

---

*Resumo*

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

**Maria Fernanda Campagnari Bueno; Yohei Doi ; Doroti de Oliveira Garcia (orientadora)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2017.

---

### **RESUMO**

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

**PALAVRAS CHAVES:** *Klebsiella*; plasmídeos; carbapenêmicos; beta-Lactamases aminoglicosídeos

---

*Abstract*

### ***Characterization of antimicrobial resistance genes and their genetic context in *Klebsiella* spp. producers of KPC isolated from hospitals in the State of São Paulo***

**Maria Fernanda Campagnari Bueno; Yohei Doi ; Doroti de Oliveira Garcia (orientadora)**

Programa de Pós-Graduação em Ciências. Coordenadoria de Controle de Doenças. Secretaria de Estado da Saúde. São Paulo, Brasil – 2017.

---

#### **ABSTRACT**

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

**KEYWORDS:** *Klebsiella*; plasmids; carbapenems; beta-lactamase aminoglycosides.