades de internação do Hospital de Base.....	60

Figura 20 - Distribuição das setenta e quatro amostras biológicas em que cepas do complexo <i>E. cloacae</i> foram detectadas.....	60
Figura 21 - Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em 74 cepas do CEC....	61
Figura 22 - Eletroforese em gel de agarose 1% contendo fragmento do gene <i>bla_{BKC}</i>	63
Figura 23 - Análise da sequência pelo método de Sanger e identificação da carbapenemase BKC em CEC61.....	63
Figura 24 - Eletroforese em gel de agarose 1%. A: CEC9 e CEC13 contendo fragmento do gene <i>rmtG</i> . B: CEC2 contendo fragmento <i>rmtD</i>	65
Figura 25 - Estrutura dos plasmídeos: pEC61A transportando o gene <i>mcr-9</i> . pEC61C transportando os genes <i>bla_{BKC-2}</i> e <i>aph(3')-VIa</i> e pEC61B transportando os genes <i>bla_{SHV-5}</i> e <i>tetC/tetD</i>	67
Figura 26 - Alinhamento Clustal W de sequências de proteínas das cefalosporinases ACT-84 e ACT-83.....	68
Figura 27 - Alinhamento Clustal W de sequências de proteínas das carbapenemases BKC-1 e BKC-2.....	69
Figura 28 - Análise colinear dos diferentes plasmídeos que albergam <i>bla_{BKC}</i> . As setas designam as direções de transcrição de genes e ORFs.....	70
Figura 29 - Representação da distribuição nucleotídica de 250 pb da sequência restante de <i>ISKpn23</i> detectada no pEC61C.....	70
Figura 30 – (A) Comparação circular entre pEC61A e 13 plasmídeos portadores de <i>mcr-9</i> . Apenas um pertenceu a IncH2 e IncH2a. (B) Comparação circular dos seis plasmídeos de maior êxito relacionados ao pEC61A na análise BlastN contra o banco de dados NCBI.....	72
Figura 31 - Análise colinear do contexto genético de <i>mcr-9</i> em quatro plasmídeos pertencentes a IncFIB e IncHI2.....	73
Figura 32 - Estrutura dos plasmídeos IncA/C. A: pEC09 e B: pEC13 transportando o gene <i>rmtG</i> . Os círculos internos coloridos em magenta e verde indicam o conteúdo de G+C.....	77
Figura 33 - Comparação entre as regiões carreadoras de <i>rmtG</i> dos plasmídeos pEC09 e pEC13. Um sombreamento azul claro indica regiões homólogas.....	78

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação de grupos do CEc por diferentes métodos genotípicos....	10
Quadro 2 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na PCR para amplificação de genes ESBL.....	45
Quadro 3 - Condições de corrida utilizadas para amplificação de genes ESBL por PCR.....	45
Quadro 4 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na PCR para amplificação de genes carbapenemases.....	46
Quadro 5 - Condições de corrida utilizadas na amplificação de genes carbapenemases por PCR.....	46
Quadro 6 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados na PCR para amplificação de genes PMQR.....	47
Quadro 7 - Condições de corrida utilizadas para amplificação de genes PMQR por PCR.....	47
Quadro 8 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados e condições de corrida para amplificação de genes de AMEs.....	120
Quadro 9 - Descrição dos <i>primers</i> utilizados e condições de corrida para amplificação de genes de metiltransferases 16S RNA.....	121
Quadro 10 - Resultado do TSA apresentado por 30 cepas do complexo <i>E. cloacae</i> carbapenemases e seus respectivos genótipos de resistência.....	122
Quadro 11 - Resultado do TSA apresentado por 44 cepas do complexo <i>E. cloacae</i> <u>não</u> carbapenemases e seus respectivos genótipos de resistência.....	123
Quadro 12 - Identificação das espécies e subespécies do gênero <i>Enterobacter</i> por WGS.....	66
Quadro 13 - Localização dos genes de resistência nos plasmídeos de Ec61 entre parênteses.....	68
Quadro 14 - Perfil de susceptibilidade das transformantes das carbapenemases BKC.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Δ – Símbolo que um gene está truncado

μg – Micrograma

μL – Microlitro

μM - Micromolar

$^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius

AAC – Aminoglicosídeos Acetiltransferases

ACT – Cefalosporinase do tipo AmpC

aadA1 – Gene que codifica uma adeniltransferase

ADP – Adenosina Difosfato

AGs - Aminoglicosídeos

AME – *Aminoglycoside Modifying enzyme*

AmpC – Betalactamase de Classe C de Ambler

ANI - *Average nucleotide identity* (Identificação Média dos Nucleotídeos).

ANT – Aminoglicosídeos Nucleotidiltransferases

APH – Aminoglicosídeos Fosfotransferases

ArmA - *Aminoglycoside resistance methyltransferase*

ATCC – *American Type Culture Collection*

attC – Sítio de recombinação no cassete genético

attI – Sítio de recombinação no integron

ATP – Adenosina Trifosfato

BIC - Bicêtre carbapenemase

BKC-1 - *Brazilian Klebsiella carbapenemase 1*

bla – Gene codificador de betalactamase

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

CCIH – Comissão de Controle de Infecção Hospitalar

CEc – Complexo *Enterobacter cloacae*

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CHDL - *Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*

CLSI – *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CN- Controle Negativo

CoA – Coenzima A CP – Controle Positivo

CTBA - *cetylmethylammonium bromide*
CTX-M – Cefotaximase isolada em Muniqué
DNA – Ácido desoxirribonucleico
dNTP – Desoxirribonucleotídeos Fosfatados DRS – Divisão Regional de Saúde
EGM – Elementos Genéticos Móveis
ESBL – *Extended Spectrum Betalactamase* (betalactamase de espectro estendido)
EUCAST – *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
F – *Forward*
FAMERP – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto
GES - *Guyana Extended-Spectrum*
HB – Hospital de Base
IAL – Instituto Adolfo Lutz IMP – Imipenemase
In - Integron
Inc – *Incompatibility group* (Grupo de incompatibilidade)
IRAS – Infecções Relacionadas a Assistência Saúde
IRL - *Left inverted repeat* (repetição invertida esquerda)
IS – Sequência de inserção
ISCR – *Insertion sequence common region* (região comum da Sequência Inserção) ITU
– Infecções do Trato Urinário
Kb – 1000 pares de bases (Quilobases)
KPC – *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LB – Luria-Bertani
LC-HB – Laboratório Central – Hospital de Base
LPS – Lipopolissacarídeo
MBL – Metallo-betalactamase Mg – Miligrama
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
MLSA – *Multi Locus sequence analysis*
MLST – *Multi Locus Sequence Type*
NAG – N-acetilglicosamina
NAM – N-acetilmurânico
NDM – *New Delhi* Metallo-beta-lactamase

ng – Nanograma

NmcA - *not metalloenzyme carbapenemase*

ORF – *Open Reading Frame*

OXA – Oxacilinase pb – Pares de bases

PAV – Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica

PBP – *Penicilin Binding Protein* (Proteínas ligadoras de penicilinas)

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

PMQR - *Plasmid Mediated Quinolone Resistance*

qnr – Gene que confere resistência a quinolona

q.s.p – quantidade suficiente para

R – *Reverse*

RAST - *Rapid Annotations Subsystem Technology*

rmt – Gene codificador de metiltransferase 16S rRNA

RNA – Ácido ribonucléico

rpoB – Gene que codifica a RNA polimerase, subunidade β

rRNA – RNA ribossômico

SHV – *Sulfhydryl variable*

SSG – Sequenciamento de segunda geração

SST – Sequenciamento de terceira geração

ST – *Sequence Type*

sul – Gene que confere resistência a sulfonamida TEM – Temoneira

Tn – Transposon

Tnp – Enzima Transposase

TSA – Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

U – Unidade

UTI – Unidade Terapia Intensiva

VIM – *Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*

V/cm – Votls por centímetro

WGS- *Whole Genome Sequencing*

RESUMO

Introdução: Bactérias do complexo *Enterobacter cloacae* (CEc) estão frequentemente envolvidas em infecções relacionadas à assistência à saúde e se destacam pela crescente prevalência em hospitais do mundo todo, pela resistência intrínseca a vários os beta- lactâmicos e pela capacidade de aquisição de genes de resistência a diversas classes de antimicrobianos. Apesar da importância, ainda existem poucas informações sobre a diversidade de mecanismos de resistência carregada por estas bactérias. **Objetivos:** Os objetivos deste estudo foram identificar e caracterizar genes de resistência responsáveis pela produção de ESBL, Carbapenemases, PMQR, AME e 16S rRNA Metiltransferases em CEc multirresistentes detectados em um hospital terciário do Estado de São Paulo; e analisar o genoma completo de isolados que apresentem mecanismos de resistência já conhecidos. **Métodos:** Setenta e quatro CEc isolados de 2013 a 2017 foram submetidas à PCR single e multiplex para detecção de *bla_{SHV-5}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-15}*, *bla_{CTX-M-8}*, *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{BKC}*, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *OqxAB*; genes AME acetiltransferases (AAC), nucleotidiltransferases (ANT), fosfotransferases (APH) e 16 rRNA Metiltransferases *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* e *rmtH*. Experimento de conjugação foi utilizado para identificação do plasmídeo carreador de gene *rmtG* 16S rRNA Metiltransferases. A caracterização das variantes dos genes de resistência, plasmídeos e ambiente genético foi obtida por sequenciamento tipo Sanger (Applied Biosystems®) e do genoma completo (MiSeq - Illumina®) e (MinION-Nanopore®). **Resultados:** Em relação aos genes de resistência, 63% das cepas apresentaram *bla_{CTX-M-15}*, 29% *bla_{CTX-M-2}*, 1% *bla_{CTX-M-8}*, 6% *bla_{SHV-5}* e 1% *bla_{SHV-12}*. Os genes PMQR encontrados foram *aac(6')Ib-cr* (46%) e *qnrB* (14%). Entre os genes AME

detectados, os mais prevalentes foram *ant(2'')-Ia* 51%, *aac(6')-Ib* 45%, *aac(3)-IIa* 34%, *aph(3')-Ia* 21% e *aph(3')-IV* 6%. Em relação aos genes 16S rRNA Metiltransferases, um isolado apresentou *rmtD-2* e dois outros isolados apresentaram *rmtG*. O sequenciamento dos plasmídeos pEc09 e pEc13 contendo o gene *rmtG* mostrou sua associação com *ISCR2*, Δ *ISCR2* e *IS26* localizados em um transposon Tn3 e carregados por um plasmídeo IncA/C. O gene *bla_{KPC-2}* foi identificado como determinante para a produção de carbapenemases na maioria dos isolados, com exceção de CEc 61 (*Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis*) carregando, entre outros genes, a nova variante BKC-2, o gene *bla_{BKC-2}* foi detectado em um plasmídeo IncQ1 sem a sequência de inserção *ISKpn23*. E o gene *mcr-9* entre duas sequências de inserção com alta similaridade a *IS903B* e *IS26* localizado em um plasmídeo IncFIB. **Conclusão:** A detecção simultânea e a disseminação de vários genes de resistência aos antimicrobianos em uma mesma bactéria do complexo *Enterobacter cloacae*, enfatiza o impacto que esses genes transmitidos por elementos genéticos móveis causam no ambiente hospitalar.

Palavras-chave: 1. Complexo *E. cloacae*; 2. Resistência aos antimicrobianos; 3. ESBL; 4. Carbapenemases; 5. Metiltransferases 16S rRNA

ABSTRACT

Introduction: The *Enterobacter cloacae* complex (ECc) are frequently involved in health care-acquired infections (HCAI). In addition to the increasing prevalence in hospitals around the world, ECc has intrinsic resistance to some classes of antibiotics, making it difficult to treat serious infections. Thus, there are few antibiotic therapy options. The spread of antibiotic resistance contributes to the selection of this group of bacteria, the main factor being the ability to mobilize several resistance genes through the mobile genetic elements. **Objectives:** The aim of this study was characterize resistance genes responsible to the production of ESBL, Carbapenemases, PMQR, AME, and 16S rRNA Methyltransferases in multidrug-resistant ECc isolated from clinical samples from a tertiary hospital in the State of São Paulo; and to analyze the complete genome of strains that have already known resistance mechanisms. **Methods:** Seventy-four strains of ECc isolated from 2013 to 2017 were subjected to single and multiplex PCR for the detection *bla*_{SHV-5}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{BKC}, *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA*, *OqxAB*; AME gene acetyltransferases (AAC), nucleotidyltransferases (ANT), phosphotransferases (APH) and 16S rRNA Methyltransferases genes *armA*, *rmtA*, *rmtB*, *rmtC*, *rmtD*, *rmtE*, *rmtF*, *rmtG* and *rmtH* genes. Conjugation experiment was used to identification the plasmid carrying the *rmtG* 16S RMTases gene. The sequencing of type: Sanger (Applied Biosystems®), MiSeq (Illumina®) and MinION (Nanopore®) were performed at the ECc for confirmation of resistance gene variants, plasmid incompatibility and genetic environment. **Results:** Our results showed a positivity of 63% for *bla*_{CTX-M-15}, 29% *bla*_{CTX-M-2}, 1% *bla*_{CTX-M-8}, 6% *bla*_{SHV-5} and 1% *bla*_{SHV-12}. The PMQR genes found were *aac(6')-Ib-cr* (46%) and *qnrB* (14%). Among the AME genes detected, the most

prevalent were *ant(2'')-Ia* 51%, *aac(6')-Ib* 45%, *aac(3)-IIa* 34%, *aph(3')-Ia* 21% and *aph(3')-IV* 6%. Regarding the 16S rRNA Methyltransferases genes, one isolate was positive for *rmtD-2* and two isolates for the *rmtG* gene. Sequencing of plasmids (pEc09 and pEc13) bearing 16S rRNA methyltransferases genes showed an association with genetic mobile elements such as ISCR2, Δ ISCR2 and IS26, belonging to the incompatibility group IncA/C and transposon Tn3. Among carbapenemases, the *bla_{KPC-2}* gene has been detected in most strains except ECc 61 identified as *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* carrying a new variant of BKC-2, the *bla_{BKC-2}* gene was detected an IncQ1 plasmid and lack of the IS*Kpn23*. The *mcr-9* gene belonging to IncFIB and genetic context with high similarity between two insertion sequences IS903B and IS26. **Conclusion:** The simultaneous detection and dissemination of several antimicrobial resistance genes in the same isolate of the *Enterobacter cloacae* complex, point out the impact that these genes transmitted by mobile genetic elements can cause in the hospital environment.

Keywords: 1. *E. cloacae* complex; 2. Antimicrobial resistance; 3. ESBL; 4. Carbapenemases; 5. 16S rRNA methyltransferases

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tem aumentado de forma alarmante em todo o mundo, resultando em infecções que são de difícil tratamento e causam o prolongamento da internação hospitalar, a elevação dos custos e aumento das taxas de morbidade e mortalidade. ⁽¹⁾

O uso intensivo e indiscriminado de antimicrobianos é apontado como o principal fator que favorece a emergência, evolução e disseminação de linhagens de bactérias resistentes. ⁽²⁾ Tais fenômenos têm sido amplamente estudados, o que permitiu a compreensão da importância de diversas espécies de *Enterobacterales* como agentes de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), devido a sua crescente prevalência e aos altos índices de resistência as várias classes de antimicrobianos. ⁽³⁾

Neste contexto, o complexo *Enterobacter cloacae* (CEc) tem-se destacado como importante patógeno ocasionando um número moderado de pneumonias, falência renal, bacteremia, infecções de pele, trato urinário e óbito em pacientes hospitalizados. ⁽⁴⁾ Além de tornar-se, em importância clínica, a terceira espécie bacteriana envolvida em infecções graves depois de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, representando uma preocupação em saúde pública. ⁽⁵⁾

O gênero *Enterobacter* spp e o CEc apresentam resistência intrínseca às aminopenicilinas (ampicilina e amoxicilina), cefalosporinas de primeira e segunda geração (cefalotina, cefalexina e cefuroxima), cefoxitina e à amoxicilina/ácido clavulânico, devido à produção de uma beta-lactamase cromossomal, denominada AmpC. ⁽⁶⁾ Em linhagens associadas às IRAS tem sido comum a identificação de mutações em genes que codificam as beta-lactamases tipo AmpC ou a aquisição de genes

que codificam ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamases*), resultando em resistência às cefalosporinas de terceira (ceftriaxona e ceftazidima) e quarta (cefepime) gerações ⁽⁵⁾, que são ainda as principais opções para o tratamento em associação com carbapenêmicos e aminoglicosídeos. ⁽⁷⁾

Além de ESBL e AmpC, as beta-lactamases com atividade sobre os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e doripenem), denominadas carbapenemases, são importantes determinantes de resistência e tem ganhado destaque nos últimos anos. ⁽⁸⁾ Outros mecanismos de resistência importantes incluem a PMQR (*plasmid mediated quinolone resistance*) responsável pela resistência às quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, levofloxacina e moxifloxacina), ⁽⁹⁾ a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs – *aminoglycoside modifying enzymes*) e 16S rRNA metiltransferases que promovem resistência aos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina). ⁽¹⁰⁾ A associação desses mecanismos com a resistência aos beta-lactâmicos resulta em linhagens resistentes a múltiplas drogas (RMD). ⁽¹¹⁾

O surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos envolvem diversos fatores que contribuem para a seleção das bactérias. Sendo talvez o principal fator, a notável capacidade das bactérias em mobilizar genes de resistência. ⁽¹²⁾ A mobilização de genes de resistência pode ocorrer através de elementos genéticos móveis (EGM) por transmissão horizontal (de uma célula bacteriana para outra), através de plasmídeos conjugativos e transposons, como também por recombinação (em um mesmo genoma) por transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção. ⁽¹³⁾

Em hospitais do mundo todo, infecções por bactérias RMD são críticas, e demandam estrito gerenciamento da terapêutica já que são susceptíveis a poucos antimicrobianos. ⁽¹⁴⁾

Esta realidade tem sido observada no Hospital de Base (HB) da Fundação Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FUNFARME), onde o isolamento de CEC não susceptíveis a distintas classes de antimicrobianos tem ocorrido no decorrer dos anos 2013 (15%), 2014 (16%), 2015 (14%), 2016 (17%), 2017(18%) e 2018 (19%) (dados fornecidos pela CCIH-Comissão de Controle de Infecção Hospitalar da instituição).

O HB é um importante hospital-escola de nível terciário do Estado de São Paulo que atende a uma população de dois milhões de habitantes dos 102 municípios pertencentes à Divisão Regional de Saúde de São José do Rio Preto (DRS 15). Possui 1.102 leitos, incluindo-se as unidades de terapia intensiva (UTIs) tanto do HB quanto do hospital da criança e maternidade (HCM). Na instituição são realizadas cirurgias cardíacas, neurocirurgias, atendimento ao trauma e transplantes. Em média, a instituição realiza 3.610 cirurgias mensalmente, 37.934 internações/ano e 1.337.616 exames laboratoriais/ano (<http://www.hospitaldebase.com.br/funfarme-em-numeros-pesquisado-em-02.08.2020>).

Devido à complexidade da assistência médica prestada na instituição e à gravidade dos quadros clínicos dos pacientes atendidos, programas de prevenção e controle das infecções são de grande importância. Desta maneira, estudos visando o conhecimento dos mecanismos de resistência aos antimicrobianos e o perfil de disseminação de patógenos multirresistentes, podem auxiliar no estabelecimento de protocolos de antibioticoterapia e de prevenção de contato e isolamento.

1.1-Objetivo Geral

Identificar os genes de resistência de distintas classes de antimicrobianos (cefalosporinas, carbapenêmicos, quinolonas e aminoglicosídeos) e realizar a

caracterização genética completa de linhagens que apresentarem mecanismos de resistência já conhecidos.

1.2-Objetivos específicos

- Caracterizar presença dos genes *bla_{SHV-5}*, *bla_{SHV-12}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-15}* e *bla_{CTX-M-8}* que codificam ESBL;
- Caracterizar presença dos genes *bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{BKC}* que codificam carbapenemases;
- Caracterizar presença dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS*, *aac(6')-Ib-cr*, *qepA* e *OqxAB* que conferem resistência as quinolonas;
- Caracterizar genes de resistência responsáveis pela produção de AMEs e 16S rRNA Metiltransferases por PCR, sequenciamento e técnica de conjugação;
- Sequenciamento genoma completo dos isolados Ec2, Ec9, Ec13 e Ec61;
- Sequenciamento dos plasmídeos que carregam genes de resistência do tipo 16S rRNA Metiltransferases e serino-carbapenemase BKC.

REVISÃO DA LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Enterobacter* spp e o complexo *Enterobacter cloacae*

As bactérias do gênero *Enterobacter* são bacilos Gram-negativos, anaeróbios facultativos, ordem *Enterobacterales*, família das *Enterobacteriaceae*.⁽¹⁵⁾ São catalase-positivas, oxidase e DNAase-negativas, fermentadores de glicose e as colônias bacterianas na sua grande maioria são lactose negativas.⁽⁸⁾ Estão amplamente distribuídos em uma variedade de habitats, tais como solo, água, plantas, esgoto, trato gastrointestinal animal e humano,⁽⁸⁾ alimentos, ambientes hospitalares e equipamentos médicos.⁽⁷⁾

Enterobacter spp. faz parte do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter*), que inclui as principais espécies de bactérias resistentes a antibióticos associadas às infecções nosocomiais.⁽¹⁶⁾ Infecções do trato urinário, de tecidos moles e intra-abdominais, pneumonia, endocardite, artrite séptica, osteomielite, bacteremia e sepse são causadas por *Enterobacter* spp,^(5,9,17) que junto *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, destacam-se pela alta prevalência, gravidade das infecções, capacidade de evolução da patogenicidade e constante aquisição de resistência a várias classes de antibióticos.⁽⁹⁾

O gênero foi descrito em 1960 por Hoffman e colaboradores, mas mudanças na taxonomia tem ocorrido nos últimos 50 anos.⁽⁷⁾ Até o momento, o gênero foi descrito com 22 espécies: *E. aerogenes*, *E. amnigenus*, *E. arachidis*, *E. asburiae*, *E. carcinogenus*, *E. cloacae*, *E. cowanii*, *E. dissolvans*, *E. gergoviae*, *E. helveticus*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori*, *E. nimipressuralis*, *E. oryzae*, *E. pulveris*, *E. pyrinus*, *E. radicincitans*, *E. soli*, *E. taylorae* e *E. turicensis*.⁽⁷⁾

Entre essas, sete foram agrupadas no complexo *Enterobacter cloacae*: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii*, *E. mori* e *E. nimipressuralis* ⁽⁸⁾ A maioria das espécies compartilha uma relação de DNA-DNA com *E. cloacae* variando de 61 a 67%. ⁽⁸⁾

A identificação precisa das espécies de *Enterobacter* e do CEC é ainda considerada um desafio, e nas últimas décadas a filogenia do gênero tem sido modificada com base em estudos que utilizam modernas técnicas moleculares, incluindo o sequenciamento do genoma. ⁽⁷⁾

Neste contexto, a taxonomia do complexo *E. cloacae* (CEC) é ainda mais desafiadora, pois o método fenotípico é irreprodutível e não diferencia espécies geneticamente diversas. ⁽¹⁸⁾ Por exemplo, os vários sistemas de identificação comercial com reações bioquímicas miniaturizadas são amplamente utilizadas nos laboratórios de microbiologia clínica, que podem ser ou não interpretadas com auxílio de automação como por ex., Vitek-2[®] (BioMérieux, França) e Phoenix[™] (BD-New Jersey, EUA) e que costumam identificar linhagens com um perfil bioquímico atípico de forma incorreta.

A espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of flight*) que ganhou importância por se tratar de uma metodologia rápida na identificação de diferentes gêneros bacterianos ⁽¹⁹⁾ não é eficiente na distinção das espécies do CEC, sendo incapaz de identificar de forma confiável *Enterobacter asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* e *E. ludwigii* em relação ao *E. cloacae*. ^(20,21)

Designações mais refinadas das espécies têm sido baseadas em métodos moleculares. ⁽¹⁷⁾ A genotipagem com base na variação alélica do gene *hsp60* (*heat shock protein 60*) classificou o CEC em treze grupos (clusters I-XIII), sendo *Enterobacter asburiae* (cluster I), *Enterobacter kobei* (cluster II), *Enterobacter ludwigii* (cluster V),

Enterobacter hormaechei subsp. *oharae* (cluster VI), subsp. *hormaechei* (cluster VII) e subsp. *steigerwaltii* (cluster VIII), *Enterobacter nimipressuralis* (cluster X), *E. cloacae* subsp. *cloacae* (cluster XI) e subsp. *dissolvens* (cluster XII), clusters III, IV e IX de *E. cloacae* Hoffmann sem nome e uma variedade de sequências instáveis de *E. cloacae*.⁽²²⁻²⁵⁾ No entanto, o uso dos genes *hsp60* ou *rpoB* sozinhos levam a discrepâncias significativas na identificação de subespécies.⁽¹⁷⁾

A técnica de MLSA (*multilocus sequence analysis*) usando seis genes *housekeeping* (*rpoB*, *fusA*, *gyrB*, *leuS*, *pyrG* e *rplB*) foi aplicada e incluiu no CEC as espécies *Enterobacter mori*, *E. xiangfangensis* e *E. cancerogenus*, sugeriu a criação de um clado recente incluindo as três subespécies de *E. hormaechei* e um clado mais antigo heterogêneo, incluindo vários clusters do CEC.⁽¹⁷⁾

Em 2013, o gene *dnaA* foi adicionado aos seis genes do MLSA em um esquema de MLST (*multilocus sequence typing*) permitindo a identificação mais robusta de isolados ECc intimamente relacionados.⁽²⁶⁾ Até a presente data, foram relatados 1396 tipos de sequência (STs) (<https://pubmlst.org/ecloacae/> pesquisado em 04/08/2010).

Atualmente, comparar todo o genoma através do WGS (*Whole-genome sequencing*) permite a melhor investigação nas relações genéticas, o que fez aperfeiçoar a classificação do CEC em 18 grupos (A-R),^(17,27) onde 12 dos quais correspondiam a 10 dos 12 grupos definidos anteriormente por Hoffmann e colaboradores.⁽²⁸⁾ O grupo X de Hoffmann e colaboradores *E. nimipressuralis*, foi reclassificado como *Lelliottia nimipressuralis*. O **quadro 1** descreve espécies reclassificadas, adicionando quatro clados (S-V).⁽²⁸⁾

Para estimar a relação genética entre espécies do CEC através do WGS, surgiram métodos estatísticos de similaridade para todo o genoma, incluindo pontuações AAI (*Average Aminoacid Identity*), dDDH (*digital DNA/DNA hybridization*), TETRA

(*tetranucleotide frequency distribution*) e ANI (*average nucleotide identity*), sendo que a identificação média dos nucleotídeos tem sido amplamente utilizada. ⁽²⁹⁾

Quadro 1. Classificação de grupos do CEC por diferentes métodos genotípicos.

<i>hsp60</i>	WGS e ANI		Espécies, Subespécies e Complexo
Hoffmann et al (2003, 2005ABC)	Chavda et al (2016)	Sutton et al (2018)	
I *	J		<i>E. asburiae</i>
II *	Q		<i>E. kobei</i>
III *	D		<i>E. hormaechei</i> ssp. <i>hoffmannii</i>
IV *	M		<i>E. roggenkampii</i>
V *	I		<i>E. ludwigii</i>
VI *	C		<i>E. hormaechei</i> ssp. <i>oharae</i>
VII *	E		<i>E. hormaechei</i> ssp. <i>hormaechei</i>
VIII *	B		<i>E. hormaechei</i> ssp. <i>steigerwaltii</i>
IX	R		<i>E. bugandensis</i>
X	–		<i>E. nimipressuralis</i> → reclassificado <i>Lelliottia nimipressuralis</i>
XI *	G		<i>E. cloacae</i> ssp. <i>cloacae</i>
XII *	H		<i>E. cloacae</i> ssp. <i>dissolvens</i>
–	A		<i>E. xiangfangensis</i> → reclassificado <i>E. hormaechei</i> ssp. <i>xiangfangensis</i>
–	F		<i>E. mori</i>
–	S		Complexo <i>E. cloacae</i> (clado S)
–	T		Complexo <i>E. cloacae</i> (clado T)
–	U		<i>E. cancerogenus</i>
–	V		<i>E. soli</i>
–	K, L, N, O, P		Complexo <i>E. cloacae</i> (clados K, L, N, O, P)

Legenda: *: 10 dos 13 grupos de Hoffmann e colaboradores para identificação do CEC. WGS (*Whole genome sequencing*-Sequenciamento genoma completo); ANI (*average nucleotide identity*- Identificação Média dos Nucleotídeos).

A identificação correta das espécies bacterianas por ANI é feita pelo pareamento da identificação média dos nucleotídeos entre dois genomas de cepas padrão, depositadas no banco de dados taxionômicos do NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy) e da coleção Alemã de Microrganismos e Culturas de células no Instituto Leibniz (www.dsmz.de/support/bacterial-nomenclature-up-to-date-downloads.html); e mensuradas ao nível da região de alinhamento. ⁽³⁰⁾ A regra padrão predefinida do ponto de corte da ANI para identificação limite das espécies é de 96%, mas isso nem sempre é apropriado. ⁽²⁹⁾

Desta maneira, a introdução do WGS vem corroborar com a capacidade de investigar o surgimento do CEC em diversos ambientes, mesmo com a sua diversidade polifilética e genômica. ⁽¹⁷⁾

2.2 Complexo *Enterobacter cloacae* (CEc) e a resistência aos Antimicrobianos

2.2.1 Beta-lactâmicos

Tem sido utilizado por décadas para o tratamento de infecções por bactérias Gram negativas por serem bem tolerados e eficazes. ^(31,32) A característica estrutural comum dessa classe de antimicrobiano é o anel β -lactâmico isolado ou conjugado a outro anel, resultando em estruturas bicíclicas. São representados pelas penicilinas, inibidores de beta-lactamases, cefalosporinas (1°, 2°, 3°, 4° e 5° gerações), monobactâmico e carbapenêmicos ⁽³¹⁾ conforme **figura 01**.

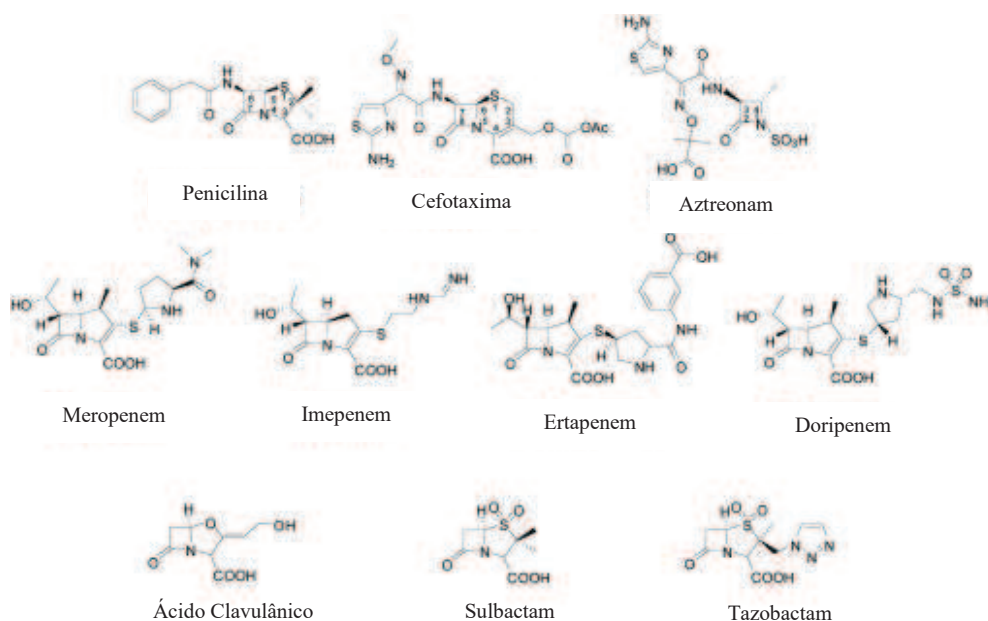


Figura 1. Estrutura química de diferentes beta-lactâmicos. **Adaptado de Drawz, Bonomo (2010).**

São bactericidas que agem através da inibição da síntese da parede celular bacteriana (**figura 2**), que por sua vez é composta por unidades alternadas de ácido N-

acetilmurânico (NAM) e N-acetilglicosamina (NAG) formando camadas de peptidoglicano. Cada NAM possui um terminal pentapeptídico com dois resíduos de D-alanina na sua extremidade. A ligação covalente entre esses dois resíduos (transpetidação) é catalisada pelas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs).⁽³³⁾

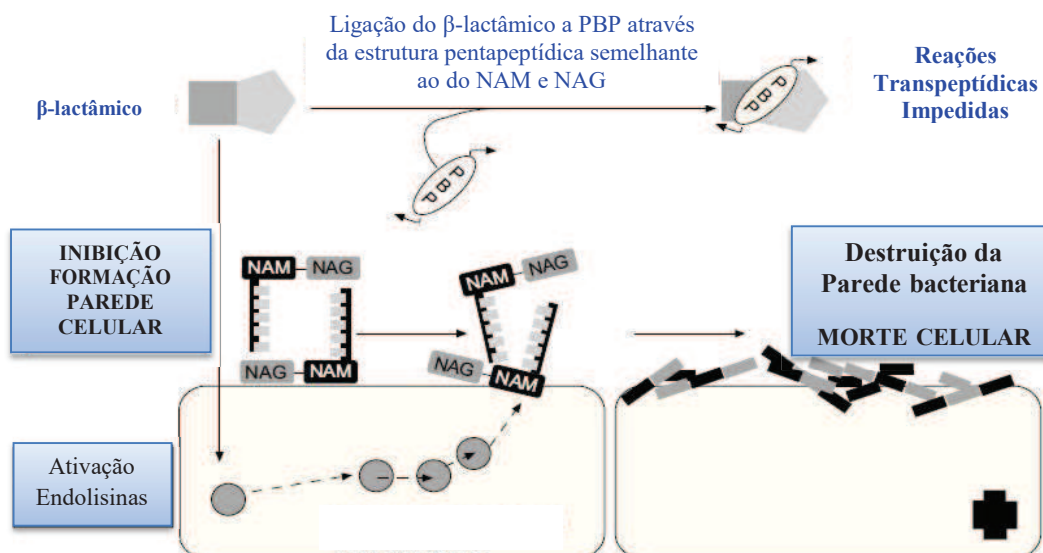


Figura 2. Mecanismo de ação dos beta-lactâmicos. Adaptado de Suárez e Gudiol (2009).

Ao longo dos anos, as bactérias Gram negativas adquiriram estratégias para desenvolvimento de resistência a estes antimicrobianos.⁽³⁴⁾ O mecanismo com maior impacto na epidemiologia da resistência bacteriana e que apresenta a maior eficiência contra os beta-lactâmicos é a produção de beta-lactamases.⁽³⁵⁾

Essas enzimas se associam de forma não covalente ao anel beta-lactâmico, que é atacado pelo radical OH (hidroxila) livre presente no resíduo serina do sítio ativo da beta-lactamase, formando uma ligação covalente acil-éster (**figura 3**). A inativação do antimicrobiano ocorre no momento da hidrólise deste éster, entretanto sem a perda da atividade hidrolítica pela enzima.⁽³⁶⁾

As beta-lactamases diferem entre si em seus perfis de substrato (ou seja, os diferentes tipos de antibióticos beta-lactâmicos que elas inativam), perfil de inibidor

(quais compostos os inativam) e homologia de sequência (composição de aminoácidos dessas enzimas).⁽³⁷⁾

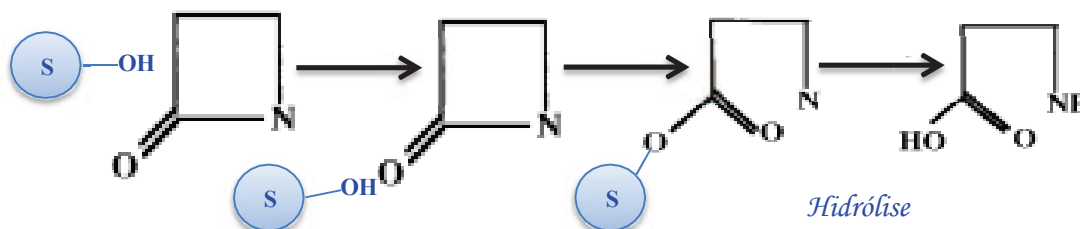


Figura 3. Mecanismo de ação das serino beta-lactamases produzidas pelas bactérias resistentes aos beta-lactâmicos. Adaptado de Livermore (1998).

Com base nestas características, foram criados dois sistemas de classificação para dividir as beta-lactamases em classes. A classificação de Ambler com base na homologia da sequência de aminoácidos, que reconhece quatro classes: A (Penicilinases, ESBL e Carbapenemases - Serino-beta-lactamases), B (Metallo-beta-lactamases), C (Cefalosporinas cromossomais) e D (Oxacilinases). Já a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na similaridade entre os perfis de substratos e inibidores das beta-lactamases, e é dividida em diferentes subgrupos representados por números cardinais (1, 2 e 3) e vogais.^(35,38,39)

2.2.2 ESBL (*Extended-spectrum beta-lactamase*)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) são enzimas produzidas por bactérias capazes de hidrolisar as oximino-cefalosporinas (por ex., cefuroxima, cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona e cefepima) e monobactam (aztreonam). Porém, não degradam cefamicinas (cefexetina) e carbapenêmicos.^(37,40) A maioria das ESBL pertence classe A de Ambler, 2b Bush-Jacoby-Medeiros e as mais importantes são TEM, SHV e CTX-M.⁽⁴⁰⁾

As variantes de ESBLs do tipo TEM e SHV são derivadas de enzimas de espectro restrito TEM-1, TEM-2 e SHV-1 localizadas no cromossomo bacteriano. Surgiram após

mutações pontuais em *bla*_{SHV-1} e *bla*_{TEM-1}, que resultam na modificação de seu sítio ativo e expansão de sua atividade hidrolítica. ⁽³⁶⁾

Até o momento, existem descritas mais de 242 variantes de TEM de amplo espectro ⁽⁴¹⁾ (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020). São detectadas em bactérias Gram negativas da família *Enterobacteriaceae* como *E. cloacae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Salmonella* spp. ⁽⁴⁰⁾

No fim do século 20, as enzimas SHV surgiram em *Enterobacteriaceae* causando IRAS, sendo que em 1983 a variante SHV-2 foi detectada em *K. ozaenae* de um isolado clínico. ⁽⁴⁰⁾ Dentro de poucos anos, outras quatro variantes de SHV-ESBL foram identificadas, SHV-2a, SHV-3, SHV-4 e SHV-5 capaz de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido e monobactam. ⁽⁴²⁾ Atualmente, mais de 228 variantes de SHV são conhecidas mundialmente ⁽⁴¹⁾ (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020).

O mais importante grupo de ESBL são as enzimas CTX-M, que ao contrário das enzimas TEM e SHV, não sofreram mutação pontual. Acredita-se que tal enzima tenha sido identificada pela primeira vez a partir do cromossomo de *Kluyvera* spp após sua transformação em plasmídeo. ⁽⁴³⁾ As CTX-M incluem mais de 230 enzimas diferentes (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020), agrupadas em cinco subfamílias ou grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25) com base em suas distintas identidades de aminoácidos. ^(37,41)

Mundialmente, as CTX-M mais amplamente distribuída são CTX-M-15 (pertencente subfamília CTX-M-1), e CTX-M-14, variante do grupo CTX-M-9 detectadas em países como China, Sudeste Asiático, Coreia do Sul, Japão e Espanha. ⁽³⁷⁾

Enquanto em alguns países da América do Sul, CTX-M-2 são geralmente relatadas em *Enterobacteriaceae*.⁽³⁷⁾

No Brasil, as principais CTX-M detectadas no CEC isoladas de pacientes hospitalizados são CTX-M-2, CTX-M-15, CTX-M-9 e CTX-M-8.⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾ A prevalência de CTX-M aumentou rapidamente nas últimas décadas, e atualmente é a ESBL mais comum entre diferentes espécies bacterianas.⁽³⁷⁾

2.2.3 Carbapenemases

As Carbapenemases são classes de beta-lactamases que pode hidrolisar antibióticos carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem).⁽⁴⁸⁾ De acordo com método de classificação de Ambler, as carbapenemases podem ser divididas dentro das classes A, B e D.^(48,49) As classes A e D são serina beta-lactamases, ou seja, possuem enzimas com um mecanismo hidrolítico à base do aminoácido serina, já as enzimas da classe B requerem 1 ou 2 íons de zinco para sua atividade catalítica, sendo denominadas como Metallo-beta-lactamases (MBLs).⁽⁵⁰⁾

➤ Classe A

- IMI (*imipenemase*), NMC-A (*not metalloenzyme carbapenemase*), SME (*Serratia marcescens enzyme*).

São codificadas por genes localizados principalmente no cromossomo,⁽⁴⁹⁾ apesar de algumas variantes como *bla*_{IMI-5}, *bla*_{IMI-6} e *bla*_{NMC-A} terem sido localizadas em elementos genéticos móveis no complexo *E. cloacae*.⁽⁵¹⁾

- GES (*Guiana Extended-Spectrum*)

A primeira variante GES-2 foi relatada como responsável pela sua atividade em relação aos carbapenêmicos após comprovação da substituição do aminoácido Glicina por Asparagina ou Serina na posição 170 da proteína GES-1, após esta mutação surgiram

outras variantes, sendo as principais GES-4, GES-5, GES-6, GES-14, GES-16 e GES-18. ⁽⁵²⁾ No Brasil *bla*_{GES-5} e *bla*_{GES-16} foram detectadas em *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *S. marcescens*. ^(52,53) Em espécies do CEC, GES-5 foi detectada de *E. cloacae* causando infecção em paciente diabético em um hospital da República Tcheca. ⁽⁵⁴⁾

▪ BKC-1 (*Brazilian Klebsiella carbapenemase-1*)

Recentemente, uma nova carbapenemase da classe A foi detectada no Brasil, proveniente de três isolados clínicos de *K. pneumoniae* (ST1781) coletados em 2008 em diferentes pacientes hospitalizados em São Paulo. ^(55,56) A BKC-1 hidrolisa cefalosporinas, monobactâmico, quinolonas e carbapenêmicos. ⁽⁵⁷⁾

▪ KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)

Esta serino-carbapenemase foi identificada pela primeira vez em 1996 em *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos isolada de um paciente na Carolina do Norte, EUA, durante um programa de estudo de vigilância, denominado ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*). ^(49,57)

Os países com alta prevalência de carbapenemases do tipo KPC incluem os EUA, bem como alguns países da América do Sul (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Venezuela, Equador e Colômbia), Europa (Itália e Grécia) e Leste Asiático (em particular a China). ^(50, 57)

Até o momento, 55 variantes de KPC foram descritas (KPC-2 a KPC-44) (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020). Mundialmente, a KPC é a mais detectada em espécies da família *Enterobacteriaceae*, (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. marcescens* *P. mirabilis* e CEC) sendo que KPC-2 e KPC-3 são de longe as mais predominantes. ⁽⁵⁷⁾

Os genes *bla*_{KPC}, apresentam grande mobilidade, devido a sua localização em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons, ^(49,57) esta característica explica sua disseminação global. No Brasil, as principais espécies do CEC albergando *bla*_{KPC-2} são *Enterobacter cloacae* ⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾, *E. hormaechei* e *E. asburiae*. ⁽⁴⁶⁾

➤ **Classe D**

As carbapenemases da classe D são um grupo de Oxacilinases capazes de hidrolisar fracamente os carbapenêmicos, chamadas de CHDLs (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*), ⁽⁵⁷⁾ porém degradam cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefepima). ⁽⁵⁰⁾

Entre espécies da família *Enterobacteriaceae*, OXA-48 é a CHDL mais comumente detectada em diferentes países do mundo, principalmente na Europa (França, Alemanha, Holanda, Itália, Reino Unido), países do Mediterrâneo, incluindo o norte da África (Marrocos, Tunísia, Egito e Líbia) ^(48,50) e mais recentemente nos Estados Unidos e Japão. ⁽⁵⁷⁾ A OXA-48 foi relatada pela primeira vez em *Klebsiella pneumoniae* isolado de um paciente em hospital de Istambul (Turquia) em 2001, ⁽⁶¹⁾ desde então, esta CHDL tornou-se endêmica neste país. ^(50,61)

Na América Latina, principalmente Argentina, Brasil e Colômbia OXA-48 e suas variantes OXA-163, OXA-247 e OXA-370 tem sido relatada em espécies de *Enterobacteriaceae*. ⁽⁵⁷⁾ No Brasil, OXA-370 foi descrita pela primeira vez em *Enterobacter hormaechei*, e esta variante difere de OXA-48 por uma única substituição de aminoácido Gli220Glu. ⁽⁶¹⁻⁶²⁾ O gene *bla*_{OXA-370} tem sido descrito em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *C. freundii*, *E. aerogenes* e *E. cloacae* proveniente de vários hospitais do sul do Brasil. ⁽⁶³⁾

➤ **Classe B**

As carbapenemases da classe B (Metallo-betalactamases -MBLs) hidrolisam quase todos os beta-lactâmicos, exceto o monobactam. São classificadas em três subclasses B1, B2 e B3 de acordo com substrato de preferência e estrutura proteica, sendo que B1 inclui a enzimas de maior interesse clínico (IMP, VIM e NDM).⁽⁶⁴⁾

- IMP (Imipenemase)

A enzima IMP-1 foi a primeira carbapenemase a ser identificada no mundo, detectada em 1988 no Japão em *P. aeruginosa* resistente ao imipenem.⁽⁵⁷⁾ Em 1993, foi identificado em um isolado de *S. marcescens* no mesmo país.⁽⁶⁴⁾

Até o momento, 85 variantes de IMP foram descritas (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020). As *Enterobacteriaceae* produtoras de IMP foram encontradas com maior frequência no Japão, Taiwan e China; porém e em outros países, os surtos ou relatos de *bla*_{IMP} são esporádicos.⁽⁴⁸⁾

No entanto, na América Latina IMP-1 foi detectado pela primeira vez em *Providencia rettgeri* no Brasil em 2005 e IMP-8 em *E. cloacae*, *K. oxytoca* e *C. Freundii* na Argentina.⁽⁵⁷⁾

- VIM (*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*)

Esta carbapenemase foi identificada em isolados de *P. aeruginosa* em Verona na Itália em 1997.⁽⁵⁷⁾ Desde então, VIM-1 e suas 69 variantes (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020) vem sendo detectadas na Europa (Grécia, Reino Unido, Bélgica, Espanha, Itália, Hungria) e algumas regiões asiáticas, como Taiwan, China e Coréia do Sul.⁽⁴⁸⁾ Na América Latina, VIM-2 foi descrita em espécies de *Enterobacteriaceae* como *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *P. rettgeri* e *E. cloacae* na Argentina, México e Venezuela.^(57,65)

- NDM (*New Delhi metallo-β-lactamase*)

A metalo-betalactamase NDM foi descrita no ano de 2008, em *E. coli* e *K. pneumoniae* isolados de um paciente sueco hospitalizado anteriormente em Nova Deli, Índia. ⁽⁵⁷⁾ Esta carbapenemase é capaz de hidrolisar a maioria dos beta-lactâmicos (incluindo os carbapenêmicos), bem como os inibidores de beta-lactamases (avibactam, clavulanato, sulbactam e tazobactam), mas não monobactam (aztreonam). ⁽⁶⁶⁾

Bactérias produtoras de *bla*_{NDM-1} foram isoladas de pacientes com infecções adquiridas em hospitais e na comunidade no Sul da Ásia (Índia, Paquistão e Bangladesh), e desde então, disseminada mundialmente. ^(48,66) Atualmente, são conhecidas 29 variantes de NDM-1 (<http://www.bldb.eu/Enzymes.php> pesquisado em 04/08/2020). Dentre estas, NDM-1 tem sido isolada em distintas espécies da família *Enterobacteriaceae* incluindo espécies do CEC. ⁽⁶⁷⁾ NDM-4 foi detectada em *E. xiangfangensis* e *E. asburiae*, NDM-7 em *E. hormaechei* de hospitais da Tchecoslováquia e Espanha respectivamente. ^(67,68)

No Brasil, NDM-1 foi identificada pela primeira vez em *Providencia rettgeri* isolada em um hospital do Rio Grande do Sul em 2013. ⁽⁶⁹⁾ Desde então, NDM-1 tem sido relatada esporadicamente em diferentes estados do Brasil, como Rio de Janeiro, Paraná, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, São Paulo, Sergipe, Maranhão e Bahia, e em várias espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *P. rettgeri*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *Citrobacter freundii*. ⁽⁷⁰⁾

2.3 Quinolonas e Fluoroquinolonas

As quinolonas são antimicrobianos cujo primeiro representante, o ácido nalidíxico é uma naftiridina isolada pela primeira vez por George Lesher e colaboradores em 1962, como subproduto da síntese de cloroquina (quinina-antimalárico). ⁽⁷¹⁾ Em 1980, foram introduzidas as fluoroquinolonas, assim chamadas devido ao acréscimo de uma molécula de flúor, na região do carbono-6 e um substituinte do anel principal (piperazina ou metil-

piperezina) no carbono-7. ⁽⁷¹⁾ Os principais representantes das fluoroquinolonas são norfloxacin, ciprofloxacina e ofloxacina, apresentando uma farmacocinética e farmacodinâmica aprimoradas, ⁽⁷¹⁾ conforme **figura 4**.

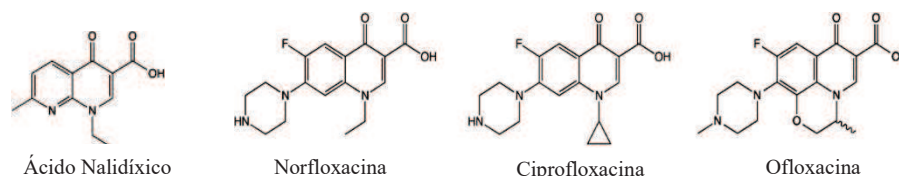


Figura 4. Estrutura química do Ácido Nalidíxico e diferentes fluoroquinolonas. **Adaptado Aldred KJ e colaboradores (2014).**

Estes antimicrobianos, agem inibindo atividade de duas topoisomerases bacterianas essenciais, do tipo II, a DNA Girase e a Topoisomerase IV, tais enzimas heterotetrâmeras compostas por dois pares de subunidades idênticas, GyrA2/GyrB2 e ParC2/ParE2 têm funções fisiológicas distintas. ⁽⁷²⁾ A DNA girase é responsável pelo enovelamento do DNA, essenciais para: (i) definir a densidade super-helicoidal que permite a condensação cromossômica; (ii) diminuir o estresse de torção que se acumula na frente de forquilha de replicação e complexos de transcrição; e (iii) promover a fusão local para o início da transcrição pela RNA polimerase. ⁽⁷²⁾ Já a topoisomerase IV é responsável pela decatenação (separação) dos cromossomos filhos interligados no final da replicação. ⁽⁷²⁾ Como resultado da formação do complexo Quinolona-Topoisomerase-DNA, tem-se inibição da síntese de DNA, o que imediatamente leva à bacteriostase e, eventualmente, à morte celular, ⁽⁷³⁾ conforme **figura 5**.

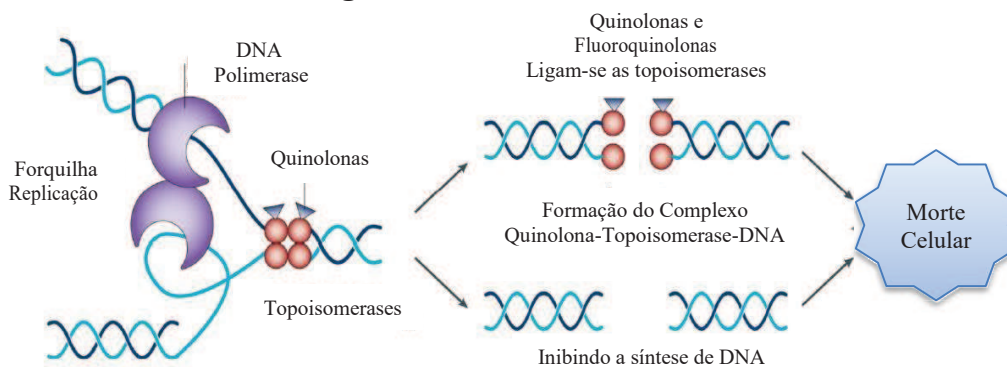


Figura 5. Mecanismo de ação das quinolonas. **Adaptado Kohanski MA e colaboradores (2010).**

A aquisição da resistência bacteriana à quinolonas podem estar associadas com três tipos de mecanismos: (i) mutações cromossômicas que alteram as enzimas alvo e sua afinidade de ligação ao medicamento; (ii) mutações cromossômicas que levam ao acúmulo reduzido de fármacos pela diminuição da captação; e (iii) genes de resistência adquiridos por plasmídeo que produzem proteínas de proteção ao alvo, enzimas modificadoras de medicamentos ou bombas de efluxo ⁽⁷²⁾ conforme **figura 6**.

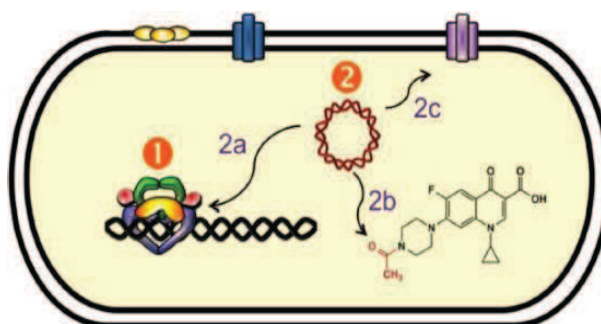


Figura 6. Mecanismos de resistência bacteriana as quinolonas. **(1)** Resistência mediada por alvo (mutações na girase e topoisomerase IV enfraquecem as interações quinolona-enzima). **(2) Resistência mediada por plasmídeo.** **(2a) proteínas Qnr** (amarelo) diminuem a ligação da topoisomerase-DNA e protegem os complexos enzima-DNA da quinolonas. **(2b) Aac(6')-Ib-cr**, acetila o nitrogênio livre no anel C7 de ciprofloxacina e norfloxacina, diminuindo sua eficácia. **(2c) Bombas de efluxo** (QepA/OqxAB) codificadas por plasmídeo diminuem a concentração de quinolonas na célula bacteriana. Adaptado de Aldred KJ e colaboradores (2014).

2.3.1 PMQRs (*Plasmid Mediated Quinolone Resistance*)

A aquisição de genes plasmidiais (PMQR) confere (i) proteção do sítio alvo pelas enzimas Qnr, (ii) alteração do antimicrobiano pela enzima aminoglicosídeo acetiltransferase – cr e (iii) sistemas de efluxo (OqxAB e QepA), conforme **figura 6**. Estes mecanismos são atualmente considerados os principais. ^(74,75)

➤ Enzimas Qnr

As enzimas Qnr (*Quinolone resistance*) fazem parte da família de proteínas pentapeptídeos repetidas (~200 aminoácidos de comprimento) e codificadas pelos genes *qnr*. ⁽⁷²⁾ Até o momento, mais de 100 variantes de Qnr foram identificadas, sendo classificadas em seis famílias distintas: QnrA, QnrB, QnrS, QnrC, QnrD e QnrVC, ^(72,76)

que agem ligando-se à DNA girase e topoisomerase IV inibindo a entrada de quinolonas nos complexos de clivagem formados (Quinolona-Topoisomerase-DNA).⁽⁷¹⁾

➤ **Acetilação de quinolonas - Aac(6')-Ib-cr**

A enzima Aac(6')-Ib-cr (aminoglicosídeo acetiltransferase resistente a ciprofloxacina), descoberta em 2006 é uma variante de aminoglicosídeo acetiltransferase, possui duas alterações de aminoácidos nas posições 102 (Triptofano por Arginina) e 179 (Aspartato por Tirosina) em relação Aac(6')-Ib (responsável pela resistência à tobramicina, canamicina e amicacina).^(72,76)

Esta variante é capaz de acetilar o nitrogênio não substituído do anel de piperazina C7, encontrado em ciprofloxacina e norfloxacina, conferindo assim resistência à quinolona, diminuindo a atividade destes medicamentos.⁽⁷²⁾

➤ **Bombas de Efluxo (QepA e OqxAB)**

Outras proteínas de resistência à quinolonas codificadas por plasmídeo são constituídas por bombas de efluxo: OqxAB, QepA1 e QepA2, sendo que as duas últimas proteínas são encontradas em infecções bacterianas humanas, enquanto OqxAB é visto quase exclusivamente em infecções animais.⁽⁷¹⁾ QepA pertence à transportadores da superfamília do facilitador principal MFS (*Major Facilitator Superfamily*), sendo capaz de eliminar as fluoroquinolonas hidrofílicas (ciprofloxacina e norfloxacina) da célula bacteriana por um mecanismo de efluxo ativo.⁽⁷⁶⁾

OqxAB pertence à família de transportadores de divisão celular por resistência à modulação RND (*Resistance-Nodulation-Division*), possuem uma ampla especificidade de substratos, além da ciprofloxacina, norfloxacina e ácido nalidíxico; também inclui antibióticos tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim, entre outros.^(72,76)

2.4 Aminoglicosídeos

Os aminoglicosídeos (AGs) são um grupo de antibióticos usados principalmente para tratar um amplo espectro de infecções bacterianas. ⁽⁷⁷⁾ Foram descobertos como moléculas produzidas naturalmente por bactérias, em particular *Streptomyces griseus*, precursor da estreptomina que foi introduzida para uso clínico em 1944. ⁽⁷⁸⁾ Nos anos seguintes, vários outros membros desta classe foram introduzidos, incluindo a neomicina (1949, *S. fradiae*), canamicina (1957, *S. kanamyceticus*), gentamicina (1963, *Micromonospora purpurea*), netilmicina (1967, derivada sisomicina), tobramicina (1967, *S. tenebrarius*) e amicacina (1972, derivada canamicina). ⁽⁷⁹⁾

A estrutura geral dos aminoglicosídeos consiste em um núcleo de aminociclitol (2-Deoxestreptamina e Estreptidina) ligado amino-açúcares ⁽⁷⁷⁾ conforme **figura 7**.

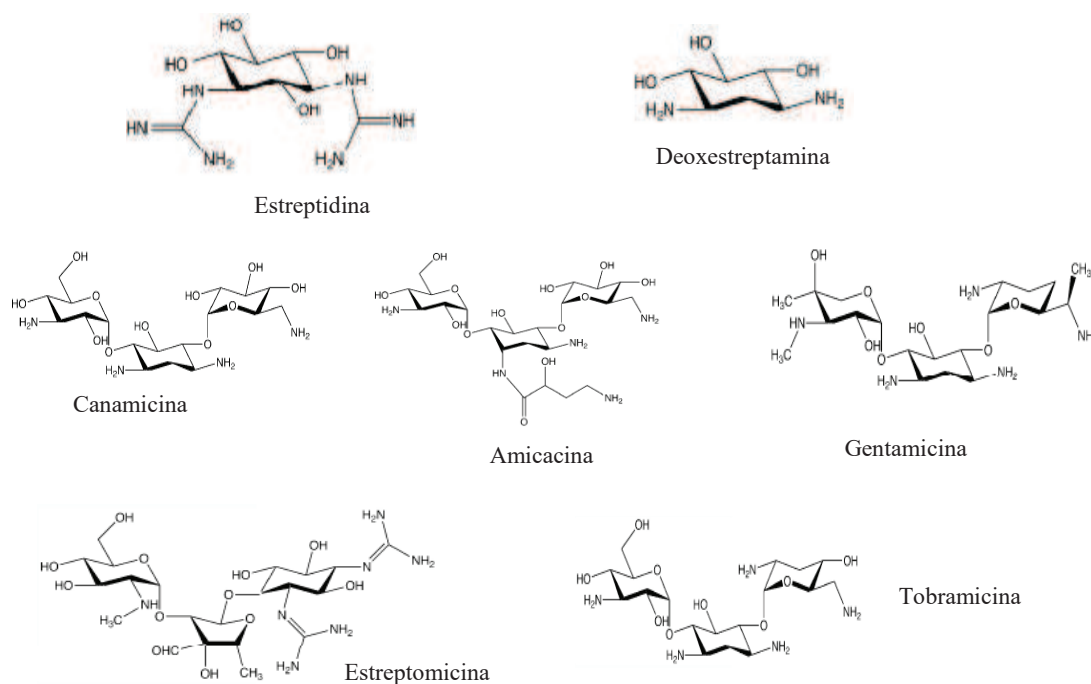


Figura 7. Estrutura química de dois aminociclitol e alguns derivados dos aminoglicosídeos. Adaptado Ramirez MS, Tolmasky ME (2017).

Devido sua natureza policatiónica, os aminoglicosídeos se ligam primeiro aos compostos aniônicos encontrados na superfície bacteriana; no caso de bactérias Gram-

negativas, esses compostos são lipopolissacarídeos (LPS), fosfolipídios e proteínas da membrana externa. ⁽⁷⁷⁾

A captação dos AGs ocorre em duas fases, na primeira, uma quantidade de aminoglicosídeo atravessa a membrana celular e atinge o citoplasma (“fase dependente de energia I”). ⁽⁷⁷⁾ Na segunda fase, (“fase dependente de energia II”) os AGs ligam-se ao sítio A do componente 16S rRNA da subunidade 30s dos ribossomos procarióticos ^(78,79), resultando na síntese de proteínas defeituosas que são inseridas na membrana celular. ⁽⁷⁷⁾ Como consequência, o acúmulo de proteínas aberrantes produzidas ao longo do tempo leva à morte celular bacteriana ⁽⁷⁷⁾ conforme **figura 8**.

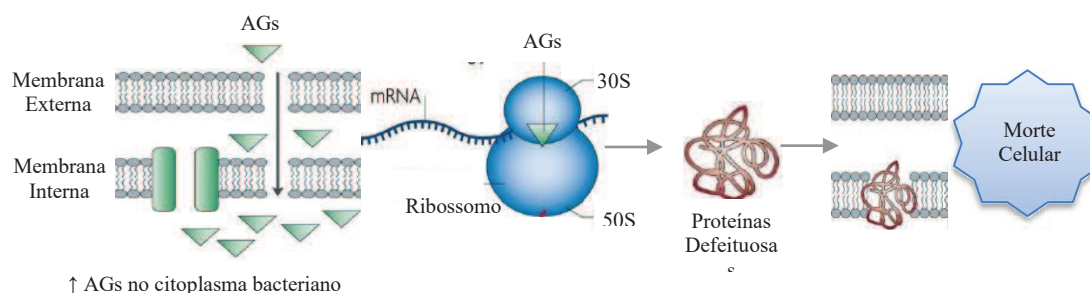


Figura 8. Mecanismo ação dos Aminoglicosídeos. Adaptado Kohanski MA e colaboradores (2010).
AGs: Aminoglicosídeos, ↑: Aumento, mRNA: RNA mensageiro

A resistência aos aminoglicosídeos pode ocorrer com base em vários mecanismos:

(i) modificação enzimática e inativação dos aminoglicosídeos, mediados pelas acetiltransferases, nucleotidiltransferases ou fosfotransferases; (ii) aumento do efluxo; (iii) permeabilidade reduzida; e (iv) modificações da subunidade ribossômica 30S que interferem na ligação dos aminoglicosídeos ⁽⁸⁰⁾ No entanto, serão abordados nesta revisão a produção de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs – *aminoglycoside modifying enzymes*) e produção das metiltransferases 16S rRNA.

2.4.1 AMEs (*Aminoglycoside Modifying Enzymes*)

As enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs) catalisam a modificação nos grupos hidroxila (OH) ou amina (NH₂) do núcleo 2-desoxistreptamina ou nas porções de amino-açúcares dos AGs. ⁽⁸¹⁾ São classificadas em três famílias: aminoglicosídeos fosfotransferases (APHs- *Aminoglycoside O-Phosphotransferases*), acetiltransferases (AACs- *Aminoglycoside N-Acetyltransferases*) e as nucleotidiltransferases (ANTs- *Aminoglycoside O-Nucleotidyltransferases*). ⁽⁷⁹⁾

São divididas em subtipos de acordo com a posição que a enzima é modificada no aminoglicosídeo, seguido por um número romano e, em alguns casos, uma letra quando existem várias enzimas que modificam a mesma posição. ⁽⁷⁹⁾

As AMEs são encontradas em plasmídeos, transposons e integrons, contendo múltiplos elementos de resistência, incluindo outras AMEs ou β-lactamases. ^(79,82)

➤ Aminoglicosídeos N-acetiltransferases (AACs)

As AACs compreendem o maior grupo de AMEs, acetilam os grupos amina encontrados em várias posições na molécula dos aminoglicosídeos, em uma reação dependente de acetil-CoA ⁽⁷⁹⁾ conforme figura 9.

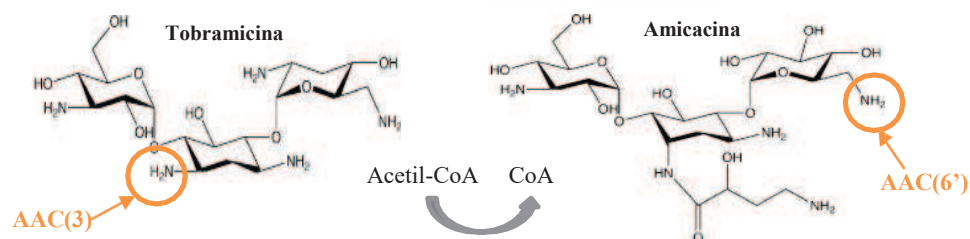


Figura 9. Sítio de Ação das principais Aminoglicosídeos Acetiltransferases (AACs). **Adaptado Krause KM e colaboradores (2016); Becker B e Cooper MA (2013).**

Existem quatro classes e um número de subclasses de AACs: AAC(1), que não possui subclasses, AAC(3)-I a X, AAC(2')-I e AAC(6')- I e -II. ⁽⁸²⁾ AAC(3) tem como alvo os grupos amina encontrados nas posições 1 e 3, do anel 2-desoxistreptamina ⁽⁷⁹⁾, sendo que AAC(3)II modifica gentamicina, tobramicina e neomicina. ^(81,82)

A enzima mais relevante entre AACs é provavelmente AAC(6'), onde a subclasse AAC(6')-Ib está presente em mais de 70% das bactérias Gram negativas de isolados clínicos, agindo na maioria dos AGs utilizados, com exceção da gentamicina. ⁽⁸²⁾

Geralmente AAC (6')-Ib está associada aos genes de resistência à quinolona, como *qnrA*, *qnrB2*, *qnrB4*, *qnrB6*, *qnrB10*, *qnrS1*, *qnrS2* e *qepA* ou β -lactamases, como *bla*_{CTX-M-1}, *bla*_{CTX-M-14}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-24}, *bla*_{DHA-1}, *bla*_{SHV-12} e *bla*_{KPC-2}. ⁽⁸¹⁾

➤ Aminoglicosídeos Fosfotransferases (APHs)

O segundo maior grupo de AMEs são as APHs, agem como quinases (serina-treonina e tirosina-quinases), onde catalisam a fosforilação dependente de ATP de grupos hidroxila (OH) encontrados nos aminoglicosídeos ⁽⁷⁹⁾ conforme **figura 10**.

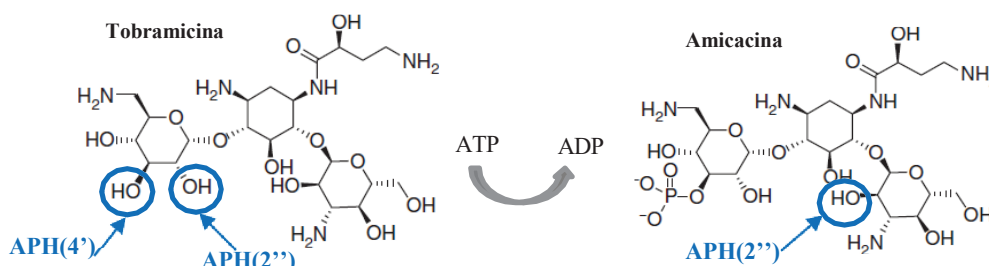


Figura 10. Sítio de Ação de alguns Aminoglicosídeos fosfotransferases (APHs). Adaptado Krause KM e colaboradores (2016); Becker B e Cooper MA (2013).

As modificações feitas por essas enzimas diminuem afinidade de ligação ao alvo, desta maneira, diminuindo o potencial de ligação de hidrogênio dos grupos hidroxilados aminoglicosídeo ao sítio A do ribossomo. ^(79,82) As classes e subclasses de APHs são: APH (4)-I, APH (6)-I, APH (9)-I, APH (3')-I a VII, APH (2'')-I a -IV, APH (3'')-I e APH (7'')-I. ⁽⁸²⁾ As principais subclasses são: APH (3')-I e APH (3')-VI amplamente distribuídas entre bactérias Gram-negativas, atuando em canamicina e neomicina. ^(81,82)

➤ Aminoglicosídeos Nucleotidiltransferases (ANTs)

O último grupo de AMEs são ANTs. ⁽⁷⁹⁾ Essas enzimas agem catalisando (adicionando) a transferência de um grupo AMP do ATP doador aos grupos hidroxila nas posições 2'', 3'', 4', 6 e 9 ^(79,82) nas moléculas dos aminoglicosídeos conforme **figura 11**.

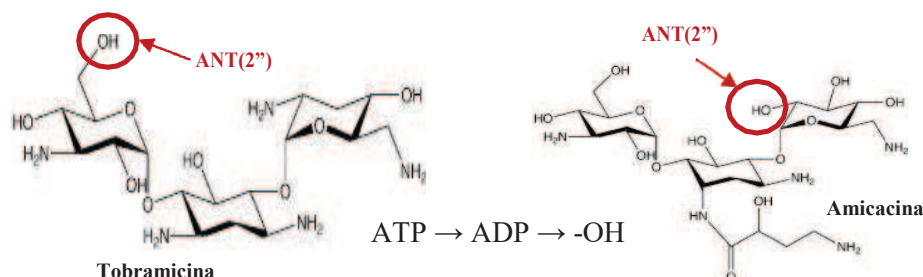


Figura 11. Sítio de Ação de alguns Aminoglicosídeos nucleotidiltransferases (ANTs). **Adaptado de Becker B e Cooper MA (2013).**

Embora sejam a menor família das AMEs em número, as ANTs são de importância clínica significativa, principalmente ANT(2'') que age em tobramicina e gentamicina, ANT(4') age na tobramicina e amicacina, e ambas enzimas agem em canamicina. ^(79,82) A enzima ANT(2'')-Ia está amplamente distribuídas entre as enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose. ⁽⁸¹⁾

2.4.2 16S rRNA Metiltransferases

As enzimas 16S rRNA metiltransferases (16S-RMTases) atuam em uma estrutura complexa formada pelo 16S RNA e ribonucleoproteínas na subunidade ribossomal 30S bacteriana, responsável pela tradução do RNA mensageiro (mRNA). ⁽⁸³⁾ Duas posições estão envolvidas na metilação do 16S rRNA, desta maneira as 16S-RMTases foram subclassificadas em dois grupos, as N7-G1405 16S-RMTases e as N1-A1408 16S-RMTases, dependendo da posição do nucleotídeo a ser modificado no sítio A do 16S rRNA ⁽⁸⁴⁾ conforme **figura 12**.

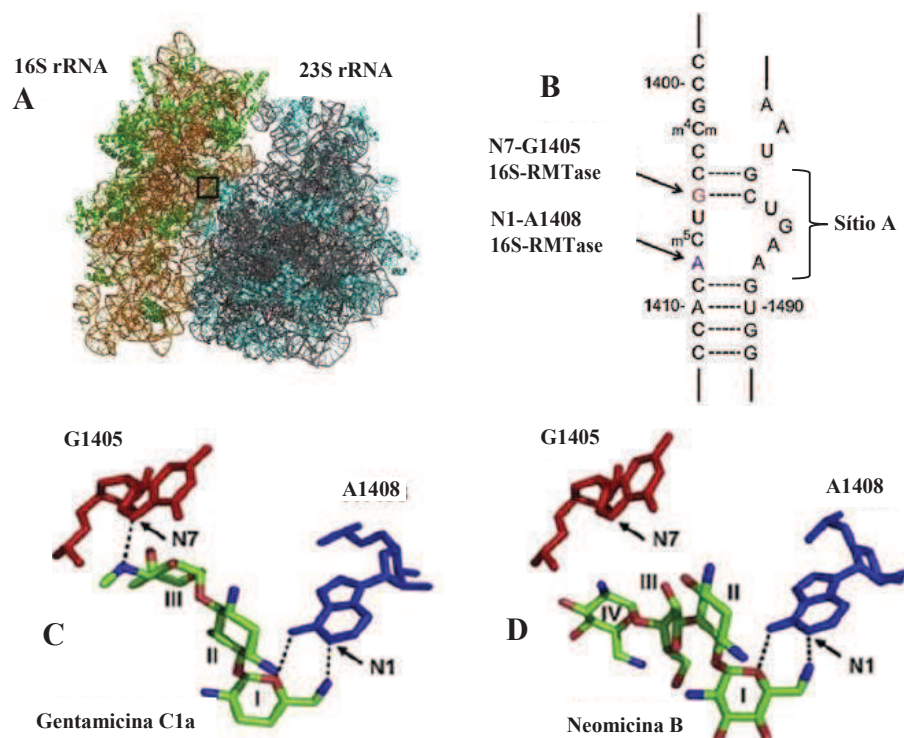


Figura 12. Sítios de metilação no 16S rRNA, que levam a diferentes fenótipos de resistência. (A) Estrutura do ribossomo 70S da *E. coli* contendo 16S rRNA (laranja), 23S rRNA (cinza) e proteínas ribossômicas (verde e azul). A ligação da gentamicina com o 16S rRNA está sendo mostrada com um quadrado. (B) Região decodificadora do Sítio A no 16S rRNA. (C e D) Estruturas dos complexos entre aminoglicosídeos (Gentamicina C1a e Neomicina B) e nucleotídeos G1405 e A1408 no 16S rRNA. As linhas tracejadas indicam prováveis ligações de hidrogênio. **Adaptado de Wachino J, Arakawa Y (2012).**

A introdução de um grupo metil nos nucleotídeos A1408 e G1405 causa um distúrbio na ligação entre o nucleotídeo e o aminoglicosídeo, reduzindo a afinidade do antimicrobiano pelo seu sítio alvo. ^(80,84)

A maioria dos genes que codificam as 16S-RMTases estão localizados em transposons dentro de plasmídeos transferíveis, podendo se disseminar para outras espécies bacterianas. ⁽⁸⁵⁾ Até o momento, foram identificadas dez 16S-RMTases: ArmA, RmtA, RmtB, RmtC, RmtD, RmtE, RmtF, RmtG, RmtH e NpmA que estão distribuídas mundialmente. ⁽⁸⁰⁾ No Brasil, as enzimas 16S-RMTases foram descritas em algumas espécies de enterobactérias, como RmtB em *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Klebsiella pneumoniae* associada ao gene *bla*_{KPC-2}, RmtD2 e RmtG associadas aos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-59} em *K. pneumoniae*. ⁽⁸⁶⁻⁸⁸⁾ Em espécies do CEC, ArmA

estava associada ao gene *bla*_{NDM-1} em estudo realizado em 2013 em hospitais do Rio de Janeiro. ⁽⁵⁹⁾

2.5 Elementos genéticos móveis e sua associação com resistência bacteriana

A bactérias capturam, acumulam e disseminam genes de resistência em grande parte devido ações de elementos genéticos móveis (EGM), que promovem a mobilidade intracelular do DNA (do cromossomo à um plasmídeo ou entre plasmídeos), ou aqueles que permitem a mobilidade intercelular do DNA. ⁽⁸⁹⁾

Os EGMs podem ser divididos em dois grupos: intracelulares ou elementos transponíveis que incluem transposons (Tn), sequências de inserção (IS) e integrons (In); bem como intercelulares de troca genética como conjugação / mobilização (mediada por plasmídeos e elementos conjugativos integrativos-ECI), transdução (por bacteriófagos) e transformação (captação de DNA extracelular). ^(89,90)

As interações entre os vários tipos de EGMs sustentam a rápida evolução de diversos patógenos multirresistentes diante dos antimicrobianos. ⁽⁸⁹⁾

2.5.1 Plasmídeos

Os plasmídeos são moléculas de DNA circular extracromossômicos que se replicam de forma independente do genoma bacteriano, sendo a transferência horizontal de plasmídeos essencial para disseminação de diferentes genes de resistência aos antimicrobianos e virulência. ⁽⁹¹⁻⁹⁴⁾

Podem ser classificados baseando-se em diferentes critérios: número de cópias na célula, tamanho do plasmídeo, faixa de bactérias hospedeiras, grupo de incompatibilidade e capacidade de transferências entre células bacterianas. ⁽⁹⁴⁾ A capacidade que um plasmídeo possui de se transferir de uma célula bacteriana para outra permite distingui-lo em: conjugativo, mobilizável e não conjugativo. ⁽⁹⁴⁻⁹⁶⁾

Os plasmídeos conjugativos são assim denominados pois codificam todas as funções necessárias para sua transferência, através de dois conjuntos de sistemas: (i) MOB (mobilidade) formado por *oriT* (proteína de transferência), relaxases (proteínas iniciadoras de replicação), T4CP (proteína de acoplamento) e (ii) MPF (*Mating Pair Formation*) responsável pelo sistema de secreção do tipo 4 (T4SS).^(95,96)

Os mobilizáveis possuem apenas o sistema MOB, que codificam proteínas *oriT*, relaxases e raramente T4CP, sendo, portanto, dependente de um plasmídeo conjugativo,⁽¹⁰⁴⁾ conforme mostra **figura 13**. Já os não conjugativos são desprovidos das características de conjugação e mobilização.⁽⁹⁷⁾

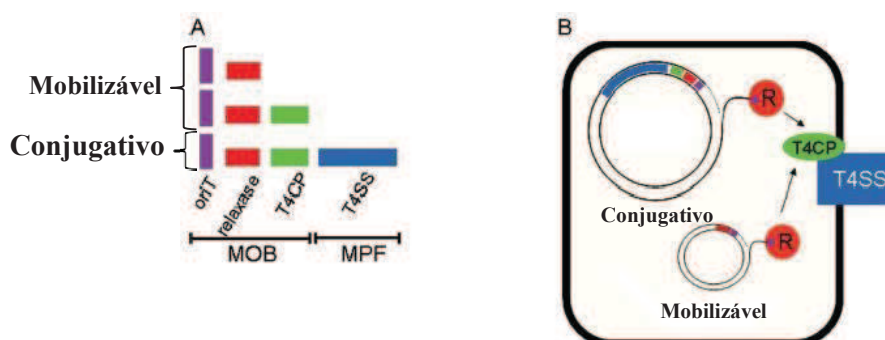


Figura.13 Esquema da constituição genética de plasmídeos transmissíveis. A- Os plasmídeos conjugativos codificam os quatro componentes: (*oriT*) (violeta), relaxase (R) (vermelha), proteína de acoplamento (T4CP) (verde) e sistema de secreção do tipo IV (T4SS) (azul). Os plasmídeos mobilizáveis contém apenas sistema MOB (com ou sem o T4CP) e precisam do MPF de um plasmídeo conjugativo para se tornar transmissível por conjugação. B- Esquema de algumas interações essenciais no processo de conjugação. Adaptado de Smillie C e colaboradores (2010)

Outra forma de classificar os plasmídeos são, por grupos de incompatibilidade (Inc), fundamentado na sua estabilidade durante a conjugação.⁽⁹²⁾ Desta maneira, plasmídeos com o mesmo controle de replicação são incompatíveis, enquanto plasmídeos com controle de replicação diferentes são compatíveis.⁽⁹³⁾ Assim, incompatibilidade é definida como a incapacidade de plasmídeos que compartilham sistemas de replicação e partição semelhantes, serem propagados de maneira estável na mesma linhagem celular.⁽⁹⁸⁾ Portanto, a organização dos plasmídeos em grupos Inc é um importante recurso para

analisar a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes que carregam genes de resistência antimicrobiana. ⁽⁹²⁾

2.5.2 Transposons, Sequências de inserção e Integrons/cassete gênico

Os elementos transponíveis ou transposons (Tns) são elementos genéticos que podem se mover no genoma bacteriano através da ação da enzima transposase (Tnp), responsável pelo mecanismo de transposição. ⁽⁹⁹⁾ Em diferentes bactérias é comum a detecção de um mesmo transposon, pressupondo desta forma uma intensa troca de material genético entre células bacterianas. ⁽¹⁰⁰⁾ Os elementos transponíveis são divididos em: Tns compostos, Tns não compostos e sequências de inserção (ISs). Os Tns compostos são flanqueados pelas ISs. ⁽⁸⁹⁾ Já os Tns não compostos também denominados de família Tn3, são flanqueados por IRs (*sequences of inverted repeats*- sequências repetidas invertidas), portadores dos genes *tnpA* (codifica Tnp) e *tnpR* (codifica Rvase e suprime a expressão Tnp), e apresentam um local de recombinação (*res*), podendo causar mutações e, portanto, importante na disseminação da resistência aos antibióticos. ⁽⁹⁹⁾

As ISs são geralmente pequenos elementos móveis com ~2500pb, que são transferidos entre os genomas bacterianos pela codificação de um ou dois genes transposase (*tnp*). ^(89,99) Possuem 15 famílias, sendo diferenciadas com base em similaridade genética, tipos Tnp e IRs. ⁽⁹⁹⁾ A IS26 (pertencente à família IS6), é uma importante sequência de inserção na resistência aos antibióticos encontradas em Tns compostos como em Tns não compostos (pois são flanqueadas por sequências IRs através da Tnp) em bactérias Gram-negativas. ⁽⁹⁹⁾

Os integrons são sequências de DNA fita dupla conservadas que permitem as bactérias evoluírem rapidamente pela aquisição, armazenamento, excisão e reordenação, através dos cassetes gênicos, por recombinação específica do local. ^(101,102)

Integrans e cassetes gênicos são imobilizáveis, mas quando localizados em plasmídeos transferíveis podem se disseminar entre diferentes espécies bacterianas. ⁽¹⁰¹⁾

São constituídos por (i) gene que codifica integrase (*IntI*) um tipo de tirosina recombinase responsável pela integração e excisão dos cassetes, (ii) *attI* (receptor para integração de cassetes genéticos por recombinação específica) reconhecida pela *IntI*; (iii) um promotor (Pc) que pode estar dentro de *IntI* ou entre *IntI* e *attI* necessário para a transcrição e expressão de cassetes de acordo com a **figura 14**, e (iv) *attC* genes de recombinações associados. ^(101,102) Os integrans de resistência aos antimicrobianos são classificados como integrans de classes I. ⁽¹⁰²⁾

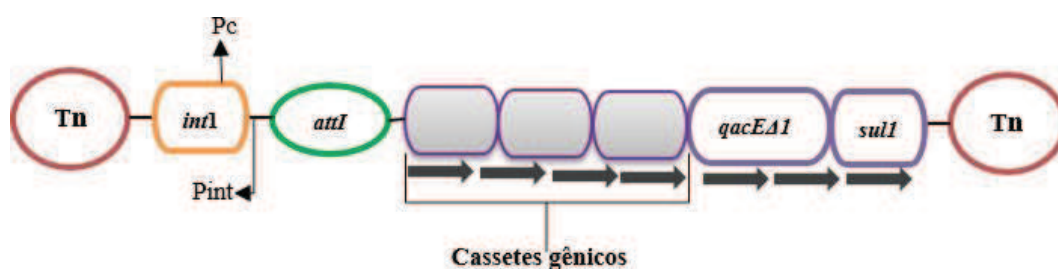


Figura 14. Esquema representativo do Integron dentro de transposons (Tn) contendo genes de resistência. O *intI* e o *attI* são importantes para ligação e integração dos cassetes genéticos. A resistência às sulfonamidas e aos compostos de quaternário de amônio foram codificados pelos genes *sulI* e *qacEA1*, respectivamente. Os quadrados cinza mostram os cassetes genéticos com diferentes funções. O Pint e o Pc são promotores de integrase (*intI*) e cassetes genéticos. Adaptado de Akrami F e colaboradores (2019).

2.5.3 Contexto genético dos genes 16S rRNA metiltransferases, KPC e BKC

Os EGMs que albergam genes das 16S-RMTases, juntamente com outros genes de resistência antimicrobiana, tem sido associado com vários plasmídeos conjugativos pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade como IncL/M, IncFII, IncA/C, IncN entre outros. ⁽¹⁰³⁾

Entre as 16S-RMTases, as que estão em integrans de classe 1 são ArmA, RmtE e RmtF. ⁽⁸⁰⁾ Sendo que, o gene *armA* está associado *ISCRI* e aos genes *dhfrA12* (resistência ao trimetoprim), *aadA2* (resistência à estreptomicina), *sulI* (resistência à sulfonamida) e *mph2* (resistência a macrolídeos); enquanto *rmtE* albergam *bla_{CMY-2}*, *rmtF* e *rmtC* estão

em conjunto com a carbapenemase *bla*_{NDM-1}.⁽⁸⁰⁾ O gene *rmtC* pode estar adjacente a *ISEcp1* em um plasmídeo não conjugativo, e associado *armA* e *rmtB*.⁽⁸⁰⁾ Já *rmtB* está frequentemente relacionado com *bla*_{TEM-1a} em Tn3 ou *bla*_{TEM-1b} em Tn2, e em plasmídeos IncFII carreando genes que codificam carbapenemases.⁽¹⁰⁴⁾

O ambiente genético de *rmtD1* em *K. pneumoniae* é composto pela IS26 flanqueada, o que pode facilitar a disseminação deste gene pela recombinação mediada por este elemento genético; enquanto *rmtD2* em outros isolados da mesma espécie bacteriana está flanqueado por ISCR3, onde os genes *aac(6')-Ib*, *ant(3'')-Ia*, *qacEΔ1* e *sulI* presentes são componentes do integron de classe 1, porém com ausência do gene *intI1* devido inserção de Tn3.⁽¹⁰³⁾ O gene *rmtG* também detectado em *K. pneumoniae* é flanqueado *downstream* pela IS*Vsa3*.⁽⁸⁰⁾

Na maioria das vezes os genes *bla*_{KPC} estão localizados no transposon Tn4401, sendo flanqueados pelas sequências de inserção IS*Kpn7* e IS*Kpn6*, juntamente com os genes *tnpA* e *tnpR* (resorvase).⁽¹⁰⁵⁾ O Tn4401 possui três variantes, onde Tn4401a difere de Tn4401b por uma deleção de 100pb; enquanto Tn4401c do segundo transposon por uma deleção de 200pb.⁽¹⁰⁵⁻¹⁰⁷⁾

Em relação ao gene *bla*_{BKC}, é geralmente transportado por um plasmídeo IncQ de 10 Kb e associado a IS*Kpn23*, uma sequência de inserção pertencente à família IS1380, no entanto, esse gene de resistência foi caracterizado até o momento em *Klebsiella pneumoniae*.⁽⁵⁵⁾

2.6 Sequenciamento do genoma completo dos tipos: segunda e terceira gerações

O sequenciamento de nova geração (*Next Generation Sequencing*- NGS) levou a vários avanços importantes na pesquisa de doenças humanas, detecção de mutação em câncer, metagenômica e evolução da agricultura e biologia.⁽¹⁰⁸⁾

O sistema MiSeq foi lançado pela Illumina[®] (San Diego, CA) em 2011 como um sequenciador de bancada compacto, usando a tecnologia de sequenciamento por síntese (*sequencing-by-synthesis-SBS*).⁽¹⁰⁸⁾

O sequenciamento por MiSeq favorece análise de várias amostras, podendo ser carregadas na célula de fluxo de oito faixas para análise simultânea, o que facilita o acesso às enzimas, garantindo alta estabilidade e baixa ligação não específica de nucleotídeos marcados com fluorescência.⁽¹⁰⁹⁾ A amplificação em fase sólida cria até 1.000 cópias idênticas de cada molécula da amostra (diâmetro de um micron ou menor). Como esse processo não envolve fotolitografia, manchas mecânicas ou posicionamento de esferas em poços, são alcançadas densidades da ordem de dez milhões de aglomerados de uma única molécula por cm^2 (**figura 15**).⁽¹⁰⁹⁾

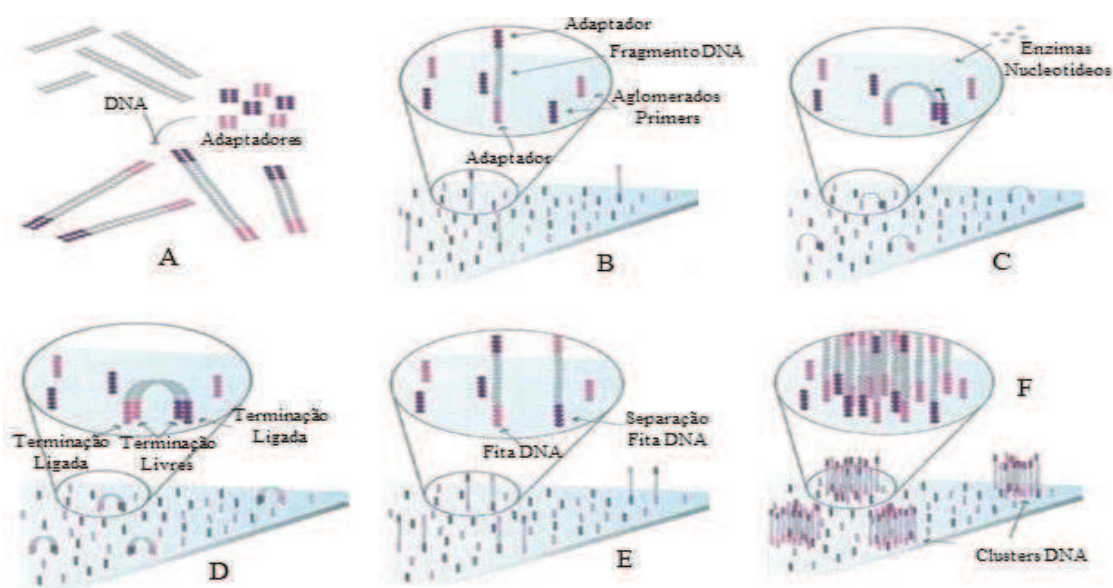


Figura 15. Amplificação da fase sólida por MiSeq. **A:** Os adaptadores ligam-se em ambas extremidades dos fragmentos de DNA. **B:** Ligação do DNA de fita simples na superfície interna dos canais das células de fluxo. **C:** Adição de nucleotídeos e enzimas não marcadas para iniciar amplificação da ponte de fase sólida. **D:** A enzima incorpora nucleotídeos para construir pontes de fita dupla no substrato da fase sólida. **E:** A desnaturação deixa amostras de fita simples ancoradas no substrato. **F:** Milhões de Clusters DNA de fita dupla em cada canal da célula de fluxo. Adaptado de https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf.

A tecnologia SBS utiliza quatro nucleotídeos marcados com fluorescência para sequenciar as dezenas de milhões de *clusters* paralelos de DNA na superfície da célula de fluxo (figura 16).⁽¹⁰⁹⁾

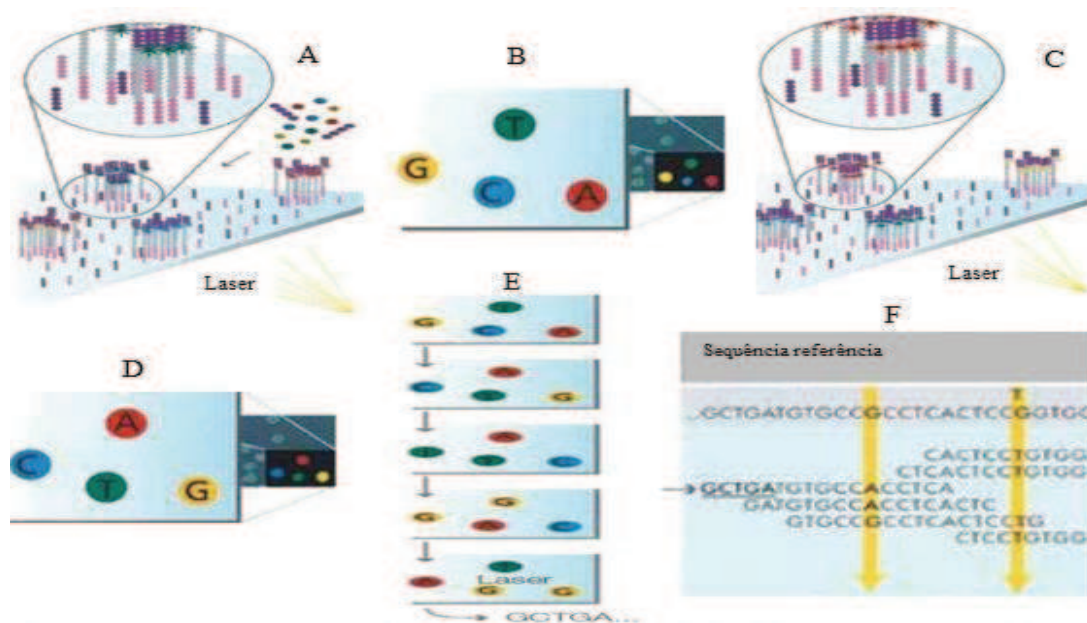


Figura 16. Sequenciamento por síntese utilizando fluorescência. **A:** O primeiro ciclo de sequenciamento tem início na adição de quatro terminadores reversíveis marcados, primers e DNA polimerase. **B:** Após a excitação a laser, a fluorescência emitida de cada cluster é capturada e a primeira base é identificada. **C:** O próximo ciclo repete a incorporação de quatro terminadores reversíveis marcados, primers e DNA polimerase. **D:** Após a excitação do laser, a imagem é capturada como anteriormente e a identidade da segunda base é gravada. **E:** Os ciclos de sequenciamento são repetidos para determinar a sequência de bases em um fragmento, uma base por vez. **F:** Os dados são alinhados e comparados a uma sequência referência e as diferenças de sequenciamento são identificadas.

Adaptado de https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

Durante cada ciclo de sequenciamento, um único desoxinucleosídeo trifosfato (dNTP) marcado é adicionado à cadeia de ácido nucléico.⁽¹⁰⁹⁾

O nucleotídeo marcado serve como um terminador para a polimerização, portanto, após cada incorporação de dNTP, o corante fluorescente é criado para identificar a base, e depois clivado enzimaticamente para permitir a incorporação do próximo nucleotídeo.

⁽¹⁰⁹⁾ Como os quatro dNTPs reversíveis ligados ao terminador (A, C, T, G) estão presentes como moléculas únicas e separadas, a competição natural minimiza o viés de incorporação.⁽¹⁰⁹⁾

O ponto de partida é feito diretamente a partir das medições da intensidade do sinal durante cada ciclo, o que reduz significativamente as taxas de erro bruto em comparação com outras tecnologias. ⁽¹⁰⁹⁾ O resultado final é um sequenciamento, base por base altamente preciso, que elimina erros específicos do contexto de regiões de sequência repetitiva e dentro de homopolímeros. ⁽¹⁰⁹⁾

A abordagem do sequenciamento Illumina é construída em torno de uma enorme quantidade de leituras de sequências em paralelo. ⁽¹⁰⁹⁾ Cada base de leitura bruta possui um *score* de qualidade atribuída, para que o *software* possa aplicar um fator de ponderação nos diferentes *scores* de confiança gerados. ⁽¹⁰⁹⁾ O *software* de coleta de dados Illumina permite que os usuários alinhem sequências a uma referência em aplicativos de sequenciamento de novas imagens. ⁽¹⁰⁹⁾ O sequenciamento de segunda geração (SSG) conquistou o mercado devido à sua capacidade de produzir um enorme volume de dados. ⁽¹¹⁰⁾ No entanto, o SSG por MiSeq possui uma desvantagem em relação a leituras curtas produzidas (100 a 400 pb), o que levam a montagens altamente fragmentadas quando se trata de genomas maiores pela plataforma *de novo*, devido a dificuldades na resolução de sequências repetitivas no genoma. ^(110,111)

Por outro lado, existem três melhorias importantes nas plataformas de sequenciamento de terceira geração (STG): (i) aumento no comprimento da leitura de dezenas de bases para dezenas de milhares de bases por leitura; (ii) redução do tempo de sequenciamento de dias para horas (ou minutos para aplicativos em tempo real); e (iii) redução ou eliminação de vieses de sequenciamento introduzidos por amplificação por PCR. ⁽¹¹⁰⁾

O representante do STG lançado em 2014, foi o dispositivo MinION da Oxford Nanopore Technologies (ONT), de Oxford, Reino Unido. ⁽¹¹⁰⁾ Este dispositivo pode ser

conectado diretamente a uma porta USB3 padrão em um computador com poucos requisitos de *hardware* e configuração simples (**figura 17**).

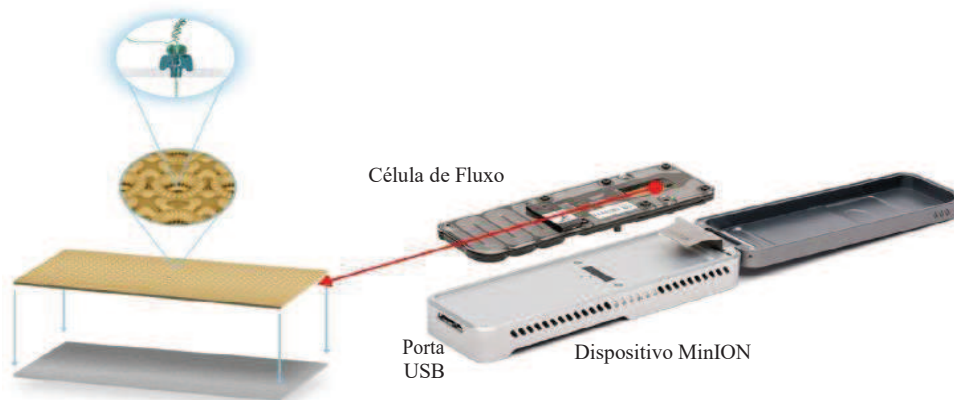


Figura 17. Dispositivo MinION para sequenciamento. O sequenciamento de DNA é realizado adicionando a amostra à célula de fluxo. Quando moléculas de DNA passam através ou perto do nanoporo, haverá uma mudança na magnitude da corrente no nanoporo, que é medida por um sensor. Os fluxos de dados são transmitidos para o *software* que geram os dados a nível de sinal ASIC e o MinKNOW, ASIC circuito integrado específico da aplicação. Adaptado de Lu H et al (2016).

Podendo ser usado para o sequenciamento, o Windows 7 ou 8, um computador com um SSD (*solid-state drive*) de 8 GB de RAM e mais de 128 GB de espaço em disco rígido. O *software* especializado chamado MinKNOW é executado no computador ao qual o MinION está conectado. ⁽¹¹⁰⁾

O princípio do MinION baseia-se no reconhecimento de uma alteração da corrente elétrica em uma proteína nanopore. Quando uma fita de DNA está dentro dos nanoporos, os nucleotídeos induzem uma mudança na corrente elétrica basal. ⁽¹¹¹⁾

Esse padrão de perturbação da corrente elétrica é específico para os kmers (unidade de medida) e é reconhecido pelos sensores e traduzido em uma sequência de nucleotídeos por um algoritmo (**figura18**). As *Base-calling** podem ser realizadas em movimento ou após o sequenciamento. Uma conexão online também é opcional; assim, o sequenciamento pode ocorrer em isolamento. ⁽¹¹¹⁾

**Base-calling* é a determinação de cada nucleotídeo baseado em um cromatograma/ou pico elétrico característico. Baseando-se nas características fornecidas pelo aparelho.

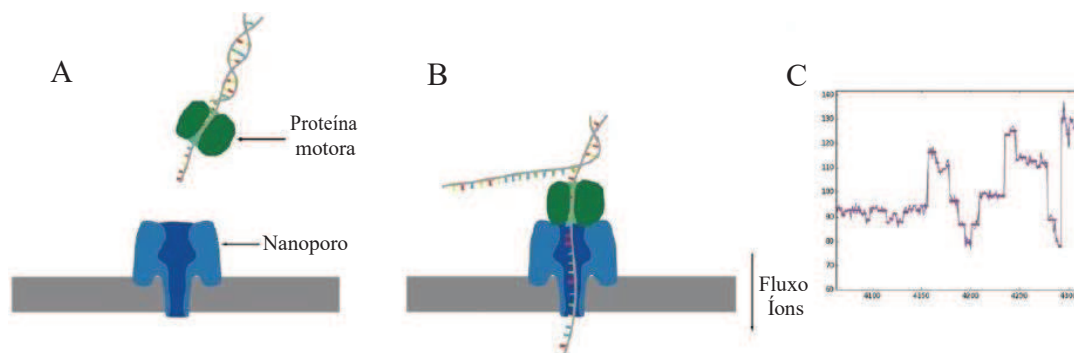


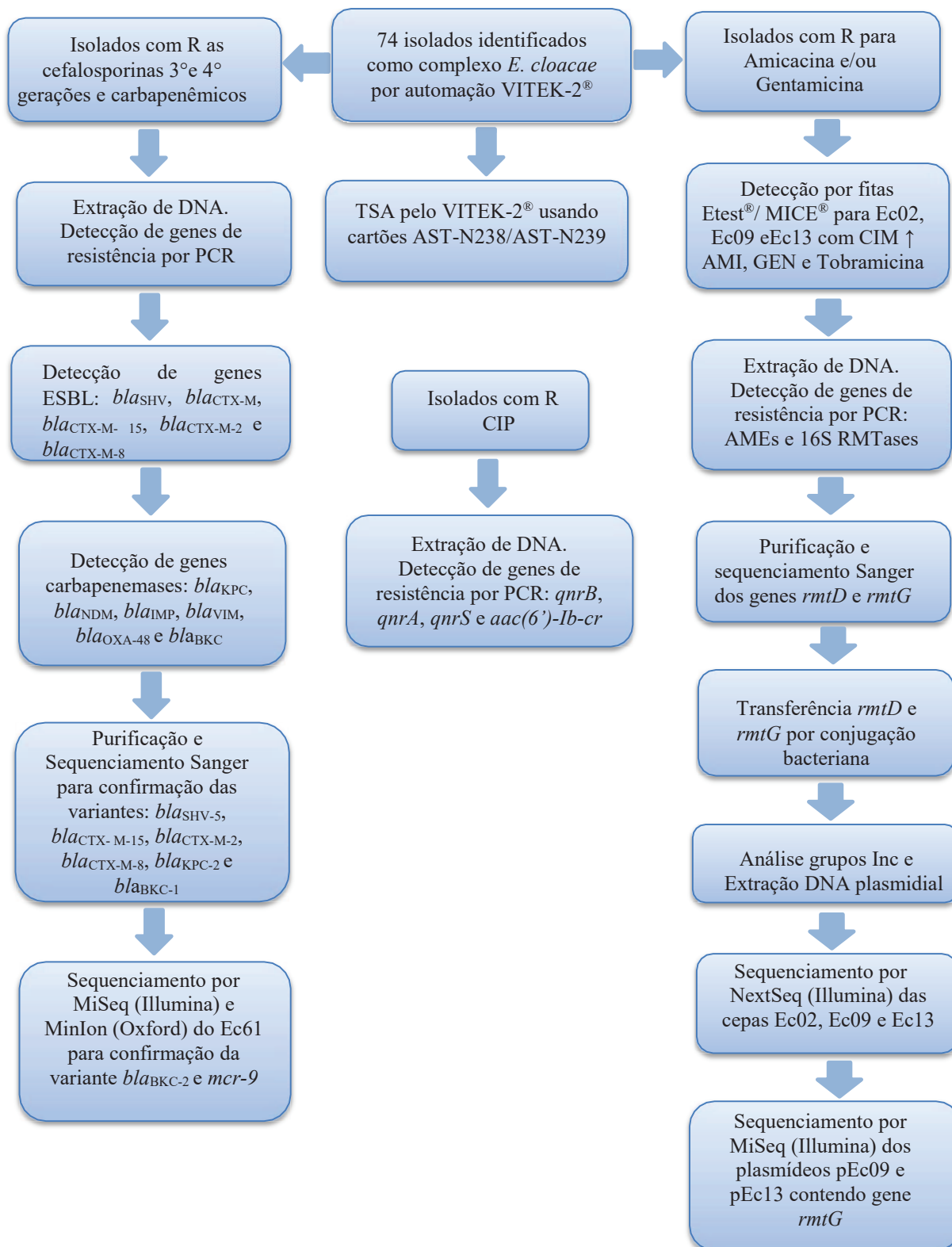
Figura18. Sequenciamento por nanoporos. **A:** Nanoporos biológicos são inseridos em uma membrana sintética eletricamente resistente. Um potencial é aplicado através da membrana, resultando em fluxo de íons. As moléculas de DNA da biblioteca possuem adaptadores com estruturas alifáticas (não mostradas) que se localizam preferencialmente na membrana para uma concentração localizada da biblioteca. **B:** A proteína motora ligada ao outro adaptador acopla-se ao poro e passa a molécula de DNA através dele. **C:** As bases nos nanoporos causam rupturas na corrente, características de sua sequência. Em alguns *base-calling*, o sinal é ainda mais refinado para eventos que correspondem distintos poros. Adaptado de Leggett e Clark (2017).

A exclusão de lasers e fluorescência, que são comumente usados em sequenciadores de DNA tradicionais e de alto rendimento, permite que a tecnologia de STG seja portátil e economize energia. ⁽¹¹¹⁾ Desta maneira, o MinION provou ser muito benéfico nas áreas clínicas, de biossegurança e ambiental. ⁽¹¹²⁾

MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Fluxograma da metodologia usada neste estudo



3.2 Seleção, identificação e determinação do TSA nos isolados bacterianos

Neste estudo, foram incluídas 74 isolados do complexo *Enterobacter cloacae* de amostras biológicas não duplicadas de junho 2013 a outubro 2017, provenientes do setor de microbiologia do Laboratório Central do Hospital de Base (LC-HB) de São José do Rio Preto. Aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da FAMERP (CAAE: 48767315.0.0000.5415).

Os isolados foram selecionados por apresentarem resistência a dois ou mais antimicrobianos de diferentes classes (aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas), e obtidos de pacientes hospitalizados em diferentes unidades de internação como: unidades de terapia intensiva (UTIs), enfermarias e clínicas. As amostras biológicas foram oriundas de diversos locais, incluindo: urina, sangue, aspirado traqueal, lavado bronco-alveolar, cateteres, fragmentos de tecidos para biópsia, secreções de abscessos pós-cirúrgicos, líquido pericárdico, ascítico e sinovial.

A identificação bacteriana e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) foram realizados pela equipe de Microbiologia do LC-HB, no equipamento Vitek-2[®] Compact System (Biomérieux[®], França) utilizando a técnica de microdiluição em caldo automatizada durante a rotina do setor de microbiologia. Os inóculos dos isolados foram preparados pelo método de suspensão direta de colônias, e para isso, 3 mL de solução salina a 0,85% foi distribuída em dois tubos de ensaio, (um tubo utilizado para o teste de identificação e o outro para o TSA).

No tubo utilizado para a identificação foram inoculadas aproximadamente cinco colônias isoladas de culturas puras crescidas em ágar MacConkey (Biomérieux[®], França), e após isso, a turbidez ideal (0,5 na escala de McFarland - $1,5 \times 10^8$ UFC/ml) foi ajustada

com auxílio do densitômetro Densichek™ (Biomerieux®, França). Em seguida, 120 µL dessa suspensão foram adicionados ao tubo utilizado para o TSA.

O cartão de identificação para bacilos Gram-negativos (Biomerieux®, França) foi adicionado ao primeiro tubo e o cartão de antibiograma (AST-N238 e/ou AST-N239) ao segundo tubo. Em seguida, os tubos foram inseridos no equipamento, e após aproximadamente 7 horas de incubação, o resultado da identificação e do antibiograma foram liberados. Os antimicrobianos testados e selecionados para o CEC foram: piperacilina/tazobactam, colistina, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, ertapenem, imipenem, meropenem, amicacina, gentamicina, ácido nalidíxico, ciprofloxacina e norfloxacina. A interpretação do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos foi conduzida de acordo com as recomendações estabelecidas nos documentos vigentes, CLSI (2013- M100-S23) e Nota Técnica 01/2013 da Anvisa. ⁽¹¹³⁻¹¹⁴⁾

Em três isolados do CEC (Ec2, Ec9 e Ec13) foram determinadas a CIM (Concentração Inibitória Mínima) para amicacina, gentamicina e tobramicina, através de tiras contendo gradientes de concentração de drogas (Etest® AB Biodisk, Suécia e M.I.C.Evaluator® Basingstoke, UK).

Para o preparo do inóculo bacteriano, foi feita uma suspensão de colônias isoladas de acordo a metodologia acima citada. A suspensão bacteriana foi semeada em placas com ágar Mueller-Hinton (Oxoid®, Inglaterra) com auxílio de um swab estéril em 3 direções diferentes e, após a absorção do excesso de líquido pelo ágar, foram aplicadas as tiras com auxílio de uma pinça, de acordo com as instruções do fabricante. Após 16-20 horas de incubação foi feita a leitura e interpretação dos testes realizados de acordo com os documentos acima citados. A determinação da CIM foi feita a partir da intersecção da elipse com a escala das tiras de Etest® e M.I.C.Evaluator®. Como controle de

qualidade, foram incluídas nos testes de sensibilidade cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC) de *E. coli* ATCC 25922.

3.3 Armazenamento e manutenção dos isolados bacterianos

Após a realização da identificação e dos TSA, os isolados clínicos resistentes aos aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas e quinolonas foram encaminhados ao Laboratório CIM (Centro de Investigação de Microrganismos) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, SP (FAMERP), onde foram repicados em ágar BHI - *Brain Heart Infusion* (Oxoid[®], Inglaterra) e 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* (Oxoid[®], Inglaterra), a 37° C por 16 a 18 horas. Após este tempo, 0,7 mL de cada cultura foi transferido para criotubos estéreis previamente rotulados, onde foram adicionados 0,3 mL de glicerol 50% estéril. Para cada isolado, o armazenamento foi realizado em duplicata e cada criotubo identificado com 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, espécime de isolamento, unidade de internação e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.4 Extração de DNA Bacteriano

Os isolados armazenados a -80 °C foram reativadas por cultivo em caldo TSB (Oxoid[®], Inglaterra) por 16 a 24 horas a 36±1°C. Em seguida, uma alíquota de 1,5 mL da suspensão bacteriana foi centrifugada a 15000 g por 8 minutos e o sobrenadante descartado, essa massa celular obtida (*pellet*) foi utilizada para a extração do DNA bacteriano. O *pellet* foi homogeneizado em 200 µL de água Milli-Q e submetido à nova

centrifugação a 15000 x g por 5 minutos, em seguida, após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspensionado 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 tampa suspensa 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 250 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 ressuspensionado com 100 µL de tampão TE e 2 µL de RNase (2 µg/mL) (Invitrogen[®], USA) e a amostra de DNA incubada por 30 minutos a 37 °C em termobloco Thermomixer Comfort (Eppendorf). O DNA extraído foi quantificado em ng/µL por espectrofotometria (Nanodrop[®] Spectrophotometer ND 1000/Thermo Scientific, USA) e armazenado em freezer -20 °C para posterior utilização.

3.5 Investigação de genes de resistência por reação em cadeia da polimerase

A primeira etapa da técnica consiste em amplificar os genes de interesse por PCR (*polymerase chain reaction*) *single*, *duplex* ou *multiplex*. Para cada gene (ESBL, carbapenemases, PMQRs, AMEs e 16S RMTases) utilizou-se uma mistura contendo: 2,5µL de tampão para PCR (10X), 1,5 µL de MgCl₂ (2,5mM), 0,2 µL de Taq-DNA polimerase (5U/µL); sendo que, o volume da mistura de nucleotídeos dNTP (2,5mM) e de cada primer F e R (concentração inicial 10µM) foram variáveis e 1,0 µL de DNA, com uma quantidade suficiente para (q.s.p) água ultrapura de 25 µL.

3.5.1 Genes β-lactamases do tipo ESBL

A amplificação dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-2}*, *bla_{CTX-M-15}* e *bla_{CTX-M-8}*, foi feita pela técnica de PCR *single*. Os *primers* utilizados para cada gene estão descritos no quadro 2. O *primer* específico para a detecção do gene *bla_{CTX-M-8}* foi desenhado pela ferramenta online Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos no quadro 3. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo, e como controles positivos, cepas carreadoras dos genes pesquisados e sequenciados, gentilmente cedidas pela Dra. Fernanda Modesto Tolentino Binhardi (IAL/São José do Rio Preto) e Dr. Nilton Lincopan (USP/São Paulo). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 50 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen®, USA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus®, Brasil).

Quadro 2. Descrição dos *primers* utilizados na PCR para amplificação de genes ESBL.

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho fragmento	Referência
SHV F	ATT TGT CGC TTC TTT ACT CGC	1011 pb	115
SHV R	CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC		
CTX-M F	TTT GCG ATG TGC AGT ACC AGT AA	544 pb	116
CTX-M R	CGA TAT CGT TGG TGG TGC CAT A		
CTX-M-2 F	AAA TGT GCT GCT CCT TTC GTG AGC	1122 pb	117
CTX-M-2 R	AGG GTT CGT TGC AAG ACA AGA CTG		
CTX-M-15 F	CAC ACG TGG AAT TTA GGG ACT	1001 pb	118
CTX-M-15 R	GCC GTC TAA GGC GAT AAA CA		
CTX-M-8 F	CGT TAA GCG GAT GAT GCT AAT G	782pb	Deste Estudo
CTX-M-8 R	GGG TGA AGT AAG TGA CCA GAA TAA		

Quadro 3. Condições de corrida utilizadas para amplificação de genes ESBL por PCR.

Gene	Denaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação/Anelamento/Extensão	Extensão final
<i>bla_{SHV}</i>	96°C/5 min	30	96°C/ 30s, 60°C/ 30s, 72°C/ 1min	72°C/5 min
<i>bla_{CTX-M}</i>	94°C/3 min	35	95°C/ 20s, 51°C /30s, 72°C/ 30s	72°C°/5min
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	96°C/3 min	35	95°C/ 30s, 60°C/ 30s, 72°C/ 30s	72°C/5 min
<i>bla_{CTX-M-15}</i>	95°C/3 min	35	95°C/ 20s, 51°C/ 30s, 72°C/ 30s	72°C/5 min
<i>bla_{CTX-M-8}</i>	94°C/2 min	30	94°C/ 15s, 55°C/ 15s, 72°C/ 1min	72°C/ 5min

3.5.2 Genes β -lactamases do tipo carbapenemases

Para investigação dos genes das diferentes classes de carbapenemases (*bla_{KPC}*, *bla_{IMP}*, *bla_{VIM}*, *bla_{NDM}*, *bla_{OXA-48}* e *bla_{BKC}*) foram realizadas PCR *single* e *multiplex*. Os *primers* utilizados para cada gene estão descritos no quadro 4. Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos no quadro 5. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo, e como controles positivos, cepas carreadoras dos genes pesquisados e sequenciados, foram gentilmente cedidas pela Dra. Ana Cristina Gales (EPM-Unifesp/São Paulo). A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 50 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus[®], Brasil).

Quadro 4. Descrição dos *primers* utilizados na PCR para amplificação de genes carbapenemases.

Primer	Sequência (5'→3')	Tamanho fragmento	Referência
KPC F	TGT CAC TGT ATC GCC GTC	1011 pb	119
KPC R	CTC AGT GCT CTA CAG AAA ACC		
IMP F	GAA GGC GTT TAT GTT CAT AC	587 pb	
IMP R	GTA CGT TTC AAG AGT GAT GC		
VIM F	GTT TGG TCG CAT ATC GCA AC	389 pb	
VIM R	AAT GCG CAG CAC CAG GAT AG		
NDM F	GCA GCT TGT CGG CCA TGC GGG C	782 pb	120
NDM R	GGT CGC GAA GCT GAG CAC CGC AT		
OXA-48 F	GCG TGG TTA AGG ATG AAC AC	438 pb	
OXA-48 R	CATCAAGTTCAACCCAACCG		
BKC F	ACA TAA TCT CGC AAC GGG CG	~500 pb	55
BKC R	TCG CCG GTCTTG TTC ATC AC		

Quadro 5. Condições de corrida utilizadas na amplificação de genes carbapenemases por PCR.

Gene	Denaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação/Anelamento/Extensão	Extensão final
<i>bla_{KPC}</i>	94°C/5 min	30	94°C/ 15s, 55°C/ 15s, 72°C/1min	72°C/7 min
<i>bla_{IMP}</i>	95°C/5 min	35	95°C/ 45, 60°C /45s, 72°C /1min	72°C/8 min
<i>bla_{VIM}</i>	95°C/5 min	35	95°C/ 45, 60°C /45s, 72°C /1min	72°C/8 min
<i>bla_{NDM}</i>	95°C/5 min	35	95°C/ 45, 60°C /45s, 72°C /1min	72°C/8 min

<i>bla_{OXA-48}</i>	95°C/5 min	35	95°C/ 45, 60°C /45s, 72°C /1min	72°C/8 min
<i>bla_{BKC}</i>	95°C/5 min	30	95°C/ 45, 60°C /45s, 72°C /1min	72°C/ 7min

3.5.3 Genes PMQR

Para investigação dos genes *qnrA*, *qnrB*, *qnrS* e *aac(6')-Ib-cr* foram realizadas PCR *single*. Os *primers* utilizados para cada gene estão descritos no quadro 6. Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos no quadro 7. Foi utilizada uma reação isenta de DNA como controle negativo, e como controles positivos, isolados carreadores dos genes pesquisados e sequenciados. A eletroforese foi realizada a 100 volts, por 50 minutos. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos. O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus[®], Brasil).

Quadro 6. Descrição dos *primers* utilizados na PCR para amplificação de genes PMQR.

Primers	Sequência (5'→3')	Tamanho fragmento	Referência	
QnrA F	AGA GGA TTT CTC ACG CCA GG	580 pb	121	
QnrA R	TGC CAG GCA CAG ATC TTG AC			
QnrB F	GGM ATH GAA ATT CGC CAC TG	264 pb		
QnrB R	TTT GCY GYY CGC CAG TCG AA			
QnrS F	GCA AGT TCA TTG AAC AGG GT	428 pb		
QnrS R	TCT AAA CCG TCG AGT TCG GCG			
Aac(6')-Ib F	TTG CGA TGC TCT ATG AGT GGC TA	482 pb		122
Aac(6')-Ib R	CTC GAA TGC CTG GCG TGT TT			

Quadro 7. Condições de corrida utilizadas para amplificação de genes PMQR por PCR.

Gene	Denaturação inicial	Nº de ciclos	Desnaturação/Anelamento/Extensão	Extensão final
<i>qnrA</i>	95°C/ 5min	30	95°C/55s, 55°C/ 50s, 72°C/55s	72°C/7 min
<i>qnrB</i>	95°C/ 5min	30	95°C/55s, 55°C/ 50s, 72°C/55s	72°C/7 min
<i>qnrS</i>	95°C/ 5min	30	95°C/55s, 55°C/ 50s, 72°C/55s	72°C/7 min
<i>aac(6')-Ib</i>	95°C/ 5min	35	95°C/45s, 55°C/45s, 72°C/50s	72°C/7 min

Para detecção da variante *aac(6')Ib-cr* no gene *aac(6')-Ib* foi utilizada enzima de restrição Anza™ 112BseGI (Invitrogen® USA). Após amplificação do gene por PCR, foi colocado em tubo de tampa suspensa de 200 µL: 2µl do tampão (Buffer 10X-Anza), 1,5µL da enzima BseGI, 2µL do produto amplificado de *aac(6')-Ib* e água ultrapura quantidade suficiente para 20µL. Em seguida, foi colocado no termobloco a 37° C por 35 a 45 minutos. Isolados em que se observou duas bandas em gel de agarose 1,5% não apresentam a variante *cr*. Já as cepas em que a enzima não consegue atuar permanecendo com uma banda, possuem a variante *cr*, sendo o gene assim denominado *aac(6')-Ib-cr*. Para confirmação dos resultados foi utilizado um isolado controle sequenciado de *E. cloacae* (41AC1-USP) gentilmente cedida pelo Dr. Nilton Lincopan (USP/São Paulo).

3.5.4 Genes de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos – AMEs

Foram realizados ensaios de PCR-*Multiplex* para pesquisar sequências específicas dos genes codificadores das enzimas modificadoras de aminoglicosídeos: AACs, ANTs e APHs. Para reação PCR-Triplex-1, serão adicionados *primers* específicos para amplificação dos genes *aac(3)-Ia*, *aac(3)-IIa* e *aac(6')-Ih*; à reação PCR-Triplex-2 serão inclusos os *primers* para a amplificação de *aph(3')-VI*, *ant(2')-Ia* e *rrn*, e, à reação PCR- Duplex, serão 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, será adicionado como controle interno da reação, conforme descrito no **quadro 8** (Anexo I, pg.120).

Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos no mesmo quadro 8. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de 0,8 µL de brometo de etídio

(10mg/mL). A corrida de eletroforese foi programada por 60 minutos a 6 V/cm, e o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen, EUA). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus[®], Brasil).

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 foi utilizado como controle positivo, gentilmente cedida pela Dra. Fernanda Modesto Tolentino Binhardi (IAL/São José do Rio Preto).

3.5.5 Genes 16S rRNA Metiltransferases

A investigação da presença dos genes *ribosomal methyltransferase (rmt)* e *aminoglycoside resistance methyltransferase (arm)* das metiltransferases 16S rRNA foram realizados segundo protocolos e *primers* previamente descritos no **quadro 9** (Anexo I, pg.121) por diferentes pesquisadores e seus colaboradores. ^(88, 124-125)

Os microtubos foram colocados no termociclador seguindo as condições de corrida específicas para cada gene, descritos na mesma tabela. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% acrescido de 0,8 µL de brometo de etídio (10mg/mL). A corrida de eletroforese foi programada por 60 minutos a 6 V/cm, e o marcador de peso molecular utilizado foi de 100 pb (Invitrogen, EUA). O resultado foi visualizado e fotografado pelo fotodocumentador LPix Ex (Loccus[®], Brasil).

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 foi utilizado como controle positivo, gentilmente cedida pela Dra. Doroti de Oliveira Garcia (IAL/São Paulo).

3.6 Purificação e Sequenciamento das ESBL e Carbapenemases (*bla_{KPC}* e *bla_{BKC}*)

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

Os produtos amplificados obtidos nos ensaios de PCR foram purificados com etanol, de acordo com protocolo adaptado de Sambrook e Russel.⁽¹²⁶⁾ Os *amplicons* foram transferidos para tubos de 1,5 ml onde foi realizada a purificação.

A estes tubos foram adicionados 10% do volume de acetato de sódio 3M seguido de três vezes o volume de etanol absoluto (Merck[®], New Jersey-USA). 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[®], New Jersey-USA) 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 ultrapura (Invitrogen[®], USA) e armazenado em freezer -20°C.

O sequenciamento dos genes detectados teve como finalidade confirmar se os *amplicons* obtidos na PCR correspondiam aos genes investigados. Os *primers* utilizados no sequenciamento 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 2. Para *bla*_{CTX-M-8} o sequenciamento foi realizado com intuito de englobar 04 elementos estruturais nas posições: 70-73 (S-X-X-K); 130-132 (S-D-N); 166 (E) e 234-236 (K-T-G) do gene, segundo descrito por BONNET e colaboradores.⁽⁴⁷⁾

A análise das sequências do gene *bla*_{CTX-M-8} foi realizada pelo programa MEGA v.5.2.2 (<https://mega.software.informer.com/5.2/>), utilizando fita molde retirada do GenBank com número de acesso: AF189721.

Uma nova reação de PCR foi feita a partir do *amplicon* purificado, utilizando-se o *Big Dye*®. Para cada amostra, 2 mix foram feitos, um para o primer F e outro para o primer R dos genes a ser caracterizados (*bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{KPC} e *bla*_{BKC}), com 2,0 µL de *Big Dye*, 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 20-40 ng/mL e água ultrapura qsp. 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 **ABI 3500** (*Applied Biosystems Foster City, CA*) e as sequências obtidas foram analisadas pelo *software Accelrys* e os *contigs* das sequências F e R 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 Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

3.7 Sequenciamento genoma completo de *E. cloacae* Ec61 e Análise das sequências

Antes do sequenciamento do genoma completo, experimentos de conjugação usando *Escherichia coli* J53 AziR como célula receptora foram realizados, em temperatura ambiente 37°C e 42°C em triplicata biológica. As transconjugantes foram selecionadas no ágar UTI ChromoSelect Agar (Merk, Nova Jersey, EUA) contendo 200 mg/L de ampicilina e 0,5mg/L de colistina e rastreados para *bla*_{BKC} e *mcr*, respectivamente. A frequência de transferência foi calculada pela razão do número de

transconjugantes por células receptoras. Posteriormente, experimento de transformação foi realizado para verificar a diferença entre o perfil de resistência antimicrobiana fornecido pelos produtores de BKC-1 e BKC-2. Os plasmídeos p60136 (portador de *bla*_{BKC-1}) pEc61 (portador de *bla*_{BKC-2}) foram transformados em *E. coli* Top10. As células transformantes foram selecionadas em placa de ágar LB contendo 100 mg/L de ampicilina, submetidas ao TSA por microdiluição em caldo contra os β-lactâmicos e interpretadas de acordo com as recomendações da EUCAST. ⁽¹²⁷⁾

A caracterização dos plasmídeos presentes em Ec61 foi realizada por S1-PFGE, seguida de hibridação com *bla*_{BKC}. ⁽¹²⁸⁾

Para a determinação do genoma completo do isolado Ec61 duas metodologias foram associadas para o mapeamento de todo conteúdo genômico e plasmidial do isolado estudado. O sequenciamento baseado em leituras curtas (MiSeq Illumina[®]) e longas (MinIon Oxford[®]) foram realizados em combinação.

Na metodologia Illumina, o DNA total bacteriano foi extraído partindo de um inóculo de 2 mL contendo o isolado Ec61 usando o sistema automatizado QIAcube, (Quiagen[®], Germany) com o kit de extração DNeasy Blood & Tissue Kit (Quiagen[®], Germany). As bibliotecas de DNA foram preparadas usando o kit Nextera[®] XT (Illumina[®] San Diego, CA) e sequenciadas usando a plataforma Illumina MiSeq (Illumina Inc., San Diego, CA). O controle de qualidade das leituras de sequência bruta incluiu FastQC (v.0.11.2) e a qualidade e o ajuste do adaptador foram realizados usando Trim Galore (v.0.4.3).

Visando a obtenção das sequências de leitura longas, pela metodologia MinION, o DNA bacteriano do isolado Ec61 foi extraído utilizando o método de extração baseado na lise alcalina bacteriana e precipitação do DNA com CTAB (*cetylmethylammonium*

bromide) e cloreto de sódio. Em seguida, o mesmo foi preparado para o sequenciamento usando uma versão modificada do protocolo do fabricante do kit Oxford Nanopore (SQK-NSK007; ONT, UK). A fragmentação não foi realizada e a preparação da biblioteca começou com 4-6 µg de DNA. Todas as etapas de limpeza com base em microesferas foram estendidas para 10 minutos de incubação e ligação, e 10 minutos de eluição a 37° C. Todas as outras etapas foram realizadas seguindo o protocolo do fabricante.

As bibliotecas foram sequenciadas usando as melhores células de fluxo disponíveis no momento (3/5 amostras sequenciadas usando células de fluxo R9 FLO-MIN104 e 2/5 sequenciadas usando células de fluxo R9 spot-on FLO-MIN105). As mesmas bibliotecas foram completadas após 12-24 horas, e o sequenciamento total foi realizado por 48 horas. Os dados foram avaliados em tempo real pelo programa Metrichor (<https://nanoporetech.com/about-us/careers/metrichor>), usado na ocasião como melhor fluxo de trabalho disponível (ONT, Reino Unido).

A montagem genômica do Ec61 através de leituras curtas e longas, permite uma montagem híbrida *de novo* usando o Unicycler v.0.4.0. Essa estratégia permite gerar sequências circularizadas completas tanto de cromossomos e plasmídeos. ⁽¹²⁹⁾ A identidade média de nucleotídeos ou ANI (*Average Nucleotide identity*) foi realizada para identificar a espécie de Ec61, o valor de ANI usado foi de >95% como um limiar para definição de espécie, e >98% para subespécie. ⁽¹³⁰⁾ Para análise de ANI foram usadas as seguintes cepas: *E. asburiae* (CP011863.1), *E. cloacae* subsp. *cloacae* ATCC13407 (NC_014121.1), *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* (NZ_CP017179.1), *E. hormaechei* subsp. *oharae* (NZ_CP017180), *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis* (NZ_CP017183.1), *E. hormaechei* subsp. *hoffmannii* (CP017186.1), *E. hormaechei* subsp. *hormaechei* (MKEQ01000001-MKEQ01000004), *E. Bungandensis*

(LT992502.1), *E. ludwigii* (CP017279.1), *E. kobei* (NZ_CP017181.1), and *E. canerogenus* (NZ_CP045769.1).

O tipo de sequência multilocus (MLST - *Multilocus sequence typing*), os genes de resistência antimicrobiana e replicons plasmídicos foram identificados usando as bases de dados MLSTfinder v.2.0.4, Resfinder v.3.2 e PlasmidFinder v.2.1.

A montagem genômica dos três plasmídeos encontrados em Ec61 (pEc61A, pEc61B e pEc61C) foi realizada usando os programas Newbler v 3.0 (Roche Inc.) e SPAdes v 3.8.0, com parâmetros padronizados.

Para verificar a presença de qualquer região promotora, foi usado a ferramenta BDGP (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) para prever promotores procaríotos hipotéticos em pEc61C e p60136.

3.8 Purificação e Sequenciamento de *rmtD* e *rmtG* metiltransferases 16S rRNA

Para os genes *rmtD* e *rmtG* 16S-RMTases os protocolos de purificação e sequenciamento pelo método de Sanger foram os mesmos descritos no item 3.6 acima citados. Os *primers* utilizados no sequenciamento foram os mesmos das reações de PCR descritos por Bueno e colaboradores. ⁽⁸⁸⁾

O sequenciamento foi realizado no aparelho 3130 *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems Foster City, CA) e as sequências obtidas foram analisadas pelo programa Accelrys e os *contigs* das sequências F e R foram comparados com as sequências depositadas no BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

3.9 Transferência dos genes *rmtD* e *rmtG* por conjugação bacteriana

Com a finalidade de avaliar se os plasmídeos portadores dos genes *rmtD* e *rmtG* 16S-RMTases são passíveis de transferência horizontal para outras espécies bacterianas, foi realizado o teste de conjugação, adaptado do protocolo de Walsh e colaboradores. ⁽¹³¹⁾

A técnica consiste em semear os isolados (Ec2, Ec9 e Ec13) e receptora (*Escherichia coli* J53) em ágar seletivo e diferencial, MacConkey (MC) (Oxoid[®], Inglaterra) e incubar em estufa *overnight* a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Após crescimento bacteriano, foi colocado duas colônias isoladas dos isolados doadores e receptora (EcJ53) em falcons de 50 mL contendo 5-7,5 mL de caldo LB-Luria Bertani (HIMEDIA[®]) por aproximadamente 4 horas em estufa sem agitação a $36\pm 1^\circ\text{C}$. Após quatro horas, foi medida a OD (*Optical Density*) em absorbância 700 nm = 0,1 = 1.10^8 .

Em seguida foi adicionado em outro falcon 1.10^8 dos isolados doadores, com 1.10^7 da EcJ53, completando o volume para 1 mL. Por exemplo:

*Receptora (EcJ53) → Absorbância 700 nm = 0,4

$$C_I.V_I = C_F.V_F \quad 0,4.V_I = 0,01.1000 \quad V_I = 25\mu\text{L}$$

*Doadoras (Ec2, Ec9 e Ec13) → Absorbância 700 nm = 0,3

$$C_I.V_I = C_F.V_F \quad 0,3.V_I = 0,1.1000 \quad V_I = 333\mu\text{L}$$

Portanto, foi adicionado ao Falcon: 333 μL do isolado doador + 25 μL da EcJ53 + 725 μL de caldo LB = 1000 μL (1mL). Esta mistura (doador e EcJ53) foi incubada *overnight* em estufa sem agitação a temperatura de 25 a 30°C .

No dia seguinte, a suspensão foi diluída a 10^3 e 10^5 em solução salina 0,9% estéril. Foram preparadas placas de ágar MC (Oxoid[®], Inglaterra) e ágar BHI (Oxoid[®], Inglaterra) contendo 200 μL de azida sódica (150 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 200 μL de amicacina (100 $\mu\text{L}/\text{mL}$). Após solidificação do ágar MC, foi pipetado 100 μL da suspensão diluída (10^3 e 10^5) nas placas e semeadas em várias direções com alça de drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas *overnight* em estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$. A frequência de transferência foi calculada pela razão do número de transconjugantes por células receptoras.

As colônias bacterianas isoladas com características macroscópicas da EcJ53 no

MC, foram repicadas em ágar BHI e novamente incubadas em estufa a $36\pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 18 horas. Após crescimento das colônias em BHI, fez-se novamente extração DNA bacteriano para confirmação dos genes *rmtG* e *rmtD* nas transconjugantes TEc2, TEc9 e TEc13.

3.10 PCR das transconjugantes, análise dos grupos Inc e extração DNA plasmidial

Para confirmação da presença dos genes *rmtD* e *rmtG* pelo método de conjugação foi novamente realizado extração do DNA cromossomal e PCR *single* das transconjugantes (TEc2, TEc9 e TEc13) conforme descritos nos itens: 3.5, 3.5.5 e quadro 8. Após PCR das transconjugantes, as mesmas foram submetidas ao esquema de tipagem de plasmídeos por PCR baseado em *replicons* PBRT (*PCR-based replicon typing scheme*), modificado de Carattoli e colaboradores, ⁽⁹²⁾ através do kit PBRT 2.0 (Diatheva[®], Itália) conforme orientações do fabricante. O DNA total extraído das TEc2, TEc9 e TEc13 foram submetidas oito PCR *multiplex* para a amplificação de 30 replicons: HI1, HI2, I1, I2, X1, X2, X3, X4, L, M, N, FIA, FIB, FIC, FII, FIIS, FIIK, FIB KN, FIB KQ, W, Y, P1, A / C, T, K, U, R, B / O, HIB-M e FIB-M, representante dos principais grupos de incompatibilidade de plasmídeos e genes de replicase identificados em plasmídeos de resistência que circulam entre *Enterobacteriaceae*. Para essas reações de PCR-PBRT, foram utilizadas as seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguida de 25 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 60°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto, finalizando com 5 minutos de extensão a 72°C . A extração de plasmídeos contendo as 16S RMTases citadas acima, foram feitas através do kit QIAamp[®] DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) seguindo as recomendações do fabricante.

3.11 Sequenciamento do Genoma Completo das *E. cloacae* – Ec02, Ec09 e Ec13

O DNA genômico total de Ec2, Ec9 e Ec13 foi extraído com kit Nextera[®] XT (Illumina[®] San Diego, CA). Para construção de uma biblioteca de DNA (seguindo as recomendações do fabricante), que em seguida, foi sequenciada usando a plataforma NextSeq (Illumina[®] San Diego, CA).

A montagem *De novo* foi realizada usando os programas Velvet v.1.2.1 e Geneious v.R9 (Biomatters). O genoma foi anotado usando o programa de Anotação de Genoma Procariótico NCBI v.3.2 (PGAP-*Prokaryotic Genome Annotation Pipeline*).

O tipo de sequência multilocus (MLST - *Multilocus sequence typing*), os genes de resistência antimicrobiana e replicons plasmídicos foram identificados usando bases de dados MLST v.1.8, ResFinder v.2.1 e PlasmidFinder v.1.3, respectivamente, disponíveis no Centro de Epidemiologia Genômica (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

3.12 Sequenciamento dos plasmídeos pEc09 e pEc13 contendo *rmtG*

Para o sequenciamento completo de plasmídeos, foram selecionados os plasmídeos pEc09 e pEc13 que carrega o gene *rmtG*. Os plasmídeos foram extraídos das cepas Ec09 e Ec13 e, então, foi feita a conjugação em *E. coli* J53. Os plasmídeos das células conjugadas foram extraídos por kit específico.

O sequenciamento e montagem dos plasmídeos foram realizadas em colaboração com a Dra. Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos e sua equipe no Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC) em Petrópolis – RJ.

As bibliotecas de sequenciamento foram construídas usando o kit de preparação de amostras TruSeq DNA PCR-Nano (Illumina[®], San Diego, CA), com um tamanho médio de inserção de 350 pb, de acordo com o protocolo do fabricante. Resumidamente, 100 ng de cada DNA plasmidial foi fragmentado usando o ultrasonicador focalizado Covaris

M220; e para o controle de qualidade da biblioteca (reparo da extremidade) foi usado o sistema Bioanalyzer System 2100 com o kit *Agilent High Sensitivity DNA* (Agilent Technologies[®], USA). As bibliotecas foram quantificadas individualmente via qPCR usando o kit *KAPA Library Quantification* para plataforma Illumina e agrupadas em quantidades equimolares para serem sequenciadas no sistema MiSeq[®] Illumina para obtenção de leituras de extremidade pareada 2X250.

3.13 Análise das sequências e montagem dos pEc09 e pEc13

A montagem completa do genoma de pEc09 e pEc13 foi realizada usando a combinação dos programas Newbler v 3.0 (Roche Inc.), SPAdes 3.10.0⁽¹³²⁾ e phrap / cross-match (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>).

A ferramenta *cross-match* foi usada para alinhar os *contigs/scaffolds* de cada conjunto com o outro. O *phrap* com sequências de consenso da montagem SPAdes foi usado para fechar as lacunas entre *contigs* e *scaffolds* gerados pela montagem Newbler até que a sequência de consenso de cada plasmídeo fosse obtida.

As sequências de plasmídeos foram anotadas usando o servidor *Rapid Annotations Subsystem Technology* (RAST) (<http://rast.nmpdr.org>) e depois foram curadas manualmente usando os bancos de dados BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) e ISfinder (<https://www-is.biotoul.fr/blast.php>). O EasyFig v.2.0 foi usado para mapear e comparar regiões de interesse contendo *rmtG* de ambos os plasmídeos.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Perfil Clínico-epidemiológico

Os 74 CEC foram isolados de pacientes admitidos tanto em enfermarias quanto unidades de terapia intensiva (UTIs), sendo 51% (38 de 74) isolados de pacientes das diferentes enfermarias e 31% (23 de 74) de UTIs, entre elas: UTI Geral (SUS e Convênio) 13% (3/23), UTI da neurocirurgia 17% (4/23), UTI coronariana 30% (7/23), UTI da emergência 22% (5/23) e Unidade Semi Intensiva 17% (4/23). Já em outras unidades de internação (ala de transplante e clínica cirúrgica) a frequência foi de 13 isolados em 74 (18%), conforme **figura 19**.

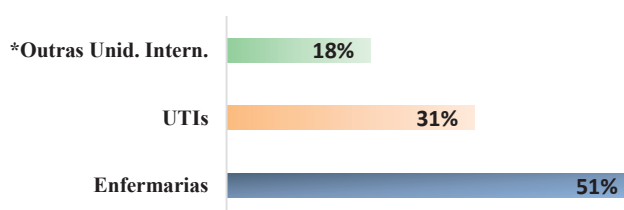


Figura 19. Distribuição dos setenta e quatro pacientes presentes nas diferentes unidades de internação do Hospital de Base

Neste estudo, os 74 isolados do CEC foram recuperadas de distintos materiais biológicos: urina 50% (37/74), aspirado traqueal 22% (16/74), biópsias 9% (7/74), sangue 7% (5/74), ponta de cateter e líquidos estéreis (pericárdico, sinovial e ascítico) 4% (3/74), e outras amostras (pólipo nasal, fragmento ósseo e abscesso) 4% (3/74) conforme **figura 20**.

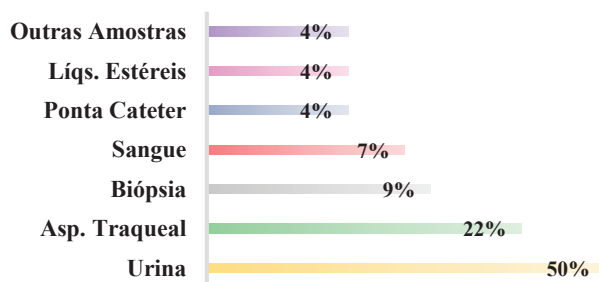


Figura 20. Distribuição das setenta e quatro amostras biológicas em que cepas do complexo *E. cloacae* foram detectadas.

4.2 Avaliação do Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana (TSA)

Neste estudo, foi avaliado o perfil de suscetibilidade das 74 isolados do CEC em cinco classes de antimicrobianos (aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e fluoroquinolonas), aos quais CEC não apresenta resistência intrínseca, conforme **figura 21**.

Com relação aos aminoglicosídeos, amicacina foi o antimicrobiano ao qual 48 cepas do CEC apresentaram uma maior taxa de sensibilidade (65%). No entanto, a gentamicina foi o aminoglicosídeo com maior taxa de não sensibilidade em 39 cepas (53%). Já entre os antimicrobianos da classe dos carbapenêmicos, todos os 74 isolados estudados (100%) foram resistentes ao ertapenem, e 31 cepas (42%) ao imipenem e meropenem. A resistência as cefalosporinas de terceira e quarta gerações: cefepime, ceftazidima e ceftriaxona foram observados com porcentagens de 62%, 66% e 68% respectivamente. A quinolona de segunda geração, ciprofloxacina avaliada neste estudo, apresentou baixa efetividade em um elevado percentual dos CEC, 72%.

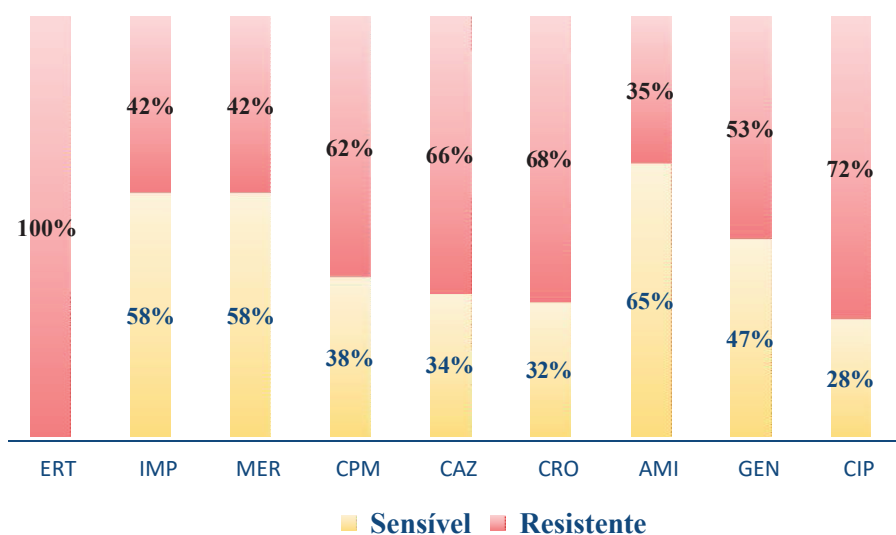


Figura 21. Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos em 74 cepas do CEC. Antimicrobianos: ERT: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; CPM: Cefepime; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina.

4.3 Detecção e caracterização dos genes de resistência aos antimicrobianos

Os quadros 10 e 11 (anexo I) mostram os diversos genes que codificam resistência a diferentes classes de antimicrobianos encontrados nos isolados do C_{Ec}.

4.3.1 Genes de resistência as cefalosporinas de 3^o e 4^o gerações

Entre os genes que codificam ESBL, os mais frequentes neste estudo foram: *bla*_{CTX-M-15} (31 isolados, 63%), *bla*_{CTX-M-2} (14 isolados, 29%), *bla*_{CTX-M-8} (1%), *bla*_{SHV-5} (3 isolados, 6%) e *bla*_{SHV-12} (1%).

No isolado C_{Ec} 66 foi detectado o gene *bla*_{CTX-M-8}, onde apresentou CIM ≥ 64 $\mu\text{g/ml}$ para ceftazidima, ceftriaxona e cefepime. A análise da sequência mostrou que o nucleotídeo e a proteína apresentaram 100% de identidade para tal ESBL (conforme descrito abaixo) em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*.

Nucleotídeo

>CTX-M-8

```
TCGCTGTTGCTGGGGAGTGCGCCGCTGTATGCGCAGGCGAACGACGTTTCAGCAAAAGCTGG
CGGCGCTGGAGAAAAGCAGCGGGGGCGGTTGGGAGTGGCGCTGATTGACACCGCCGATAA
CGCACAGACGCTCTACCGCGCCGATGAGCGCTTTGCCATGTGCAGCACCAGTAAGGTGATGG
CGGCAGCGGCTGTGCTCAAGCAAAGTGAAACGAAAAGAAGGTGTTGAGTCAGAAGGTTGA
GATTAATCTTCAGACCTGATTAATACTACAATCCCATTAAGTAAAAACACGTCAACGGCACGA
TGACGCTGGCGGAATTGAGCGCCGCGGCGTTGCAGTACAGCGACAATACGGCCATGAACAA
GCTGATTGCCCATCTTGGGGGGCCGGATAAAGTGACGGCGTTTGGCCGTGCGATTGGGGATA
ACACCTCCGGCTCGATCGTACTGAGCCGACGCTCAACACCGCGATCCCCGGCGACCCGCGC
GATACCACCGCCATTAGCGATGGCGCAGACGCTTCGCAATCTGACGTTGGGCAGTGCCTT
AGGTGAAACTCAGCGTGCGCAACTGGTAACGTGGCTGAAAGGCAATACCACCGCGCTGCC
AGCATTGAGGCTGGGCTACCCACATCGTGGGTTGTCGGGGATAAAACCGGCAGCGGTGATT
ATGGTACGACGAATGACATCGCCG
```

Proteína

>CTX-M-8

```
LLGSAPLYAQANDVQKLAALEKSSGGRLGVALIDTADNAQTLYRADERFAMCSTSKVMAAA
AVLKQSETQKKVLSQKVEIKSSDLINYPITEKHVNGTMTLAELSAAALQYSDNTAMNKLIAHL
GGPDKVTAFAAIGDNTFRLDRTEPTLNTAIPGDPRDTTTPLAMAQTLRNLTLGSALGETQRAQL
VTWLKGNNTGAASIQAGLPTS WVVGDKTGS GDYGTNDIA
```

4.3.2 Genes de resistência aos carbapenêmicos

Com relação aos genes que codificam carbapenemases, em 39% (29/74) dos isolados foram detectados o gene *bla*_{KPC-2} (quadros 10 e 11 – anexo 1). Os genes *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} não foram detectados.

Nos isolados em que não foram detectados nenhum dos genes de carbapenemases inicialmente investigados, foi investigada a presença do gene *bla*_{BKC-1}, que foi detectado apenas em CEc 61 (**figura 22** e quadro 10). O isolado CEc 61 apresentou resistência ao ertapenem e imipenem (CIM ertapenem = 4µg/µl, CIM imipenem ≥16µg/µl, respectivamente) e sensibilidade ao meropenem (CIM= 2µg/µl). A análise da sequência do amplicon de *bla*_{BKC-1}, foi realizada utilizando-se o programa *Accelrys* e uma fita molde para BKC-1 obtida do GenBank (KP689347.1), resultou na sua identificação como BKC- 1, conforme mostrado na sequência abaixo **figura 23**.

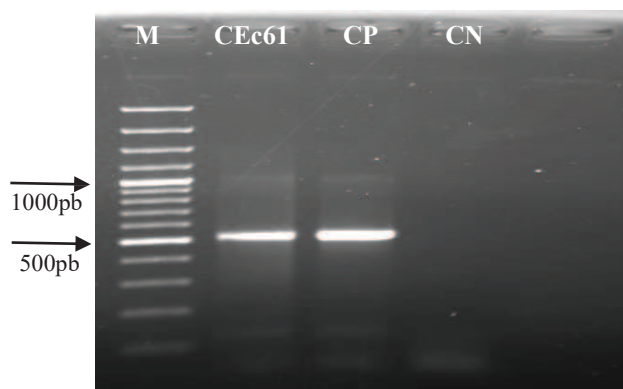


Figura 22. Eletroforese em gel de agarose 1% contendo fragmento do gene *bla*_{BKC}. M: Marcador de 1KB. CP: Controle positivo (TfBKC-1). CN: Controle Negativo (reação isenta de DNA).

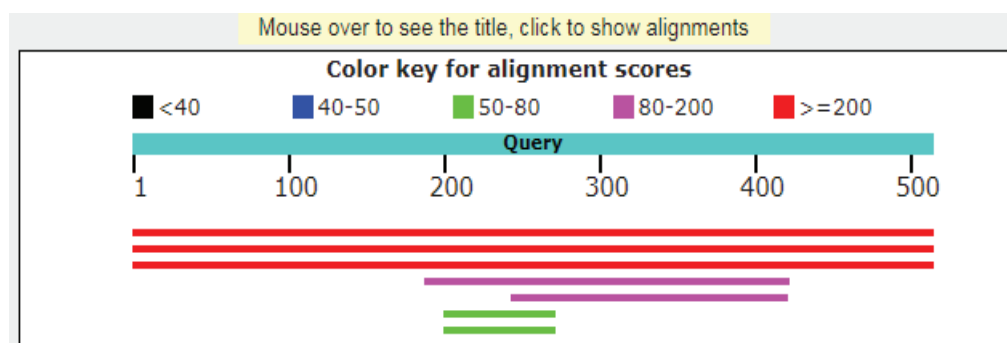


Figura 23. Análise da sequência pelo método de Sanger e identificação da carbapenemase BKC em CEc61. A partir da ferramenta <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Após a identificação de *bla*_{BKC-1} o isolado CEC 61, foi submetido ao sequenciamento do seu genoma completo, em colaboração com o Laboratório Alerta (EPM/UNIFESP- São Paulo) e o departamento de microbiologia médica/divisão de infecção e imunidade da Universidade *Cardiff* – Reino Unido. Os resultados serão mostrados no item 4.4.

É interessante observar que CEC66 foi o único isolado em que apresentou resistência aos três carbapenêmicos (ertapenem $\geq 8\mu\text{g}/\mu\text{l}$; imipenem e meropenem $\geq 16\mu\text{g}/\mu\text{l}$) porém, não se detectou nenhuma das carbapenemases testadas. O teste fenotípico para detecção de carbapenemase foi realizado, para mCIM, resultou em halo de 22mm, considerado, portanto não produtor de carbapenemase. No estudo em questão, outras carbapenemases como: *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48} não foram detectadas.

4.3.3 Genes de resistência às quinolonas

Em 74 CEC estudados, 43 (58%) destes foram detectados com genes PMQR (quadros 10 e 11 – anexo 1). Sendo que, 40% (17/43) foram associações dos genes *qnrB* + *aac(6')Ib-cr*, enquanto 14% (6/43) do gene *qnrB* e 46% (20/43) de *aac(6')Ib-cr* foram detectados isoladamente nos demais CEC. Em 10 CEC não foram detectados genes PMQR. Os genes *qnrA*, *qnrS*, *qepA* e *OqxAB* não foram detectados.

4.3.4 Genes de resistência aos aminoglicosídeos

Foram detectados cinco genes codificadores de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs), sendo eles *aac(6')-Ib*, *aac(3)-IIa*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-VI* e *ant(2'')-Ia*; distribuídos em 63% (47/74) dos isolados incluídos neste estudo (quadros 10 e 11 – anexo 1). Os genes *aac(6')-Ih* e *aac(3)-Ia* não foram detectados. O gene *aac(6')-Ib* foi detectado 45% (21/47) dos isolados, *aac(3)-IIa* em 34%(16/47), *aph(3')-Ia* em 21%(10/47), *aph(3')-VI* em 6% (3/47) e *ant(2'')-Ia* em 51% (24/47). Entre as cepas do

CEc, 49% (23/47) apresentaram apenas um gene, 38% (18/47) dois genes e 13% (6/47) três genes simultaneamente. As mais frequentes associações observadas nos CEc estudados foram de dois genes simultâneo, sendo *aph(3')-Ia* + *ant(2'')-Ia* 33% (6/18).

A concordância entre fenótipo (resistência a gentamicina) e genótipo observada para os isolados que apresentaram *ant(2'')-Ia* foi de 51% (24/47). Todos os 21 CEc carreadores de *aac(6')-Ib* e os 03 isolados carreadores *aph(3')-VI* apresentaram resistência a amicacina (100% de concordância entre fenótipo e genótipo). Os dados sugerem que o gene *aac(3)-IIa* foi expresso em todos os isolados em que foi detectado, pois todos apresentaram resistência à gentamicina (100% de concordância entre fenótipo e genótipo). A relação entre fenótipo e genótipo nos isolados que apresentaram *aph(3')-Ia* não foi avaliada pois esta enzima degrada principalmente a canamicina, que não foi testado.

Genes que codificam 16S rRNA metiltransferases foram detectados em três isolados que apresentaram resistência em nível elevado aos aminoglicosídeos; onde CIM para CEc2 e CEc9 foram de ≥ 256 para AMI e ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$ para GEN e TM, e CEc13 (AMI ≥ 256 , GEN 64 e TM ≥ 1024 $\mu\text{g/mL}$). No isolado CEc2 foi detectado o gene *rmtD*, enquanto CEc9 e CEc13 apresentaram o gene *rmtG* (**figura 24**).

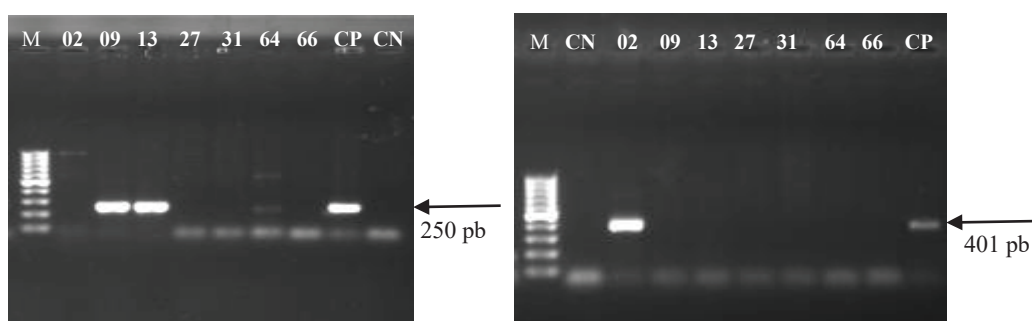


Figura 24. Eletroforese em gel de agarose 1%. A: CEc9 e CEc13 contendo fragmento do gene *rmtG*. B: CEc2 contendo fragmento *rmtD*. M: Marcador de 100 pb. CP: Controle positivo (Kp368/10 e Kp145/11). CN: Controle Negativo (reação isenta de DNA).

Estes isolados foram submetidos ao sequenciamento do genoma completo em colaboração com Núcleo de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia (IAL- São Paulo), Laboratório Resistência Bacteriana e Alternativas Terapêuticas (USP-São Paulo) e Laboratório Nacional de Computação Científica (LNCC- Petrópolis/RJ). Os resultados serão mostrados nos itens 4.5, 4.6 (anexo II e III).

4.4 Caracterização do Genoma Completo de Ec61

Após o sequenciamento por MiSeq e MinION, o Ec61 foi identificado a nível de espécie e subespécie através da análise de ANI, onde a identidade nucleotídica classificou o isolado como *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* com 99,28% para a sequência de referência NZ_CP017183.1 conforme descrito no **quadro 12**.

Quadro 12. Identificação das espécies e subespécies do gênero *Enterobacter* por WGS.

Espécies e Subespécies	Sequência Referência	(%)
<i>Enterobacter asburiae</i>	CP011863.1	87.43%
<i>E. bungandensis</i>	LT992502.1	88.08%
<i>E.hormaechei</i> subsp. <i>xiangfangensis</i>	NZ_CP017183.1	99.28%
<i>E. ludwigii</i>	CP017279.1	85.91%
<i>E. cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> ATCC13407	NC_014121.1	97.05%
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>steigerwaltii</i>	NZ_CP017179.1	97.05%
<i>E. hormaechei</i> subsp. <i>oharae</i>	NZ_CP017180	97.13%
<i>E. kobei</i>	NZ_CP017181.1	87.04%
<i>Enterobacter cancerogenus</i>	NZ_CP045769.1	86.19%

<http://enve-omics.ce.gatech.edu/ani/index>

A análise do genoma revelou a presença de um cromossomo de 4,8 Mb com 55,3% de conteúdo GC e de três plasmídeos denominados pEc61A (149,8 Kb), pEc61B (77,6 Kb) e pEc61C (8,3 Kb) (**Figura 25**). Ec61 foi identificado como ST451 (*dnaA*-146, *fusA*-21, *gyrB*-148, *leuS*-44, *pyrG*-99, *rplB*-4 e *rpoB*-6). A análise pelo ResFinder revelou inicialmente a presença de *bla*_{ACT-16}, *bla*_{BKC-1}, *bla*_{SHV-5}, *sull1*, *sul2*, *mcr-9*, *fosA2*, *aac(6')-Ib3*, *aadA1*, *aph(3')-Ia*, *aac(6')-Ib-cr* e *tetD* conforme descrito no **quadro13**.

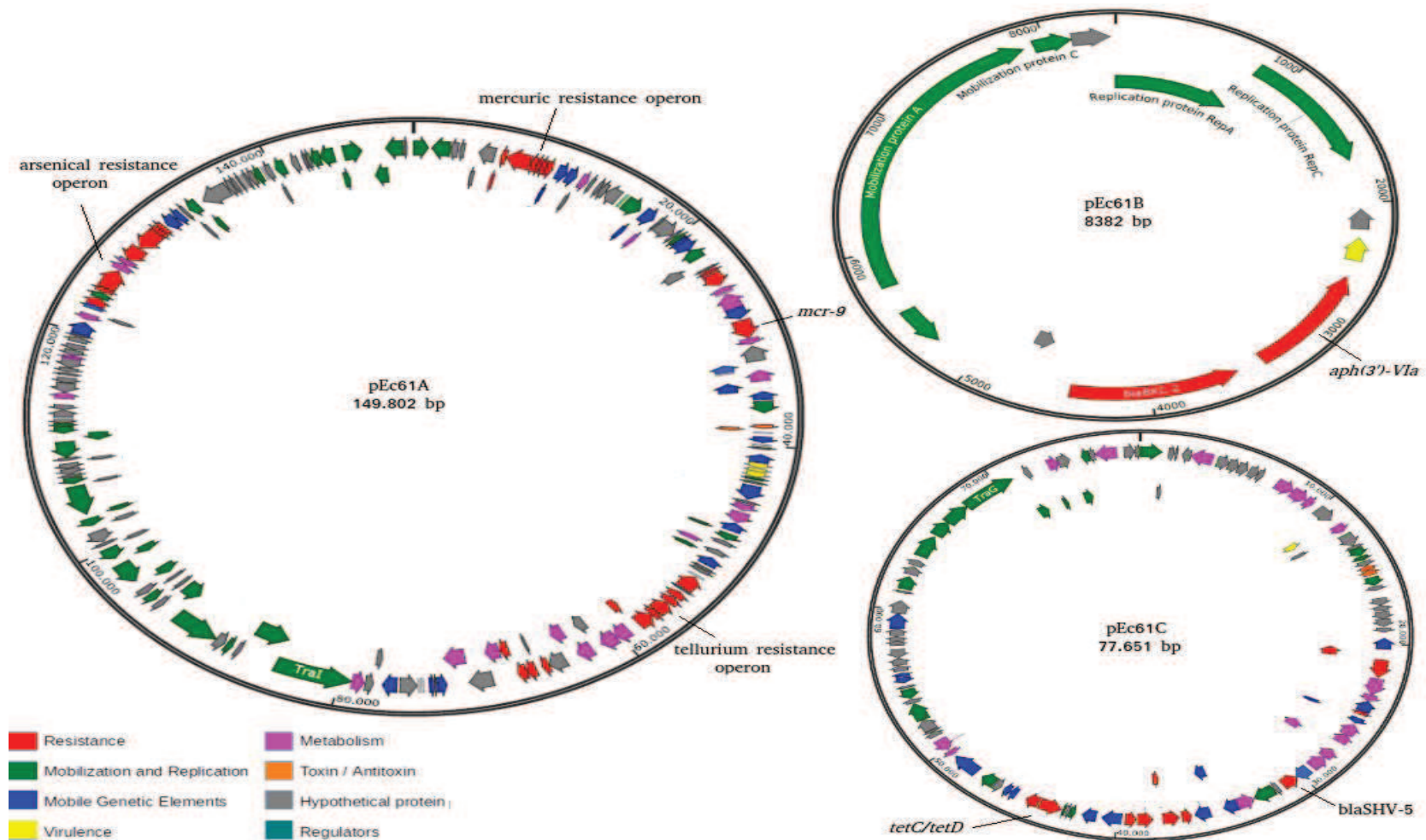


Figura 25. Estrutura dos plasmídeos: **pEc61A** transportando o gene *mcr-9*. **pEc61C** transportando os genes *bla_{BKC-2}* e *aph(3')-VIa* e **pEc61B** transportando os genes *bla_{SHV-5}* e *tetC/tetD*.

Quadro 13. Localização dos genes de resistência nos plasmídeos de Ec61 entre parênteses.

	Plasmídeos de Ec61		
	pEc61A	pEc61C	pEc61B
Características gerais	149,802 pb 52% CG IncFIB	8382 pb 59,4% CG IncQ1	77,651 pb 53,5% CG IncC
Genes Resistência Antimicrobiana	<i>mcr-9</i> (28747..30366)	<i>aph(3')-VIIa</i> (2562..3341) <i>bla_{BKC-2}</i> (3498..4439)	<i>aac(6')-Ib3</i> (39040..39594) <i>aadA1</i> (38179..38970) <i>bla_{SHV-5}</i> (30232..31092) <i>aac(6')-Ib-cr</i> (39040..39558) <i>sul1</i> (36835..37674) <i>sul2</i> (49991..50806) <i>tet(C)</i> (42887..44077) <i>tet(D)</i> (21060..22244)

Entretanto, devido à similaridade de 97% entre os genes *bla_{ACT-16}* e *bla_{BKC-1}*, o banco de dados do Resfinder sugeriu a presença de novas variantes genéticas. O alinhamento da sequência da cefalosporinase ACT-16 com todos os alelos ACT disponíveis no banco de dados NCBI, resultou na identificação de uma nova variante, que foi denominada ACT-84 (número de acesso: MT136764). ACT-84 difere do ACT-83 por uma única substituição de aminoácidos (Pro58Ser), conforme mostrado na **figura 26**.

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
blaACT-84  MMKKSLLCCALLLGLSCSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSVPGMAVAVIYQGGKPHYHTFGKADIAANKPVTPTLFL
blaACT-83  MMKKSLLCCALLLGLSCSALAAPVSEKQLAEVVANTVTPLMKAQSVPGMAVAVIYQGGKSHYHTFGKADIAANKPVTPTLFL
.....
blaACT-84  ELGSISKFTFTGVLGGDAIARGEISLDDPVTRYWPELTGKQWQGIRMLDLATYTAGGLPLQVPDEVTDASLLRFYQHWQP
blaACT-83  ELGSISKFTFTGVLGGDAIARGEISLDDPVTRYWPELTGKQWQGIRMLDLATYTAGGLPLQVPDEVTDASLLRFYQHWQP
.....
blaACT-84  QWKPQTTRLYANASIGLFGALAVKPSGMRYEQAMTERVFKPLALHHTWINVPKAEAAHYAWGYRDGKAVRVSPGMLDAQA
blaACT-83  QWKPQTTRLYANASIGLFGALAVKPSGMRYEQAMTERVFKPLALHHTWINVPKAEAAHYAWGYRDGKAVRVSPGMLDAQA
.....
blaACT-84  YGVKTNVQDMANWVMANMAPEKVADASLKQGIALAQSRYWRIGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSKVALAPLVAE
blaACT-83  YGVKTNVQDMANWVMANMAPEKVADASLKQGIALAQSRYWRIGSMYQGLGWEMLNWPVEANTVVEGSDSKVALAPLVAE
.....
blaACT-84  VNPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAYHILEALQ
blaACT-83  VNPPAPPVKASWVHKTGSTGGFGSYVAFIPEKQIGIVMLANKSYNPNARVEAAYHILEALQ
.....

```

Figura.26 Alinhamento Clustal W de sequências de proteínas das cefalosporinases ACT-84 e ACT-83. Mostrando a substituição de um aminoácido destacado na cor magenta.

O alinhamento da sequência de *bla_{BKC}* detectado em Ec61 com a sequência de nucleotídeos BKC-1 (NG_048710.1) mostrou a ocorrência de 20 incompatibilidades

que resultam em 11 modificações de aminoácidos (**Figura 27**) e na identificação de uma nova variante, denominada BKC-2. A sequência de codificação de BKC-2 foi localizada em um pequeno plasmídeo do grupo IncQ1 (pEc61C).

```

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment
BKC-1      MTITFSRRQAIAGALLAVPAVSTLAASAGALLAVPAVSTLAASAGAATGGPLEKRLAELEGRHKGRIGVAIHNLATGARI
BKC-2      MTITFSRRQAIAGALLAVPAVSTLAASAGAAATGGLEKRLAELEGRHKGRIGVAIHNLATGARI
*****
BKC-1      GHRADERFLMCSTFKALLAAHILARVDRKEETLDRRIVVVGKSDLVDWSPVETRVGGEGISIAELCEAAITLSDNAAANL
BKC-2      GHRADERFLMCSTFKALLAAHILARVDRKEETLDRRIVVVGKSDLVDWSPVETRVGGEGISIAELCEAAITLSDNAAANL
*****
BKC-1      LLSASGGPKAVTQFLRGFGDDVTRLDRTEPTLNRYRETPDDERDTTTPAAMAETLRKLIIGDVLARGSKAQLAAWLVMNKT
BKC-2      LLSASGGPKAVTQFLRGFGDDVTRLDRTEPTLNRYRETPDDERDTTTPAAMAETLRKLIIGDVLARGSKAQLAAWLVMNKT
*****
BKC-1      GDTRLRAGFPVDWTTGDKTGTNGDRHGNANDVAIAWSPDRGAVVVTAFCEIPGISGDERNAVIAEIGRIAAEA
BKC-2      GDTRLRAGFPVDWTTGDKTGTNGDRHGNANDVAIAWSPDRGAVVVTAFCEIPGISGDERNAVIAEIGRIAAEA
*****

```

Figura 27. Alinhamento Clustal W de sequências de proteínas das carbapenemases BKC-1 e BKC-2. Mostrando a substituição de onze aminoácidos destacados na cor magenta.

A comparação da sequência de nucleotídeos de *bla*_{BKC-1} e *bla*_{BKC-2} revelou a ausência de *ISKpn23 upstream* de *bla*_{BKC-2} (**Figura 28**). Embora ausente, uma região com sequência de nucleotídeos da *ISKpn23* de quase 250 pb foi detectada *upstream* de *bla*_{BKC-2}, sugerindo a saída da *ISKpn23* do pEc61C.

O alinhamento de nucleotídeos mostrou que esses 250 nucleotídeos estavam em conformidade com o início e o final da sequência de codificação *ISKpn23*. As regiões promotoras das sequências de inserção são frequentemente localizadas no segmento de repetição invertida esquerda (IR_L).⁽⁹⁰⁾ Uma região promotora (gatttacttggggaatgtgggagtaaatagataatcttaatttggttcac) foi prevista em torno da região IR_L (*left inverted repeat*) de ambos os plasmídeos (**Figura 29**), sugerindo a presença do mesmo promotor em ambos os plasmídeos.

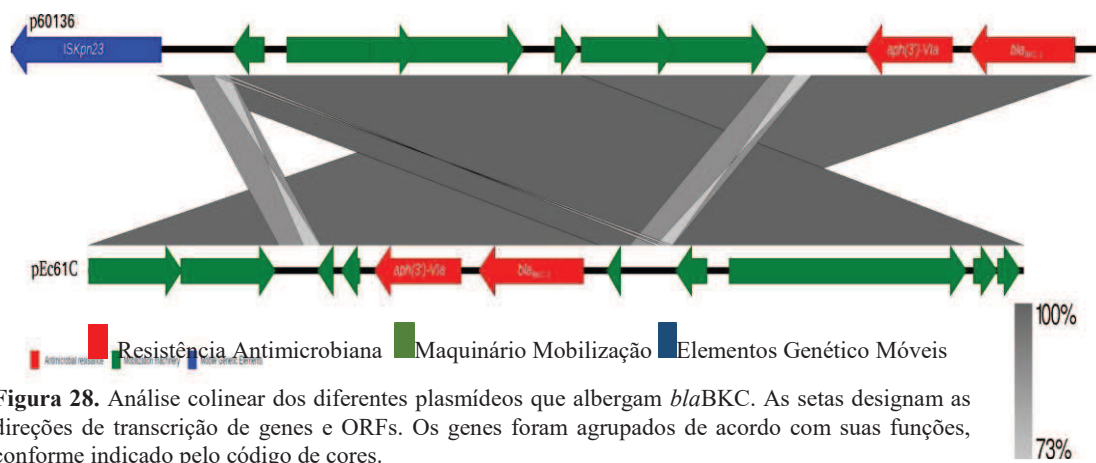


Figura 28. Análise colinear dos diferentes plasmídeos que albergam *bla*BKC. As setas designam as direções de transcrição de genes e ORFs. Os genes foram agrupados de acordo com suas funções, conforme indicado pelo código de cores.

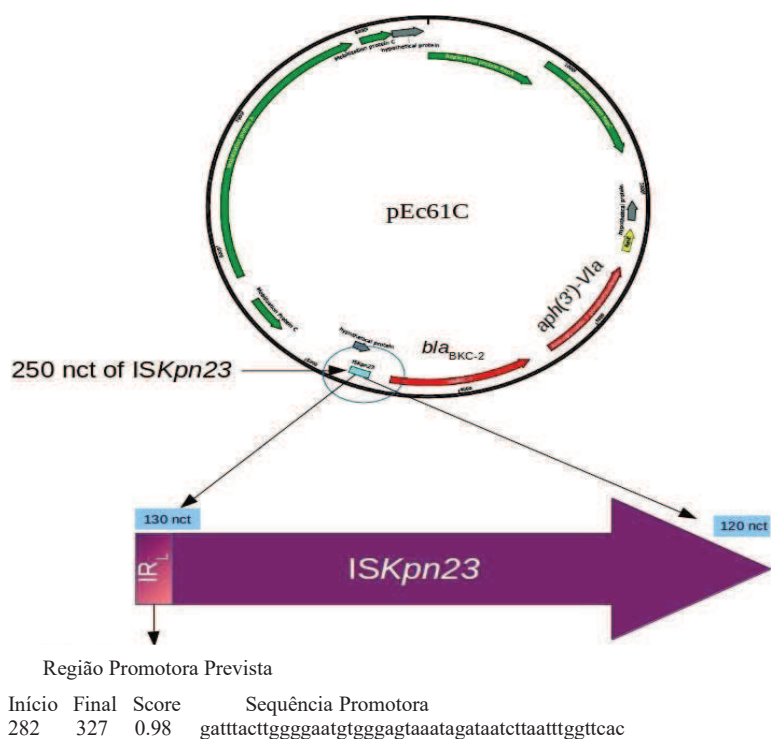


Figura 29. Representação da distribuição nucleotídica de 250 pb da sequência restante de ISKpn23 detectada no pEc61C. O promotor previsto foi detectado em uma região denominada IR_L (*left inverted repeat*) ou repetição invertida à esquerda.

Em geral, as CIMs da transformante BKC-1 foram maiores do que as apresentadas pela transformante BKC-2. As CIMs para ertapenem, meropenem e imipenem foram 4, 2 e 2 vezes mais altas na transformante BKC-1 quando comparadas as da transformante BKC-2, conforme descrito no **quadro 14**.

Quadro 14. Perfil de susceptibilidade das transformantes das carbapenemases BKC.

Isolados CIM (mg/L)					
Agentes Antimicrobianos	TfBKC-1		TfBKC-2		TOP10
	<i>E. coli</i> Top10 +p60136 (<i>bla</i> _{BKC-1})	Aumento MIC (diluição log ²)	<i>E. coli</i> Top10 +pEc61C (<i>bla</i> _{BKC-2})	Aumento MIC (diluição log ²)	<i>E. coli</i> Top 10
Ertapenem	0.5	4	0.125	2	≤0.03
Meropenem	0.25	3	0.125	2	≤0.03
Imipenem	0.5	4	0.125	2	≤0.03
Cefepima	16	9	8	8	≤0.03
Ceftazidima	128	9	64	8	0.25
Aztreonam	256	12	64	10	0.06
Amoxicilina	>512	>8	256	7	2
Amox.+Clav	128	5	32	3	4
Ampicilina	>512	>9	>512	9	1
Cefotaxima	256	12	64	10	0.06
Cefalexina	512	6	256	6	8

Além do novo *bla*_{BKC-2}, Ec61 apresentou o gene de resistência à colistina, *mcr-9*, apesar de o isolado ser sensível à colistina. O gene *mcr-9* está localizado em um plasmídeo IncFIB de 149,8 Kb (pEc61A) carreador de genes de resistência aos metais (arsênico, telúrio, mercúrio, níquel e cobalto) mas sem outros genes de resistência aos antimicrobianos (**Figuras 25 e 30A**).

A análise BlastN de pEc61A contra seis plasmídeos do banco de dados GenBank (cinco IncFIB e um grupo Inc desconhecido) mostrou que, embora todos os plasmídeos analisados compartilhassem diversas regiões comuns, o *mcr-9* não era frequente nos plasmídeos IncFIB. Além do plasmídeo IncFIB detectado em nosso estudo (pEc61A) carreando *mcr-9*, apenas um único IncFIB (p1_045523) foi detectado no banco de dados Genbank (**Figura 30B**).

O esqueleto genético de *mcr-9* relacionado ao pEc61A continha IS903B::*mcr-9*::*wubC*::*qseC*-like::*qseB*-like::ATPase::Integrase::IS26. A análise da identidade do contexto genético do *mcr-9* nos plasmídeos IncFIB (pEc61A e p1_045523) revelou alta

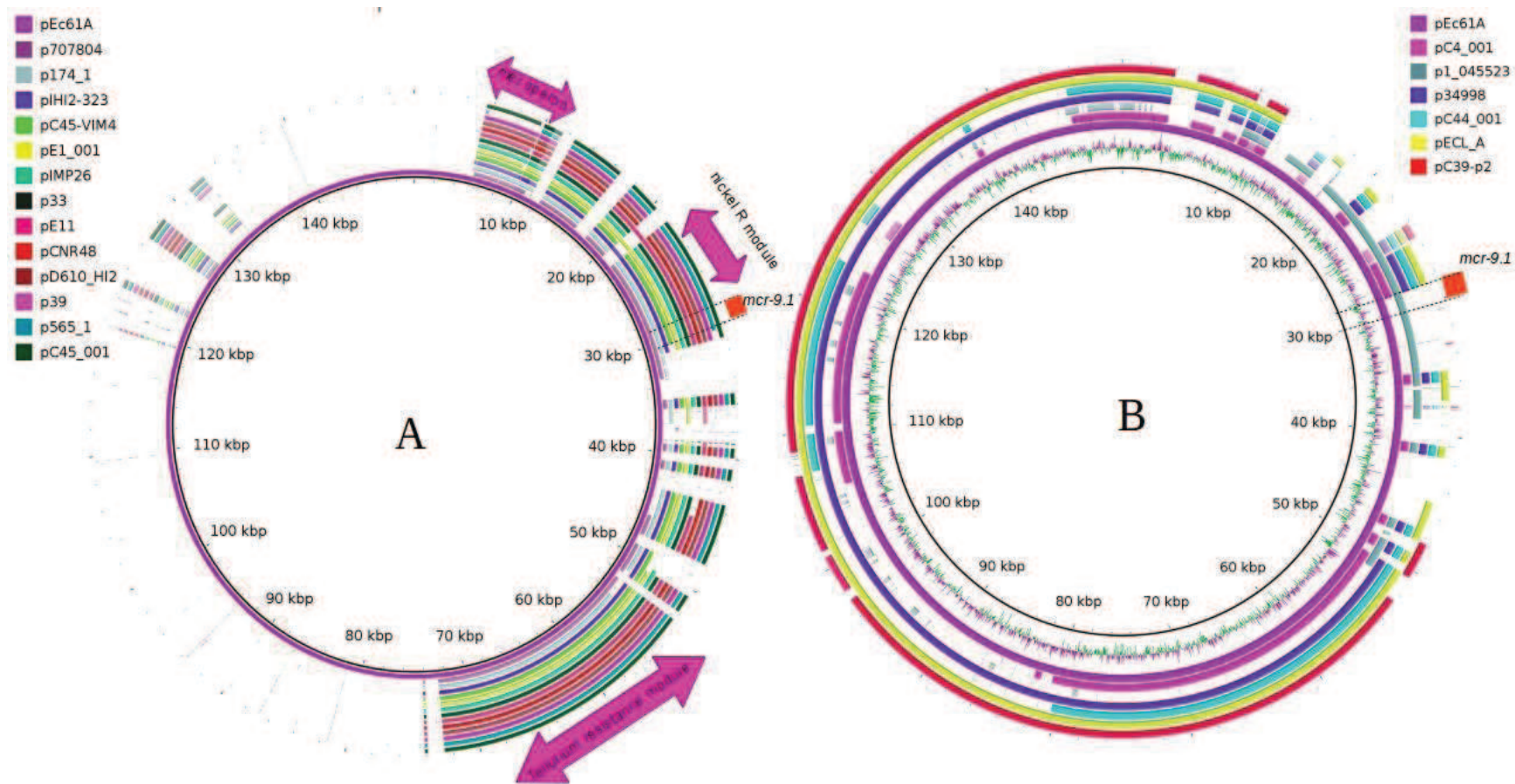


Figura 30. (A) Comparação circular entre pEc61A e 13 plasmídeos portadores de *mcr-9*. Apenas um pertenceu a IncH2 e IncH2a. As setas cor-de-rosa localizadas fora dos anéis no painel A representam as regiões conservadas que incluem o operon *mer* (mercúrio), o módulo de resistência ao níquel e o operon da resistência ao telúrio. (B) Comparação circular dos seis plasmídeos de maior êxito relacionados ao pEc61A na análise BlastN contra o banco de dados NCBI. Cinco dos seis plasmídeos analisados pertenciam ao grupo IncFIB, e apenas o p1_045523 também abrigava *mcr-9*.

similaridade na sequência de nucleotídeos da região compreendida entre as duas sequências de inserção IS903B e IS26 (**Figura 31**). Embora p1_045523 compartilhe o mesmo contexto genético de *mcr-9*, os plasmídeos não são geneticamente relacionados (**Figura 30B**).

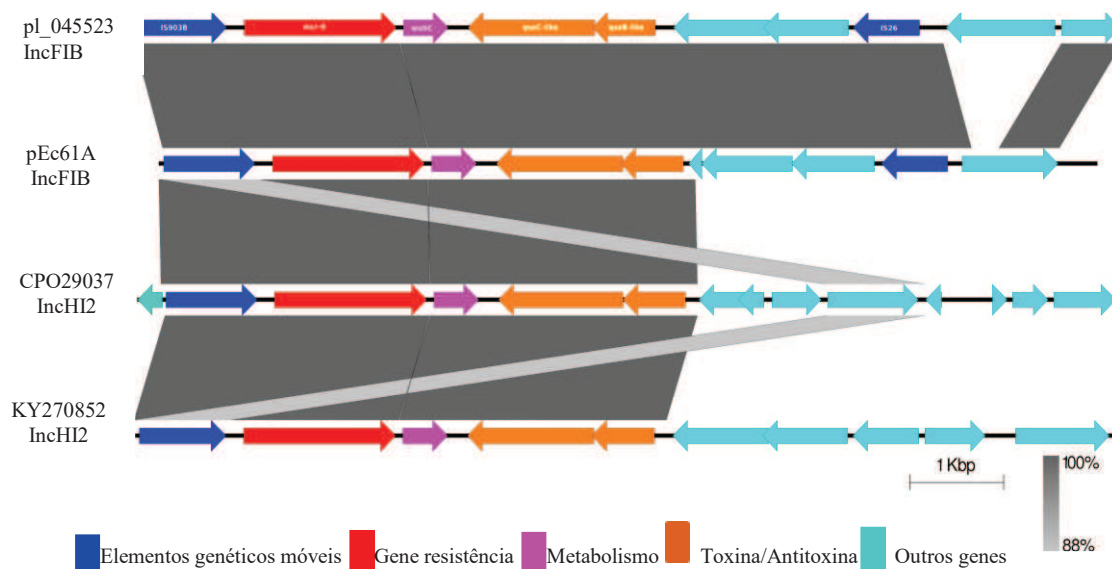


Figura 31. Análise colinear do contexto genético de *mcr-9* em quatro plasmídeos pertencentes a IncFIB e IncHI2.

O ensaio de conjugação para a transferência de IncFIB com *mcr-9* não teve êxito. A transferência do IncFIB foi observada apenas a 42° C, com baixa frequência de 10^{-8} , usando baixa concentração de colistina como agente seletivo. Como a CIM da colistina no isolado Ec61 foi de 1 mg/L, as concentrações sub-inibitórias (0,25 e 0,5 mg/L) usadas em todas as tentativas foram insuficientes para fornecer uma seleção ideal usando *E. coli* J53 AziR.

No plasmídeo pEc61B pertencente ao grupo IncC, outros genes de resistência foram detectados para diferentes classes de antimicrobianos, tais como: *sul1* e *sul2*, *tet(C)* e *tet(D)*, *aac(6')-Ib-cr*, *bla_{SHV-5}*, *aadA1* e *aac(6')-Ib3*. Em relação a alterações cromossomais em regiões determinantes de resistência à quinolonas em Ec61, a análise mostrou mutações na sequência de *gyrA*, que revelou a ocorrência de uma substituição de

Ser83Phe, ocasionando um aumento das CIMs de quinolonas. Não foram detectadas substituições adicionais de aminoácidos na região QRDR de GyrB, ParC e ParE.

4.5 Caracterização do Genoma Completo de Ec2

O sequenciamento do genoma completo de Ec2 produziu 12 042 164 leituras de pareamento final com uma cobertura total de 361x. Um total de 137 contigs foram gerados com um conteúdo de G + C de 54, 7% e tamanho do genoma de 5,3Mb. A anotação resultou em 5 527 genes codificados, 62 genes codificadores de RNA (57 tRNAs e 5 ncRNAs) e 275 pseudogenes.

A análise do genoma mostrou que Ec02 pertence ao ST395 e carrega os genes de resistência aos aminoglicosídeos *aph(3'')-Ib*, *aacA4*, *aac(3)-IIa*, *aph(6)-Id*, *aadA1* e *rmtD-2*, aos beta-lactâmicos *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-1}*, *bla_{ACT-16}* e *bla_{CTX-M-15}*, às fluoroquinolonas *aac(6')-Ib-cr* e *qnrB1*, à fosfomicina *fosA*, ao fenicol *catA1* e *catB3*, à sulfonamida *sul1* e *sul2*, à tetraciclina *tet(B)*, *tet(A)* e *tet(G)* e ao trimetoprim *drfA8* e *drfA14*. Foram encontrados plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncFII (pKPX1), IncHI2A e IncI1. O gene *rmtD-2* não foi localizado em nenhum destes plasmídeos.

4.6 Caracterização do Genoma de Ec09 e Ec13

A partir da análise de 15 606 loci, observou-se que Ec09 e Ec13 apresentaram 2403 alelos diferentes.

4.6.1 Genoma de Ec09

O sequenciamento de Ec09 produziu 13 896 066 leituras de pareamento final com uma cobertura total de 416x. Foram gerados um total de 86 *contigs* com um conteúdo de G + C de 55,2% e tamanho do genoma de 5,3 Mb. A anotação resultou em 5 069 genes codificados, 54 genes codificadores de RNA (49 tRNAs e 5 ncRNAs) e 197 pseudogenes.

A análise do genoma completo mostrou que Ec9 pertence ao ST184 e carrega os genes de resistência aos aminoglicosídeos *aac(6')-Ib*, *aadA1* e *rmtG*, aos beta-lactâmicos *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-9}*, *bla_{ACT-7}* e *bla_{CTX-M-2}*, à fluoroquinolonas *aac(6')-Ib-cr*, à fosfomicina *fosA*, aos MLS (macrolídeos, lincosamidas e estreptogramina B) *mph(A)*, à sulfonamida *sul1* e *sul2* e ao trimetoprim *dfrA1*. Foram identificadas sequências de dois plasmídeos, pertencentes aos grupos IncFII (Yp) e IncA/C.

O plasmídeo carreador de *rmtG* em Ec9 (443x cobertura) foi identificado como pertencente ao grupo IncA/C. O sequenciamento do plasmídeo (pEC9) mostrou 191 genes preditos e um tamanho de 152 054 pb. A região central do pEc09 é composta pelo gene da proteína de iniciação à replicação *repA*, os genes *traABCDEFGHIKLNUVW* necessários para a transferência conjugada do plasmídeo e pelos genes *parAB* e *stbA*, envolvidos na estabilidade do plasmídeo. Os genes codificadores de beta-lactamases *bla_{OXA-9}* e *bla_{TEM-1a}*, resistência aminoglicosídeos *aadA1*, *aac(6')-Ib*, *rmtG* e resistência a sulfonamida *sul2* foram identificados em um transposon Tn3 flanqueado por duas cópias de IS26 conforme mostrado na **figura 32A**.

Duas cópias de *rmtG* estão associadas aos genes *rsmH* e *tgt* que codificam uma subunidade pequena de rRNA metiltransferase H (RsmH) e uma transglicosilase tRNA-guanina, respectivamente. O primeiro conjunto *rsmH-tgt-rmtG* é flanqueado por duas cópias de um Δ ISCR2, e o segundo *rsmH-tgt-rmtG* é flanqueado por uma segunda cópia Δ ISCR2 e ISCR2 completo, mostrado na **figura 33**. A presença desta dupla repetição foi confirmada por PCR visando a região que contém a repetição.

A análise das sequências de *rsmH* na matriz *rsmH-tgt-rmtG* de pEc9 mostrou uma substituição g.29764 C > T, causando a presença de um códon de parada (*stop codon*). Como existe uma duplicação dessa região, essa mutação também se repete, na posição 33

776, gerando dois pseudogenes *rsmH*. O gene *bla*_{CTX-M-2} ESBL, *qacEΔ1* de resistência ao composto quaternário de amônio e *sulI* de resistência ao sulfonamida são carregados em associação com uma cópia da *ISCR1*.

4.6.2 Genoma de Ec13

O sequenciamento de Ec13 produziu 9 902 678 leituras de pareamento final com uma cobertura total de 297x. Um total de 92 *contigs* foram gerados com um conteúdo de G + C de 54,6% e tamanho do genoma de 5,1 Mb. A anotação resultou em 4 928 genes codificados, 61 genes codificadores de RNA (56 tRNAs e 5 ncRNAs) e 207 pseudogenes. Ec13 pertence ao ST121 e carrega os mesmos genes de resistência para aminoglicosídeos, beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, fosfomicina e sulfonamida encontrados em Ec09, diferindo apenas pela ausência de *mph(A)* e a presença do gene de resistência à tetraciclina *tetC*. Foram identificadas sequências de plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncA/C, IncFI2A e IncFI2.

O plasmídeo carreador de *rmtG* em Ec13 (143x cobertura) também foi identificado como pertencente ao grupo IncA/C; possui um comprimento de 235 699 pb e alberga 277 genes. A região central compreende o gene da proteína de iniciação à replicação *repA*, os relacionados à transferência *traABCDEFGHIJKLMNPQRSUVXW* e *trbBCEL* e vários genes envolvidos na estabilidade do plasmídeo (*parAB*, *parM*, *stbA*, *psiAB*, *ardA* e *umuCD*) conforme mostrado **figura 32B**. O gene *rmtG* está presente na matriz *rsmH-tgt-rmtG*, também flanqueada por duas cópias de *ISCR2* (**Figura 33**) transportadas pelo Tn3, juntamente com os genes *bla*_{TEM-1b} e *sul2*. Os genes *bla*_{CTX-M-2}, *sulI* e *qacEΔ1* também foram identificados em associação ao *ISCR1* (**figura 32B**).

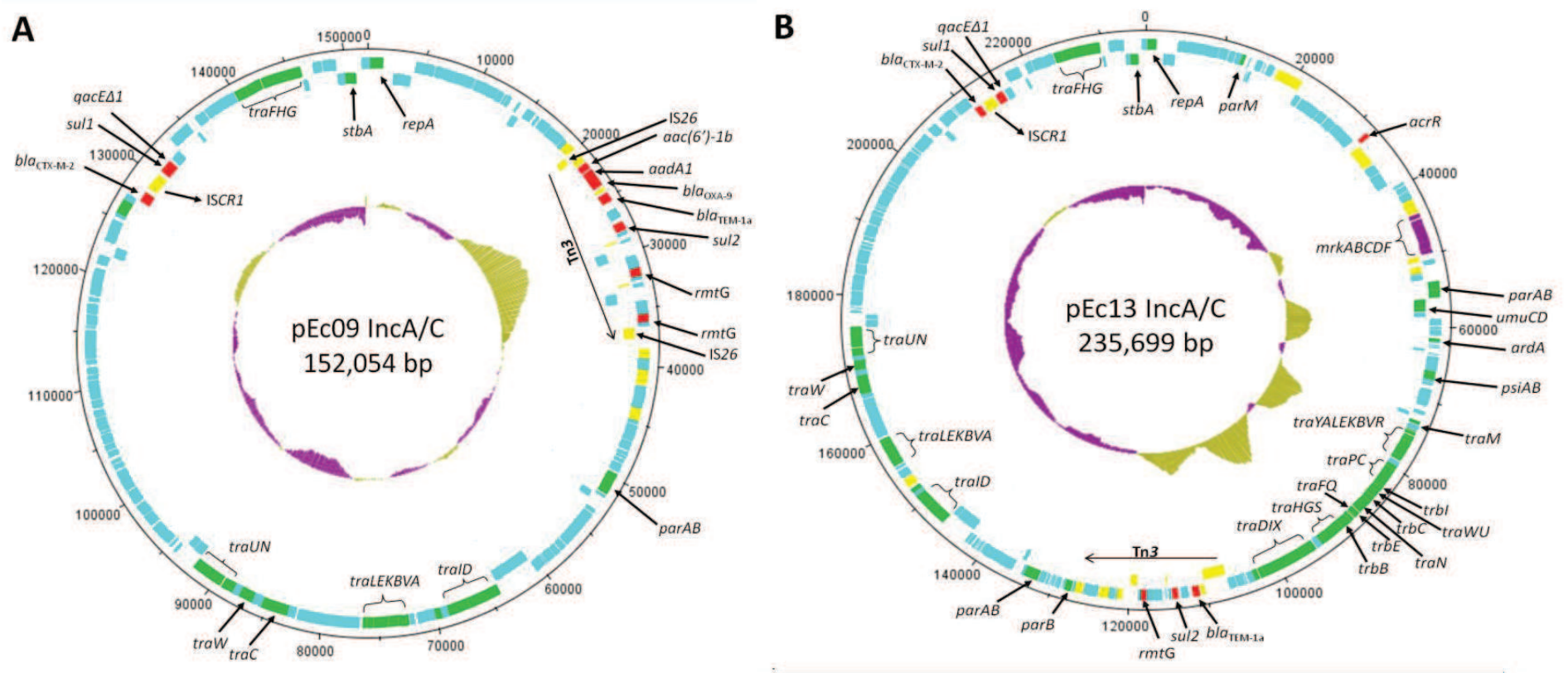


Figura 32. Estrutura dos plasmídeos IncA/C. **A:** pEc09 e **B:** pEc13 transportando o gene *rmtG*. Os círculos internos coloridos em magenta e verde indicam o conteúdo de G+C.

- Genes resistência
- Replicação, partição e conjugação
- Elementos genéticos móveis
- Virulência
- Outros genes

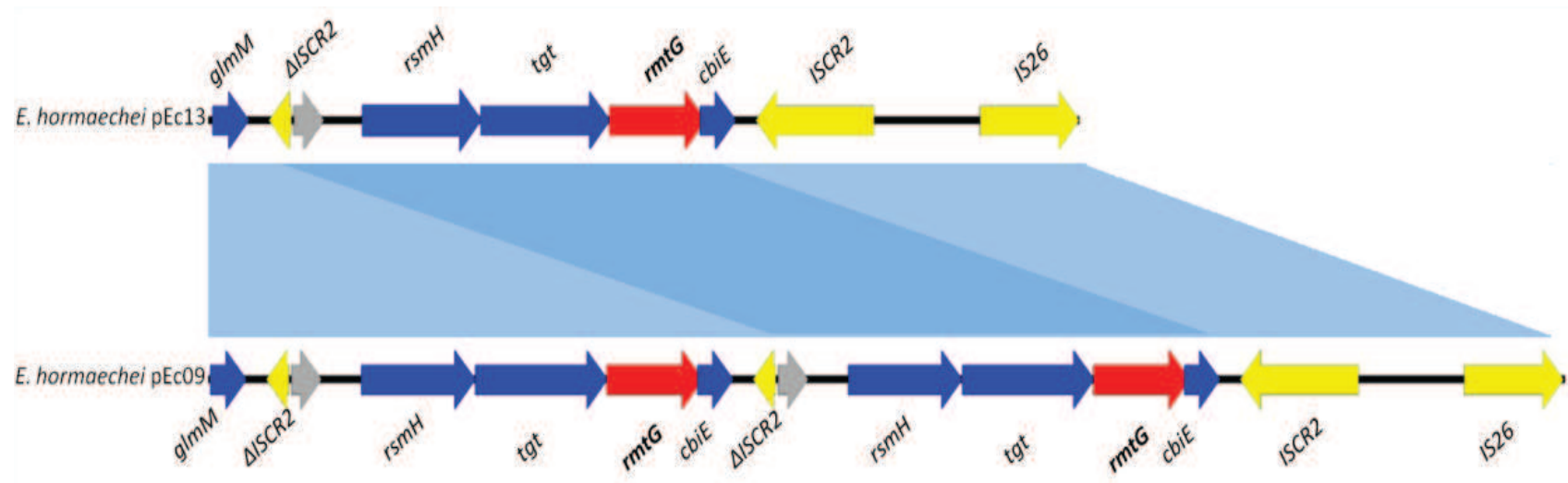


Figura 33. Comparação entre as regiões carreadoras de *rmtG* dos plasmídeos pEc09 e pEc13. Um sombreamento azul claro indica regiões homólogas.

- Genes resistência
- Elementos genéticos móveis
- Genes de virulência e vias bioquímicas
- Proteínas hipotéticas

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

* Perfil Clínico-epidemiológico

O isolamento do CEC em diferentes amostras clínicas reflete a sua capacidade de causar infecções oportunistas em pacientes hospitalizados, tais como infecções do trato respiratório inferior e meningites. ^(133,134) Neste estudo, CEC foi isolado com maior frequência do trato urinário (50%). Um estudo realizado na África mostrou índices variados de prevalência de infecções do trato urinário por CEC em pacientes hospitalizados quando comparadas a outros patógenos de *Enterobacteriales* ⁽¹³⁵⁾. Outro estudo realizado na Hungria com os gêneros *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* associados a infecção do trato urinário mostrou que o CEC era um dos patógenos mais prevalentes, tanto em pacientes hospitalizados como ambulatoriais durante 10 anos. ⁽¹³⁶⁾

O segundo sítio mais frequente de isolamento de CEC foi o trato respiratório inferior (22%), sendo que a maioria das amostras de aspirado traqueal foram obtidas de pacientes internados em UTI. Um fator importante para aquisição de pneumonia por CEC parece ser a intubação endotraqueal, principalmente a intubação translaríngea pois pode mover CEC da parte do trato respiratório superior para o inferior. ⁽¹³⁷⁾ Pacientes tratados em UTIs com distúrbios neurológicos, bronco pulmonares e oncológicos podem ser mais acometidos por pneumonia por estes microrganismos. ⁽¹³⁷⁾

Amostras de tecidos para biópsias foram o terceiro sítio mais frequente neste estudo (7%), onde o CEC foi detectado nestas amostras biológicas. Até o momento, não há relatos na literatura de infecções pelo CEC neste sítio biológico. No entanto, infecções de corrente sanguínea por CEC são mais relatadas mundialmente, ^(45,138,139) porém em nosso estudo foi o sítio com menor frequência de detecção, seguidos de ponta de cateter, líquidos estéreis, pólipos nasal, fragmento ósseo e abscesso.

* Avaliação da susceptibilidade aos antimicrobianos e genes de resistência

A maioria dos isolados deste estudo são considerados MDR (*multidrug resistant*), ou seja, apresentam resistência a pelo menos um agente de três ou mais classes de antimicrobianos, como definido em acordo entre o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) e ECDC (*European Centers for Disease Prevention and Control*).⁽¹⁴⁰⁾ Nesse mesmo acordo também foram definidas dezessete categorias de antimicrobianos para o tratamento de infecções por *Enterobacteriales*.⁽¹⁴⁰⁾ Porém, no presente estudo foram testadas cinco dessas categorias: aminoglicosídeos, carbapenêmicos, cefalosporinas de terceira e quarta gerações e fluoroquinolonas, aos quais CEC não apresenta resistência intrínseca.

A amicacina foi o antimicrobiano ao qual os isolados de CEC apresentaram maior taxa de sensibilidade. Em um estudo realizado na Espanha com CEC⁽¹⁴¹⁾ (17 linhagens - 18%) apresentaram sensibilidade a amicacina. Sendo talvez, uma opção de tratamento para infecções por CEC, quando comparado com a gentamicina que foi o aminoglicosídeo com maior taxa de não sensibilidade (53%) em nosso estudo.

Os genes AMEs que modificam a gentamicina como *ant(2'')-Ia* e *aac(3')-IIa*, e *aac(6')-Ib* e *aph(3')-VI* que modificam amicacina⁽⁸¹⁾ tornam os microrganismos resistente a classe destes antibióticos comumente usados,⁽¹⁴²⁾ o que parece ser frequente nos isolados de CEC resistentes.

O gene *aac(6')-Ib* tem sido descrito como prevalente em várias espécies de *Enterobacteriales*,^(143,144) e foi associado principalmente as 16S rRNA metiltransferases (*armA* e *rmtB*), em isolados clínicos de *E. cloacae* na China.⁽¹⁴⁵⁾ O mesmo foi observado no isolados de Ec9 e Ec13 estudados, onde carregavam os genes *aac(6')-Ib* e *rmtG*.

Muito dos genes AME estão localizados em EGM ou em sequências de inserção, passíveis de transferência por plasmídeos conjugativos, ⁽¹⁴⁴⁾ o que explica sua ampla disseminação e alta frequência de detecção em distintas espécies bacterianas e no complexo *E. cloacae*.

As 16S rRNA metiltransferases são responsáveis por altos níveis de resistência aos aminoglicosídeos em *Enterobacteriales* ⁽⁸⁴⁾. A 16S rRNA metiltransferases RmtD foi inicialmente identificada em *P. aeruginosa* ⁽⁸⁰⁾, mas foram posteriormente encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae* e *Citrobacter freundii* no Brasil, Chile e Argentina. ^(80,86,88) Foi interessante observar que o isolado Ec2, que abriga *rmtD-2* também apresenta outros genes de resistência tais como: *aac(3-IIIa)*, *ant(2'')-Ia*, *qnrB* e *bla_{CTX-M-15}*. De fato, isolados produtores de 16S RMTases costumam carrear genes do tipo ESBL, PMQR, AME e outros genes de resistência de diferentes classes de antimicrobianos. Moura e colaboradores descreveram a coexistência de *rmtD-2* com *bla_{CTX-M-131}*, *aac(6')Ib-cr*, *aacA4*, *sulI* e *tet(G)* em *Aeromonas hydrophila* isolada em 2007 de hemocultura em um hospital terciário de São Paulo. ⁽¹⁴⁶⁾ Os isolados Ec9 e Ec13, que albergava o gene *rmtG* também apresentaram genes de resistência a outras classes de antimicrobianos. A enzima RmtG em *Enterobacteriales* foi identificada inicialmente em *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases do tipo KPC ⁽⁸⁸⁾ e *Klebsiella aerogenes*. ⁽¹⁴⁷⁾ A resistência à cefepime, ceftazidima e ceftriaxona resulta principalmente da produção de β -lactamases que hidrolisam cefalosporinas de terceira e quarta gerações, e não das cefalosporinases cromossomais constitutivas do CEC. ⁽¹⁴⁸⁾

Neste estudo foram identificadas diversas ESBL, sendo CTX-M-15 a mais frequente, seguida por CTX-M-2, SHV-5, CTX-M-8 e SHV-12. Um estudo realizado com CEC isolados de hemocultura em cinco hospitais do Rio de Janeiro também

encontrou o predomínio de CTX-M-15. ⁽¹⁴⁹⁾ No entanto, em um hospital universitário de Curitiba-PR, a variante CTX-M-2 foi a mais predominante em CEC associadas às infecções de corrente sanguínea, e CTX-M-15 foi encontrada em apenas 1 isolado. ⁽⁴⁵⁾ Poucos são os estudos realizados sobre a epidemiologia de isolados do CEC produtores de variantes de CTX-M, apesar dos muitos relatos de *Enterobacteriales* que produzem enzimas CTX-M em hospitais brasileiros. ⁽¹⁴⁹⁾ Foi interessante detectar *bla*_{CTX-M-8} em CEC 66 em nosso estudo. Este tipo de ESBL do grupo CTX-M-8/25 tem sido descrita em outras espécies como *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp, também provenientes de hospital universitário no sul do Brasil. ⁽¹⁵⁰⁾

AS ESBL SHV-5 e SHV-12 têm sido encontradas em diversas espécies de bactérias Gram-negativas. ⁽⁴²⁾ Em um estudo em dois hospitais na China com 100 isolados de CEC a enzima SHV-12 foi detectada em 58% dos casos. ⁽¹⁵¹⁾ No México, SHV-5 foi detectado em um *E. cloacae* isolado de um paciente admitido em UTI, ⁽¹⁵²⁾ semelhante ao estudo em questão, onde *bla*_{SHV-5} foi detectado em Ec41 e Ec42 isolados em amostras clínicas de pacientes internados em diferentes UTIs.

A resistência à ciprofloxacina e genes plasmidiais que codificam resistência às quinolonas (PMQR), foi observada na maioria dos isolados. No entanto, em 10 CEC do estudo (CEC7A, XIV, 34^{NC}, 37^{NC}, 39, 46, 57, 58, 63 e 64) não foram detectados genes PMQR. Nestes casos, outro mecanismo de resistência bacteriana pode estar presente, como mutações no ponto cromossômico nas regiões determinantes da resistência à quinolona (QRDR) (genes *gyrA* e/ou *parC*), que codificam as subunidades das enzimas girase e topoisomerase IV. ⁽⁹⁾ O gene *aac(6')Ib-cr* foi o mais prevalente se comparado ao *qnrB* no estudo em questão. Na Argentina, *aac(6')Ib-cr* foi associado a variantes de *qnrB* em *E. cloacae* em 66 hospitais. ⁽¹⁵³⁾ Em cinco hospitais pediátricos do México o gene

qnrB e suas variantes foram detectadas em *E. cloacae*.⁽¹⁵⁴⁾ A associação entre ESBL e PMQR foi observada em um estudo realizado com 167 isolados do CEC em um hospital da Bulgária, onde a associação CTX-M-15 + QnrB foi encontrada em 96% dos isolados de CEC.⁽⁹⁾ Em nosso estudo, tal associação entre os genes *bla*_{CTX-M-15}+*qnrB*+*aac(6')*-*Ib-cr* foi detectado em 14(19%) dos isolados de CEC. Os genes *qnrA*, *qnrS*, *qepA* e *OqxAB* não foram detectados nos 74 CEC investigados neste estudo.

A resistência ao ertapenem é considerada um indicador de alta sensibilidade para detecção de isolados produtores de carbapenemases⁽¹⁵⁵⁾. Assim, a resistência ao ertapenem foi determinante para a seleção de todos os isolados incluídos nesse estudo. Contudo, é um indicador com baixa especificidade, pois a associação entre mecanismos de resistência (por ex. produção de ESBL associada a mutações nas porinas da membrana celular) também podem promover resistência ao ertapenem, mas não aos demais carbapenêmicos⁽¹⁵⁶⁾, o que pode explicar porque apenas 42% dos isolados apresentaram resistência ao imipenem e meropenem e genes que codificam carbapenemases.

O gene *bla*_{KPC-2} foi o principal determinante de resistência aos carbapenêmicos encontrado neste estudo. Em um estudo envolvendo 11 hospitais do sul do Brasil, *bla*_{KPC-2} foi encontrado em 42,9% dos *E. cloacae*.⁽¹³⁴⁾ Outro estudo, com 28 CEC isoladas em nove hospitais colombianos, *bla*_{KPC-2} foi detectado em 68% dos isolados.⁽¹⁵⁷⁾ Na Espanha, um estudo de vigilância identificou 10,8% dos CEC como carreadores de *bla*_{KPC-2}.⁽¹⁵⁸⁾ Outros genes carbapenemases já foram identificados em CEC. Durante estudos realizados na China foram identificados CEC produtores de NDM-1 e IMP-4⁽¹⁵⁹⁾ e KPC-3, VIM-1 e NDM-1.⁽¹⁶⁰⁾ O CEC66 foi o único isolado em que apresentou resistência aos três carbapenêmicos, porém, não se detectou nenhuma das carbapenemases testadas neste estudo. Neste caso, outros mecanismos de resistência podem estar atuando, como por ex.,

diminuição ou perda de proteínas de membrana externa (OmpC e/ou OmpF) associadas a expressão de ESBLs, ou a presença do sistema de bomba de efluxo AcrAB-TolC. ⁽¹⁶¹⁾

* Caracterização do Genoma Completo de Ec61

A identificação de bactérias produtoras da carbapenemase tipo BKC é rara, e genes que codificam essa carbapenemase não foram, antes desse estudo, encontrados e descritos em espécies diferentes de *K. pneumoniae*. ^(55,56) Assim, o isolado Ec61 foi submetido ao sequenciamento do genoma completo, o que permitiu a sua melhor caracterização. A análise do genoma permitiu identificar corretamente o isolado, como *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* ST451, um clone já associado ao *bla*_{KPC-3} nos Estados Unidos. ⁽¹⁶²⁾ Todos os genes *bla*_{BKC-1} previamente identificados são carregados por plasmídeos não-conjugativos IncQ de 10 kb e associados a *aph(3)-VI* e ISKpn23, uma sequência de inserção da família IS1380. ^(55,163)

O gene *bla*_{BKC-2}, uma nova variante, identificada pela primeira vez nesse estudo, é o responsável pela resistência ao ertapenem e imipenem em CEC 61. Está localizado em um plasmídeo IncQ1, que se apresentou 1,3 Kb menor que o plasmídeo em que *bla*_{BKC-1} foi inicialmente identificado, e a ISKpn23 *upstream* em *bla*_{BKC-2} está ausente, sugerindo a saída da ISKpn23 do pEc61C. Considerando que associação de ISKpn23 com *bla*_{BKC-1} seja responsável pela mobilização e expressão de *bla*_{BKC-1} ^(57,163), podemos inferir que a ausência da ISKpn23 seja responsável pela não mobilidade do plasmídeo portador de *bla*_{BKC-2}, que resultou na dificuldade de transferência por conjugação.

Após a descrição inicial de BKC-1 em 2015 no Brasil, somente duas outras linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de BKC-1 foram descritas (ST1781 e ST442, complexo clonal 442), isoladas de dois pacientes admitidos em diferentes hospitais na cidade de São Paulo. ⁽⁵⁶⁾ Nestas linhagens, *bla*_{BKC-1} também está localizado no mesmo

plasmídeo IncQ de 10 kb em que foi inicialmente identificado. Os plasmídeos da família IncQ são distinguidos por possuir um mecanismo de replicação exclusivo (RepB-primase, RepA-helicase, RepC- proteína de ligação específica ao DNA) e serem mobilizáveis, ⁽¹⁶⁴⁾ porém não são auto conjugativos, mas podem ser mobilizados em alta frequência por plasmídeos conjugativos auxiliares, o que pode justificar a não transferência por conjugação de *bla*_{BKC-1} nas *Klebsiella pneumoniae* em que este gene foi detectado. ^(55,56)

Conforme observado no quadro 14, as CIMs da transformante BKC-1⁽⁵⁵⁾ foram maiores quando comparadas as apresentadas pela transformante BKC-2, sugerindo que, em seu contexto genético natural, o BKC-1 possui maior atividade sobre os β -lactâmicos. Sabe-se que por meio de estudos de cinética enzimática, pode-se determinar as afinidades de ligação de substrato e inibidores a uma enzima e sua eficiência catalítica máxima. ⁽¹⁶⁵⁾ Portanto, serão realizados outros experimentos para confirmação da baixa atividade enzimática de BKC-2 tais como: teste de hidrólise da enzima ou análise de espectrometria de massa, além de experimento de clonagem com o mesmo ambiente genético (suposta região promotora), tanto de BKC-1 e BKC-2, desta maneira as CIMs resultantes serão a conclusão final sobre a eficácia das duas variantes de BKC.

Nesse estudo também foi identificado uma nova variante da cefalosporinase ACT, a ACT-84, que difere do ACT-83 por uma única substituição de aminoácidos (Pro58Ser). Embora este seja o primeiro relato de ACT-84, a substituição Pro58Ser foi detectada anteriormente em outros isolados de *E. cloacae* (ST200) resistentes aos carbapenêmicos, no entanto, associada a outras mutações do gene *ampC*. ⁽¹⁶⁶⁾ Como em BKC-2, outros experimentos como cinética enzimática serão realizados para atribuir a atividade de degradação dos carbapenêmicos ao ACT-84.

Apesar de ser carreador de *mcr-9*, o isolado Ec61 é sensível à colistina. Esse fenótipo foi previamente observado em *Escherichia coli* carreadora de *mcr-9* isolada de fezes humanas na França em 2019. ⁽¹⁶⁷⁾

A localização de *mcr-9* em um plasmídeo IncFIB é um achado interessante. No entanto, IncFIB foi identificado em associação com *mcr-8* no clone bem sucedido e de alto risco de *Klebsiella pneumoniae* ST15. ⁽¹⁶⁸⁾ Os plasmídeos IncHI são os principais responsáveis pela disseminação de *mcr-9*, ^(167,169) porém suas variantes IncHI2 ou IncHI2A foram detectados carreando *mcr-9* em *E. cloacae*, *E. coli*, *K. oxytoca* e *Citrobacter freundii* isolados de cavalos na Suécia, o que indica a sua capacidade de disseminação interespécies. ⁽¹⁷⁰⁾

O mecanismo responsável pela mobilização de *mcr-9* em Ec61 não foi elucidado, mas seu esqueleto genético apresenta a mesma estrutura anteriormente descrita nos plasmídeos IncHI, ⁽¹⁶⁷⁾ onde diferentes sequências de inserção (IS903-like, IS903B, IS26, IS1) tem sido associadas com *mcr-9*. ^(167,170) IncFIB são plasmídeos conjugativos reconhecidos, ⁽⁹⁴⁾ entretanto, o ensaio de conjugação para a transferência de IncFIB com *mcr-9* foi possível apenas a 42° C, usando-se baixa concentração de colistina como agente seletivo, e ainda assim com baixa frequência (10^{-8}). Os resultados levantaram a hipótese de disseminação limitada do *mcr-9* pelo IncFIB.

* Caracterização do Genoma Completo das Ec2, Ec9 e Ec13

Os isolados Ec02, Ec09, Ec13 foram inicialmente identificados como *Enterobacter cloacae complex* pelo método bioquímico automatizado adotado na rotina do laboratório clínico em seu hospital de origem.

De fato, os métodos de identificação disponíveis na maioria dos laboratórios clínicos apresentam pouca capacidade de discriminar membros do CEC.

Os isolados Ec2, Ec09 e Ec13 foram submetidos ao sequenciamento de genoma completo visando identificar a diversidade de genes de resistência de maneira mais detalhada e obter outras informações sobre as plataformas genéticas que transportam estes genes. Entretanto, em janeiro de 2019 as espécies foram modificadas de *E. cloacae* subsp *cloacae* (identificadas por MALD-TOF) para *Enterobacter hormaechei*, segundo informação enviada (e-mail) por pesquisadores do GenBank (NCBI) comunicando a modificação de Ec02, Ec9 e Ec13. Tais pesquisadores analisaram as sequências depositadas, por método estatístico de similaridade de todo o genoma, como ANI-*average nucleotide identity*.

E. hormaechei é um importante patógeno entre os membros do CEC, sendo mais frequentemente isolado de amostras clínicas humanas ⁽¹⁷¹⁾ e com capacidade de persistir e se espalhar nos ambientes hospitalares, onde pode atuar como um reservatório para infecções e transmissão de resistência a antibióticos. ⁽¹⁷²⁾

** Ec02

A análise do genoma permitiu determinar que Ec02 pertence ao “*sequence type*” ST395. Apesar de terem sido encontrados plasmídeos dos grupos de incompatibilidade IncFII, IncHI2A e IncI1, o gene *rmtD-2* não estava localizado em nenhum deles. Bueno e colaboradores detectaram *rmtD-1* e sua variante *rmtD-2* em plasmídeos IncL/M e IncA/C respectivamente, em *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados em hospitais de São Paulo. ⁽¹⁰³⁾

** Ec09 e Ec13

O isolado Ec13 não está geneticamente relacionado com Ec9, apesar de compartilhar vários genes de resistência. O primeiro pertence ao clone ST121 e o segundo ao ST184. Em um estudo envolvendo 12 hospitais da Europa e Israel, um *E. cloacae* proveniente

da Itália apresentava o ST121 carreando CTX-M-15 e SHV-2, ⁽¹⁷³⁾ diferindo de Ec13 ST121 que carregava CTX-M-2, ACT-7, OXA-9 e TEM-1.

Já Ec9 que careava os mesmos genes de resistência, e pertencente ao ST184, apresentou o mesmo tipo de sequência que *E. cloacae* carreando carbapenemase VIM-2 em hospitais da Argentina. ⁽¹⁷⁴⁾ A coexistência de diversos genes de resistência com 16S rRNA metiltransferases é comum pois os genes que as codificam são tipicamente transportados por EGM que podem carrear determinantes de resistência adicionais. ⁽⁸⁶⁾

O gene *rmtG* já foi detectado no cromossomo de *P. aeruginosa* ^(175,176) e em plasmídeos pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncN, IncL/M, ⁽⁸⁸⁾ e IncA/C ^(177,178) em *Klebsiella pneumoniae*.

No presente estudo, pEc09 e pEc13 também carregavam esta 16S RMTase em plasmídeos do grupo IncA/C. Plasmídeos da família IncA/C são, geralmente, grandes (>110 Kb) e se disseminam entre várias espécies de *Enterobacteriaceae* e *Vibrionaceae*, ⁽¹⁷⁹⁾ podendo mobilizar genes que conferem resistência aos β -lactâmicos, aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamida, trimetoprim, quinolonas e tetraciclina. ⁽¹⁸⁰⁾

Tanto pEc09 quanto pEc13 carregam *rmtG* associado aos genes *rsmH* e *tgt*. O papel do gene *rsmH* gerando um códon de parada não foi investigado.

O gene *rsmH* codifica rRNA *small-subunit methyltransferase* (RsmH), que realiza a metilação pós transcricional da C1407 no 16S rRNA no ribossomo e é essencial para a maturação adequada da subunidade 30S durante biogênese. ⁽¹⁸¹⁾ O gene *tgt* codifica a “tRNA-guanine transglycosylase” (Tgt), responsável pela incorporação de bases nitrogenadas em tRNAs. ⁽¹⁸²⁾

Comparando o ambiente genético, os genes *rmtG*, *tgt* e *rsmH*, em pEc09 estão

flanqueados por duas cópias de *ISCR2*, e apenas uma cópia em pEc13. A *ISCR2* está presente em vários plasmídeos, geralmente na forma truncada, é um elemento móvel da família *IS91* que tem sido encontrado próximo a genes de resistência a sulfonamida, trimetoprim e cloranfenicol em microrganismos Gram-negativos. ⁽¹⁸³⁾

Segundo Bueno (2017) o arranjo *rmtG-rsmH-tgt* conservado, localizadas no Tn3, onde também existem *IS26* e *ISCR2* pode ter sido responsável pela mobilização subsequente de *rmtG* e de outras RMTases para plasmídeos de diferentes grupos de incompatibilidade. ⁽¹⁸⁴⁾ De fato, *IS26* foi detectado em plasmídeo IncA/C (pKp368/10) carreando *rmtD-2*, porém associado *ISCR3* e em Tn3 em *K. pneumoniae* ⁽¹⁰³⁾ A *IS26* está constantemente associada a genes de resistência de diferentes classes de antimicrobianos e está comprometida na sua propagação em bactérias Gram negativas. ⁽¹⁸⁵⁾ A rápida disseminação dos genes 16S RMTase mediada por plasmídeos de uma ampla gama de hospedeiros, como IncA/C, aparentemente acelera a aquisição de natureza multirresistente em microrganismos patogênicos. ⁽⁸⁶⁾

CONCLUSÃO

4 CONCLUSÕES

A maioria dos CEC deste estudo carrega simultaneamente mais de um gene, associados à resistência a diferentes classes de antimicrobianos.

Variantes de *bla*_{CTX-M} são os principais determinantes da produção de ESBL, sendo *bla*_{CTX-M-15} o mais frequente e *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{CTX-M-8} pouco disseminados. Os genes *bla*_{SHV-12} e *bla*_{SHV-5} também contribuem para a produção de ESBL.

O gene *bla*_{KPC-2} é o principal responsável pela produção de carbapenemase.

Entre os genes PMQR, *aac*(6')-Ib-cr é o predominante, mas *qnrB* também contribui para a redução da suscetibilidade às fluoroquinolonas.

A produção de AMEs, especificamente nucleotidiltransferases e acetiltransferases, codificadas por *ant*(2'')-Ia, *aac*(6')-Ib e *aac*(3)-IIa são os principais determinantes da resistência aos aminoglicosídeos.

A presença de 16S RMTases é incomum, mas a detecção de RmtD e RmtG pela em diferentes linhagens de *E. hormaechei* mostra o potencial para a disseminação destes determinantes de resistência no CEC.

A ocorrência de novos genes pode contribuir para a ampliação do perfil de resistência, como observado pela detecção das novas variantes *bla*_{BKC-2} e *bla*_{ACT-84}, e do ainda raro gene *mcr-9* em um isolado de *E. hormaechei* subsp. *xiangfangensis*.

Os diferentes elementos genéticos móveis detectados neste estudo (IncA/C, IncQ, IncFIB, Tn3, ISCR2, IS26) nos permitiu verificar a variabilidade genética e a facilidade de disseminação de diferentes genes de resistência no ambiente hospitalar.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Khameneh B, Diab R, Ghazvini K, Fazly Bazzaz BS. Breakthroughs in bacterial resistance mechanisms and the potential ways to combat them. *Microb Pathog* 2016;95:32–42.
2. Septimus EJ, Owens RC. Need and potential of antimicrobial stewardship in community hospitals. *Clin Infect Dis*. 2011;53(SUPPL. 1).
3. Sedláková MH, Urbánek K, Vojtová V, Suchánková H, Imwensi P, Kolář M. Antibiotic consumption and its influence on the resistance in Enterobacteriaceae. *BMC Res Notes*. 2014;7(1).
4. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, et al. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated with Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016;37(11):1288–301.
5. Davin-Regli A, Pagès JM. Enterobacter aerogenes and Enterobacter cloacae; Versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015;18:1– 10.
6. Hilty M, Sendi P, Seiffert SN, Droz S, Perreten V, Hujer AM, et al. Characterisation and clinical features of Enterobacter cloacae bloodstream infections occurring at a tertiary care university hospital in Switzerland: Is cefepime adequate therapy? *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(3):236–49.
7. Davin-Regli A, Lavigne J-P, Pagès J-M. Enterobacter spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(4):e00002-19.

8. Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. Enterobacter cloacae complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol.* 2012; 7(7): 887-902.
9. Markovska R, Stoeva T, Dimitrova D, Bovanova L, Stankova P, Mihova K, Mitov I. Quinolone resistance mechanisms among third-generation cephalosporin resistant isolates of Enterobacter spp. in a Bulgarian university hospital. 2019; 12:1445-1455.
10. Li Y, Green KD, Johnson BR, Garneau-Tsodikova S. Inhibition of aminoglycoside acetyltransferase resistance enzymes by metal salts. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(7):4148–56.
11. Threats F on M, Health B on G, Institute of Medicine. Antibiotic resistance: Implications for Global Health and Novel Intervention Strategies. National Academies Press (US); 2010.
12. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005;3(9):722–32.
13. Boerlin P, Reid-Smith RJ. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. *Anim Health Res Rev.* 2008;9(2):115–26.
14. Martínez JL, Baquero F. Emergence and spread of antibiotic resistance: Setting a parameter space. *Ups J Med Sci.* 2014;119(2):68–77.
15. Adeolu M, Alnajjar S, Naushad S, Gupta RS. Genome-based Phylogeny and Taxonomy of the ‘Enterobacteriales’: Proposal for Enterobacterales Ord. Nov Divided Into the Families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae Fam Nov., Pectobacteriaceae Fam. Nov., Yersiniaceae Fam. Nov., Hafniaceae Fam. Nov., Morganellaceae Fam. Nov., and Budviciaceae Fam. Nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2016; 66(12):5575-5599.

16. Lazarovitch T, Amity K, Coyle JR, Ackerman B, Tal-Jasper R, Ofer-Friedman H et al. The Complex Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacter Infections: A Multicenter Descriptive Analysis. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2015; 36(11): 1283-19.
17. Annavajhala MK, Gomez-Simmonds A, Uhlemann AC. Multidrug-Resistant Enterobacter cloacae Complex Emerging as a Global, Diversifying Threat. *Front Microbiol.* 2019; 31:10-44.
18. Delmas J, Breyse F, Devulder G, Flandrois JP, Chomarat M. Rapid identification of Enterobacteriaceae by sequencing DNA gyrase subunit B encoding gene. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006; 55(4):263-8.
19. Pasternak J. New methods of microbiological identification using MARDI-TOF. *Einstein.* 2012; 10(1):118-9.
20. Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A duol approach employing Maldi-Tof MS and real-time PCR for fast species identification within the Enterobacter cloacae complex. *FEMS Microbiol Lett.* 2012; 328(1):46-53.
21. Richter SS, Sercia L, Branda JA, Burnham CA, Bythrow M, Ferraro MJ, et al. Identification of Enterobacteriaceae by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry using the VITEK MS system. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2013; 32(12): 1571-8.
22. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population of the nomen species Enterobacter cloacae. *App Environ Microbiol.* 2003; 69(9):5306-18.
23. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Heesemann J, et al. Reassignment of Enterobacter dissolvens to Enterobacter cloacae as E. cloacae subspecies dissolvens comb. nov. and emended description of Enterobacter asburiae and

Enterobacter kobei. Syst. Appl. Microbiol 2005A; 28(3):196-205.

24. Hoffmann H, Stindl S, Ludwig W, Stumpf A, Mehlen A, Monget A, et al. *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* subsp.nov., *E. hormaechei* subsp. *steigerwaltii* subsp. nov., three new subspecies of clinical importance. J Clin Microbiol. 2005B; 43(7):3297-303.
25. Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heesemann J, et al. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. Syst Appl Microbiol. 2005C; 28(3):206-12.
26. Miyoshi-Akiyama T, Hayakawa K, Ohmagari N, Shimojima M, Kirikae T. Multilocus sequence typing (MLST) for characterization of *Enterobacter cloacae*. PloS One. 2013; 8(6):e66358.
27. Chavda KD, Chen L, Fouts DE, Sutton G, Brinkac L, Jenkins SG, et al. Comprehensive Genome Analysis of Carbapenemase Producing *Enterobacter* spp.: New Insights into Phylogeny, Population structure, and Resistance Mechanisms. MBio. 2016; 7(6):e02093-16.
28. Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggenkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on computational analysis of sequenced *Enterobacter* genomes. F1000Research. 2018; 7:521.
29. Federhen S, Rossello-Mora R, Klenk HP, Tindall BJ, Konstantinidis KT, Whitman WB, et al. Meeting report: GenBank microbial genomic taxonomy workshop (12- 13 May, 2015). Stand Genomic Sci. 2016; 11:15.
30. Ciufu S, Kannan S, Sharma S, Badretdin A, Clark K, Turner S, et al. Using

average nucleotide identity to improve taxonomic assignments in prokaryotic genomes at the NCBI. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2018; 68(7):2386-2392.

31. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010; 23(1):160-201.
32. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Perspect Med*. 2016; 6(8):a025247.
33. Suárez C, Gudiol F. Beta-lactam antibiotics. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(2):116-29.
34. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010; 300(6):371-9.
35. Bush K, Fisher JF. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*. 2011; 65:455-78.
36. Livermore DM. Beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. *J Antimicrob Chemother*. 1998; 41 Suppl D:25-41.
37. Peirano G, Pitout JDD. Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Update on Molecular Epidemiology and Treatment Options. *Drugs*. 2019; 79(14):1529-1541.
38. Bonomo, RA. β -Lactamase: A Focus on Current Challenges. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2017; 7(1):a025239.
39. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54(3):969-76.
40. Ghafourian S, Sadeghifand N, Soheili S, Sekawi Z. Extended Spectrum Beta-lactamases: Definition, Classification and Epidemiology. *Curr Issues Mol Biol*.

2015;17:11-21.

41. Naas T, Queslati S, Bonnin RA, Dabos ML, Zavala A, Dortet L, et al. Beta-lactamase database (BLDB) – structure and function. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2017; 32(1):917-919.
42. Liakopoulos A, Mevius D, Ceccarelli D. A review of SHV Extended-Spectrum β -Lactamases: Neglected Yet Ubiquitous. *Front Microbiol*. 2016; 7:1374.
43. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β -lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72(8):2145-2155.
44. Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca ME, Marinowicz DR, et al. Assessment of extended-spectrum β -lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*. 2013; 42(1):76-9.
45. Nogueira Kda S, Paganini MC, Conte A, Cogo LL, Taborda de Messias Reason I, da Silva MJ, 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*. 2014; 32(2):87-92.
46. Andrade LN, Siqueira TES, Martinez R, Darini ALC. Multidrug-Resistant CTX-M- (15,9,2)-and KPC-2 Producing *Enterobacter hormaechei* and *Enterobacter asburiae* Isolates Possessed a Set of Acquired Heavy Metal Tolerance Genes Including a Chromosomal *sil* Operon (for Acquired Silver Resistance). *Front Microbiol*. 2018; 9:539.
47. Bonnet R, Sampaio JL, Labia R, De Champs C, Sirot D, Chanal C, et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated

in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(7):1936-42.

48. Cui X, Zhang H, Du H. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Detection and Antimicrobial Therapy. *Front Microbiol.* 2019; 10:1823.

49. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017; 8(4):460-469.

50. Bonomo RA, Burd EM, Conly J, Limbano BM, Poirel L, Segre JA, et al. Carbapenemase-Producing Organisms: A Global Scourge. *Clin Infect Dis.* 2018; 66(8):1290-1297.

51. Boyd DA, Mataseie LF, Davidson R, Delpont JA, Fuller J, Hoang L, et al. Enterobacter cloacae Complex Isolates Harboring *bla*NMC-A or *bla*IMI-Types Class A Carbapenemase Genes on Novel Chromosomal Integrative Elements and Plasmids. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(5): pii02578-16.

52. Streling AP, Barbosa PP, Marcondes MF, Nicoletti AG, Picão RC, Pinto EC, et al. Genetic and biochemical characterization of GES-16, a new GES-Type β -lactamase with carbapenemase activity in *Serratia marcescens*. *Diag Microbiol Infect Dis.* 2018; 92(2):147-151.

53. Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(4):796-7.

54. Chudejova K, Rotova V, Skalova A, Medvecký M, Adamkova V, Papagiannitsis CC, et al. Emergence of sequence type 252 *Enterobacter cloacae* producing GES-5 carbapenemase in a Czech hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(2):148- 150.

55. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, Almeida LG, Nicolás MF, Vasconcelos AT, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from

- Klebsiella pneumoniae clinical isolates in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2015; 59(9):5159-64.
56. Martins WM, Nicoletti AG, Santos SR, Sampaio JL, Gales AC. Frequency of BKC- 1-Producing Klebsiella Species Isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2016; 60(8):5044-6.
57. Escandón-Vargas K, Reyes S, Gutiérrez S, Villegas MV. The epidemiology of carbapenemases in Latin America and the Caribbean. Expert Rev Ant Infect Ther. 2017; 15(3):277-297.
58. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. Int J Antimicrob Agents. 2009; 34(3):286-8.
59. Quiles MG, Rocchetti TT, Fehlberg LC, Kusano EJ, Chebabo A, Pereira RM, et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. Braz J Med Biol Res. 2015; 48(2):174-7.
60. Martins ER, Estofolete CF, Zequini AB, Cerdeira L, de Oliveira Garcia D, Bueno MFC, et al. Transfer of KPC-2 carbapenemase from Klebsiella pneumoniae to Enterobacter cloacae in a patient receiving meropenem therapy. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017; 88(3):287-289.
61. Mairi A, Pantel A, Sotto A, Lavigne JP, Touati A. OXA-48 like carbapenemases producing Enterobacteriaceae in different niches. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2018; 37(4):587-604.
62. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, Rozales FP, Magagnin CM, Falci DR, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D β -lactamase, in Enterobacter hormaechei from Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2014; 58(6):3566-7.

63. Magagnin CM, Rozales FP, Antochervis L, Nunes LS, Martins AS, Barth AL, et al. Dissemination of blaOXA-370 gene among several Enterobacteriaceae species in Brazil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017; 36(10):1907-1910.
64. Martínez-Martínez L, González-López JJ. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2014; 32 Suppl 4:4-9.
65. De Belder D, Faccone D, Tijet N, Melano RG, Rapoport M, Petroni A, et al. Novel class 1 integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. *Infect Genet Evol*. 2017; 54:374-378.
66. Wu W, Feng Y, Tang G, Qiao F, McNally A, Zong Z. NDM-Metallo- β -lactamases and their bacterial producers in health care settings. *Clin Microbiol Rev*. 2019; 32(2) pii:e00115-18.
67. Vila J, Carretero O, Viedma E, Lora-Tamavo J, Mingorance J, Chaves F. Emergence of NDM-7-producing multi-drug resistant *Enterobacter hormaechei* sequence type ST-78 in Spain: a high-risk international clone. *Int J Antimicrob Agents*. 2019; 53(4):533-534.
68. Paskova V, Medvecký M, Skalova A, Chudejova K, Bitar I, Jakubu V, et al. Characterization of NDM-Encoding Plasmids From Enterobacteraceae Recovered From Czech Hospital. *Front Microbiol*. 2018; 9:1549.
69. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68(12):2956-7.
70. da Silva IR, Aires CAM, Conceição-Neto OC, de Oliveira Santos IC, Ferreira Pereira N, Moreno Senna JP, et al. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-

Negative Bacteria in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2019; 25(3):394-399.

71. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N. Mechanism of quinolone action and resistance. *Biochemistry.* 2014; 53(10):1565-74.

72. Correa S, Poeta P, Hébraud M, Capelo JL, Igrejas G. Mechanismos of quinolone action and resistance: where do we stand? *J Med Microbiol.* 2017; 66(5):551-559.

73. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6):423-35.

74. Poirel L, Cattoir V, Nordmann P. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions Between Human, Animal, and Environmental Ecologies. *Front Microbiol.* 2012; 3:24.

75. Ruiz J. Transferable Mechanisms of Quinolone Resistance from 1998 Onward. *Clin Microbiol Rev.* 2019; 32(4):e00007-19.

76. Rodríguez-Martínez JM, Machuca J, Cano ME, Calvo J, Martínez-Martínez L, Pascual. Plasmid-mediated quinolone resistance: Two decades on *Drug Resist Updat.* 2016; 29:13-29.

77. Ramirez MS, Tolmasky ME. Amikacin: Uses, Resistance, and Prospects for Inhibition. *Molecules.* 2017; 22(12):2267.

78. Poulidakos P, Falagas ME. Aminoglycoside therapy in infectious diseases. *Expert Opin Pharmacother.* 2013; 14(12):1585-97.

79. Krause KM, Serio AW, Kane TR, Connolly LE. Aminoglycosides: An Overview. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2016; 6(6):pii: 027029.

80. Doi Y, Wachino JI, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am.*

2016; 30(2);523-537.

81. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug Resist Updat.* 2010;13(6):151-71.
82. Becker B, Cooper MA. Aminoglycoside antibiotics in the 21st century. *ACS Chem Biol.* 2013; 8(1):105-15.
83. Lambert T. Antibiotics that affect the ribosome. *Rev Sci Tech.* 2012; 31(1):57-64.
84. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat.* 2012; 15(3):133-48.
85. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin Infect Dis.* 2007; 45(1):88-94.
86. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. Detection of Methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North america, and Latin America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(5):1843-5.
87. Cassu-Corsi D, Martins WM, Nicoletti AG, Almeida LG, Vasconcelos AT, Gales AC. Characterization of plasmid-mediated rmtB-1 in Enterobacteriaceae clinical isolates from são Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2018; 113(12):e180392.
88. Bueno MF, Francisco GR, O'Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013; 57(5):2397-400.
89. Partridge SR, Kwong SM, Firth N, Jensen SO. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev.* 2018; 31(4).pii:e00088-17.

90. Siguier P, Gourbevre E, Chandler M. Bacterial insertion sequences: their genomic impact and diversity. *FEMS Microbiol Rev.* 2014; 38(5):865-91.
91. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Rev.* 2015; 28(3):565-91.
92. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005; 63(3):219-28.
93. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(6):2227-38.
94. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011; 301(8):654-8.
95. Alvarado A, Garcillán-Barcia MP, de la Cruz F. A degenerate primer MOB typing (DPMT) method to classify gamma-proteobacterial plasmids in clinical and environmental settings. *PLoS One.* 2012; 7(7):e40438
96. Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. Mobility of plasmids. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2010; 74(3):434-52.
97. Frost LS, Leplae R, Summers AO, Toussaint A. Mobile genetic elements: the agents of open source evolution. *Nat Rev Microbiol.* 2005; 3(9):722-32.
98. Shintani M, Sanchez ZK, Kimbara K. Genomic of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Front Microbiol.* 2015; 6:242.
99. Babakhani S, Oloomi M. Transposons: the agents of antibiotic resistance in bacteria. *J Basic Microbiol.* 2018; 58(11):905-917.
100. Skipper KA, Andersen PR, Sharma N, Mikkelsen JG. DNA transposon-based gene

- vehicles-scenes from an evolutionary drive. *J Biomed Sci.* 2013; 20:92.
101. Akrami F, Rajabnia M, Pournajaf A. Resistance integrons; A mini review. *Caspian J Intern Med.* 2019; 10(4):370-376
102. Escudero JA, Loot C, Nivina A, Mazel D. The integron: Adaptation On Demand. 2015; 3(2):MDNA3-0019-2014.
103. Bueno MFC, Francisco GR, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing *rmtD* and *rmtD-2* 16S rRNA methyltransferase genes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(3):1928-31.
104. Martins WMBS, Gales AC. Frequent Tn2 Misannotation in the Genetic Background of *rmtB*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(8). pii:e00811-17.
105. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *blaKPC* gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(4):1257-63.
106. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009; 9(4): 228-36.
107. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *blaKPC-2* gene. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(9):1349-56.
108. Ravi RK, Walton K, Khosroheidari M. MiSeq: A Next Generation Sequencing Platform Genomic Analysis. *Methods Mol Biol.* 2018; 1706: 223-232.
109. Illumina Sequencing Technology. Highest data accuracy, simple workflow, and a broadrange of applications.2010;
https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf

110. Lu H, Giordano F, Ning Z. Oxford Nanopore MinION Sequencing and Genome Assembly. *Genomics Proteomics Bioinformatics*. 2016; 14(5):265-279.
111. Leggett, RM, Clark MD. A world of opportunities with nanopore sequencing. *J Exp Bot*. 2017; 68(20):5419-5429.
112. Runtuwene LR, Tuda JSB, Mongan AE, Suzuki Y. On-Site MinION Sequencing. *Adv Exp Med Biol*. 2019; 1129:143-150.
113. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-third Informational Supplement M100-S23. CLSI, Wayne, PA, USA, 2013.
114. ANVISA. Nota Técnica N° 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fb/d/nota17-04-2013.pdf?MOD=AJPERES>
115. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A preliminary survey of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;184(1):53- 6.
116. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and molecular Epidemiology of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(12):3724-32.
117. de Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a

neonatal Intensive care unit in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(5):1790-3.

118. Muzaheed, Doi Y, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad SM et al. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 61(6):1393-4.

119. Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J 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.* 2008; 46(6):2066-69.

120. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol.* 2012; 50(12):3877-80.

121. Cattoir V, Poirel L, Rotimi V, Soussy CJ, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 60(2):394-7.

122. Park CH, Robicsek A, Jacoby GA, Sahm D, Hooper DC. Prevalence in the United States of aac(6')-Ib-cr encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(11):3953-5.

123. Akers KS, Chaney C, Barsoumian A, Beckius M, Zera W, Yu X et al. Aminoglycoside resistance and Susceptibility Testing errors in *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex. *J Clin Microbiol.* 2010; 48(4):1132-8.

124. O'Hara JA, McGann P, Snesrud EC, Clifford RJ, Waterman PE, Lesho EP et al. Novel 16S rRNA methyltransferases RmtH produce by *Klebsiella pneumoniae*

- associated with war-related trauma. *Antimicrob Agentes Chemother.* 2013; 57(5): 2413-6.
125. Corrêa LL, Montezzi LF, Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Revised and updated multiplex PCR targeting acquired 16S rRNA methyltransferases. *Int J Antimicrob Agents.* 2014;43(5):479-81.
126. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001.
127. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Clinical breakpoints and dosing of antibiotics. Disponível em http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/.
128. Toleman MA. Direct in Gel Genomic Detection of Antibiotic Resistance Gene in S1 Pulsed Field Electrophoresis. *Methods Mol Biol.* 2018; 1736:129-136.
129. Wick RR, Judd LM, Gorrie CL, Holt KE. Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Comput Biol.* 2017;13(6): e1005595.
130. Goris J, Konstantinidis KT, Klappenbach JA, Coenye T, Vandamme P, Tiedje JM. DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int J Syst Evol Microbiol* 2007;57(Pt1):81-91.
131. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis.* 2011; 11(5):355-62.
132. Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Lesin VM et al. SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing. *J Comput Biol.* 2012;19(5):455-77.

133. Liu WY, Wong CF, Chung KM, Jiang JW, Leung FC. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013;8(9):e74487.
134. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini ALDC, Zavascki AP et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol*. 2013;62(11):1721-1724.
135. Irengue LM, Kabego L, Vandenberg O, Chirimwami RB, Gala JL. Antimicrobial resistance in urinary isolates from inpatients and outpatients at a tertiary care hospital in South-Kivu Province (Democratic Republic of Congo). *BMC Res Notes*. 2014;7:374.
136. Gajdács M, Urbán E. Resistance trend and epidemiology of *Citrobacter-Enterobacter-Serratia* in urinary tract infections of inpatients and outpatients (RECESUTI): a 10 year survey. *Medicina (Kaunas)*. 2019;55(6): piiE285.
137. Hennigs JK, Baumann HJ, Schmiedel S, Tennstedt P, Sobottka I, Bokemeyer C et al. Characteriation of *Enterobacter cloacae* pneumonia: a single-center retrospective analysis. *Lung*. 2011;189(6):475-83.
138. Eibach D, Belmar Campos C, Krumkamp R, Al-Emran HM, Dekker D, Boahen KG et al. Extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacteriaceae* causing bloodstream infections in rural Ghana, 2007-2012. *Int J Med Microbiol*. 2016; 306(4): 249-54.
139. Chen CH, Huang CC. Risk factor analysis for extend-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter cloacae* bloodstream infections in central Taiwan. *BMC Infect Dis*. 2013;13:417.
140. Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG et al. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin*

Microbiol Infect. 2012;18(3):268-81.

141. Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. 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*. 2014;43(5): 460-4.
142. GÜR D, Hasdemir U, Çakar A, Çavuşoğlu I, Çelik T, Aksu B. Comparative in vitro activity of plazomicin and older aminoglycosides against enterobacteriales isolates; prevalence of aminoglycoside modifying enzymes and 16S rRNA methyltransferases. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2020;97(4):115092.
143. Costello SE, Deshpande LM, Davis AP, Mendes RE, Castanheira M. Aminoglycoside-modifying enzyme and 16S ribosomal RNA methyltransferase genes among a global collection of Gram-negative isolates. *J Glob Antimicrob Resist*. 2019;16:278-285.
144. Miró E, Grünbaum F, Gómez L, Rivera A, Mirelis B, Coll P, Navarro F. Characterization of aminoglycoside-modifying enzymes in enterobacteriaceae clinical strains and characterization of the plasmids implicated in their diffusion. *Microb Drug Resist*. 2013;19(2):94-9.
145. Huang S, Dai W, Sun S, Zhang X, Zhang L. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2012; 7(10):e477636.
146. Moura Q, Fernandes MR, Cerdeira L, Santos ACM, de Souza TA, Ienne S et al. Draft genome sequence of a multidrug-resistant *Aeromonas hydrophila* ST508 strain carrying *rmtD* and *bla_{CTX-M-131}* isolated from a bloodstream infection. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017;10:289-290.

147. Passarelli-Araujo H, Palmeiro JK, Moharana K, Pedrosa-Silva F, Dalla-Costa ML, Venancio TM. Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil: RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). *An Acad Bras Cienc.* 2019; 91(suppl 1):e20180762.
148. Su PA, Wu LT, Cheng KC, Ko WC, Chuang YC, Yu WL. Screening extended-spectrum beta-lactamase producing in *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens* using antibiogram-based methods. *J Microbiol Immunol Infect.* 2010; 43(1):26-34.
149. Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceição M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX- M-15. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(6):640-6.
150. Pereira Lacava J, Volcão LM, Klafke GB, Vieira RS, Gonçalves VC, Ramis IB et al. Antimicrobial resistance and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamases of *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp isolates from urinary tract infections in Southern Brazil. *Microb Drug Resist.* 2019;25(2):173-181.
151. Liu J, Li GM, Lin LY, Wu XL, Huang SL, Zhou Y et al. Association of antibiotic resistance with SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter cloacae*. *Exp Ther Med.* 2016;11(1):269-276.
152. Garza-Ramos U, Davila G, Gonzalez V, Alpuche-Aranda C, López-Collada VR, Alcantar-Curiel D et al. The blaSHV-5 gene is encoded in a compound transposon duplicated in tandem in *Enterobacter cloacae*. *Clin Microbiol Infect.* 2009; 15(9):878-80.
153. Albornoz E, Lucero C, Romero G, Quiroga MP, Rapoport M, Guerriero L et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance genes in clinical Enterobacteria from Argentina. *Microb Drug resist.* 2017;23(2):177-187.

154. Silva-Sánchez J, Cruz-Trujillo E, Barrios H, Reyna-Flores F, Sánchez-Pérez A, Garza-Ramos U. Characterization of plasmid-mediated quinolone resistance (PMQR) genes in extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae pediatric clinical isolates in Mexico. *PLoS One*. 2013;8(10):e77968.
155. McGettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2009;47(3):785-6.
156. Lee M, Chung HS. Different antimicrobial susceptibility testing methods to detect ertapenem resistance in Enterobacteriaceae: VITEK2, MicroScan, Etest, disk diffusion and broth microdilution. *J Microbiol Methods*. 2015;112:87-91.
157. De La Cadena E, Correa A, Muñoz JS, Rojas LJ, Hernández-Gómez C, Pallares C et al. Molecular characterization of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex in Colombia: bla_{KPC} and the ‘changing landscape’. *J Glob Antimicrob Resist*. 2018;13:184-189.
158. Oteo J, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Ortega A, Zamarrón P, Saez D et al. The spread of KPC-producing Enterobacteriaceae in Spain: WGS analysis of the emerging high-risk clones of *Klebsiella pneumoniae* ST11/KPC-2, ST101/KPC-2 and ST512/KPC-3. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(12):3392-3399.
159. Zhao Y, Zhang J, Fu Y, Li C, Hu K, Su S et al. Molecular characterization of metallo- β -lactamase-producing carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* complex isolated in Heilongjiang Province of China. *BMC Infect Dis*. 2020;20(1):94.
160. Miao M, Wen H, Xu P, Niu S, Lv J, Xie X et al. Genetic Diversity of Carbapenem- Resistant Enterobacteriaceae (CRE) Clinical Isolates From a Tertiary Hospital in Eastern China. *Front Microbiol*. 2019;9:3341.

161. Rosa JF, Rizek C, Marchi AP, Guimaraes T, Miranda L, Carrilho C et al. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC-producing *Enterobacter* sp. in Brazil. *BMC Microbiol.* 2017;17(1):69.
162. Kanamori H, Parobek CM, Juliano JJ, Duin D van, Cairns BA, Weber DJ et al. A Prolonged Outbreak of KPC-3-Producing *Enterobacter cloacae* e *Klebsiella pneumoniae* Driven by Multiple Mechanisms of Resistance Transmission at a Large Academic Burn Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61(2):e01516-16.
163. Partridge SR. Mobilization of *bla*_{BKC-1} by *ISKpn23*? *Antimicrob Agents Chemother.* 2016; 60(8):5102-5104.
164. Loftie-Eaton W, Rawlings DE. Diversity, biology and IncQ-family plasmids. *Plasmid.* 2012;67(1):15-34.
165. Voet D, Voet JG. Velocidade da reação enzimática. In: *Bioquímica.* Porto Alegre: Artmed; 2006. p472-495.
166. Baharak BF, Ellington MJ, Hopkins KL, Turton JF, Doumith M, Woodford N. The differential importance of mutations within AmpD in cephalosporin resistance of *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*. *Int J Antimicrob Agents.* 2016; 48(5):555-558.
167. Kieffer N, Royer G, Decousser J-W, Bourrel A-S, Palmieri M, Ortiz De La Rosa J- M et al. *mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and its Origin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019; 63(9):e00965-19.
168. Farzana R, Jones LS, Barratt A, Rahman MA, Sands K, Portal E et al. Emergence of Mobile Colistin Resistance (*mcr-8*) in a Highly Successful *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 15 Clone From Clinical Infections in Bangladesh.

mSphere. 2020; 5(2):e00023-20.

169. Carroll LM, Gaballa A, Guldimann C, Sullivan G, Henderson LO, Wiedmann M. Identification of Novel Mobilized Colistin Resistance Gene *mcr-9* in a Multidrug-Resistant, Colistin-Susceptible *Salmonella Enterica* Serotype Typhimurium Isolate. mBio. 2019; 10(3):e00853-19.

170. Börjesson S, Greko C, Myrenås M, Landén A, Nilsson O, Pedersen K. A Link the Newly Described Colistin Resistance Gene *mcr-9* and Clinical Enterobacteriaceae Isolates Carrying *bla_{SHV-12}* From Horses in Sweden. J Glob Antimicrob Resist. 2020; 20:285-289.

171. Monahan LG, Demaere MZ, Cummins ML, Djordjevic SP, Chowdhury PR, Darling AE. High Contiguity genome sequence of a multidrug-resistant hospital isolate of *Enterobacter hormaechei*. Gut Pathog. 2019; 11:3.

172. Beyrouthy R, Baretts M, Marion E, Dananché C, Dauwalder O, Robin F et al. Novel *Enterobacter* Lineage as Leading Cause of Nosocomial Outbreak Involving Carbapenemase-Producing Strains. Emerg Infect Dis. 2018; 24(8):1505-1515.

173. Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fielt J, Bonten MJ, Carmeli Y et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. J Antimicrob Chemother. 2014; 70(1):48-56.

174. De Belder D, Faccone D, Tijet N, Melano RG, Rapoport M, Petroni A, et al. Novel class 1 Integrons and sequence types in VIM-2 and VIM-11-producing clinical strains of *Enterobacter cloacae*. Infect Genet Evol. 2017; 54: 374:378.

175. Francisco GR, Nora STR, Bueno MFC, da Silva Filho LVR, de Oliveira Garcia D. Identificação of aminoglycoside-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing RmtG 16S rRNA methyltransferase in cystic fibrosis patient. Antimicrob Agents Chemother.

2015; 59(5):2967-8.

176. Bueno MFC, Francisco GR, Cerdeira L, Lenne S, Souza TA, Lincopan N et al. Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtG-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 isolated from cystic fibrosis patient. *J Glob Antimicrob Resist*. 2017; 8:106-107.

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

178. Hu F, Munoz-Price LS, DePascale D, Rivera J, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014; 58(8):4980-1.

179. Poulin-Laprade D, Carraro N, Burrus V. The extended regulatory networks of SXT/R391 integrative and conjugative elements and IncA/C conjugative plasmids. *Front Microbiol*. 2015; 6:837.

180. Carraro N, Matteau D, Burrus V, Rodrigue S. Unraveling the regulatory network of IncA/C plasmid mobilization: When genomic islands hijack conjugative elements. *Mob Genet Elements*. 2015;5(3):1-5.

181. Lioy VS, Goussard S, Guerineau V, Yoon E-J, Courvalin P, Galimand M et al. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. *RNA*. 2014;20(3):382-91.

182. Stengl B, Reuter K, Klebe G. Mechanism and substrate specificity of tRNA-guanine transglycosylases (TGTs): tRNA-modifying enzymes from the three different kingdoms of life share a common catalytic mechanism. *Chembiochem*. 2005;

6(11):1926-39.

183. Toleman MA, Bennett PM, Walsh TR. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? *Microbiol Mol Bio Rev.* 2006; 70(2):296-316.

184. Bueno MCF. Caracterização de genes de resistência antimicrobiana e seu contexto genético em *Klebsiella* spp. produtoras de KPC isoladas de hospitais do Estado de São Paulo [Tese]. São Paulo (SP): Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo/ Coordenadoria de Controle de Doença/SES-SP, 2017.

185. Harmer CJ, Moran RA, Hall RM. Movement of IS26-Associated Antibiotic Resistance Genes Occurs via a translocatable Unit That Includes a Single IS26 and Preferentially Inserts adjacente to Another IS26. *mBIO.* 2014; 5(5):e01801-14.

ANEXO I

Quadros 8 - 9 - 10 - 11

Quadro 8. Descrição dos *primers* utilizados e condições de corrida para amplificação de genes de AMEs

Genes	Primers	Sequências 5' a 3'	DI	D	AN	E	EF	Amplicon	Referência	
N-Acetiltransferases										
<i>aac(6')-Ih</i> (Triplex 1)	aac(6)Ih-F	TGCCGATATCTGAATC						407 pb	123	
	aac(6)Ih-R	ACACCACACGTTTCAG								
<i>aac(3)-Ia</i> (Triplex 1)	aac(3)Ia-F	GACATAAGCCTGTTTCGGTT	95°C/5min	95°C/30s (30ciclos)	49°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	372 pb		
	aac(3)Ia-R	CCCGCTTTCTCGTAGCA								
<i>aac(3)-IIa</i> (Triplex 1)	aac(3)IIa-F	ATGCATACGCGGAAGGC						822 pb		
	aac(3)IIa-R	TGCTGGCACGATCGGAG								
<i>aac(6')-Ib</i> (Duplex)	aac(6)Ib-F	TATGAGTGGCTAAATCGAT	95°C/5min	95°C/30s (30ciclos)	54°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	395 pb		
	aac(6)Ib-R	CCCGCTTTCTCGTAGCA								
O-Fosfotransferases										
<i>aph(3')-VI</i> (Triplex 2)	aph(3)VI-F	CGGAAACAGCGTTTTAGA	95°C/5min	95°C/30s (30ciclos)	49°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	716 pb		
	aph(3)VI-R	TTCCTTTTGTCAGGTC								
<i>aph(3')-Ia</i> (Duplex)	aph(3)Ia-F	CGAGCATCAAATGAAACTGC			54°C/ 1min			623 pb		
	aph(3)Ia-R	GCGTTGCCAATGATGTTACAG								
O-Nucleotidiltransferases										
<i>ant(2')-Ia</i> (Triplex 2)	ant(2)Ia-F	ATCTGCCGCTCTGGAT	95°C/5min	95°C/30s (30ciclos)	49°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	404 pb		
	ant(2)Ia-R	CGAGCCTGTAGGACT								
Controle interno reação										
<i>rrn</i> 16S rRNA (Triplex 2)	rrn-F	GAGGAAGGTGGGGATGACGT	95°C/5min	95°C/30s (30ciclos)	49°C/ 1min	72°C/ 1min	72°C/ 7min	216 pb		
	rrn-R	AGGCCCGGAACGTATTCAC								

Legenda: DI: Desnaturação Inicial; D: Desnaturação; AN: Anelamento; E: Extensão; EF: Extensão Final; pb: pares de bases.

Quadro 9. Descrição dos *primers* utilizados e condições de corrida para amplificação de genes de metiltransferases 16S rRNA

Genes	Primers	Sequências 5' a 3'	DI	D	AN	E	EF	Amplicon	Referência
<i>Ribosomal methyltransferase</i>									
<i>rmtG</i>	rmtG-F	AAATACAGCGATGTGTGTCC						250 pb	88
	rmtG-R	ACACGGCATCTGTTTCTTCC	94°C 2min	94°C 30s 30 Ciclos	55°C 30s	72°C 1min	72°C 7min		
<i>rmtH</i>	rmtH-F	ATGACCATTGAACAGGCAGC						758 pb	124
	rmtH-R	TCAAGCTGGGTTTGGCTGGA							
<i>rmtB</i> (Triplex)	rmtB-F	GCTTTCTGCGGGCGATGTAA						173 pb	
	rmtB-R	ATGCAATGCCGCGCTAT							
<i>rmtC</i> (Triplex)	rmtC-F	CGAAGAAGTAACAGCCAAAG						711pb	85
	rmtC-R	ATCCCAACATCTCTCCCACT	96°C 5min	96°C 30s 30 Ciclos	55°C 30s	72°C 1min	72°C 7min		
<i>rmtA</i> (Duplex1)	rmtA-F	CTAGCGTCCATCCTTTCCTC						635 pb	
	rmtA-R	TTGCTTCCATGCCCTTGCC							
<i>rmtD</i> (Duplex1)	rmtD-F	CGGCACGCGATTGGGAAGC						401 pb	
	rmtD-R	CGGAAACGATGCGACGAT							
<i>rmtE</i> (Duplex2)	rmtE-F	GATGCCGTGTCTGTTACGCCG						446 pb	125
	rmtE-R	ACGTGAACCCACGAGTCCTGC	94°C 5min	94°C 45s 25Ciclos	57°C 30s	72°C 25s	72°C 7min		
<i>rmtF</i> (Duplex2)	rmtF-F	CGATCCTACTGGGCTCCAT						314 pb	
	rmtF-R	GGCATAGTGCTTTTCCATGC							
<i>Methyltransferase</i>									
<i>armA</i> (Triplex)	armA-F	ATTCTGCCTATCCTAATTGG	96°C 5min	96°C 30s 30 Ciclos	55°C 30s	72°C 1min	72°C 7min	315 pb	85
	armA-R	ACCTATACTTTATCGTCGT							

Legenda: DI: Desnaturação Inicial; D: Desnaturação; AN: Anelamento; E: Extensão; EF: Extensão Final; pb: pares de bases.

Quadro 10. Resultado do TSA apresentado por 30 cepas do complexo *E. cloacae* carbapenemases e seus respectivos genótipos de resistência

Data	Cepas	Antibióticos Ativos	Antibióticos Não Ativos	-	Genótipos encontrados		
					Betalactamases	PMQR	AMEs e 16S RMTases genes
Jun.2013	CEcVIII	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Ago.2013	CEc7A	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN	ERT, IMP, MER, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2}	ND	-
Out.2013	CEc IX	AMI, GEN	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	-
Fev.2014	CEc X	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Fev.2014	CEcXIII	AMI	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	<i>aac(3-)IIa</i> ; <i>ant(2'')-Ia</i>
Mar.2014	CEcXIV	AMI	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, GEN, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	ND	<i>ant(2'')-Ia</i>
Abr.2014	CEcXV	AMI	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>
Mai.2014	CEc61	CPM, CIP, COL	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, AMI, GEN		<i>bla</i>_{ABK-1} ; <i>bla</i> _{SHV-5}	-	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>aph(3')-IV</i>
Jul.2014	CEc13	AMI, GEN	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	-
Set.2014	CEc15	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Out.2014	CEc16	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Fev.2015	CEc18	AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	-
Fev.2015	CEc19	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Jul.2015	CEc22	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Set.2015	CEc24	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Out.2015	CEc25	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Fev.2016	CEc26	AMI, GEN	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	-
Mai.2016	CEc27	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2} ;	-	-
Out.2016	CEc28	CIP	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, AMI, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>aac(3-)IIa</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Nov.2016	CEc30	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Dez.2016	CEc31	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Fev.2017	CEc32	CIP	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, AMI, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>aac(3-)IIa</i> ; <i>aac(6')-Ib</i>
Abr.2017	CEc34	GEN	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, AMI, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Mai.2017	CEc35	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Jun.2017	CEc36	CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-
Jun./2017	CEc37	CIP	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, AMI, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	<i>aph(3')-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>ant(2'')-Ia</i>
Jun.2017	CEc38	CPM, CAZ, CRO, CIP	ERT, IMP, MER, AMI, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2}	-	<i>aph(3')-Ia</i> ; <i>aac(6')-Ib</i> ; <i>ant(2'')-Ia</i>
Set.2017	CEc40	AMI, GEN	ERT, IMP, MER, CAZ, CRO, CPM, CIP		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6'')-Ib-cr</i>	-
Set.2017	CEc41	CPM, AMI, GEN, CIP	CAZ, CRO, ERT, IMP, MER		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{SHV-5}	-	-
Out.2017	CEc42	CPM, CIP	CAZ, CRO, ERT, IMP, MER, AMI, GEN		<i>bla</i> _{KPC-2} ; <i>bla</i> _{SHV-5}	-	<i>aac(6')-Ib</i> ; <i>ant(2'')-Ia</i>

Quadro 11. Resultado do TSA apresentado por 44 cepas do complexo *E. cloacae* não carbapenemases e seus respectivos genótipos de resistência.

Data	Cepas	Antibióticos Ativos	Antibióticos Não Ativos	Genótipos encontrados		
				Betalactamases	PMQR	AMEs e 16S RMTases genes
Jun.2013	CEc1	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Jun.2013	CEc2	IMP, MER	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB</i>	<i>aac(3)-IIa; ant(2'')-Ia; rmtD2</i>
Jul.2013	CEc4	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>
Jul.2013	CEc5	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>qnrB</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>
Jul.2013	CEc6	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Jul.2013	CEc8	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Ago.2013	CEc9	IMP, MER	ERT, CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib; ant(2'')-Ia; rmtG</i>
Ago.2013	CEc13^{NC}	IMP, MER	ERT, CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib; ant(2'')-Ia; rmtG</i>
Set.2013	CEc18^{NC}	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Set.2013	CEc19^{NC}	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa; aph(3')Ia</i>
Out.2013	CEc21	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>
Out.2013	CEc25^{NC}	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>
Nov.2013	CEc26^{NC}	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa; ant(2'')-Ia</i>
Nov.2013	CEc27^{NC}	IMP, MER	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib; aac(3)-IIa</i>
Nov.2013	CEc30^{NC}	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Nov.2013	CEc31^{NC}	IMP, MER	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib; aac(3)-IIa</i>
Nov.2013	CEc32^{NC}	IMP, MER, CPM, CAZ, CRO, AMI, GEN	ERT, CIP	—	<i>aac(6')Ib-cr</i>	—
Nov.2013	CEc33	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Nov.2013	CEc34^{NC}	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CRO, AMI, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	ND	<i>aac(6')-Ib</i>
Nov.2013	CEc35^{NC}	IMP, MER,	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa; aph(3')-Ia</i>
Dez.2013	CEc37^{NC}	IMP, MER, CPM, CAZ, CRO, AMI	ERT, GEN, CIP	—	ND	<i>ant(2'')-Ia</i>
Dez.2013	CEc39	IMP, MER, CPM, CAZ, CRO, AMI	ERT, GEN, CIP	—	ND	<i>ant(2'')-Ia</i>
Dez.2013	CEc41	IMP, MER, AMI, GEN	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	—
Jan.2014	CEc42	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>ant(2'')-Ia</i>
Jan.2014	CEc43	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>
Jan.2014	CEc44	IMP, MER, AMI, GEN	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	—
Jan.2014	CEc46	IMP, MER, AMI, GEN, CPM, CAZ	ERT, CRO, CIP	—	ND	—
Jan.2014	CEc47	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CRO, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Jan.2014	CEc48	IMP, MER, CPM, CAZ, CRO	ERT, CIP, AMI, GEN	—	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>

Cont. Quadro 11. Resultado do TSA apresentado por 44 cepas do complexo *E. cloacae* não carbapenemases e seus respectivos genótipos de resistência.

Data	Cepas	Antibióticos Ativos	Antibióticos Não Ativos	Genótipos encontrados		
				Betalactamases	PMQR	AMEs e 16S RMTases genes
Jan.2014	CEc50	IMP, MER, AMI, GEN, CAZ, CPM	ERT, CIP	–	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	–
Jan.2014	CEc51	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>qnrB</i>	<i>aph(3')-Ia; ant(2'')-Ia</i>
Jan.2014	CEc53	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, CIP, GEN	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(3)-IIa</i>
Jan.2014	CEc54	IMP, MER, AMI, GEN, CPM	ERT, CIP	–	<i>qnrB</i>	–
Fev.2014	CEc55	IMP, MER, AMI, GEN, CPM	ERT, CIP	–	<i>aac(6')Ib-cr</i>	–
Fev.2014	CEc56	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Mar.2014	CEc57	IMP, MER, AMI	ERT, CPM, CAZ, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	ND	<i>aac(3)-IIa</i>
Mar.2014	CEc58	IMP, MER, CPM, CAZ, AMI	ERT, GEN, CIP	–	ND	<i>ant(2'')-Ia</i>
Abr.2014	CEc59	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Abr.2014	CEc60	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Mai.2014	CEc62	IMP, MER, GEN	ERT, CPM, CAZ, CIP, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>qnrB aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
Mai.2014	CEc63	IMP, MER, CAZ, CPM, AMI	ERT, GEN, CIP	–	ND	<i>ant(2'')-Ia</i>
Mai.2014	CEc64	IMP, MER	CIP, ERT, CPM, CAZ, AMI, GEN	<i>bla</i> _{SHV-12 bla} _{CTX-M-2}	ND	<i>aac(6')-Ib; ant(2'')-Ia</i>
Mai.2014	CEc65	IMP, MER, GEN	CIP, ERT, CPM, CAZ, AMI	<i>bla</i> _{CTX-M-15}	<i>aac(6')Ib-cr</i>	<i>aac(6')-Ib; aph(3')-IV</i>
Mai.2014	CEc66	–	ERT, IMP, MER, CPM, CAZ, AMI, GEN, CIP	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>qnrB</i>	<i>aac(6')-Ib; aph(3')-IV; ant(2'')-Ia</i>

Legenda Tabelas 10 e 11: ^{NC} = Não Carbapenemases. Antimicrobianos: ERT: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; CAZ: Ceftazidima; CRO: Ceftriaxona; CPM: Cefepime; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; CIP: Ciprofloxacina; ND = Não Determinado.

ANEXO II

Artigo Científico 01

ARTIGO 1

Accepted Manuscript

Title: Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtD-2-producing *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (ST)395 in Brazil

Authors: Evelin Rodrigues Martins, Maria Fernanda Campagnari Bueno, Gabriela Rodrigues Francisco, Fernanda Modesto Tolentino, Louise Cerdeira, Tiago Casella, Monalisa Nogueira Costa, Carla Cevada, Nilton Lincopan, Doroti de Oliveira Garcia, Mara Corrêa Lelles Nogueira



PII: S2213-7165(17)30140-6
DOI: <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.jgar.2017.07.012>
Reference: JGAR

464 To appear in:

Received date: 19-4-2017
Revised date: 17-7-2017
Accepted date: 20-7-2017

Please cite this article as: Evelin Rodrigues Martins, Maria Fernanda Campagnari Bueno, Gabriela Rodrigues Francisco, Fernanda Modesto Tolentino, Louise Cerdeira, Tiago Casella, Monalisa Nogueira Costa, Carla Cevada, Nilton Lincopan, Doroti de Oliveira Garcia, Mara Corrêa Lelles Nogueira, Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtD-2-producing *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (ST)395 in Brazil (2010), <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgar.2017.07.012>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Draft genome sequence of an aminoglycoside-resistant RmtD-2-producing *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (ST)395 in Brazil

Evelin Rodrigues Martins^a (evelin.rod.martins@gmail.com), Maria Fernanda Campagnari Bueno^b (mf.campagnari@gmail.com), Gabriela Rodrigues Francisco^b (gabis.francisco@gmail.com), Fernanda Modesto Tolentino^c (fernandaTollentino@hotmail.com), Louise Cerdeira^d (lcerdeira@gmail.com), Tiago Casella^a (tiago_casella@yahoo.com.br), Monalisa Nogueira Costa^e (nogueiracostam@yahoo.com.br), Carla Cevada^e (carlamcevada@gmail.com), Nilton Lincopan^{d,f} (lincopan@usp.br), Doroti de Oliveira Garcia^b (dogarcia@yahoo.com), Mara Corrêa Lelles Nogueira^{a,*} (ml.nogueira@famerp.br).

^a Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

^b Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

^c Instituto Adolfo Lutz, São José do Rio Preto, Brazil.

^d Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

^e Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. ^f Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

*** Corresponding author**

M.C.L. Nogueira
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416.
15090-000. São José do Rio Preto –
SP.
Brazil.
Tel.: +55 17 3201 5909; fax: +55 17 3229 1777.
E-mail address: ml.nogueira@famerp.br

ABSTRACT

Objectives: *Enterobacter cloacae* has recently emerged as an important agent of nosocomial infections, due to the diffusion of extended spectrum β -lactamases and carbapenemases in this species. In this context, a raise in the use of aminoglycosides for therapy was noticed, being followed by the accelerated development of resistance mechanisms. In this study, we report the draft genome sequence of a multidrug-resistant *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* strain (Ec2), isolated from active surveillance culture of a patient with Chagas disease. **Methods:** Whole genome sequencing (WGS) was performed using Nextera XT DNA library and a NextSeq platform. **Results:** WGS analysis revealed the presence of 5527 coding genes, 62 RNA-encoding genes, and 275 pseudogenes. Ec2 belongs to Sequence Type (ST)395 and carries 22 transferable antibiotic resistance genes, comprising eight antimicrobial classes, including the *rmtD-2* gene conferring high-level aminoglycoside resistance. **Conclusions:** This draft genome can be used in comparative genomic analyses with different *E. cloacae* strains; in addition, it could help at elucidating epidemiological aspects regarding the dissemination of clinically relevant resistance genes.

Keywords: *Enterobacter cloacae*, *rmtD-2*, aminoglycoside resistance.

Enterobacter cloacae has recently emerged as an important agent of nosocomial infections, due to the diffusion of extended spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases in this species [1]. Unfortunately, antibiotic therapy options are very limited, leading to adverse clinical outcomes [2].

In the last years, a renewed interest in the use of aminoglycosides for monotherapy or in combination therapy against carbapenem resistant Enterobacteriaceae was noticed [3], leading to the accelerated development of resistance mechanisms. In this context, transmissible 16S rRNA methyltransferases (16S RMTases) have emerged as a new and worrisome source of aminoglycoside resistance that operates by reducing the affinity of nearly all aminoglycosides for 16S rRNA via ribosomal methylation [4].

In Brazil, RmtD, which includes the two closely related enzymes RmtD1 and RmtD2, predominates [5]. In this study, we report for the first time the detection of RmtD2 in *E. cloacae* subsp. *cloacae* (strain Ec2), isolated in 2013, from an inguinal swab collected from a patient with Chagas disease, admitted to a tertiary hospital located in the State of São Paulo, Brazil, for a cardiac surgical procedure aiming the implantation of definitive pacemaker.

Total genomic DNA of Ec2 was extracted to construct a Nextera XT DNA library, which was sequenced using Next Seq platform (Illumina Inc., San Diego, CA). De novo assembly was performed using the Velvet V.1.2.1 pipeline and Geneious v.R9 (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand). The genome was annotated using NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline v.3.2.

Sequencing of Ec2 produced 12,042,164 paired-end reads a 361x total coverage. One hundred and thirty seven contigs were generated with a G + C content of 54, 7% and 5.3Mb genome size. Annotation resulted in 5527 coding genes, 62 RNA-encoding genes (57 tRNAs and 5 ncRNAs) and 275 pseudogenes. The multilocus sequence type (MLST), antimicrobial resistance genes and plasmid replicons for Ec2 were identified using MLST 1.8, ResFinder 2.1 and PlasmidFinder 1.3 databases, respectively, available from Center for Genomic Epidemiology (<http://genomicepidemiology.org/>). In this regard, whole- genome sequencing analysis showed that Ec2 belongs to the Sequence Type (ST)395 and carried the aminoglycoside resistance genes *aph(3'')-Ib*, *aacA4*, *aac(3)-IIa*, *aph(6)-Id*, *aadA1*, and *rmtD-2*, the β -lactam resistance genes *bla*_{TEM-1B}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{ACT-16} and *bla*_{CTX-M-15}, the fluoroquinolone resistance gene *aac(6')Ib-cr* and *qnrB1*, the fosfomycin resistance gene *fosA*, the phenicol resistance genes *catA1* and *catB3*, the sulphonamide resistance genes *sul1* and *sul2*, tetracycline resistance genes *tet(B)*, *tet(A)* and *tet(G)*, and trimethoprim resistance genes *drfA8* and *drfA14*. Plasmids of incompatibility groups IncFII(pKPX1), IncHI2A, and IncI1 were identified, but the *rmtD-2* gene was not harbored by any of these.

To our knowledge, this is the first draft genome sequence of an RmtD-2-producing *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* (ST)395. This draft genome can facilitate comparative genomic analyses among *E. cloacae* strains with different antimicrobial susceptibility patterns, and aimed at elucidating epidemiological aspects regarding dissemination and mobilization of clinically significant resistance genes in this pathogens. This Whole Genome Shotgun project has

been deposited at DDBJ/ENA/GenBank under accession MUDE00000000. The version described in this paper is version MUDE01000000.

Declarations

Funding: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP #2014/17184-0) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). N.L. is research fellow of CNPq. L.C. is recipient of postgraduate fellowship from FAPESP (2015/21325-0).

Competing Interests: None declared

Ethical Approval: Not required

Acknowledgement

Dr. Luiz Juliano Neto and his PhD student Rafaella Grenfell de Carvalho of the Department of Biophysics of the Federal University of São Paulo (UNIFESP) São Paulo, Brazil for the confirmation of the bacterial species by the Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization- Time of Flight Mass Spectrometry technique.

References

- [1] Davin-Regli A, Pagès JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 2015; 6: 1-10.
- [2] Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* 2012; 7; 887-902.
- [3] Perez F, El Chakhtoura NG, Papp-Wallace KM, Wilson BM, Bonomo RA. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: can we apply “precision medicine” to antimicrobial chemotherapy? *Expert Opin Pharmacother.* 2016; 17: 761-81.
- [4] McGann P, Chahine S, Okafor D, Ong AC, Maybank R, Kwak YI, Wilson K, Zapor M, Lesho E, Hinkle M. Detecting 16S rRNA Methyltransferases in *Enterobacteriaceae* by Use of Arbekacin. *J Clin Microbiol.* 2016; 54: 208-11.
- [5] Bueno MF, Francisco GR, O’Hara JA, de Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum β - lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57: 2397- 400.

ANEXO III

Artigo Científico 02

ARTIGO 2

Accepted Manuscript

Title: Genome and plasmid context of two *rmtG*-carrying *Enterobacter hormaechei* isolated from urinary tract infections in Brazil



Authors: Evelin Rodrigues Martins, Maria Fernanda Campagnari Bueno, Gabriela Rodrigues Francisco, Tiago Casella, Doroti de Oliveira Garcia, Louise Teixeira Cerdeira, Alexandra Lehmkuhl Gerber, Luiz Gonzaga Paula de Almeida, Nilton Lincopan, Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos, Mara Corrêa Lelles Nogueira

PII: S2213-7165(19)30164-X
DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.020>
Reference:

JGA

R 976 To appear in:

Received date: 12 December 2018
Revised date: 19 June 2019
Accepted date: 25 June 2019

Please cite this article as: Martins ER, Bueno MFC, Francisco GR, Casella T, de Oliveira Garcia D, Cerdeira LT, Gerber AL, de Almeida LGP, Lincopan N, de Vasconcelos ATR, Nogueira MCL, Genome and plasmid context of two *rmtG*-carrying *Enterobacter hormaechei* isolated from urinary tract infections in Brazil, *Journal of Global Antimicrobial Resistance* (2019), <https://doi.org/10.1016/j.jgar.2019.06.020>

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting proof before it is published in its final form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.

Genome and plasmid context of two *rmtG*-carrying *Enterobacter hormaechei* isolated from urinary tract infections in Brazil

Evelin Rodrigues Martins^{1§}, Maria Fernanda Campagnari Bueno^{2§}, Gabriela Rodrigues Francisco², Tiago Casella^{1,3}; Doroti de Oliveira Garcia², Louise Teixeira Cerdeira⁴, Alexandra Lehmkuhl Gerber⁵, Luiz Gonzaga Paula de Almeida⁵, Nilton Lincopan⁴, Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos⁵, Mara Corrêa Lelles Nogueira^{1*}

¹Centro de Investigação de Microrganismos, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

²Centro de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil.

³Hospital de Base, São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

⁴Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil.

⁵Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis, Rio de Janeiro, Brazil.

***Corresponding author:** Current address: Av. Brigadeiro Faria Lima, 5416, 15090-000 São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil. Phone/Fax: +55 17 3229 1777. E-mail ml.nogueira@famerp.br

§Both authors have equally contributed to this work.

Highlights

- *Enterobacter hormaechei* is an emerging opportunistic pathogen that presents remarkable ability to acquire new resistance determinants.
- 16S rRNA methyltransferases confer high-level resistance to clinically relevant aminoglycosides and are an emerging challenge.
- Two different strains of aminoglycoside-resistant *E. hormaechei* isolated in Brazil harbor *rmtG* carried by distinct IncA/C plasmids.

Abstract

Objectives: *Enterobacter hormaechei* is an important agent of severe infections in critically ill patients. Aminoglycosides are among the main antibiotics for treatment; however, the development of resistance is an increasing problem.

RmtG is a 16S rRNA methyltransferase, a class of enzymes that confer high-level resistance to clinically relevant aminoglycosides. This study aimed to characterize the full genetic context of plasmids harboring the *rmtG* gene in two aminoglycoside resistant *E. hormaechei* isolated in Brazil. **Methods:** The *rmtG*- harboring plasmids were transferred to *Escherichia coli* J53 recipient strains and fully sequenced in MiSeq sequencing system. Complete genome assemblies were accomplished using combination of Newbler v 3.0, SPAdes 3.10.0 and phrap/cross_match programs. Plasmid sequences were annotated using RAST server and then curated manually using BLAST databases and ISfinder. EasyFig

2.0 was used to map and compare regions of interest containing *rmtG* of both plasmids.

Results: Both isolates carry the *rmtG* genes in IncA/C plasmids of about 152 kb and 235 kb associated to Tn3 transposons. The plasmids contain a transfer region, genes involved in stability, genes codifying resistance to beta- lactams, sulfonamide, and quaternary ammonium compound. One of the plasmids also carries the *mrk* operon encoding type 3 fimbriae. **Conclusions:** This first detection of *rmtG* in *E. hormaechei* reinforces the ability to horizontal transfer. Location in complex genetic platforms carried by Tn3 transposons in IncA/C plasmids may facilitate dissemination to other Gram-negative pathogens and further limit the treatment options.

Keywords: *Enterobacter hormaechei*; aminoglycoside resistance; *rmtG*; 16S rRNA methyltransferase

1. Introduction

Enterobacter is a genus of Gram-negative, non-spore-forming bacteria of the family *Enterobacteriaceae* that is widely distributed in the environment and is also part of the commensal microbiota of the human gut [1]. Most of the *Enterobacter* clinical isolates belong to the *Enterobacter cloacae* complex (Ecc) [2], a heterogeneous group divided into 12 genetic clusters (I-XII) and one sequence crowd (*xiii*) [3]. Over recent decades, the Ecc have emerged as important agents of infections in critically ill patients [2]. In this regard, the

intrinsic resistance to some antibiotics and the high ability to upregulate or acquire resistance determinants raises clinical significance of these bacteria, that poses a great challenge to public health and to the management of the spread of infections [4]. Identification methods available in most clinical laboratories such as biochemical tests or mass-spectrometry present poor ability to discriminate members of the *Ecc*. However, studies based on molecular characterization have revealed that *E. hormaechei* account for most of the clinical isolates [5].

Aminoglycosides are often used in combination with beta-lactams to treat severe infections by Gram-negative bacteria. However, the development of various resistance mechanisms against this class of antibiotics is an increasing problem. In the past decade, 16S rRNA methyltransferases (16S RMTases) emerged globally. These enzymes confer high-level resistance to clinically relevant aminoglycosides such as amikacin, gentamicin and tobramycin by catalyzing the process of post-transcriptional methylation of the A site of 16S ribosomal RNA. Genes encoding acquired 16S RMTase are usually associated with mobile genetic elements carried by plasmids belonging to diverse incompatibility groups, which play an important role in the spread of such resistance mechanism among Gram-negative pathogens [6]. The simultaneous presence of a 16S RMTase gene with other resistance determinants allows the development of multidrug resistance [7]. RmtG 16S RMTase was first identified in Brazil, in *K. pneumoniae* clinical strains [8]. In this study, we report the draft genome of two genetically distinct *E. hormaechei* and the full genetic context of *rmtG* genes carried by these strains.

2. Material and Methods

2.1. Bacterial Isolates and Patients

Isolates Ec9 and Ec13 were recovered in 2013 during a study to characterize the diversity of multidrug-resistant *E. cloacae* associated to infections in a tertiary- care hospital located in the State of São Paulo, Brazil. Ec9 was isolated from urine sample of a patient admitted for sigmoid resection due to perforated diverticulitis. Ec13 was also isolated from urine sample, from a patient admitted for radical nephrectomy due to a kidney neoplasia. Both patients were treated for urinary tract infection with meropenem (500 mg/10 mL IV).

2.2. Bacterial Identification and Antimicrobial Susceptibility Testing

Identification of isolates was firstly performed by VITEK 2 Compact System (bioMérieux), as a routine of the microbiology set of the hospital, and also by whole-genome sequencing (discussed below) and subsequent identification by the Average Nucleotide Identity (ANI) test after submission to GenBank database. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the VITEK 2 Compact system. Also, minimum inhibitory concentrations (MIC) for amikacin and gentamicin were determined using the MIC Evaluator strip (M.I.C.E, Thermo Fisher Scientific, Basingstoke, UK). The results were interpreted according to document M100-S23 [9].

2.3. Genome sequence of isolates

Total genomic DNA of Ec9 and Ec13 was extracted to construct a Nextera XT DNA library, which was sequenced using a NextSeq platform (Illumina). De

novo assembly was performed using the Velvet v.1.2.1 pipeline and Geneious v.R9 (Biomatters). The genome was annotated using NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) v.3.2. The multilocus sequence type (MLST), antimicrobial resistance genes and plasmid replicons were identified using MLST 1.8, ResFinder 2.1 and PlasmidFinder 1.3 databases, respectively, available from Center for Genomic Epidemiology (<http://www.genomicepidemiology.org/>).

Fastq files from sequenced genomes were also processed using the BioNumerics calculation engine and the wgMLST plug-in tool (Applied-Maths). Assembly-free allele detection analyses were performed for each isolate. The wgMLST (15 606 loci synchronized with the in-house schema) dendrogram was produced using categorical differences with 100 scaling factor and complete linkage cluster analysis.

2.4. Next Generation Sequencing, assembly and annotation

For determination of the full genetic contexts of the *rmtG* genes, plasmids from Ec9 and Ec13 (pEc09 and pEc13, respectively) were transferred by broth mating to *Escherichia coli* J53 sodium azide-resistant recipient strain, using a previously described protocol, with modifications [10]. Briefly, suspensions of overnight cultures were prepared, with the recipient at one-tenth of the cell density of the donor. About 10^8 colony-forming units of the donor and 10^7 colony-forming units of the recipient were then added to 1 mL of Luria-Bertani broth and left overnight at 25 °C. After this, the suspension was diluted in sterile 0.9% saline (10^{-3} and 10^{-5}), plated onto MacConkey agar containing sodium azide (150 mg/L) and amikacin (100 mg/L) and incubated

overnight at 37 °C to recover the *rmtG*-positive transconjugants. Putative transconjugants were confirmed by detection of *rmtG* with PCR as previously [8]. The plasmidial DNA was extracted using QIAamp® DNA Mini Kit (QIAGEN, Valencia, CA) following the manufacturer's recommendations.

Sequencing libraries were constructed using Illumina TruSeq DNA PCR-Nano sample preparation kit, with a median insert size of 350 bp, according to manufacturer's protocols. Briefly, 100 ng of each plasmidial DNA were fragmented using Covaris M220 Focused-ultrasonicator, end-repaired, A-tailed, and adapter ligated Library quality control was performed using 2100 Bioanalyzer System with Agilent High Sensitivity DNA Kit. Libraries were individually quantified via qPCR using KAPA Library Quantification Kits for Illumina platforms and they were pooled together in equimolar quantities and sequenced in MiSeq sequencing system (Illumina) to obtain 2x250 paired-end reads. Complete genome assembly of pEc09 and pEc13 was accomplished using combination of Newbler v 3.0 (Roche Inc.), SPAdes 3.10.0 [11], and phrap/cross_match (<http://www.phrap.org/phredphrapconsed.html>) programs. The cross_match tool was used to align the contigs/scaffolds of each assembly against the other. The phrap with consensus sequences from SPAdes assembly was used to close gaps between contigs and scaffolds generated by Newbler assembly until consensus sequence of each plasmid was obtained.

Plasmids sequences were annotated using Rapid Annotations using Subsystem Technology (RAST) server (<http://rast.nmpdr.org>) and then were further curated manually using BLAST databases

(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) and ISfinder (www-is.biotoul.fr/blast.php). EasyFig 2.0 was used to map and compare regions of interest containing *rmtG* of both plasmids.

Nucleotide sequence accession number

The draft genome sequences of Ec9 and Ec13 were deposited at DDBJ/ENA/GenBank under accession number MUDF00000000 and MUDC00000000, respectively. Versions described in this paper are MUDF01000000 and MUDC01000000, respectively. The plasmid sequences reported in this work have also been deposited to the DDBJ/ENA/GenBank, under accession number MH325468 and MH325469.

3. Results

Both isolates Ec9 and Ec13 were firstly identified as *Enterobacter cloacae* by the VITEK 2 Compact system, and then rectified to *E. hormaechei* by the ANI test. Regarding the pattern of susceptibility to antibiotics, Ec9 and Ec13 presented resistance to ertapenem, ceftazidime, ceftriaxone, cefepime, ciprofloxacin and norfloxacin, and susceptibility to imipenem, meropenem and colistin. According to results of the antimicrobial susceptibility test performed by the VITEK 2 Compact system, both strains presented resistance to amikacin (MIC \geq 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and intermediate resistance to gentamicin (MIC = 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$). However, the MIC values determined by M.I.C.E for Ec9 and Ec13 were \geq 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for amikacin, and \geq 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for gentamicin.

From the 15 606 loci analyzed by the wgMLST, Ec9 and Ec13 presented 2

403 different alleles. Sequencing of Ec9 produced 13 896 066 paired-end reads with a 416 × total coverage. A total of 86 contigs were generated with a G + C content of 55.2% and 5.3 Mb genome size. Annotation resulted in 5 069 coding genes, 54 RNA-encoding genes (49 tRNAs and 5 ncRNAs) and 197 pseudogenes. The whole-genome sequencing analysis showed that Ec9 belongs to Sequence Type (ST184) and carried the aminoglycoside resistance genes *aac(6′)-Ib*, *aadA1*, and *rmtG*, the beta-lactam resistance genes *bla_{TEM-1B}*, *bla_{OXA-9}*, *bla_{ACT-7}* and *bla_{CTX-M-2}*, the fluoroquinolone resistance genes *aac(6′)-Ib-cr*, the fosfomycin resistance gene *fosA*, the MLS (Macrolide, Lincosamide and Streptogramin B) resistance gene *mph(A)*, the sulphonamide resistance genes *sul1* and *sul2*, and the trimethoprim resistance gene *dfrA1*. The analysis of the genome of Ec9 identified the sequences de two plasmids, which belonged to the IncFII(Yp) and IncA/C groups.

Sequencing of Ec13 produced 9 902 678 paired-end reads with a 297 × total coverage. A total of 92 contigs were generated with a G + C content of 54.6% and 5.1 Mb genome size. Annotation resulted in 4 928 coding genes, 61 RNA-encoding genes (56 tRNAs and 5 ncRNAs) and 207 pseudogenes. The whole-genome sequencing analysis showed that Ec13 belongs to ST121 and carries the same resistance genes for aminoglycosides, beta- lactams, fluoroquinolones, fosfomycin and sulphonamide as Ec9, differing only by the absence of *mph(A)* and the presence of the tetracycline resistance gene *tetC*. Plasmids of incompatibility groups IncA/C, IncFI2A and IncFI2 were identified.

The plasmids carrying *rmtG* in Ec9 (443 × coverage) and Ec13 (143 × coverage) were both identified as belonging to the IncA/C incompatibility group.

Sequencing of pEc09 showed 191 predicted genes and 152 054 bp in size. The core region in pEc09 is composed by the replication initiation protein gene *repA*, the *traABCDEFGHIKLNUVW* genes necessary for plasmid conjugative transfer and the *parAB* and *stbA* genes, involved in plasmid stability. The beta-lactamase codifying genes *bla_{OXA-9}* and *bla_{TEM-1a}*, the aminoglycoside resistance genes *aadA1*, *aac(6')-Ib* and *rmtG* and the sulfonamide resistance gene *sul2* were identified in a Tn3 transposon flanked by two copies of the insertion element IS26 (**Figure 1A**). Two copies of the *rmtG* gene are associated to *rsmH* and *tgt* genes that codify an rRNA small-subunit methyltransferase H (RsmH) and a tRNA-guanine transglycosylase, respectively. The first *rsmH-tgt-rmtG* array is flanked by two copies of a Δ ISCR2, and the second first *rsmH-tgt-rmtG* array is flanked by the second Δ ISCR2 copy and a complete ISCR2 (**Figure 2**). The presence of this two-fold repeat was confirmed by long range PCR targeting the region containing the repeat. Analysis of the sequences of *rsmH* in the *rsmH-tgt-rmtG* array of pEc09 showed a substitution g.29764C>T, causing the presence of a stop codon. Since there is a duplication of this region, this mutation also repeats, in position 33 776, generating two pseudogenes *rsmH*. The extended spectrum beta-lactamase (ESBL) gene *bla_{CTX-M-2}*, the quaternary ammonium compound resistance gene *qacE Δ 1*, and the sulphonamide resistance gene *sul1* are carried in association with one copy of ISCR1 (**Figure 1A**).

The pEc13 is 235 699 bp long and harbors 277 predicted genes. The core

region comprises the replication initiation protein gene *repA*, the transfer related genes *traABCDEFGHIJKLMNPQRSUVXW* and *trbBCEL* and several genes involved in plasmid stability (*parAB*, *parM*, *stbA*, *psiAB*, *ardA*, and *umuCD*) (**Figure 1B**).

The *rmtG* gene is also present in the *rsmH-tgt-rmtG* array flanked by 2 copies of ISCR2 (**Figure 2**) carried by a Tn3 transposon along with *bla_{TEM-1b}* and *sul2* genes (**Figure 1B**). The *bla_{CTX-M-2}*, *sul1* and *qacEΔ1* genes were also identified in association with ISCR1 (**Figure 1B**).

4. Discussion

As previously discussed, phenotypic methods are unable to distinguish between species in the *Enterobacter cloacae* complex, which often renders their identification incomplete [2]. In this study, the two *E. hormaechei* identified by genomic analysis were initially misidentified as *E. cloacae* by automatic biochemical tests. Correct species identification is clinically relevant as the different clusters of the Ecc present different virulence outcomes [12].

Implementation of sequence-based methods, considered as a reliable tool, is necessary to achieve a more precise diagnostic of these important infections [13].

It was interesting to observe that while VITEK 2 Compact system identified Ec9 and Ec13 as presenting intermediate resistance to gentamicin, results obtained by M.I.C.E showed that both strains present high-level resistance to amikacin and gentamicin, as usually observed for resistance conferred by the 16S RMTases [8]. In fact, decreased accuracy of the VITEK 2 automated

system in reporting susceptibility to gentamicin was previously reported, and, based on this finding, it was suggested that gentamicin shall not be considered as for treatment of infections by amikacin-resistant *K. pneumoniae* isolates, even if VITEK 2 reports susceptibility to gentamicin [14].

The *rmtG* gene was mostly described in *K. pneumoniae* [8], and there is also a description in a plasmid of a *K. aerogenes* [15], both isolated in Brazil. To the best of our knowledge, this is the first report of the presence of *rmtG* in *E. hormaechei*. However, the propensity for recombination and genetic exchange in the Ecc is an important feature, and *E. hormaechei* was already discussed as a model of genetic capitalism, a mechanism of accumulation of mobile elements that allows bacteria that already have a selective advantage in a certain setting to adapt even further [16].

The great difference presented by Ec9 and Ec13 by wgMLST shows that the isolates are not related and the acquisition of plasmids containing *rtmG* was independent events. In fact, rapid dissemination of 16S-RMTase genes mediated by broad-host range plasmids like IncA/C apparently accelerates acquisition of a multidrug resistant nature in pathogenic microorganisms [17]. It is known that 16S-RMTase genes are frequently associated with other antimicrobial resistance mechanisms, including CTX-M-type ESBLs [17]. The co-production of RmtG with KPC-2 and a ESBL belonging to the CTX-M group was already reported in a *K. pneumoniae* isolated in Brazil [8]; and co-production of RmtG with CTX-M-2 and CTX-M-15 in a *K. pneumoniae* isolated in the USA [18]. The isolation of *E. cloacae* ST121 and ST184 harboring different combinations of resistance genes from humans was previously

reported [19].

The *rmtG* gene was already identified in IncA/C plasmids carried by *K. pneumoniae* [18]. The organizational structure of pEc09 suggests that ISCR2, in association with IS26, also present, is responsible for the mobilization of the array. Furthermore, the association of *rmtG* with ISCR2 in a 2-fold tandem repeat suggests a gene amplification process. In fact, ISCR2 has been already observed in association with 16S RMTases such as *rmtD* in plasmids, and identified as responsible for gene amplifications [6].

None of the patients received any aminoglycoside-based treatment during hospital admission. However, the selection of RmtG-producing *K. pneumoniae* in the absence of selective pressure was already reported [18].

Plasmid pEc13 also carries the *mrk* operon (*mrkABCDEF*) encoding a type 3 fimbriae, produced by various species of *Enterobacteriaceae* and is responsible for adhesion in various components of the extracellular matrix and biofilm formation [20]. This plasmid-mediated pathogenic feature could be of very importance to the establishment of the infection.

5. Conclusions

The genome sequence of RmtG-producing *E. hormaechei* ST184 and ST121 presented here can facilitate comparative genomic analyses among *Enterobacter* strains with distinct antimicrobial susceptibility patterns. The presence of *rmtG* in complex genetic platforms carried by Tn3 transposons in IncA/C plasmids may allow dissemination of this important mechanism of resistance to other Gram-negative pathogens and further limit the treatment options.

Declarations

Funding: This work was supported by the São Paulo Research Foundation (FAPESP) [#2014/17184-0]. ERM is a recipient fellow from Coordination of Improvement of Higher Level Personnel (CAPES). tc is a research FELLOW OF FAPESP [2018/02691-4]. LC is recipient of postgraduate fellowship from FAPESP [2015/21325-0].

Ethical Approval: YES, ethical approval was obtained. Process CEPE 48767315.0.0000.5415

Competing Interests: No, there is no conflict of interests.

References

- [1] Mezzatesta ML, Gona F, Stefani S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. *Future Microbiol* 2012;7:887–902. doi:10.2217/fmb.12.61.
- [2] Garinet S, Fihman V, Jacquier H, Corvec S, Le Monnier A, Guillard T, et al. Elective distribution of resistance to beta-lactams among *Enterobacter cloacae* genetic clusters. *J Infect* 2018;77:178–82. doi:10.1016/j.jinf.2018.05.005.
- [3] Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenclature *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:5306–18. doi:10.1128/AEM.69.9.5306-5318.2003.
- [4] De Florio L, Riva E, Giona A, Dedej E, Fogolari M, Cella E, et al. MALDI-TOF MS identification and clustering applied to *enterobacter* species in nosocomial setting. *Front Microbiol* 2018;9:1–8. doi:10.3389/fmicb.2018.01885.
- [5] Sutton GG, Brinkac LM, Clarke TH, Fouts DE. *Enterobacter hormaechei* subsp. *hoffmannii* subsp. nov., *Enterobacter hormaechei* subsp. *xiangfangensis* comb. nov., *Enterobacter roggkampii* sp. nov., and *Enterobacter muelleri* is a later heterotypic synonym of *Enterobacter asburiae* based on

- computational a. F1000Research 2018;7:521.
doi:10.12688/f1000research.14566.1.
- [6] Bueno MFC, Francisco GR, De Oliveira Garcia D, Doi Y. Complete sequences of multidrug resistance plasmids bearing rmtD1 and rmtD2 16S rRNA methyltransferase genes. *Antimicrob Agents Chemother* 2016;60:1928–31. doi:10.1128/AAC.02562-15.
- [7] Doi Y, Wachino J ichi, Arakawa Y. Aminoglycoside Resistance: The Emergence of Acquired 16S Ribosomal RNA Methyltransferases. *Infect Dis Clin North Am* 2016;30:523–37. doi:10.1016/j.idc.2016.02.011.
- [8] Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA, De Oliveira Garcia D, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013;57:2397–400. doi:10.1128/AAC.02108-12.
- [9] CLSI. M100-S23. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement 2013.
- [10] Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: An environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis* 2011;11:355–62. doi:10.1016/S1473-3099(11)70059-7.
- [11] Bankevich A, Nurk S, Antipov D, Gurevich AA, Dvorkin M, Kulikov AS, et al. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to

- Single-Cell Sequencing. *J Comput Biol* 2012;19:455–77.
doi:10.1089/cmb.2012.0021.
- [12] Pavlovic M, Konrad R, Iwobi AN, Sing A, Busch U, Huber I. A dual approach employing MALDI-TOF MS and real-time PCR for fast species identification within the *Enterobacter cloacae* complex. *FEMS Microbiol Lett* 2012;328:46–53.
doi:10.1111/j.1574-6968.2011.02479.x.
- [13] Akbari M, Bakhshi B, Peerayeh SN. Particular Distribution of *Enterobacter cloacae* Strains Isolated from Urinary Tract Infection within Clonal Complexes. *Iran Biomed J* 2016;20:49–55.
doi:10.7508/ibj.2016.01.007.
- [14] Ko JH, Baek JY, Peck KR, Cho SY, Ha YE, Kim SH, et al. Discrepant susceptibility to gentamicin despite amikacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* by VITEK 2 represents false susceptibility associated with the *armA* 16S rRNA methylase gene.
J Med Microbiol 2017;66:1448–50. doi:10.1099/jmm.0.000583.
- [15] Passarelli-Araujo H, Palmeiro JK, Moharana KC, Pedrosa-Silva F, Dalla-Costa LM, Venancio TM. Molecular epidemiology of 16S rRNA methyltransferase in Brazil:
RmtG in *Klebsiella aerogenes* ST93 (CC4). *An Acad Bras Cienc* 2019;91:e20180762. doi:10.1590/0001-376520182018762.
- [16] Paauw A, Caspers MPM, Leverstein-van Hall MA, Schuren FHJ, Montijn RC, Verhoef J, et al. Identification of resistance and virulence factors in an epidemic *Enterobacter hormaechei* outbreak strain. *Microbiology*

2009;155:1478–88. doi:10.1099/mic.0.024828-0.

- [17] Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist Updat* 2012;15:133–48. doi:10.1016/j.drug.2012.05.001.
- [18] Hu F, Munoz-Price LS, DePascale D, Rivera JI, Doi Y. *Klebsiella pneumoniae* sequence type 11 isolate producing RmtG 16S rRNA methyltransferase from a patient in Miami, Florida. *Antimicrob Agents Chemother* 2014;58:4980–1. doi:10.1128/AAC.02632-14.
- [19] Izdebski R, Baraniak A, Herda M, Fiett J, Bonten MJM, Carmeli Y, et al. MLST reveals potentially high-risk international clones of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother* 2015;70:48–56. doi:10.1093/jac/dku359.
- [20] Langstraat J, Bohse M, Clegg S. Type 3 Fimbrial Shaft (MrkA) of *Klebsiella pneumoniae*, but not the fimbrial (MrkD), facilitates biofilm formation. *Am Soc Microbiol* 2001;69:5805–12. doi:10.1128/IAI.69.9.5805.

Figure Captions

Figure 1. Structure of the IncA/C plasmids pEc09 (A) and pEc13 (B) carrying *rmtG*

gene. The inner circles colored in magenta and yellow indicate the G+C contents.

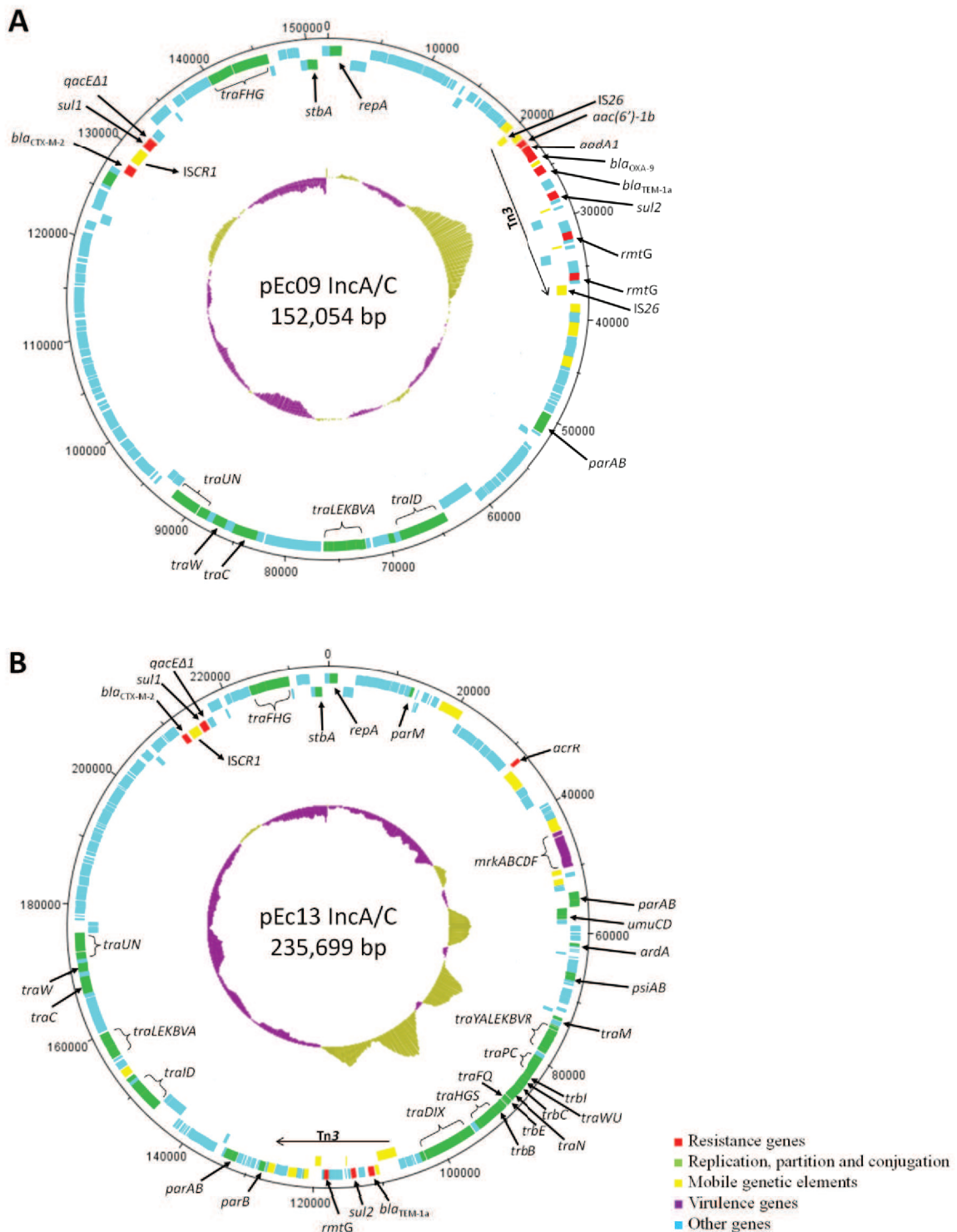


Figure 2. Comparison of *rmtG*-carrying regions of pEc09 and pEc13. Light-blue shading indicates regions with homology.

