

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

POLYANA SILVA PEREIRA

Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Biologia Celular e Molecular

Orientadores: Profa. Dra. Marise Dutra Asensi
Profa. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

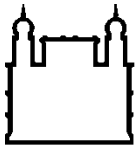
RIO DE JANEIRO

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2012.

1. *Klebsiella pneumoniae* 2. KPC 3. MLST 4. Multirresistência



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

POLYANA SILVA PEREIRA

Caracterização Molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes Regiões do Brasil

ORIENTADORES: Profa. Dra. Marise Dutra Asensi
Profa. Dra. Ana Paula D’Alincourt Carvalho Assef

Aprovada em: 12/03/2012

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Ozório de Moraes - Presidente
Prof. Dr. Simone Aranha Nauer
Prof. Dr. Elizabeth Andrade Marques
Prof. Dr. Viviane Zahner
Prof. Dr. Ernesto Hofer

Rio de Janeiro, 12 de março de 2012.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família. Primeiramente aos meus pais, Lúcia Helena e Hermínio. Sem seu apoio e dedicação eu jamais conseguiria ter chegado até aqui. Eles me deram educação, amor, carinho e acima de tudo são um grande exemplo de vida para mim. Agradeço a eles por todas as conversas e conselhos recebidos durante toda a minha vida. Amo vocês! Gostaria de agradecer também ao meu irmão Rafael, pelo companheirismo, amizade e compreensão, mas acima de tudo pela ajuda.

À minha madrinha Valéria, que sempre me acompanhou e me ajudou nos momentos em que mais precisei; a minha avó Edith, por ser tão amorosa e dedicada a sua família.

Também ao meu namorado Guilherme, pelo amor, carinho e companheirismo.

A todos os meus amigos, que de maneira geral, contribuíram para a formação da pessoa que sou hoje e me acompanharam durante a minha trajetória.

Aos professores e pesquisadores do IOC/FIOCRUZ que transmitiram a mim seu precioso conhecimento, que pretendo guardar para vida toda.

À Coordenação da BCM, especialmente a Danielle, por toda a ajuda para o desenvolvimento desse trabalho.

Às minhas orientadoras, Marise e Ana Paula, pela orientação e apoio durante o todos os quatro anos que tenho desenvolvido pesquisa no LAPIH.

À Veronica da UERJ, por ter nos ajudado a padronizar a metodologia de extração plasmidial.

Ao meu querido amigo e “aluno” Carlos, por toda a ajuda, principalmente com os plasmídios, para a confecção desse estudo.

Aos integrantes e ex-integrante do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH), local onde aprendi muito: Viviane, Liliane, Karyne, Thiago, Felipe, Paula, Carol, Isabel, Melise, Jéssica, Fernanda, Júlia, Vanessa. Agradeço também ao Setor de Meio de Cultura da Bacteriologia, principalmente ao Seu Evaldo, pela ajuda na confecção do projeto.

Aos hospitais e laboratórios centrais estudados, pelo fornecimento das cepas.

As agencias financiadoras que permitiram que este projeto fosse realizado: Instituto Oswaldo Cruz, Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Muito obrigada!

"A perseverança é a mãe da sorte."

Miguel Cervantes.

"Esmere-se para realizar uma obra, seja ela simples ou complexa. O valor de uma pessoa pode ser medido pelo esmero das suas realizações."

Inácio Dantas

"A imaginação é mais importante que o conhecimento. Conhecimento auxilia por fora, mas só o amor socorre por dentro. Conhecimento vem, mas a sabedoria tarda."

Albert Einstein

SIGLAS E ABREVIATURAS

AmpC	Tipo de beta-lactamase cromossomal
AK	Amicacina
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	do ingles <i>American Type and Culture Collection</i>
BHI	do ingles <i>Brain Heart Infusion Agar</i>
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo clonal
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CDC	do ingles <i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	do ingles <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DHP-1	Dehidropeptidase-1
DIG	Digoxigenina
EMB	do ingles <i>Eosin Methylene- blue Agar</i>
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	do inglês <i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EDTA	do inglês <i>Ethylene Diamine TetrAcetic acid</i>
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
FOSF	Fosfomicina/trometranol
GES	do inglês <i>Guiana extended spectrum beta-lactamase</i>
GN	Gentamicina
HCl	Ácido clorídrico
H₂S	Gás Sulfídrico
IMI	Imipenem
Inc	Grupo de incompatibilidade plasmidial
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IR	Sequencia repetitiva invertida
IS	Sequencia de inserção
kDa	Quilodaltons

KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meropenem
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MLEE	do inglês <i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MLST	do inglês <i>Multilocus sequence typing</i>
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MurA	UDP-N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NDM	New Delhi Metalobetalactamase
OMS	Organização Mundial da Saúde
OMPs	Classe de porinas presente em Procariotos
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
OXA	Oxacilinase
pb	Pares de bases
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
pH	Potencial de hidrogênio
POL	Polimixina B
PTZ	Piperacilina/ Tazobactam
RNA	Ácido ribonucléico
rpm	Rotações por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHV	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
SLV	do inglês <i>Single locus variant</i>
ST	do inglês <i>Sequence type</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SXT	Sulfametoxazole/ Trimetoprima
TAE	Tampão Tris-acetado EDTA
TBE	Tampão Tris-borato EDTA
TIG	Tigeciclina
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano
UTI	Unidade de terapia intensiva

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Reação de cicloadição que gera anel beta-lactâmico	8
Figura 1.2: Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos existentes	9
Figura 1.3: Esquema representando o mecanismo de ação das beta-lactamases	17
Figura 1.4: Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene <i>bla</i> _{KPC-2} , segundo Naas e colaboradores (57).	25
Figura 4.1: Susceptibilidade aos antimicrobianos de 165 cepas de <i>K.pneumoniae</i> produtoras de KPC realizada através do método de difusão em ágar	56
Figura 4.2: Concentrações inibitórias mínimas frente ao imipenem, meropenem e ertapenem nas 165 amostras produtoras de KPC.	57
Figura 4.3: Concentrações inibitórias mínimas frente à tigeciclina e polimixina B nas 165 amostras produtoras de KPC.	57
Figura 4.4: Dendrograma representativo dos 28 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 165 amostras de <i>K.pneumoniae</i> produtoras de KPC, onde podemos observar em destaque os grupos de clones mais prevalentes: A-KpRj, C e Q.	61
Figura 4.5: Figura gerada pelo software <i>Eburst</i> , onde podemos observar todos os STs de <i>K.pneumoniae</i> descritos até o momento (05/01/12). Destacados em vermelho estão os STs observados em nosso trabalho, assim como os respectivos complexos clonais aos quais pertencem	65
Figura 4.6: Figura gerada pelo software <i>Eburst</i> , onde podem ser observados os 28 STs descritos neste trabalho e os três complexos clonais encontrados: CC11, CC16-17 e CC758-840.	66
Figura 4.7: Figura gerada pelo software <i>Eburst</i> , onde podemos observar os 22 STs que apresentaram variantes em apenas um <i>locus</i> quando comparados ao banco de dados	67
Figura 4.8: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos <i>tonB</i> do CC11	68
Figura 4.9: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos <i>mdh</i> do CC16-17	68
Figura 4.10: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos <i>tonB</i> do CC758-840	69
Figura 4.11: Imagens dos géis de PCR realizados para a detecção da região flanqueadora do gene <i>bla</i> _{KPC}	70
Figura 4.12: Imagem gerada pelo software <i>GelComparII</i> , onde podemos observar os plasmídios das 45 amostras estudadas	74

- Figura 4.13:** Foto de um dos géis realizados e da membrana correspondente, exemplificando a marcação dos plasmídios com a sonda *bla*_{KPC} 75
- Figura 4.14:** Foto de um dos géis realizados e das membranas correspondentes, exemplificando a marcação dos plasmídios com as sondas *bla*_{KPC-2} e IncN 76
- Figura 4.15:** Foto de um dos géis realizados e da membrana correspondente, exemplificando a marcação dos plasmídios com a sonda IncL/M 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas segundo Tenover, 2006(9).	4
Tabela 1.2: Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2011 (32).	19
Tabela 3.1: Iniciadores específicos para a detecção do gene <i>bla</i> _{KPC} utilizados nas reações de PCR.	41
Tabela 3.2: Iniciadores específicos para a detecção dos genes <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM} e <i>bla</i> _{CTX-M} utilizados nas reações de PCR.	44
Tabela 3.3: Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST utilizados nas reações de PCR.	46
Tabela 3.4: Iniciadores específicos para o sequenciamento dos genes do esquema de MLST.	47
Tabela 3.5: Iniciadores específicos utilizados para a detecção do Transposon Tn4401.	48
Tabela 3.6: Iniciadores específicos para a determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial.	50
Tabela 4.1: Espécimes clínicos e estados de origem das 165 amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtores de KPC.	55
Tabela 4.2: Perfil de resistência das 165 amostras de <i>K.pneumoniae</i> produtoras de KPC estudadas.	58
Tabela 4.3: Associação de genes de ESBLs detectados nas 165 cepas de <i>K.pneumoniae</i> estudadas.	59
Tabela 4.4: Distribuição dos genótipos de <i>K. pneumoniae</i> produtores de KPC nos estados brasileiros estudados.	60
Tabela 4.5: Relação dos genótipos encontrados (PFGE), dos respectivos “ <i>sequence types</i> ” e perfis alélicos correspondentes das 45 amostras de <i>K.pneumoniae</i> em que o MLST foi realizado.	63
Tabela 4.6: Diferenças nucleotídicas encontradas entre os alelos do gene <i>tonB</i> das cepas pertencentes ao CC11.	68
Tabela 4.7: Relação dos clones definidos por PFGE/MLST em relação ao ambiente genético do gene <i>bla</i> _{KPC} (Tn4401).	70
Tabela 4.8: Relação dos grupos de incompatibilidade plasmidial encontrados nas 45 amostras de <i>K.pneumoniae</i> estudadas.	71
Tabela 4.9: Relação dos perfis de grupos de incompatibilidade plasmidial em relação aos clones determinados por PFGE/MLST encontrados nas 45 amostras de <i>K.pneumoniae</i> estudadas.	72

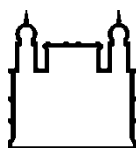
Tabela 4.10: Número de plasmídios, pesos moleculares dos mesmos e o tamanho dos plasmídios marcados pelas sondas *bla*_{KPC}, IncN e IncL/M das 45 amostras em que a extração plasmidial e hibridização foram realizadas.

78

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1
1.2.	Antimicrobianos	2
1.2.1.	Antimicrobianos que inibem a síntese proteica	4
1.2.2.	Antimicrobianos que inibem a síntese de ácidos nucleicos	5
1.2.3.	Antimicrobianos que inibem vias metabólicas	6
1.2.4.	Antimicrobianos que geram o rompimento da membrana celular	7
1.2.5.	Antimicrobianos que atuam na síntese da parede celular	7
1.2.5.1.	Antimicrobianos beta-lactâmicos	8
1.3.	Resistência aos antimicrobianos	12
1.4.	Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos	14
1.4.1.	Mudança no sítio ativo das PBPs	15
1.4.2.	Diminuição da expressão de porinas (OMPs)	15
1.4.3.	Aumento da expressão de bombas de efluxo	16
1.4.4.	Beta-lactamases	16
1.4.5.	Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)	20
1.4.6.	Carbapenemases	22
1.4.6.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)	23
1.4.6.1.1.	Plataformas genéticas associadas ao gene <i>bla</i> _{KPC}	23
1.4.6.1.1.1.	Plasmídios	23
1.4.6.1.1.2.	Transposon Tn4401	24
1.4.6.1.2.	Ocorrência mundial	25
1.4.6.1.3.	Ocorrência no Brasil	29
1.4.6.1.4.	Deteção laboratorial	30
1.5.	Metodologias de tipagem de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	32
1.5.1.	Metodologias não moleculares	33
1.5.2.	Metodologias moleculares	33
1.6.	Infecções causadas por ESBLs e KPCs	35
1.7.	Justificativa e relevância	37
2.	OBJETIVOS	39
2.1.	Objetivo geral	39
2.2.	Objetivos específicos	39
3.	METODOLOGIA	40
3.1.	Seleção das amostras	40
3.2.	Confirmação da produção de KPC e identificação da variante alélica	40
3.2.1.	Extração de DNA pela metodologia de Tiocianato de Guanidina	40
3.2.2.	Confirmação da produção de KPC	41
3.2.3.	Identificação da variante alélica do gene KPC	42
3.3.	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	42

3.3.1.	Difusão em ágar	42
3.3.2.	Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B	43
3.3.3.	Análise de perfil de multirresistência	43
3.4.	Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases	43
3.5.	Análise do polimorfismo genético através de PFGE	44
3.6.	Análise do polimorfismo genético através de MLST	46
3.6.1.	Amplificação por PCR	46
3.6.2.	Sequenciamento	47
3.7.	Detecção das regiões flanqueadoras do gene <i>bla_{KPC}</i>	48
3.8.	Identificação do plasmídio carreador do gene <i>bla_{KPC}</i>	48
3.8.1.	Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial	48
3.8.2.	Extração plasmidial	51
3.8.3.	Hibridização com sonda do gene <i>bla_{KPC}</i> e com as sondas dos grupos plasmidiais mais prevalentes	52
3.9.	Fluxograma da metodologia	54
4.	RESULTADOS	55
4.1.	Amostras bacterianas	55
4.2.	Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos	55
4.2.1.	Difusão em ágar	55
4.2.2.	Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B	56
4.2.3.	Análise de perfil de multirresistência	58
4.3.	Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases	58
4.4.	Análise do polimorfismo genético através de PFGE	59
4.5.	Análise do polimorfismo genético através de MLST	62
4.6.	Detecção das regiões flanqueadoras do gene <i>bla_{KPC}</i>	69
4.7.	Identificação do plasmídio carreador do gene <i>bla_{KPC}</i>	71
4.7.1.	Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial	71
4.7.2.	Extração plasmidial	73
4.7.3.	Hibridização com sonda de <i>bla_{KPC}</i> e com as sondas dos grupos plasmidiais mais prevalentes	75
5.	DISCUSSÃO	81
6.	CONCLUSÕES	98
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
8.	ANEXO	113



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

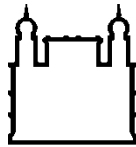
Caracterização Molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes Regiões do Brasil

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Polyana Silva Pereira

Klebsiella pneumoniae é um patógeno Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, frequentemente associado às infecções. Isolados clínicos de *K. pneumoniae* usualmente apresentam resistência a classe dos beta-lactâmicos, devido a produção de carbapenemase do tipo KPC. Além da resistência a todos os beta-lactâmicos disponíveis, a KPC possui alta capacidade de disseminação, pois tem sido descrita em plasmídios associados à transposons (Tn4401). Foi descrita inicialmente nos EUA, e atualmente se tornou uma ameaça global. A sua primeira descrição no Brasil ocorreu em 2006 e desde então sua incidência tem crescido significativamente. Assim, o objetivo desse trabalho foi analisar o polimorfismo genético, determinar o perfil de resistência a antimicrobianos, identificar o plasmídio carreador e a região flanqueadora do gene bla_{KPC} de 165 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de doze estados Brasileiros (AL, AM, CE, DF, ES, GO, MG, MA, PE, PI, RJ e SC) no período de 2006 a 2010. A confirmação da produção de KPC e identificação da variante alélica foram realizadas por PCR e sequenciamento. A susceptibilidade aos antimicrobianos foi determinada através de difusão em ágar (CLSI, 2011) e determinação da CIM por Etest® (ANVISA Nº1/2010). PFGE e MLST foram utilizados para a análise epidemiológica. Avaliação da região flanqueadora do gene bla_{KPC} foi realizada através de PCR para detecção do Tn4401. A identificação do plasmídio carreador do gene bla_{KPC} foi realizada através de extração plasmidial (Kado e Liu, 1981) e hibridização (Sambrook e Russel, 2001). As amostras foram recuperadas principalmente a partir de sangue (39%) e urina (37%), e todas as cepas produziram KPC-2. Foi observada resistência a ciprofloxacina (95,7%), sulfametoxazol/trimetoprima (84,2%), amicacina (34%) e gentamicina (57%), fosfomicina (7,8%), polimixina B (11%) e tigeciclina (38%). A maioria das cepas se mostrou multirresistente, sendo três resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas. Através de PFGE, encontramos 28 grupos clonais, sendo três mais prevalentes: grupo A (40,6%- ES, RJ, SC e CE); grupo C (23% - CE, DF, MG, GO, PE e RJ); grupo Q (9,7%- AL, ES, DF e PI). Através de MLST, também se observou 28 clones, mostrando boa correlação. Os grupos clonais A/KpRj, C e Q foram designados por MLST como ST437, ST11 e ST340 respectivamente. Através de análise filogenética, observamos três complexos clonais entre nossas amostras: CC11 (ST11, ST340, ST437, ST757, ST855), CC16-17 e CC758-840. O CC11 apresenta grande importância epidemiológica, pois inclui dois STs que têm desempenhado papel de destaque em relação à disseminação do gene bla_{KPC} : ST258 e ST11 (encontrado em nosso trabalho). O gene bla_{KPC-2} foi encontrado associado ao Tn4401, isoforma “a” em todas as amostras, e associado à plasmídios em 95,3% das amostras. Desses plasmídios, 92% eram de 40kb (IncN) e 8% de 55kb (IncL/M). Dessa forma, acreditamos que em nosso país esteja ocorrendo a disseminação do gene bla_{KPC} tanto devido a dispersão de um mesmo plasmídio de aproximadamente 40kb do grupo de IncN entre cepas de diferentes STs, como também a disseminação de um mesmo complexo clonal (CC11), onde os clones A-KpRJ/ST437 e C/ST11 tem desempenhado importante.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Caracterização Molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes Regiões do Brasil

ABSTRACT

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Polyana Silva Pereira

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative pathogen belonging to Enterobacteriaceae family, often associated with infections. Clinical isolates of *K. pneumoniae* usually show resistance to beta-lactams, due to production of KPC-type carbapenemase. In addition to resistance to all beta-lactams available, this carbapenemase has high capacity to spread, since it has been described in plasmids associated with transposons (Tn4401). KPC was first described in the U.S., and nowadays is considered a global threat. The first description of KPC in Brazil occurred in 2006 and since then its incidence has greatly increased. Thus, the objective of this study was to analyze the genetic polymorphism, determine the antimicrobial resistance profile, and identify the carrier plasmid and the flanking region of the *bla*_{KPC} gene of 165 KPC-producing *K.pneumoniae* from twelve Brazilian states (AL, AM, CE, DF, ES, GO, MG, MA, PE, PI, RJ and SC) in the period of years 2006 to 2010. Confirmation of KPC production and identification of the allele variant were performed by PCR and sequencing. The antimicrobial susceptibility was determined by agar diffusion (CLSI, 2011) and MIC determination by Etest® (ANVISA 1/ 2010). PFGE and MLST were used for epidemiological analysis. Evaluation of flanking region surrounding the *bla*_{KPC} gene was performed by PCR for the detection of Tn4401. The identification of the plasmid carrying the *bla*_{KPC} gene was performed by plasmid extraction (Kado and Liu, 1981) and hybridization (Sambrook and Russell, 2001). The isolates were mainly recovered from blood (39%) and urine (37%), and all strains produced KPC-2. Resistance was observed to ciprofloxacin (95,7%), sulfamethoxazole/trimethoprim (84.2%), amikacin (34%), gentamicin (57%), fosfomicin (7.8%), polymyxin B (11%) and tigecycline (38%). Most of the strains showed multidrug resistant pattern, and three of them were resistant to all classes of antimicrobials tested. By PFGE, we found 28 clonal groups, three being the most prevalent: group A (40.6% - ES, RJ, SC and EC), group C (23% - CE, DF, MG, GO, RJ and EP); group Q (9.7% - AL, ES, DF and PI). By MLST, we also found 28 profiles, showing good consistency between these two methodologies. The clonal group A/KpRj, C and Q were designated by MLST as ST437, ST11 and ST340 respectively. Phylogenetic analysis showed three clonal complexes: CC11 (ST11, ST340, ST437, ST757, ST855), CC16-17 and CC758-840. The CC11 has great epidemiological importance, because it includes two STs that have been playing a prominent role in the spread of the *bla*_{KPC} gene: ST258 and ST11 (found in our work). The *bla*_{KPC-2} gene was found associated with Tn4401, isoform "a" in all samples, and associated with plasmids in 95.3% of them. Of these plasmids, 92% had 40kb belonging to the IncN group and 8% had 55kb (IncL/M). Thus, we believe that our country is experiencing the spread of the gene *bla*_{KPC} both associated with the dispersion of a single plasmid of approximately 40kb of the IncN group among strains of different STs, but also by the spread of the same clonal complex (CC11), where the clones A-KpRj/ST437 and C/ST11 has played an important role.

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella pneumoniae é um procarioto, pertencente ao filo Proteobacteria, Classe Gammaproteobacteria, ordem Enterobacteriales, família *Enterobacteriaceae* (1).

O gênero *Klebsiella* foi nomeado por Trevisan (1885) em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs (1834 - 1913). A primeira espécie de *Klebsiella* descrita foi um bacilo encapsulado isolado de uma paciente com rinoscleroma. Este isolado foi denominado *Klebsiella rhinoscleromatis* por Trevisan em 1887. Em 1882, uma bactéria foi isolada dos pulmões de um paciente que havia morrido de pneumonia e desta forma foi designada *Klebsiella pneumoniae* também por Trevisan em 1887 (1).

As espécies do gênero *Klebsiella* foram originalmente diferenciadas de acordo com suas características patogênicas, como doenças causadas ou quanto a sua origem. Posteriormente foram classificadas de acordo com a utilização de diversos substratos, provas bioquímicas e atividade enzimática. Finalmente, estudos moleculares permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero.

Cinco espécies pertencentes ao gênero *Klebsiella* foram definidas a partir de metodologia de hibridização DNA-DNA: *K.oxytoca*; *K.planticola*; *K.terrigena*; *K.mobilis* e *K.pneumoniae*. Esta última foi subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entretanto, em estudos que comparam as sequências dos genes 16S rRNA e *rpoB*, as espécies *K.planticola*, *K.terrigena* e *K.mobilis*, foram agrupadas em outro gênero, *Raoultella*, sendo nomeadas a partir de então como *R. planticola*, *R. terrigena* e *R. ornithinolytica* respectivamente. Entre as três subespécies do gênero, *K.pneumoniae* subespécie *pneumoniae* é a mais frequente em infecções em humanos (2, 3).

K.pneumoniae é um bastonete Gram-negativo aeróbio facultativo, de tamanho variando de 0,3 x 1,5 µm a 0,4 x 2,0 µm, não esporulado, imóvel. É não produtor de gás sulfídrico (H₂S) e da enzima citocromo oxidase, utiliza o citrato como única fonte de carbono e possui a enzima lisina descarboxilase. No Ágar EMB (*Eosin- Methylene- Blue*), produz colônias róseas elevadas com centro negro, brilhantes, de consistência mucoide devido à produção de cápsula (4).

O genoma total da espécie *K. pneumoniae* já foi sequenciado. A primeira cepa a ser sequenciada foi a MGH 78578 (ATCC 700721) isolada em 1994, oriunda de escarro de um paciente de 66 anos que apresentava pneumonia e que se encontrava internado em uma unidade de terapia intensiva (UTI) (Acession number GenBank: NC_009648.1). Essa cepa, apresentava um total de 5.315.120 pares de bases, com aproximadamente 5926 genes. A média de conteúdo G/C do cromossomo foi 57,7%, considerado o mais alto conteúdo G/C entre as espécies da família *Enterobacteriaceae*. Atualmente, já estão disponíveis nos bancos de dados especializados mais três genomas de *K. pneumoniae* (5).

Esta bactéria encontra-se ubiqüitária na natureza, encontrada em águas, esgoto, solo e na superfície das plantas, também colonizando mucosas de diversos mamíferos (6).

A relação deste organismo extracelular com humanos varia desde colonização a infecções, principalmente de pacientes hospitalizados. Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: pneumonias, infecções do trato urinário, manifestações de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse. Já como parte da microbiota normal, este organismo usualmente é encontrado colonizando a nasofaringe, a pele e principalmente o trato gastrointestinal dos indivíduos (2,7).

Os principais veículos para a transmissão de *K.pneumoniae* no ambiente hospitalar são equipamentos médicos contaminados, produtos derivados de sangue, trato gastrointestinal dos doentes e as mãos não higienizadas dos profissionais de saúde. A capacidade que este microrganismo possui de disseminar-se tem gerado surtos, especialmente em unidades neonatais (8).

1.2. Antimicrobianos

Ao longo da história, temos observado a ocorrência de uma batalha contínua entre os seres humanos e os diversos microrganismos que tem o poder de causar infecções. Diversas doenças e manifestações como a peste bubônica, tuberculose, malária, infecções bacterianas e mais recentemente a síndrome da imunodeficiência humana (AIDS) tem afetado substancialmente à população humana, causando elevadas taxas de mortalidade e morbidade ao longo dos séculos. Entretanto, no início do século 20 ocorreram grandes avanços no desenvolvimento de medicamentos, principalmente aqueles com capacidade antibacteriana, ajudando a melhorar o panorama em favor dos humanos (9).

A era moderna de terapia antimicrobiana teve início em 1929, com a descoberta da penicilina por Alexander Fleming, logo seguida pela descoberta das sulfonamidas em 1935 por Dogmagk. O isolamento de outros compostos como estreptomicina, cloranfenicol e tetraciclina ocorreu pouco tempo depois e na década de 50, já estavam disponíveis na terapêutica. Vale ressaltar que existem dois grupos de moléculas com atividade biológica que podem ser usadas para o tratamento de infecções: os antibióticos, que são substâncias naturais produzidas por certos grupos de microrganismos e antimicrobianos, que são sintetizados em laboratórios. Entretanto, hoje em dia, vários compostos originalmente descobertos em microrganismos podem ser produzidos artificialmente (9).

Apesar da identificação de centenas de compostos com atividade antibacteriana, somente alguns demonstraram eficácia clínica. O problema está relacionado com algumas características farmacológicas, tais como: toxicidade apenas contra o microrganismo, maior espectro de atividade possível, ser desprovido de propriedade alergênica, causar dano mínimo a microbiota normal, ter boa distribuição entre os tecidos e fluidos do organismo, ser de fácil produção e deve ter meia-vida longa. Desta forma, apesar do grande número de compostos candidatos a agente antimicrobianos, não possuímos até hoje um arsenal tão vasto quanto seria necessário para combater os fenômenos de resistência (10).

Atualmente, a grande maioria dos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas está categorizada de acordo com seu principal mecanismo de ação, representados por: [1] inibição da síntese proteica, [2] interferência na síntese de ácidos nucleicos, [3] inibição de vias metabólicas, [4] rompimento da membrana celular, [5] interferência na síntese da parede celular.

A classificação dos principais antimicrobianos e seus respectivos mecanismos de ação podem ser observados na tabela abaixo.

Tabela 1.1: Classificação dos antimicrobianos mais comumente utilizados na prática clínica para tratamento de infecções bacterianas segundo Tenover, 2006 (9).

Mecanismo de ação	Mecanismo de ação específico	Classe (Exemplo de antimicrobianos)
Interferência na síntese da parede celular	Ligação as PBPs	Beta-lactâmicos (Penicilinas, Cefalosporinas, Carbapenemas e Monobactâmicos)
	Inibição da enzima MurA	Fosfomicinas
	Ligação a D-alanina	Glicopeptídeos (Vancomicina e Teicoplanina)
Inibição da Síntese proteica	Ligam-se a subunidade ribossomal 50S	Cloranfenicol, Macrolídeos, Lincosamidas(Clindamicina), Oxazolidinonas (Linezolida)
	Ligam-se a subunidade ribossomal 30S	Aminoglicosídeos (Amicacina e Gentamicina), Glicilciclina (Tigeciclina) e Tetracilinas
Interferência na síntese de ácidos nucleicos	Inibe a síntese de DNA	Quinolonas (Ciprofloxacina)
	Inibe a síntese de RNA	Rifampicina
Inibição de vias metabólicas	Inibe a via de síntese do ácido fólico	Sulfonamidas
Rompimento de membrana plasmática	Aumentam a permeabilidade da membrana	Polimixinas

1.2.1. Antimicrobianos que inibem a síntese proteica

Os macrolídeos, aminoglicosídeos, tetracilinas, glicilciclina e cloranfenicol produzem efeito antibacteriano inibindo a síntese proteica. Estes agentes antimicrobianos se beneficiam da estrutura do ribossomo procariótico, que é diferente da estrutura do ribossomo eucariótico, tendo assim, a capacidade de inibir seletivamente o crescimento bacteriano. Os aminoglicosídeos, glicilciclina e tetracilinas se ligam na subunidade 30S do ribossomo bacteriano, enquanto que o cloranfenicol e os macrolídeos se ligam na subunidade 50S (11).

Os macrolídeos são moléculas constituídas por um anel macrocíclico de lactona, ao qual se ligam um ou mais açúcares. Pertencem a este grupo azitromicina, claritromicina, eritromicina, espiramicina, miocamicina, roxitromicina. O primeiro macrolídeo a ser descoberto foi a eritromicina, isolada em 1952 a partir do actinomiceto *Streptomyces erythraeus*. Essa classe tem amplo espectro de ação incluindo Gram-positivos, e somente a azitromicina possui atividade contra Gram-negativos (11).

Já os aminoglicosídeos são moléculas compostas de açúcares modificados. A estreptomicina foi o primeiro aminoglicosídeo a ser obtido a partir do fungo *Streptomyces griseus* no ano de 1944 e atualmente as principais drogas utilizadas desta classe são:

estreptomicina, gentamicina, tobramicina, ampicacina, netilmicina, paramomicina e espectinomicina e possuem atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos (12).

A tetraciclina é um antibiótico de amplo espectro produzido pelo gênero *Streptomyces*, indicado para tratamento de diversas infecções bacterianas. Apresentam amplo espectro de ação, incluindo Gram-positivos, Gram-negativos aeróbios e anaeróbios e alguns protozoários (13).

O único representante da classe das glicilciclinas é a tigeciclina. Esta droga é considerada de amplo espectro e apresenta atividade contra cocos Gram-positivos (incluindo estafilococos resistentes à oxacilina e enterococos resistentes à vancomicina), bacilos Gram-negativos (exceto *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*) e a maioria dos anaeróbios de importância clínica. Tem sido bastante utilizada para o tratamento de Enterobactérias multirresistentes (14).

Já o cloranfenicol, que também possui amplo espectro de atividade, é eficaz contra bactérias Gram-negativas, Gram-positivas e riquetsias. A molécula foi inicialmente isolada em 1947 do microrganismo *Streptomyces venezuelae*. Possui contra indicação para o uso em pacientes grávidas e em amamentação, devido a ocorrência da síndrome cinzenta. Esta síndrome resulta da deficiência natural na excreção desse fármaco, uma vez que essa droga deve ser conjugada ao ácido glicurônico e tal processo ainda não está muito bem desenvolvido nos fetos e recém-nascidos (11).

1.2.2. Antimicrobianos que inibem a síntese de ácidos nucleicos

As drogas que agem inibindo a síntese de ácidos nucleicos são as quinolonas e a rifampicina. As quinolonas produzem seu efeito impedindo síntese de DNA, se ligando na DNA girase, que possui papel importante na duplicação do material genético. As quinolonas de primeira geração, como o ácido nalidíxico, foram introduzidas na prática clínica no início dos anos 60. No início dos anos 80, com o acréscimo de um átomo de flúor no anel quinolônico, surgiram as fluoroquinolonas, ou quinolonas de segunda geração, que proporcionaram aumento do espectro de ação para os bacilos Gram-negativos e promoveram uma melhora da atividade contra alguns cocos Gram-positivos. Os dois principais representantes desta classe são a ciprofloxacina e norfloxacina. As quinolonas de terceira geração são a levofloxacina, gatifloxacina e moxifloxacina, e podem ser utilizadas para o tratamento de infecções sistêmicas causadas por Gram-negativos e também agem contra

Gram-positivos. As quinolonas da quarta geração apresentam atividade antimicrobiana potente sobre Gram-negativos aeróbios e Gram-positivos. A este grupo pertencem a trovafloxacin, a clinafloxacin, a sitafloxacin, entretanto não estão disponíveis no Brasil (11).

A rifampicina é um antibiótico que interfere na síntese de RNA, inibindo a atividade da RNA polimerase bacteriana. Esta droga é derivada da rifamicina, que é produzida pela *Amycolatopsis rifamycinica* (anteriormente nomeada *Streptomyces mediterranei*) e é primariamente utilizada para o tratamento de micobactérias, principalmente causadoras de tuberculose pulmonar e extrapulmonar, além de ser indicada para o tratamento da hanseníase (13).

1.2.3. Antimicrobianos que inibem vias metabólicas

Já as sulfonamidas e a trimetoprima agem inibindo vias metabólicas. Ambos os compostos inibem a via de síntese de ácido fólico, que tem papel importante na síntese de DNA. As células humanas conseguem aproveitar o folato consumido na dieta para o metabolismo, enquanto as bactérias dependem da produção endógena. A sulfacrisoidina, pertencente a esta classe, foi o primeiro agente antimicrobiano utilizado clinicamente, em 1935, marcando o início da moderna era da quimioterapia antimicrobiana (11).

As sulfonamidas são drogas de efeito bacteriostático, que inibem competitivamente a conversão de ácido p-aminobezoico em dihidrodropteroato, que é estritamente necessário para a síntese de folato, conseqüentemente interferindo na síntese de purinas e DNAs. As drogas desta classe são sulfadiazine, sulfametizol, sulfasalazine, sendo o sulfametoxazol a mais utilizada no Brasil. Possuem amplo espectro de atividade contra Gram-positivos e Gram-negativos (11).

O sulfametoxazole é comumente empregado em associação com a trimetoprima, uma diamino-pirimidina. O efeito das duas drogas é sinérgico, atuando em etapas diferentes da síntese do ácido tetra-hidrofólico (folínico). O sulfametoxazol inibe um passo intermediário da reação e a trimetoprima a formação do metabólito ativo do ácido tetra-hidrofólico no final do processo (11).

1.2.4. Antimicrobianos que geram o rompimento da membrana celular

O rompimento da membrana celular é o mecanismo de ação utilizado pelas polimixinas. A estrutura desta molécula consiste de um ciclopeptídeo associado a uma cauda hidrofóbica longa. Essas moléculas são produzidas por *Bacillus polymyxa*, atual *Paenibacillus polymyxa*. Estas drogas realizam seu efeito antimicrobiano rompendo a estrutura da membrana celular bacteriana através da interação específica com os fosfolipídios, aumentando a permeabilidade da membrana, causando perda de material citoplasmático. Há duas polimixinas disponíveis comercialmente, colistina (polimixina E) e polimixina B (15).

As polimixinas possuem potente ação sobre várias bactérias Gram-negativas, entretanto seu uso foi praticamente abandonado entre 1970 e 1980, devido a sua alta toxicidade, principalmente causando nefrotoxicidade. Entretanto, com o aparecimento de bactérias Gram-negativas multirresistentes, principalmente em pacientes internados em UTIs, e a ausência de novos antimicrobianos para combater esses patógenos, estas tem sido novamente utilizadas (16).

1.2.5. Antimicrobianos que atuam na síntese da parede celular

Os antimicrobianos que interferem na síntese da parede celular e promovem a lise da célula são da classe dos glicopeptídeos, fosfomicinas e beta-lactâmicos.

Os glicopeptídeos apresentam múltiplos mecanismos de ação. Esses compostos se ligam aos resíduos de D-alanina na cadeia de peptideoglicano da parede celular que está sendo formada, prevenindo a ligação cruzada que é necessária para a síntese estável dessa parede. Além disso, esses compostos podem alterar a permeabilidade da membrana citoplasmática e interferir na síntese de RNA citoplasmático, sendo usados principalmente para o tratamento de infecções causadas por Gram-positivos. Os dois principais representantes da classe dos glicopeptídeos são a vancomicina e a teicoplanina. A vancomicina foi introduzida para o uso clínico em 1958, mas sua utilização em maior escala iniciou-se nos anos 80, com o surgimento de infecções por estafilococos resistentes à oxacilina e redução da toxicidade por purificação das preparações desse antimicrobiano disponíveis. Já a teicoplanina, apesar de ser quimicamente similar à vancomicina, apresenta maior lipossolubilidade resultando em excelente penetração tecidual e meia-vida prolongada, entretanto, essa droga possui pouca penetração na barreira hemato-encefálica (13).

Fosfomicinas, que são derivadas do ácido fosfônico, são conhecidas há pelo menos quatro décadas. Apresentam um mecanismo único de ação, que envolve a inibição da primeira etapa da síntese de peptidoglicano, através da inibição da enzima MurA (UDP-N-acetilglicosamina enolpiruvil transferase), que catalisa o primeiro passo da síntese da parede celular. Essa droga possui um amplo espectro de atividade, contra Gram-negativos e Gram-positivos aeróbios. A fosfomicina trometanol, é uma formulação oral aprovada no Brasil e em diversos países, para o tratamento de infecções do trato urinário. Já na Europa e Japão, a formulação fosfomicina di-sódio está disponível para uso parenteral. Essa droga apresenta baixa toxicidade, atingindo altas concentrações tanto no sangue quanto na urina. Além disso, tem boa penetração nos tecidos, sendo indicada para o tratamento de infecções sistêmicas e graves. Infelizmente, acredita-se que mecanismos de resistência possam surgir nas amostras bacterianas quando essa droga é usada em monoterapia, assim o uso combinado com outras drogas é preferido pelos clínicos (17).

Os beta-lactâmicos agem interferindo nas enzimas que realizam a síntese da camada de peptidoglicano e devido a sua importância, vão ser demonstrados em mais detalhe.

1.2.5.1. Antimicrobianos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos foram os primeiros a serem descritos e são até hoje, mesmo depois de 80 anos da sua descoberta, o maior grupo de antimicrobianos usados na prática clínica. A característica comum deste vasto grupo de antibióticos é a presença do anel beta-lactâmico na estrutura química da molécula. O anel beta-lactâmico é uma amida cíclica, com estrutura heteroatômica, consistindo de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. O primeiro anel beta-lactâmico sintético foi preparado por Hermann Staudinger em 1907, a partir da reação de uma base de Schiff de anilina e benzaldeído com difenilqueteno, em uma reação de cicloadição, que pode ser evidenciada na figura abaixo (18).

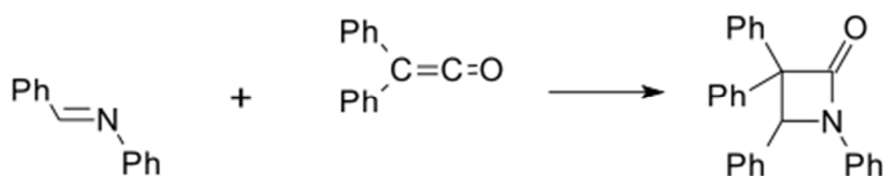


Figura 1.1: Reação de cicloadição que gera anel beta-lactâmico.

Os antimicrobianos desta classe têm ação bactericida inibindo enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana, estrutura que é primordial para manter a forma dos microrganismos em ambientes hipertônicos e hostis, bem como o equilíbrio osmótico. A estrutura rígida da parede celular é resultado da alternância de duas subunidades, o ácido N-acetil murânico e N-acetilglicosamina, sendo que as unidades glicídicas são unidas por transglicosidases. Um pentapeptídeo é ligado a cada unidade de ácido N-acetil murânico e a ligação cruzada de duas D-alanina-D-alanina presentes no pentapeptídeo é catalisada por PBPs, que atuam como transpeptidases. Entretanto, o anel beta-lactâmico é quimicamente similar a D-alanina-D-alanina do pentapeptídeo, e assim as PBPs inserem erroneamente o anel beta-lactâmico no lugar da D-alanina-D-alanina. Desta forma, ocorre a acilação das PBPs, que ficam impossibilitadas de realizar suas funções corretamente, causando a lise celular bacteriana. Uma grande vantagem para o uso dessa classe de drogas é sua baixa toxicidade, pois atuam na parede celular bacteriana, estrutura inexistente em células eucariotas (19).

Todavia, para que o beta-lactâmico seja ativo, deverá se unir a outros radicais (anéis ou cadeias lineares). A associação de diferentes cadeias lineares aos anéis modificam as propriedades do composto, resultando nos quatro tipos de beta-lactâmicos que existem hoje, disponíveis comercialmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química são capazes de modificar as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência as beta-lactamases (Figura 1.2) (20).

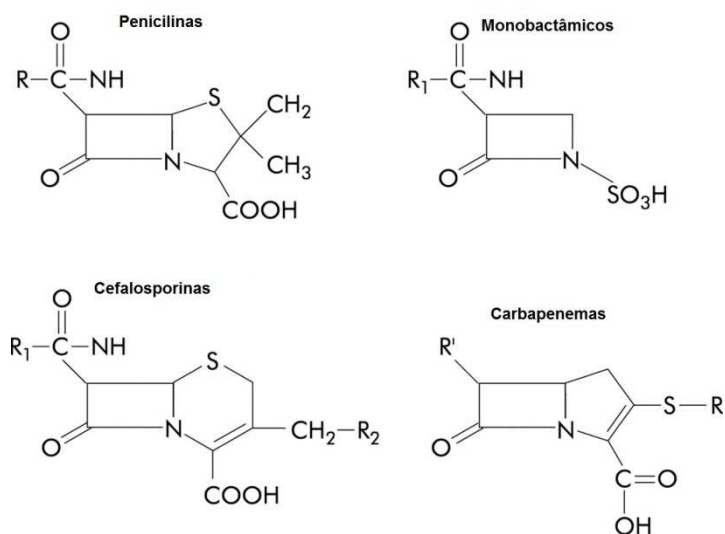


Figura 1.2: Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos existentes.

A penicilina foi o primeiro beta-lactâmico descoberto. Alexander Fleming, em 1928, observou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* era impedido na presença do fungo *Penicillium notatum* e em 1930, Cecil George Pain, um aluno de Fleming, utilizou pela primeira vez filtrados da cultura do fungo *Penicillium* como tratamento para pacientes com diversas lesões cutâneas. Contudo, somente em 1940, Ernst Chain conseguiu obter um extrato estável da penicilina. Hoje, devido a várias modificações na estrutura, existem diversos tipos de penicilina, que possuem espectros de ação um pouco variável, como: penicilina ácida, penicilina G ou benzopenicilina, penicilina G benzatina, penicilina N, penicilina O, penicilina V. A primeira penicilina semissintética a ser comercializada foi a ampicilina, que apresentava melhor absorção oral que sua precursora. Nos dias atuais, as penicilinas não são indicadas para tratamento de infecções de cepas com elevado nível de resistência, pelo fato das penicilinas exibirem um restrito espectro de ação e serem hidrolisadas pela maioria das beta-lactamases conhecidas. Mas, as penicilinas ainda são usadas para o tratamento de cepas sensíveis de *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e alguns Gram-negativos, como *Treponema pallidum*, *Neisseria gonorrhoeae* e alguns fungos. Existem relatos na literatura de fenômenos de hipersensibilidade devido à exposição a esta droga em 10% da população (20, 21).

Outra classe importante é a das cefalosporinas. Essa classe foi descoberta por Giuseppe Brotzu, em 1948, quando estudava a microbiota presente em esgoto, com o intuito de descobrir a ocorrência de beta-lactâmicos naturais. Um dos organismos isolados foi o fungo *Cephalosporium*, que apresentava atividade inibitória contra diversas espécies bacterianas, incluindo *Salmonella typhi*, causadora da febre tifóide. O composto ativo foi isolado e deu origem aos primeiros antibióticos dessa classe: Cefalosporina N (ativa contra Gram-negativos) e Cefalosporina P (ativa contra Gram-positivas). Essas drogas foram introduzidas na prática clínica em 1960 e atualmente estão disponíveis mais de vinte compostos. Suas características químicas são semelhantes as da penicilina, porém são mais estáveis em relação ao pH e a mudanças de temperatura. Algumas reações alérgicas podem surgir similarmente às que ocorrem devido ao uso da penicilina, entretanto com frequência mais baixa (1-3%). Essas drogas apresentam boa distribuição na maioria dos fluidos corporais e tecidos, como rins, pulmões, articulações, ossos e bile, entretanto alguns representantes desta classe não possuem boa penetração no líquido espinhal (21).

As cefalosporinas de primeira geração, como cefalotina, cefazolina e cefalexina são efetivas contra cocos Gram-positivos aeróbicos e também contra diversos Gram-negativos,

entretanto, são susceptíveis à ação da maioria das beta-lactamases e não são efetivas contra anaeróbios. São mais utilizadas para o tratamento de infecções de pele causadas por *Staphylococcus* sensível (21).

As de segunda geração, como cefuroxima, cefotetam e cefoxitina possuem como característica uma estrutura química um pouco mais estável. Estes compostos são menos efetivos contra organismos Gram-positivos e apesar de serem mais efetivos contra Gram-negativos, são ineficazes contra alguns Gram-negativos não fermentadores de glicose, como *Acinetobacter* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* e também anaeróbios estritos. Apesar de maior resistência a ação das beta-lactamases, estes antimicrobianos tem baixa penetração através da barreira hemato-encefálica. Assim, essas drogas são mais utilizadas para o tratamento de faringites, otite média e infecções urinárias (21).

As cefalosporinas de terceira geração, como cefpodoxima, cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, são as mais ativas contra Gram-negativos aeróbios, como *Proteus vulgaris*, *Enterobacter* sp. e possuem alta resistência a ação das beta-lactamases, entretanto essas drogas possuem moderada atividade contra Gram-positivos. Cefazidima é a única cefalosporina de terceira geração ativa contra *P. aeruginosa*. Algumas das cefalosporinas de terceira geração podem ser usadas para o tratamento de meningites, pois tem a capacidade de atravessar a barreira hemato-encefálica, além de usadas rotineiramente no tratamento de pneumonia, enterite, endocardite e cistite (21).

Em relação às cefalosporinas de quarta geração, a única aprovada para uso humano tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos é cefepime, que é efetiva contra Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo *P. aeruginosa* (21).

A classe dos carbapenemas foi primeiramente descrita através da análise do caldo de fermentação de um fungo, o actinomiceto *Streptomyces cattleya*, no ano de 1976, quando se observou a produção de um composto denominado “*Thienamycin*”, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (22). Hoje, existem três carbapenemas liberados para uso no Brasil: imipenem, meropenem e ertapenem. Os beta-lactâmicos dessa classe são os de maior espectro de ação, sendo indicados para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos, Gram-positivos, anaeróbicos, organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC, embora não possuem atividade contra *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus* resistente à metilina e *Stenotrophomonas maltophilia* (21, 22).

O imipenem, o primeiro da classe a ser sintetizado, é suscetível à degradação enzimática através da dehidropeptidase -1 (DHP-1), encontrada nos túbulos renais. Assim, na administração dessa droga é necessária a coadministração de inibidores da enzima. Já os outros representantes da classe não necessitam desta associação. Comparado com imipenem e meropenem, o ertapenem possui menor espectro de atividade, pois não é ativo contra *P. aeruginosa* e *Enterococcus* spp. (23).

Os carbapenemas podem ser utilizados para o tratamento de infecções graves, como infecções intra-abdominais complicadas, infecções de pele, pneumonias, infecções do trato urinário complicadas, meningites e neutropenia febril (23).

A classe dos monobactâmicos foi inicialmente descrita com a observação da produção de beta-lactâmicos monocíclicos por cepas de *Chromobacterium violaceum*, *Acetobacter* sp., e *Agrobacterium radiobacter* em 1981. Hoje, o principal membro dessa classe é o aztreonam. Essa classe é relativamente inativa contra Gram-positivos e bactérias anaeróbicas, mas é eficaz contra Gram-negativos aeróbios, mesmo em baixas concentrações. Além disso, essa classe é resistente a hidrólise mediada por várias beta-lactamases e mostra certo grau de estabilidade contra beta-lactamases originárias de plasmídios. Contra beta-lactamases cromossomais, o aztreonam pode agir tanto como inibidor ou como substrato fraco (21,24).

1.3. Resistência aos antimicrobianos

Apesar do entusiasmo inicial dos cientistas pelo descobrimento e utilização de antimicrobianos na prática clínica, isto não durou muito, pois rapidamente as bactérias demonstraram variadas formas de resistência. Com o aumento do uso de agentes antimicrobianos, observa-se também elevação do nível de complexidade e o número de mecanismos de resistência apresentados pelos patógenos, tornando cada dia mais difícil o tratamento das infecções de patógenos multirresistentes.

Existe uma série de razões pelas quais a resistência bacteriana se torna uma grande preocupação para a comunidade científica e um problema de saúde pública. Em primeiro lugar, as bactérias que se apresentam usualmente multirresistentes, como é o caso dos *Staphylococcus* spp., *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae* e *P.aeruginosa* estão se tornando habitantes comuns em instituições de saúde. Em segundo lugar, aponta-se o uso de terapias antibacterianas empíricas, através da utilização inicial de um agente antibacteriano cujo agente etiológico é resistente. Este fenômeno tem sido associado ao aumento das taxas de

mortalidade em pacientes com infecções da corrente sanguínea causadas por diversos microrganismos, como *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter* spp., *Staphylococcus* coagulase-negativo e *Enterococcus* spp. (9).

A resistência bacteriana resulta na falha do tratamento, que pode ter consequências graves, especialmente em pacientes criticamente enfermos (9).

Em terceiro lugar, bactérias resistentes também têm o poder de dispersão, tornando mais difícil o controle de infecções, não só dentro das instituições de saúde, mas também na comunidade e no ambiente. Isolados bacterianos clinicamente importantes, como *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) e Enterobactérias produtoras de ESBL estão cada vez mais sendo observadas na comunidade (9).

Pesquisando a presença de bactérias resistentes em efluente de esgoto hospitalar no Rio de Janeiro, Chagas e colaboradores encontraram diferentes espécies produtoras de ESBLs, e também um fato inédito até o momento, a presença de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) (25). A propagação de bactérias resistentes na comunidade acarreta problemas para o controle das infecções, não apenas em instalações de saúde como hospitais e ambulatórios, mas também em locais com aglomerados humanos. O controle da propagação desses patógenos também é complicado devido ao atual aumento da mobilidade da nossa população (26).

Finalmente, podemos observar que a presença de bactérias apresentando diversos mecanismos de resistência acarreta numa elevação dos custos gerados com o tratamento dos indivíduos, visto que o tempo de internação e a duração do tratamento são aumentados, além de se gerar maiores gastos com os agentes antimicrobianos utilizados (26).

Considerando a resistência aos antimicrobianos, as bactérias podem apresentar resistência às drogas antimicrobianas devido a: [1] Resistência intrínseca a uma ou mais classe de antimicrobianos, onde todas as cepas da mesma espécie vão apresentar resistência a todos os representantes de uma determinada classe de antimicrobianos; [2] Resistência adquirida, onde populações inicialmente susceptíveis de bactérias se tornam resistentes a um agente antibacteriano e podem proliferar e se espalhar sob a pressão seletiva do uso desse agente. Em síntese, as populações normalmente suscetíveis de bactérias podem se tornar resistentes aos agentes antimicrobianos através de mutação e seleção, ou pela aquisição de genes de resistência (26).

As mutações espontâneas podem causar resistência por: [1] alterar a proteína-alvo ao qual o agente antibacteriano se liga através da modificação ou eliminação do sítio ativo da proteína (por exemplo, mudança na proteína de ligação à penicilina 2b em pneumococos, o que resulta na resistência à penicilina), [2] aumentar a produção de enzimas que inativam o agente antimicrobiano (por exemplo, eritromicina metilase ribossomal em estafilococos), [3] diminuir a expressão ou alterar um canal de proteína de membrana externa que a droga exige para a entrada de células (por exemplo, OmpF em Enterobactérias), ou [4] aumentar a expressão de bombas que expõem a droga da célula (efluxo de fluoroquinolonas em *Staphylococcus* sp.). Em todos esses casos, cepas de bactérias portadoras de mutações conferindo resistência podem ser selecionadas devido ao uso dos antimicrobianos, que matam cepas sensíveis, mas permitem a sobrevivência e multiplicação de cepas resistentes (9).

A aquisição de material genético oriundo de organismos resistentes, tanto da mesma espécie quanto de espécies diferentes, acontece pelos principais mecanismos de intercâmbio genético, a transdução, conjugação e transformação. Os genes de resistência podem possuir localização cromossomal ou plasmidial. Nos genes localizados no cromossomo, a transmissão desses genes poderá ocorrer tanto de forma vertical (de célula-mãe para células-filhas) e por transposons (que são fragmentos de DNA com a função de transferência de material genético entre partes distintas do cromossomo e entre cromossomo e plasmídios). Já nos genes plasmidiais, a transmissão pode ocorrer de forma vertical e por conjugação (9).

Assim, fenômenos de mutação e seleção, além dos mecanismos de intercâmbio genético, favorecem que muitas espécies bacterianas se adaptem rapidamente à introdução de novos agentes antibacterianos em seu ambiente. Algumas vezes, até uma única mutação pode ser suficiente para conferir alto nível de resistência às diferentes drogas. (9).

1.4. Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais utilizados na rotina terapêutica devido a sua baixa toxicidade para mamíferos, entretanto os patógenos apresentam diversos mecanismos de resistência a esta classe de drogas.

Existem quatro principais mecanismos pelos quais as bactérias podem se tornar resistentes aos beta-lactâmicos: mudança no sítio ativo das PBPs; diminuição da expressão de porinas (OMPs); aumento da expressão bombas de efluxo e; produção de enzimas beta-lactamases (19).

1.4.1. Mudança no sítio ativo das PBPs

As PBPs são enzimas com funções de transpeptidases e carboxipeptidases. A região com função de transpeptidase dessa molécula possui um aminoácido serina (Ser37) na posição central e é responsável pela ligação cruzada do peptidoglicano, sendo também o sítio ativo da enzima. Assim, mudanças no sítio ativo da PBPs podem gerar a diminuição da afinidade destas moléculas aos beta-lactâmicos e conseqüentemente aumentar a resistência a esses agentes (19).

Devido ao uso da penicilina para o tratamento de diversas infecções por mais de cinco décadas, foi observada a emergência e dispersão de diferentes espécies possuindo PBPs mutantes pelo mundo como *Streptococcus* spp., *Streptococcus pneumoniae*, *S. aureus* e *Neisseria* spp.(19).

1.4.2. Diminuição da expressão de porinas (OMPs)

Porinas são proteínas de grande peso molecular (variando de 28 a 48kDa) encontradas tipicamente em membranas externas da grande maioria das bactérias Gram negativas. Como as membranas celulares têm caráter lipossolúvel, a entrada de moléculas hidrofílicas na célula bacteriana é mediada por estas moléculas, que formam canais transmembranares, cujas dimensões determinam o tamanho das moléculas que poderão entrar na célula (19).

Para ter acesso as PBPs que se situam na membrana plasmática interna dos Gram-negativos, os agentes beta-lactâmicos transpassam a membrana externa através das porinas situadas nesta membrana. Assim, devido à diminuição da expressão destas proteínas, muitas vezes é observada a resistência a antimicrobianos desta classe. Alguns estudos demonstram que cepas da família *Enterobacteriaceae* como *Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* e *E.coli* podem demonstrar resistência aos carbapenemas devido a perda de OMPs. Também foi observada que a resistência ao imipenem e a susceptibilidade diminuída ao meropenem foram causadas pela perda de OprD em *P.aeruginosa*. Resistência ao imipenem e meropenem também foi associada à perda da porina CarO em cepas clínicas de *A. baumannii* (19).

É preciso ressaltar que na maioria das bactérias, somente a diminuição ou deleção de porinas não é suficiente para a produção de fenótipo resistente, que é geralmente encontrado em cepas que apresentem também expressão de beta-lactamases (19).

1.4.3. Aumento da expressão de bombas de efluxo

Bombas de efluxo são compostas por proteínas de transporte envolvidas na extrusão de substratos tóxicos do interior das células para o ambiente externo, incluindo o transporte de antibióticos. Estas proteínas são encontradas tanto em Gram-positivos e Gram-negativos, bem como em organismos eucarióticos. Estas bombas podem ser específicas para um substrato ou podem transportar uma gama de compostos estruturalmente distintos. Nos procariotos, existem cinco grandes famílias de transportadores de efluxo: MF (facilitador maior), MATE (efluxo de multidrogas e moléculas tóxicas), RND (resistência, nodulação e divisão), SMR (pequena multirresistência) e ABC (cassete ligação a ATP). Todos esses sistemas utilizam a força motriz de prótons como fonte de energia, exceto as proteínas da família ABC que utilizam a hidrólise do ATP para efetuar a exportação de substratos (19).

Em *P.aeruginosa*, o aumento da expressão do sistema de bombas de efluxo MexA-MExB-OprD em combinação com a baixa permeabilidade de membrana externa pode resultar em redução da susceptibilidade a penicilinas e cefalosporinas, mas também a antimicrobianos de outras classes como quinolonas, tetraciclina e cloranfenicol. Em outros patógenos, como *Campylobacter jejuni*, o sistema de efluxo de importância é CmeABC, em cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* as proteínas AcrAB-Tolc, AcrEF-Tolc e EmrB têm sido apontadas com as de maior relevância. Em patógenos Gram-positivos como *S. pneumoniae* e *S. aureus*, as bombas de efluxo de maior importância são PmrA e NorA respectivamente (19).

1.4.4. Beta-lactamases

A produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. A primeira beta-lactamase a ser descrita foi identificada em uma cepa de *E. coli* antes mesmo da difusão em larga escala do uso da penicilina para a prática médica (27). As beta-lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram positivas e negativas e em patógenos Gram-negativos, a sua produção representa o maior fator de resistência a beta-lactâmicos (28).

O mecanismo de ação dessas enzimas é através da hidrólise do anel beta-lactâmico presente no núcleo estrutural das penicilinas, o ácido 6-aminopenicilâmico. Esta hidrólise provoca a conversão deste ácido em ácido penicilóico, que é desprovido de atividade antimicrobiana. Conseqüentemente a quebra deste anel nas diversas penicilinas forma derivados do ácido penicilóico, igualmente inativos (Figura 1.3) (28, 29).

Mecanismo de ação das beta-lactamases

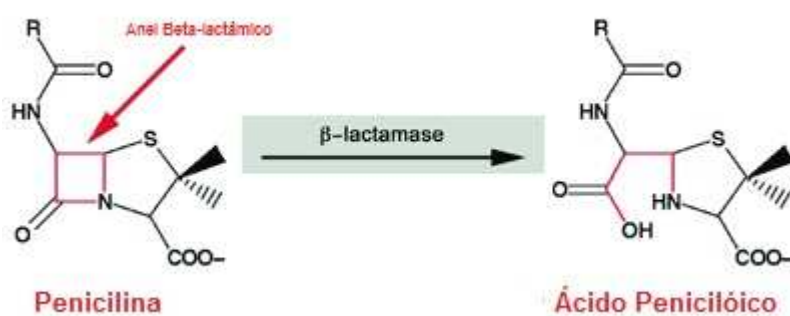


Figura 1.3: Esquema representando o mecanismo de ação das beta-lactamases.

Devido ao extenso uso da penicilina na prática médica, observa-se a emergência de resistência em diferentes patógenos. Em Gram-positivos nos anos 40, notou-se a produção de penicilinases em cepas de *S. aureus* (30), enquanto que a primeira beta-lactamase encontrada em Gram-negativos foi a TEM-1, descrita no início da década de 1960 (31). Apesar disso, acredita-se que beta-lactamases, como AmpC cefalosporinas cromossomais, já estavam presentes nas Enterobactérias muito antes do início da era antibiótica. Essas enzimas, provavelmente, teriam funções fisiológicas na montagem da cadeia do peptidoglicano ou poderiam estar envolvidas na defesa das bactérias contra beta-lactâmicos produzidos por bactérias ambientais e fungos. Mas, atualmente sabe-se que o uso de beta-lactâmicos é o maior fator de seleção influenciando a produção de beta-lactamases por patógenos (31).

As beta-lactamases, desde a sua descoberta já foram classificadas de diferentes formas, incluindo seu espectro hidrolítico, susceptibilidade a inibidores e sua localização genética. A classificação fenotípica apresenta alguns problemas, visto que uma mutação pontual pode alterar substancialmente a especificidade da droga pelo substrato e o poder de ação dos inibidores, assim podendo mudar o grupo no qual a enzima é classificada. Desta forma, a classificação por meio da sequência aminoacídica, proposta inicialmente por Ambler em 1980 se mostrou mais estável, refletindo as relações fundamentais entre as moléculas, que não podem ser modificadas por mutações (32).

Entretanto, apesar da sequência de aminoácidos ter se apresentado como uma forma atrativa para a classificação das beta-lactamases, na prática clínica tal abordagem não é vantajosa. O problema ocorre pois ainda não é possível somente com ferramentas de biologia molecular prever a função enzimática e conseqüentemente o perfil de susceptibilidade do organismo que carrega a beta-lactamase, além do fato de que para os clínicos é mais

importante saber se aquele organismo estudado é susceptível ou resistente a uma droga do que a sequência de aminoácidos da beta-lactamase carregada pela bactéria. Assim, a classificação de Bush, Jacob e Medeiros, proposta em 1995, combinando a estrutura com características funcionais é a classificação mais aceita, tendo por base as propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos (32).

Tabela 1.2: Classificação das beta-lactamases segundo Bush, 2011 (32).

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P.aeruginosa</i> e <i>E.coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2a	A	PC1 e outras penicilinas de <i>Staphylococcus</i> spp.	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26,	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Cefalosporinas inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

As beta-lactamases podem possuir localização cromossomal ou plasmidial. As beta-lactamases cromossomais são encontradas em menor número, e algumas espécies as produzem tanto de maneira constitutiva quanto de modo induzível. Cepas de *K. pneumoniae* produzem constitutivamente enzimas da classe A, enquanto que algumas Enterobactérias como *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii* possuem enzimas da classe C induzíveis (33, 34).

Atualmente, mais de 150 enzimas são classificadas como mediadas por plasmídios. Em geral, as enzimas de origem plasmidial são distintas daquelas oriundas de cromossomo, entretanto existem algumas exceções. Por exemplo, a SHV-1 que é tipicamente uma enzima plasmídica, é cromossomal em amostras de *K. pneumoniae*. As enzimas BIL-1, CMY-1, CMY-2, CMY-3, FOX-1 são consideradas enzimas plasmidiais, mas em cepas de *Enterobacter* spp. e *Citrobacter* spp. tem localização cromossômica. Várias dessas enzimas estão associadas à transposons, que facilitam a disseminação entre diferentes plasmídios e organismos (19,32).

Assim, ao longo dos últimos 30 anos, novos beta-lactâmicos têm sido desenvolvidos com o intuito de serem resistentes à ação hidrolítica das beta-lactamases. No entanto, a cada nova classe que tem sido usada para tratamento dos pacientes, novas beta-lactamases emergem e provocam resistência às novas classes de fármacos. Esses fenômenos de resistência ocorrem principalmente devido à pressão seletiva do uso e o abuso da utilização dos novos antibióticos. Uma dessas novas classes de drogas desenvolvidas foi a classe das cefalosporinas de amplo espectro de ação (terceira geração), que se tornou amplamente utilizada para o tratamento de infecções graves geradas por bactérias Gram-negativas na década de 1980 (31).

1.4.5. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

β -lactamases de espectro estendido são definidas como enzimas das classes A ou D (classificação de Ambler), ou das classes 2be ou 2d (classificação de Bush, Jacoby e Medeiros) capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de terceira geração (oximino-cefalosporinas) e monobactâmicos (31, 32).

O primeiro relato sobre a produção dessas beta-lactamases de amplo espectro ocorreu em 1983, onde uma cepa de *K. ozaenae* isolada na Alemanha possuía um gene codificador de ESBL, encontrado em um plasmídio. Este gene, quando comparado a sequência da enzima SHV-1, possuía uma única mutação que foi capaz de aumentar consideravelmente seu espectro de ação, passando a ter a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração. Esta enzima foi denominada SHV-2 (35).

Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas TEM ou SHV (31, 36). As ESBLs mais frequentemente encontradas são

do tipo TEM, SHV e CTX-M, entretanto as do tipo OXA, PER, VEB, BES, CMY e GES também tem sido bastante reportadas (37).

A beta lactamase TEM-1 é a enzima mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas. TEM-1 foi primeiramente descrita em uma cepa de *Escherichia coli* em 1965, em Atenas, na Grécia, oriunda de uma paciente chamada Temoneira (por isso a designação TEM). Essa enzima é capaz de hidrolisar ampicilina, carbenicilina, oxacilina e cefalotina, mas é ineficiente contra cefalosporinas de amplo espectro. Seu primeiro derivado foi a enzima TEM-2, que difere da TEM-1 por alteração em um aminoácido e uma mudança no ponto isoelétrico (5,6 comparado com 5,4). TEM-12 foi a primeira ESBL dessa classe descrita. Esta enzima foi isolada de uma *K. oxytoca*, apresentando um perfil de resistência a ceftazidima em Liverpool, na Inglaterra em 1982. As enzimas TEM-1, TEM-2 e TEM-13, por não apresentarem fenótipo de resistência às cefalosporinas de terceira geração, não são consideradas ESBLs (37).

As enzimas do tipo SHV são mais comumente encontradas em cepas de *K. pneumoniae*, onde o gene *bla_{SHV-1}* se encontra no cromossomo. A denominação dessa enzima se refere a “Sulfidril variável”. A produção de SHV-1 está relacionada com a resistência a ampicilina, ticarciclina e piperacilina. A alteração que ocorre na enzima SHV-1 que promove o fenótipo de ESBL é a substituição de uma glicina por serina na posição 238 e também pela substituição de lisina por glutamato na posição 240. A maioria das beta-lactamases SHV tem fenótipo ESBL, com exceção da SHV-4, SHV-10 e SHV-11 (38, 39).

A primeira beta-lactamase do tipo CTX-M foi isolada na Alemanha em 1989 e desde então se encontra altamente disseminada em todos os continentes. Ela tem sido isolada frequentemente de *Salmonella* spp., *E. coli*, *Klebsiella* spp. e outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Essa classe de beta-lactamases hidrolisa preferencialmente cefotaxima, bem como as outras cefalosporinas. Sua estrutura molecular não é muito relacionada às outras duas ESBLs, SHV e TEM. Os grupos de enzimas CTX-M mais prevalentes são CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8, sendo a variante CTX-M-15 a mais descrita. As CTX-M beta-lactamases são melhor inibidas pelo tazobactam, do que sulbactam e ácido clavulânico (30, 40, 41).

A detecção de enzimas do tipo ESBL tem sido observada com mais frequência em microrganismos do gênero *Klebsiella*, principalmente na espécie *K. pneumoniae*; além de outros representantes da família *Enterobacteriaceae*, tais como *E. coli* e, com menor

frequência *P. mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Salmonella* spp. (42).

Uma percentagem de 14 a 16% de cepas de *Klebsiella* de origem clínica tem sido relatada como produtora de ESBL na França e na Inglaterra. Na Espanha, observou-se a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBLs de 12,9%, enquanto que esse valor chegou a 26,8% no Reino Unido (43). Um estudo incluindo 36 hospitais brasileiros revelou que 48% das amostras de *K. pneumoniae* isoladas eram produtoras de ESBL (44). No Hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2000, 46,4% das amostras de *K. pneumoniae* isoladas foram produtoras de ESBL (45).

Os principais problemas de resistência a antimicrobianos na América Latina, principalmente no Brasil, são entre outros, os bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs. As taxas de Enterobactérias produtoras de ESBLs, especialmente *K. pneumoniae* e *E. coli*, estão entre as mais altas do mundo. Além da resistência as cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e monobactâmicos, estas amostras também têm mostrado altos níveis de resistência à outros antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, se tornando cepas multirresistentes aos antimicrobianos utilizados normalmente na clínica (44).

1.4.6. Carbapenemases

Com o aumento da frequência de isolamento de amostras produtoras de ESBL, os carbapenemas passaram a ser altamente prescritos pelos clínicos como alternativa para tratamento, pois são estáveis a estas enzimas. Com o aumento da utilização destas drogas começaram a surgir amostras apresentando fenômenos de resistência as mesmas. Essa resistência pode ser mediada por diferentes mecanismos, sendo a produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre carbapenemas) o mecanismo mais importante (46).

Estas carbapenemases podem ser classificadas tanto como metalo-carbapenemases ou serino-carbapenemases. As metalo-carbapenemases mais comumente encontradas são IMP e VIM, encontradas principalmente em países Europeus e nos EUA; a SPM, encontrada principalmente em cepas de *P.aeruginosa* isoladas no Brasil (46); e mais recentemente a NDM, encontrada em cepas de *K. pneumoniae* oriundas principalmente da Índia, Paquistão, Reino Unido e EUA (47). Já as serino-carbapenemases do tipo NMC, IMI, SME e GES têm

sido descritas na Europa e na Argentina. Entretanto, a serino-carbapenemase mais comumente associada a bastonetes Gram-negativos da família Enterobacteriaceae, principalmente *K.pneumoniae*, é a *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC) (46).

1.4.6.1. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

Esta carbapenamase tem a capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos de todas as classes, apresentando maior potencial de hidrólise para nitrocefina, cefalotina, benzipenicilina, ampicilina e piperacilina. Possui identidade aminoacídica de 45% em relação a enzimas da classe SME, além de possuir os resíduos C69 e C238 que formam uma ponte bissulfeto, descritas em enzimas SME e NMC (48). São enzimas da classe funcional 2f e da classe molecular A da classificação de Bush, Jacob e Medeiros (32).

Até o momento, já foram descritas onze variantes alélicas de KPC, sendo a KPC-2 a mais disseminada no mundo (49). Além disso, essa carbapenemase tem sido descrita associada a elementos genéticos móveis, como plasmídios e transposons.

1.4.6.1.1. Plataformas genéticas associadas ao gene *bla*_{KPC}

1.4.6.1.1.1. Plasmídios

Plasmídios são fragmentos de DNA bacteriano extracromossomal, com capacidade de autoreplicação. Estes elementos estão presentes em quase todas as espécies bacterianas e possuem tamanho variando de algumas poucas centenas de pares de bases a centenas de quilobases. Estes elementos, que possuem a capacidade de serem transferidos de uma bactéria para outra, muitas vezes entre espécies diferentes através de fenômenos de conjugação, tem contribuído para a aquisição de genes, aumentando a diversidade genética bacteriana e disseminando importantes genes de resistência (50, 51).

Na literatura tem sido reportada a utilização de um esquema de classificação de plasmídios, baseado nos grupos de Incompatibilidade (Inc). Plasmídios que possuem a mesma origem de replicação são considerados incompatíveis, enquanto que plasmídios possuindo diferentes origens de replicação são compatíveis entre si. Assim, a mesma bactéria pode possuir plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade, entretanto geralmente não possui dois plasmídios que pertencem ao mesmo grupo. Em Enterobactérias, já foram descritos 18 grupos de incompatibilidade baseados nas regiões que controlam a replicação desses plasmídios, que são diferentes para cada uma das classes: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1,

L/M, N, P, W, T, A/C,K, B/O, X, Y, F, e FIIA. Esta metodologia tem sido uma importante ferramenta para rastrear plasmídios que carregam determinantes de resistência importantes, como o caso do gene *bla_{KPC}* (52).

O gene *bla_{KPC}* tem sido associado a plasmídios de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade. No estudo de Cuzon e colaboradores, com cepas produtoras de KPC-2 oriundas dos EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia, observou-se que os plasmídios que continham o gene *bla_{KPC-2}* eram de três grupos plasmidiais: IncFII (80kb), IncN(70 e 80 kb) e IncL/M (12, 35 e 75kb) (53). Num estudo com cepas brasileiras publicado em 2011, observou-se o gene *bla_{KPC-2}* associado a diferentes grupos de incompatibilidade, sendo IncFII (130kb), IncN(40kb) e IncL/M(50 a 60kb), além da presença desse gene em dois plasmídios não tipáveis de 20 e 50kb (54). Em estudo com cepas portuguesas, oriundas de hospital universitário de Lisboa, observou-se a que a transmissão do gene *bla_{KPC-3}* entre amostras da família Enterobacteriaceae estava associada a plasmídios do grupo IncF em 90.5% das amostras (55). Cepas de Israel, tem sido reportadas possuindo gene *bla_{KPC-3}*, inseridos em plasmídios do grupo IncFII de aproximadamente 130kb (56).

1.4.6.1.1.2. Tn4401

Inseridos em plasmídios, usualmente encontram-se elementos genéticos como transposons e sequencias de inserção associadas a genes de resistência. Acredita-se que transposons desempenhem papel importante na disseminação de genes de resistência, visto que eles promovem a movimentação desses determinantes genéticos de resistência entre diferentes moléculas de DNA (diferentes plasmídios ou entre cromossomo e plasmídios) (57).

A disseminação do gene *bla_{KPC}* também tem sido associada na literatura principalmente a um elemento genético móvel: o transposon Tn4401. Esse transposon de aproximadamente 10 kb, que é da família dos transposons Tn3, é composto por uma transposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), o gene *bla_{KPC}*, duas sequencias de inserção, *ISKpn7* e *ISKpn6*, além das sequencias invertidas repetidas de 39 pb que flanqueiam o transposon. Já foram documentadas algumas isoformas desse elemento genético, que são caracterizadas por variações na região da sequencia de inserção *ISKpn7* (57) (Figura 1.4).

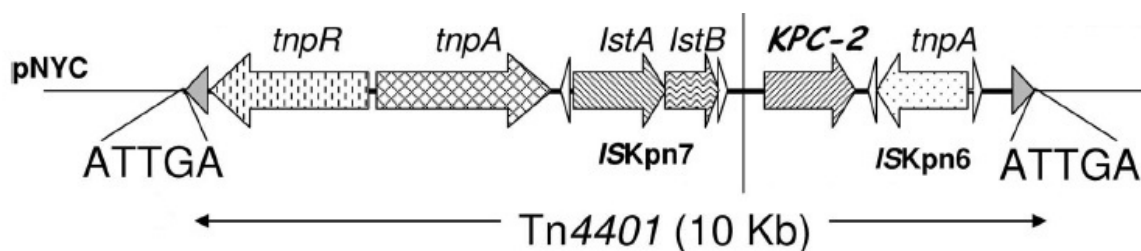


Figura 1.4: Esquema representativo do Transposon Tn4401, elemento genético que tem sido associado ao gene *bla*_{KPC-2}, segundo Naas e colaboradores (57).

Estudo realizado por Cuzon e colaboradores, com 16 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas em 6 países (EUA, Grécia, Suécia, Colômbia, Brasil e Israel) observou-se que em todas as amostras, o gene *bla*_{KPC-2} estava associado a uma das três isoformas do transposon Tn4401 (“a”, “b” ou “c”). Contudo, essas amostras pertenciam a diferentes clones e este transposon encontrava-se inserido em plasmídios de diferentes tamanhos, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade (53). Assim, a presença de diferentes clones carregando diferentes plasmídios contendo a mesma estrutura genética (Tn4401) sugere que este transposon seja a origem da disseminação mundial do gene *bla*_{KPC-2} (57).

Entretanto, algumas outras plataformas genéticas já foram descritas. Em *K. pneumoniae* oriundos da China, o gene *bla*_{KPC} foi encontrado em uma plataforma genética híbrida, ou seja, contendo partes do transposon Tn4401, partes dos transposons Tn3 e Tn1721 (58). Em amostras de *P. aeruginosa* produtoras de KPC-5 de Porto Rico, este gene tem sido associado ao transposon Tn5563. Esta mesma plataforma genética que já havia sido descrita no plasmídio pRA2 em uma cepa de *Pseudomonas alcaligenes* (59).

Além da capacidade de disseminação do gene *bla*_{KPC} associado a transposons tem sido observada a emergência e a disseminação de clones internacionais de *K. pneumoniae* produtores de KPC (53). Estes achados podem representar tanto uma cepa que se disseminou com sucesso por várias regiões do mundo como uma cepa que possui maior facilidade de adquirir e manter este mecanismo de resistência.

1.4.6.1.2. Ocorrência mundial

A primeira descrição da carbapenemase KPC ocorreu durante o projeto de vigilância ICARE, na Carolina do Norte, Estados Unidos. Uma amostra de *K. pneumoniae* de 1996 apresentava resistência a todos os beta-lactâmicos testados e apresentava elevada

concentração mínima inibitória (CIM) para os carbapenemas. Esta resistência foi associada à produção de KPC-1 que se encontrava num plasmídeo de alto peso molecular (60).

Entretanto, a descoberta da KPC-1 foi seguida por diversos relatos de uma variante em apenas um aminoácido, KPC-2, ao longo da costa leste americana. KPC-2 foi inicialmente identificada em 2003, oriunda de quatro cepas do período de 1998-1999 apresentando elevada CIM para carbapenemas (61). Depois, esta carbapenemase foi reportada em Maryland e também em Nova York, no ano de 2004 (62). Mais uma variante dessa enzima, KPC-3, começou a ser detectada entre cepas de 2000 e 2001 causadoras de surto ocorrido em Nova York. As análises cinéticas dessa enzima demonstraram um perfil de hidrólise similar a KPC-2, entretanto um pouco maior em relação à ceftazidima (63).

Após uma análise detalhada da sequência das KPCs descritas até aquele momento, observaram que ocorreu um erro durante a publicação da KPC-1. Dessa forma, concluiu-se que a sequência da KPC-1 era igual a da KPC-2, sendo assim a nomenclatura KPC-2 passou a ser utilizada (36).

Atualmente nos Estados Unidos, esta carbapenemase está bem distribuída e é considerada endêmica no estado de Nova York. Em um estudo sobre a prevalência de *bla*_{KPC} entre cepas da família Enterobacteriaceae, os Estados Unidos apresentaram um percentual de 0,5% (64). Realidade distinta da que ocorre num bairro da cidade de Nova York, Brooklyn, onde esse percentual foi de 38% (65). Neste país, a susceptibilidade de *K. pneumoniae* a carbapenemas decresceu de 97% para 76% dentro de um período de 5 anos, provavelmente devido a produção de KPC (66). Em um estudo mais amplo, publicado por Kitchel e colaboradores, foram estudadas amostras de *K. pneumoniae* produtores de KPC oriundos de 16 estados americanos que haviam sido enviados para o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) no período de 1996 a 2008. Dessas, 70% foram caracterizadas como pertencentes ao clone ST 258 (identificado por MLST), que possui grande importância epidemiológica no mundo (67).

Este clone tem sido descrito em vários estados americanos (67), Israel (56), Noruega, Suécia (68), Polônia (69), Finlândia (70) e Itália (71). Na maioria das vezes associado à produção da enzima KPC-2, mas já existem relatos de amostras deste clone produtoras de KPC-3, principalmente nos EUA (67) e Israel (56).

Atualmente, a produção de KPC já foi relatada em diversos países. O primeiro relato fora dos Estados Unidos ocorreu na França. A variante KPC-2 foi encontrada em uma cepa de *K.pneumoniae* isolada de um paciente que havia estado em Nova York para tratamento médico (72).

Na Europa, apesar da inicial detecção desse mecanismo nos países do leste, hoje em dia, essa carbapenemase já está estabelecida nesse continente, principalmente em cepas de *K. pneumoniae*. Essa carbapenemase já foi descrita em diferentes países europeus, como Alemanha, Suíça, Polônia, Dinamarca, Itália, Noruega, Espanha, Hungria, Bélgica, Finlândia, Irlanda, Inglaterra, Suécia, entretanto o país que apresenta maior prevalência é a Grécia (73).

Na Grécia, a proporção de cepas resistentes a imipenem cresceu de 1% a 20% entre amostras de *K.pneumoniae* oriundas de pacientes internados num período de cinco anos (2001 a 2006) e 50% foram de centros de terapia intensiva. Em 2002, a presença de KPC foi identificada em três hospitais, mas em 2008, esse mecanismo de resistência esteve presente em 25 dos 40 hospitais pertencentes à rede de monitoramento de resistência desse país. Esta resistência se deve principalmente a dispersão de cepas do clone epidêmico ST258 produtores de KPC-2 e SHV-12 (74).

Nos países asiáticos, essa carbapenemase já foi encontrada em Israel, China e Coreia do Sul. Em Israel, a primeira cepa produtora de KPC-2 foi identificada em 2005 (75). Entretanto em 2006, cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC-3 pertencentes ao ST258 se tornaram mais prevalentes, atingindo proporções epidêmicas (75). No ano de 2007, foi estabelecido um programa de controle de infecções, que era composto de um sistema de notificações e indicações para identificação e isolamento desse microrganismo. Somente em 2007, este sistema cadastrou 180 casos de infecções causadas por cepas de *K.pneumoniae*, mas felizmente em 2010, o número de casos caiu para 30 por mês, demonstrando a eficácia do sistema (74).

Na China, essa carbapenemase é atualmente um grande problema de saúde pública, pois está disseminada em várias províncias desse país. Em um hospital de grande porte chinês, Huashan Hospital, foi realizado estudo de vigilância epidemiológica entre amostras da família *Enterobacteriaceae*. Foram estudadas 109 cepas de *K. pneumoniae* do período de 2005 a 2010 apresentando resistência aos carbapenemas e se observou a presença do gene *bla_{KPC}* em 70,6% (76). Em outro estudo, onde foram analisados 95 *K. pneumoniae* resistentes a carbapenemas de treze hospitais de cinco províncias, observou-se o gene *bla_{KPC-2}* em todos

as amostras, e a análise genotípica forneceu sete STs diferentes. Entretanto o clone dominante foi ST11, que parece estar bastante disseminado neste país (77). Além da presença em *K. pneumoniae* e amostras da família Enterobacteriaceae na China, já foram observadas cepas de *P. aeruginosa* produtoras de KPC (78).

Na Coreia do Sul, existem dois relatos da produção dessa carbapenemase. O primeiro deles ocorreu em 2010, onde uma cepa de *K. pneumoniae* foi isolada de um paciente com diabetes melitus e apresentava sepse, sendo designada como ST11 por MLST (79). O segundo caso foi de um paciente com infecção urinária, que apresentou cultura positiva para *K. pneumoniae*. Essa cepa era resistente a todos os beta-lactâmicos, produzia a variante KPC-2 e foi designada como ST258 (80).

Nas Américas, além dos Estados Unidos, essa carbapenemase já foi encontrada em Porto Rico (81), Argentina (82), Canadá (83), Trinidad e Tobago (84), entretanto o primeiro relato ocorreu na Colômbia em 2005. Neste país, foram isoladas duas cepas de *K. pneumoniae*, uma oriunda de urina e outra de hemocultura. Ambas apresentavam a variante KPC-2 e a concentração inibitória mínima para os carbapenemas era $>256\mu\text{g/mL}$ (85).

Em Porto Rico, essa carbapenemase já se encontra mais disseminada. O primeiro relato ocorreu em cepas de *K. pneumoniae* de 2003, mas essa beta-lactamase já foi observada em bacilos Gram-negativos não fermentadores, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa* (81,86). Em um trabalho publicado em 2011, foi realizado um estudo epidemiológico acerca da prevalência dessa carbapenemase no país, no período de janeiro a junho de 2009, incluindo 17 hospitais. Foram estudadas 1.239 amostras resistentes a múltiplos beta-lactâmicos, e o gene bla_{KPC} foi encontrado em 43% dessas amostras. A distribuição desse gene entre as espécies foi *E. coli* 28% (61/219), *K. pneumoniae* 73% (333/457), *P. aeruginosa* 36% (99/272), e *A. baumannii* 14% (41/291) (87).

Na Argentina, a KPC já foi descrita na capital do país, Buenos Aires. Em um estudo publicado em 2011, a produção dessa carbapenemase foi observada em 79 *K. pneumoniae* do período de 2006 a 2010. A dispersão desse gene foi associada a plataforma genética do transposon *Tn4401* e também devido a dispersão do clone epidêmico ST258 (82).

No Canadá e em Trinidad e Tobago, existem poucos relatos. No país da América do Norte, três cepas de *K. pneumoniae* foram observadas no Hospital Ottawa, onde se evidenciou

a transmissão entre pacientes deste centro de saúde (83). Em Trinidad e Tobago, esse gene foi detectado em uma cepa de *P. aeruginosa*, possuindo a variante alélica KPC-2 (84).

1.4.6.1.3. Ocorrência no Brasil

No Brasil, essa carbapenemase foi descrita primeiramente em 2009 em quatro cepas de *K. pneumoniae* isoladas de urina e sangue, de pacientes internados na UTI de um hospital do Recife em 2006. Todos apresentaram resistência às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenemas. A análise genotípica realizada por PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) forneceu dois perfis clonais, sendo três amostras pertencentes a um mesmo clone e uma de um clone distinto. Todas as cepas carregavam a variante alélica KPC-2 e também CTX-M-2 (88).

O segundo relato ocorreu no Rio de Janeiro, onde seis amostras (4 de sangue, 1 de urina e 1 de aspirado traqueal) de *K. pneumoniae*, isoladas entre 2007 e 2008, provenientes de dois hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro foram produtores de KPC-2. Todos apresentavam resistência e altas concentrações inibitórias mínimas frente aos β -lactâmicos de amplo espectro, ciprofloxacina e gentamicina (89).

Entretanto, após a descrição no Recife e Rio de Janeiro, Pavez e colaboradores (2009) afirmam ter encontrado duas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, uma oriunda de 2005 e outra oriunda de 2007, durante a realização de um estudo epidemiológico acerca da resistência aos carbapenemas. Essas duas amostras, oriundas de hemoculturas, apresentaram resistência a todos os carbapenemas e não se mostraram relacionados clonalmente (90).

Outros representantes da família Enterobacteriaceae produtores de KPC também tem sido encontrados em nosso país. O gene *bla*_{KPC-2} foi encontrado em amostras de *E. cloacae*, no Rio Grande do Sul (91) e em 2010, o nosso grupo descreveu o primeiro relato de *E. coli* produtora de KPC-2 em um hospital no Rio de Janeiro (92).

Em setembro de 2010, um artigo que estudou a diversidade de 16 cepas de *K. pneumoniae* isoladas em seis diferentes países, Estados Unidos, Grécia, Suécia, Colômbia, Israel, incluindo o Brasil foi publicado. Nesse estudo, o gene *bla*_{KPC-2} esteve sempre associado a diferentes isoformas do transposon Tn4401 (“a”, “b”, ou “c”). Dentre essas amostras, sete STs foram descritos (ST258, ST337, ST338, ST14, ST 339, ST11, ST277, ST340), sendo o ST11 pertencentes as quatro amostras oriundas do Brasil (53).

Um estudo com cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em São Paulo no ano de 2008, no Hospital Heliópolis foi publicado em 2011. Este estudo objetivou caracterizar o desfecho clínico de seis infecções causadas por esse microrganismo. Observou-se que todos apresentaram resistência aos beta-lactâmicos, combinação de beta-lactâmicos com inibidores, carbapenemas, cefalosporinas de terceira geração e foram suscetíveis a amicacina, polimixina B e tigeciclina. Entre as seis amostras, três perfis clonais foram observados, sendo que quatro deles pertenceram a um mesmo clone (93).

Andrade e colaboradores (2011) estudaram 57 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de São Paulo, Rio de Janeiro e Rio Grande do sul. Observou-se 5 genótipos definidos por PFGE e 6 genótipos definidos por MLST: ST258, ST11, ST327, ST44, ST437, ST48. O gene *bla*_{KPC-2} estava associado ao transposon *Tn4401*, nas variantes “a” e “b”. Além disso, essa plataforma genética foi encontrada em plasmídios de diferentes tamanhos (20-130kb) de diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial (IncN, IncL/M, IncFII) (54).

1.4.6.1.4. Detecção laboratorial

Devido ao grande aumento da produção de carbapenemases e sua grande capacidade de disseminação, houve a necessidade da implementação de metodologias que fossem específicas, sensíveis e pouco laboriosas para a identificação desse mecanismo de resistência de forma rápida nos laboratórios clínicos. Assim, em 2010, para a identificação da produção de carbapenemases do tipo KPC por isolados clínicos, o *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI), órgão responsável pela padronização e interpretação de testes de sensibilidade aos antimicrobianos dos Estados Unidos (também utilizado por várias nações no mundo), preconizou que fosse realizado o teste de difusão em ágar para análise da sensibilidade aos carbapenemas ou mensuração da concentração inibitória mínima (CIM) e o teste de Hodge modificado. Um indicativo da produção dessas carbapenemases seria a resistência ou a sensibilidade diminuída (halo de inibição menor ou igual a 21 mm) no teste de disco difusão em ágar para quaisquer dos carbapenemas ou concentração inibitória mínima de 2µg/mL para ertapenem ou 2-4µg/mL para imipenem e meropenem, e um resultado do teste de Hodge modificado positivo (94,95).

O teste de Hodge Modificado é um teste fenotípico para a detecção de carbapenemases. Nessa metodologia é utilizada a cepa padrão de *E.coli* (ATCC 25922), sensível aos carbapenemas, que funciona como indicadora da produção dessa enzima. A *E.coli* é semeada (semeadura tipo tapete) numa placa de Mueller Hinton e no centro da placa,

deve ser colocado um disco de carbapenema (imipenem). A cepa a ser testada (possível produtora de carbapenemase) deve ser semeada em forma de estria fina da borda do disco até a borda da placa. O teste é interpretado, após incubação a 35°C por 18-24 horas, da seguinte forma: caso ocorra a produção de carbapenemase pela cepa teste, a enzima produzida vai hidrolisar o imipenem que foi difundido na placa, propiciando que a cepa de *E.coli* consiga crescer numa região mais próxima a estria que foi semeada da cepa teste, onde pode ser observada uma distorção no halo de inibição (95).

Entretanto a identificação da produção de KPC baseada nos testes de sensibilidade a antimicrobianos e teste Hodge modificado se mostrou bastante complicada para grande parte dos laboratórios clínicos. Isto ocorreu porque algumas amostras carreadores de KPC demonstravam baixo nível de resistência aos carbapenemas *in vitro*, tanto em metodologias de disco difusão em ágar, quanto em metodologias onde se mensurou a concentração inibitória mínima. Por outro lado, muitas amostras produtoras de ESBLs, principalmente CTX-M, associadas à perda de porinas ou aumento da expressão de bombas de efluxo podem apresentar resistência *in vitro* aos carbapenemas. Em relação ao Hodge, a análise deste teste é bastante complexa, visto que se baseia na distorção do halo de inibição, que está sujeita a interpretação pessoal. (96).

Assim, em junho de 2010 o CLSI realizou uma mudança nos parâmetros a serem utilizados. A partir da observação de dados de farmacodinâmica e farmacocinética dos antimicrobianos em questão, o CLSI preconizou uma mudança dos pontos de corte dos carbapenemas. Para imipenem, meropenem e ertapenem, a cepa deve ser considerada resistente com halo de inibição menor que 19 mm, intermediária quando o halo varia de 20-22mm e sensível quando é maior que 23mm. Na mensuração da concentração inibitória mínima para imipenem e meropenem, a cepa deve ser considerada resistente com o CIM maior que 4ug/mL, intermediária 2ug/mL e sensível menor que 1ug/mL. Já para ertapenem esses valores são distintos, visto que quando apresenta CIM maior que 1ug/mL a cepa é considerada resistente, 0,5ug/mL é intermediária e 0.25 é sensível. Esse aumento dos pontos de corte foi justificado devido a estudos epidemiológicos e o baixo número de opções para tratamento de indivíduos acometidos por bactérias produtoras de KPC, além da observação de dados de farmacodinâmica e farmacocinética dessas drogas (97).

Entretanto, o EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) que é o órgão responsável pela padronização dos testes de sensibilidade a antimicrobianos na Europa, preconiza que a interpretação da zona de inibição por disco difusão para os

carbapenemas deva ser a seguinte: ertapenem sensível maior que 25 mm e resistente menor que 22 mm; imipenem sensível maior que 21 mm e resistente menor que 15 mm; meropenem sensível maior que 22 mm e resistente menor que 16 mm. Já para a mensuração da concentração inibitória mínima, são consideradas sensíveis ao ertapenem cepas com CIM menor que 0,5 ug/mL e resistente maior que 1 ug/mL, assim como para imipenem e meropenem sensíveis cepas com CIM menor que 2 ug/mL e resistentes maior que 8 ug/mL (98).

Dessa forma, devido a não congruência dos dados dos dois principais órgãos relacionados à padronização de testes de sensibilidade, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) decidiu implementar no dia 26 de outubro de 2010 a nota técnica N°1/2010. Nesta nota técnica, é preconizado que em laboratórios de microbiologia clínica no Brasil, os critérios a serem utilizados como base para interpretação dos testes de sensibilidade para *Enterobacteriaceae* deverão ser aqueles contidos no documento M100-S20 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) publicado em janeiro de 2010, com algumas modificações. Para imipenem e meropenem, a cepa deve ser considerada resistente com halo de inibição menor que 19 mm, intermediária quando o halo varia de 20-22 mm e sensível quando é maior que 23 mm. Já para ertapenem, a cepa deve ser considerada resistente com halo de inibição menor que 21 mm, intermediária quando o halo varia de 22-24 mm e sensível quando é maior que 25 mm. Na mensuração da concentração inibitória mínima para imipenem e meropenem, a cepa deve ser considerada resistente com o CIM maior que 4ug/mL, intermediária 2ug/mL e sensível menor ou igual a 1ug/mL. Já em relação ao ertapenem, a cepa deve ser considerada resistente com o CIM maior que 2ug/mL, intermediária 1ug/mL e sensível menor que 0,5 ug/mL. Além das metodologias fenotípicas, a nota técnica também preconiza a realização de teste para detecção molecular da produção de carbapenemases através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Caso os laboratórios não possuam estrutura para realização de testes moleculares, estes devem enviar as cepas suspeitas de produção de carbapenemases para os laboratórios centrais (LACENS) de cada estado para que eles façam a identificação desses mecanismos (99).

1.5. Metodologias de tipagem de *Klebsiella pneumoniae*

Do ponto de vista epidemiológico, é frequentemente necessária a determinação da clonalidade das cepas. Entretanto, as metodologias de tipagem se tornam particularmente importantes quando se tratam de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar. Nesses locais, o uso de cateteres, aparelhos de ventilação mecânica e outros diversos equipamentos

médicos geralmente se tornam fontes de transmissão de bactérias, favorecendo a disseminação de infecções. Assim, estudos de tipagem são extremamente necessários para investigação de possíveis surtos, visto que é necessária a identificação e diferenciação de cepas realmente relacionadas a surtos de cepas epidêmicas e endêmicas, ou até a presença de isolados esporádicos (100).

Atualmente, existem uma variedade de metodologias, tanto não moleculares quanto moleculares, que vem sendo utilizadas com esse propósito.

1.5.1. Metodologias não moleculares

Nas décadas do século passado, várias tentativas foram realizadas no sentido de se diferenciar as cepas de *K. pneumoniae*. Na época, a maior parte das metodologias disponíveis era baseada em técnicas imunológicas, visto que ainda não haviam ferramentas de manipulação de DNA como existem hoje. Dentre essas, as de maior importância eram sorotipagem, tipagem por bacteriófagos, tipagem de bacteriocinas e MLEE (*Multilocus enzyme electrophoresis*) (1).

Em geral, métodos fenotípicos possuem baixo poder discriminatório quando comparados aos métodos genotípicos, pois separam as amostras em grandes grupos e apresentam baixa reprodutibilidade, diferenciando os microrganismos através da caracterização de produtos da expressão de determinados genes. Assim, essas características podem variar de acordo com mudanças nas condições e fase de crescimento do microrganismo e a ocorrência de mutações espontâneas (100).

1.5.2. Metodologias moleculares

As metodologias de tipagem molecular se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico para realização de discriminação entre as cepas e tem sido as mais utilizadas atualmente. As metodologias mais importantes são: determinação do perfil plasmidial, PCRs randômicos, ribotipagem, AFLP, PFGE e MLST.

A determinação do perfil plasmidial e a determinação do perfil de restrição de DNA desses plasmídios têm sido usadas raramente para investigações epidemiológicas, pois não são necessariamente associados a origem das amostras envolvidas em surtos. Dessa forma, comparando-se com outras técnicas, a determinação do perfil plasmidial tem se mostrado

bastante útil para acompanhamento da dispersão de plasmídios que carregam determinantes de resistência (1).

Métodos baseados em amplificação de fragmentos randômicos de DNA, como RAPD (*Random amplified polymorphic DNA*), rep-PCR (*repeat-based PCR*) ou ERIC-PCR (*Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence PCR*), apresentam a vantagem de ser aplicáveis sem o conhecimento prévio da sequência do genoma da bactéria em questão e são necessários poucos passos para a sua realização. Estes métodos apesar de serem úteis para investigações locais de fontes e rotas de dispersão clonal apresentam baixa reprodutibilidade, especialmente quando dados entre laboratórios são comparados (1).

Ribotipagem ou análise do padrão de restrição de RNA ribossomal tem sido bastante utilizada para tipagem de *K.pneumoniae*. Esta metodologia apresenta bom poder discriminatório devido à presença de diversos operons de RNA ribossomal no genoma dessa bactéria. Além disso, o uso de aparelhos automatizados tem rendido a esta técnica extrema facilidade de operação, se tornando uma das poucas técnicas padronizadas entre diversos laboratórios. A enzima *EcoRI* é a mais utilizada para tipagem, apresentando alta reprodutibilidade. Entretanto, a interpretação do padrão de bandas gerado pode apresentar problemas (1,101).

A técnica de AFLP (*Amplification of Fragment Length Polymorphisms*) é baseada na amplificação seletiva por PCR de produtos de restrição de fragmentos do DNA genômico. A metodologia de AFLP tem elevado poder discriminatório e alta reprodutibilidade, entretanto é considerada bastante laboriosa, necessita de profissionais altamente especializados para realização da técnica, além de gerar padrões de bandas complexos (entre 30-50), sendo a análise dependente de *softwares* especializados (1, 102, 103)

A metodologia de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) é provavelmente a técnica de DNA *fingerprinting* mais utilizada para tipagem de uma variedade de bactérias. A técnica consiste no aprisionamento do DNA total das cepas em blocos de agarose, seguido pela digestão com enzimas de restrição. A separação dos fragmentos é realizada em eletroforese de campo pulsado, onde campos elétricos alternados são aplicados. Atualmente, a enzima mais utilizada para tipagem de cepas de *K.pneumoniae* tem sido a *XbaI*, entretanto existem relatos da utilização de *HaeIII* e *SpeI*. Esta metodologia apresenta também elevado poder discriminatório e alta reprodutibilidade, porém como existem variados

protocolos disponíveis para a realização dessa metodologia, a reprodutibilidade inter-laboratorial fica um pouco prejudicada (1, 104, 105).

MLST é uma técnica que tem apresentado bastante importância atualmente. Isso ocorre porque, ao contrário das outras metodologias que são baseadas nas diferenças em regiões não caracterizadas do genoma, onde muitas variações entre as cepas são observadas (PFGE, RAPD, REP-PCR), esta metodologia se baseia em genes conservados, onde as mutações são acumuladas de maneira mais lenta. Outra vantagem desse método é a facilidade de comparação inter-laboratorial. Como esta técnica gera sequências de DNA e não padrões de bandas, os resultados podem ser comparados em qualquer lugar do mundo, sem que hajam critérios interpretativos envolvidos. Dessa forma, esta metodologia se apresenta mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de cepas não relacionadas geograficamente, enquanto as outras técnicas são mais utilizadas para investigações de surtos locais (1).

Esta metodologia se baseia na amplificação de sete genes conservados do genoma, seguido de sequenciamento. Os sete genes usados para o MLST de *K.pneumoniae* são: *rpoB* (codificador da subunidade beta da RNA polimerase), *tonB* (codificador do transdutor de energia periplasmático), *gapA* (codificador da enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), *pgi* (codificador da enzima fosfoglicose isomerase), *phoE* (codificador da fosforina E), *infB* (codificador do fator de iniciação da tradução 2), *mdh* (codificador da enzima malato desidrogenase). Cada um dos genes é sequenciado e a sequência encontrada é comparada com as já existentes no banco de dados. Para cada sequência diferente de cada gene, é dado um número de alelo único (*allele number*). O número de alelo é fornecido para cada um dos sete genes. Assim, a combinação de todos os números de alelos gera o ST (*sequence type*), que pode ser comparado com os STs já descritos no banco de dados disponível no site <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> (106, 107).

1.6 Infecções causadas por *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs e KPCs.

Enterobactérias, principalmente a espécie *K. pneumoniae*, produtoras de ESBL e KPC são reconhecidas como importantes agentes etiológicos de infecções, responsáveis por pneumonias e infecções do trato urinário especialmente em pacientes graves e atualmente são descritas em percentuais endêmicos e epidêmicos em hospitais de todo o mundo (37, 65, 108). As infecções contribuem para maiores índices de morbidade e mortalidade, tempos de

internação prolongados, custos altos e principalmente trazem ameaça constante de disseminação de bactérias multirresistentes (65).

Diversos estudos têm demonstrado a importância de *K. pneumoniae* nesse cenário. Um estudo realizado pelo SENTRY, com 4.267 infecções de corrente sanguínea causadas por bacilos Gram negativos coletadas nos Estados Unidos, Canadá e América Latina demonstraram que *Klebsiella* spp. foi a segunda bactéria mais prevalente, representando 18% (109). De acordo com dados do CDC (Centros para Controle de Doenças e Prevenção-EUA), *K. pneumoniae* é o integrante da família Enterobacteriaceae mais importante em casos de infecções, enquanto que *Klebsiella* spp. representam 8% das endemias de infecções hospitalares e 3% dos surtos epidêmicos nos Estados Unidos (110).

Na Europa, num estudo denominado TEST, que ocorreu no período de 2004-06, *K. pneumoniae* foi a responsável por 13.3% das infecções de corrente sanguínea, infecções urinárias, infecções do trato respiratório e feridas em 19 países. No último relatório EARSS desse continente publicado em 2006, que abrangeu mais de 800 laboratórios de 31 países, mostrou um aumento contínuo desde 2000 nas infecções causadas por *K. pneumoniae* e *E.coli* resistentes a cefalosporinas de terceira geração, com prevalência de mais de 10% em metade das nações estudadas (43).

Os relatos são escassos sobre a incidência de infecção hospitalar no Brasil, porém dados de um estudo realizado pelo Ministério da Saúde em 1994, demonstram que o índice de infecção hospitalar entre pacientes internados era de 15,5%, valor equivalente ao aceito pela OMS, porém acima da média dos países desenvolvidos (111, 112).

Estudo realizado em hospitais localizados no Rio de Janeiro, Florianópolis e em São Paulo, mostrou taxas de produção de ESBLs variando entre 30 a 50% para amostras de *K. pneumoniae* associadas às infecções da corrente sanguínea (113).

Os dados mais recentes disponíveis da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, obtidos no período de julho de 2006 a junho de 2008, em que foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs de 97 hospitais sentinelas do Brasil mostraram que os bastonetes Gram-negativos mais frequentemente isolados foram: *K. pneumoniae* (13%), *P. aeruginosa* (11%), *Acinetobacter* spp. (11%), *Enterobacter* sp. (6%), e *E. coli* (3%). As cepas de *K. pneumoniae* foram testadas para a presença de ESBL em 37 (44%) dos 78 hospitais

notificando a ocorrência desses microrganismos em infecções da corrente sanguínea de pacientes de terapia intensiva (114). Infelizmente ainda não existem relatos na literatura da prevalência/incidência de KPC nos mais diferentes estados do Brasil.

1.7. Justificativa e relevância

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública crescente em todo o mundo e a disseminação dos genes de resistência aos antimicrobianos compreende uma preocupação recorrente. A produção de KPC foi observada pela primeira vez nos EUA em 2001, e em nosso país em 2006 e desde então tem ganhado bastante importância. Isso ocorre porque a produção de KPC confere resistência a todos os beta-lactâmicos disponíveis para a prática clínica e muitas vezes estão associadas à resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Assim, o rápido reconhecimento de amostras produtoras destas enzimas no ambiente hospitalar é importante para a seleção do agente antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção.

Devido à importância dos bastonetes Gram-negativos da família Enterobacteriaceae multirresistentes em nosso país, principalmente *K. pneumoniae* produtoras de KPC de diferentes estados, envolvidos em infecções, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre essas amostras tornam-se muito importantes. Para este fim, as metodologias de tipagem molecular, como eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE) e *Multilocus Sequence typing* (MLST), que são considerados métodos de referência, devido ao alto poder discriminatório e reprodutibilidade, assim como, estudos que elucidem o ambiente genético em que estes genes estão inseridos, como a identificação da associação com transposons e a determinação do grupo de incompatibilidade do plasmídeo carreador do gene, podem auxiliar na compreensão da disseminação deste tipo de resistência no nosso país, tornando-se um importante passo para o desenvolvimento de estratégias destinadas a prevenir a propagação destes patógenos em nosso meio. Além da detecção da disseminação do clone resistente dentro de um determinado centro de saúde, a utilização dessas metodologias de tipagem molecular, também permitem a identificação da disseminação de clones epidêmicos em diferentes partes do Brasil e do mundo.

O Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar tem atuado como Centro Colaborador do Ministério da Saúde para Determinação de Resistência a Antimicrobianos na Rede Nacional de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos da ANVISA, projeto desenvolvido em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) e com a Coordenação-Geral de Laboratórios em Saúde Pública da Secretaria de Vigilância em Saúde

(CGLAB/SVS/MS), apoiado institucionalmente pela Vice-Presidência de Referência e Pesquisa da FIOCRUZ para monitoramento de resistência bacteriana recebe amostras bacterianas resistentes aos carbapenemas isoladas em vários hospitais do Brasil. Podemos observar que entre os anos de 2006 e 2009, nosso laboratório recebeu em torno de 50 *K.pneumoniae* produtoras de KPC e que em 2010, esse número foi quase nove vezes maior, visto que recebemos 445.

Desta forma, a relevância deste estudo deve-se a crescente incidência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no Brasil e a carência de dados regionais e nacionais. Outro fator relevante é o fato da infecção por *K. pneumoniae* produtoras de KPC ser de difícil tratamento, uma vez que as bactérias carregam plasmídios que conferem resistência a múltiplos antibióticos. Assim, a detecção prematura deste mecanismo de resistência e o controle da disseminação destes patógenos no ambiente hospitalar tem se mostrado de grande importância. Pacientes com infecção causada por amostras produtoras de KPC permanecem mais tempo no hospital, aumentando o custo da internação e apresentam maior letalidade. Com isso, se observa a necessidade de intervenção/contenção dos problemas causados por essas bactérias, tais como: dificuldade de detecção, controle e tratamento das infecções.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo do trabalho foi analisar o polimorfismo genético, determinar o perfil de resistência a antimicrobianos, identificar o plasmídeo carreador e a região flanqueadora do gene *bla_{KPC}* de 165 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de carbapenemase do tipo KPC provenientes de doze estados brasileiros no período de 2006 a 2010.

2.2. Objetivos específicos

- Determinar o perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.
- Confirmar a produção de carbapenemase do tipo KPC através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) e identificar da variante alélica através de sequenciamento.
- Avaliar o polimorfismo genético das amostras de *K.pneumoniae* através da técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE) e *multilocus sequence typing* (MLST).
- Identificar o tamanho e o grupo de incompatibilidade plasmidial do plasmídeo carreador do gene *bla_{KPC}* através de técnicas moleculares como extração plasmidial e hibridização.
- Avaliar o ambiente genético em que se encontra o gene *bla_{KPC}* nas amostras estudadas, através de PCR para detecção do transposon Tn4401.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção das amostras

Foram recebidas no período de 2006 a 2010 no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar – IOC – FIOCRUZ em torno de 500 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC, encaminhadas por hospitais e Laboratórios Centrais (LACENs) de doze estados brasileiros: Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e Santa Catarina. Somente no ano de 2010, 445 amostras foram enviadas para análise fenotípica e molecular. Assim, foram selecionadas para estudo 165 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC pertencentes a Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar (CCBH). O critério de seleção adotado foi a inclusão de uma amostra por paciente, preferencialmente, de materiais clínicos como: sangue, urina, líquidos abdominais e secreções do trato respiratório inferior, desde que houvesse pelo menos uma amostra de cada estado brasileiro incluído no estudo.

3.2. Confirmação da produção de KPC e identificação da variante alélica

3.2.1. Extração de DNA pela metodologia de Tiocianato de Guanidina

O Ácido Desoxirribonucléico (DNA) total das 165 amostras foi extraído pelo método do tiocinato de guanidina com base nos critérios descritos por Caetano-Anolles e Gresshoff, 1997 (115).

Células bacterianas a partir de cultura recente em meio ágar nutriente (Oxoid), foram suspensas em 3mL de caldo TSB (*Tryptic Soy Broth*) e submetidas a agitação “overnight” a 37°C. 1,5 mL do caldo foi transferido para um microtubo tipo *Eppendorf*, e em seguida, centrifugado por 10 minutos (10000rpm). O sobrenadante foi descartado, e em seguida foi adicionado os 1,5 mL restante do caldo ao microtubo, procedendo novamente a etapa de centrifugação (10 minutos a 10000 rpm). O sobrenadante foi novamente descartado. Ao sedimento formado no fundo do tubo, foi adicionado 1 mL de salina, seguida de homogeneização em vórtex. Essa última etapa foi repetida duas vezes, sendo intercalada por 10 minutos de centrifugação (10000 rpm). O sedimento foi suspenso em 100 µL de tampão TE (100mM Tris / 10mM EDTA), e a ele foram adicionados 500 µL da solução de Guanidina (5M tiocianato de guanidina, 0,1M de EDTA, sarcosil 0,5%), homogeneizado por inversão e incubado por 5 minutos a -20°C. Depois, foram adicionados à mistura 250 µL de acetato de potássio (estocado a -20°C), homogeneizado por inversão e incubado por 5 minutos à -20°C.

Após este período, foram adicionados 500 µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico. A mistura foi agitada em vórtex até a completa homogeneização, com a obtenção de uma solução de cor leitosa. Essa solução foi centrifugada por 10 minutos (10000 rpm), obtendo uma solução de três fases. Aproximadamente 750 µL da fase superior foram retirados e transferidos para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo 380 µL de Isopropanol. A mistura foi levada ao freezer (-20°C) “overnight”, e no dia seguinte, foi centrifugada por 10 minutos (10000 rpm). O sobrenadante foi desprezado e o DNA foi então mantido no fundo como um pequeno pellet. Foi adicionado 150 µL de álcool 70%, centrifugado por 10 minutos (10000rpm). Esta etapa foi repetida duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento foi colocado em temperatura ambiente para que todo o álcool evaporasse. O sedimento foi ressuspenso em 100 µL de tampão TE, por 3h horas em estufa ou banho-maria à 37°C. O DNA foi posteriormente mantido em freezer a - 20°C para a realização dos testes moleculares.

3.2.2 Confirmação da produção de KPC.

A detecção do gene *bla_{KPC}* nas 165 amostras de *K.pneumoniae* foi realizada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com a utilização dos iniciadores que se encontram na tabela abaixo (60).

Tabela 3.1: Iniciadores específicos para a detecção do gene *bla_{KPC}* utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F TGTCACTGTATCGCCGTC KPC-R CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	1011	Ygiti <i>et al.</i> , 2001(60).

A reação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico (aproximadamente 25ng) , 14,25 µl de água Milli-Q, 5 µl do tampão PCR 5X, 1,25 µl (20 pmoles) de cada “primer”, 0,5 µl (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos, 1,5 µl (1,5 mM) de solução MgCl₂ e 0,25 µl de Taq DNA polymerase (1,25U) (GoTaq Flexi-Promega).

As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de: 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 50°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C.

A amplificação do DNA foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5M pH 8,0; Tris 1M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035 M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L) e observado sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus biotecnologia.

3.2.3. Identificação da variante alélica do KPC.

Os *amplicons* gerados a partir do PCR foram purificados através do kit “Gfx PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare) e sequenciados no seqüenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), na Plataforma de Sequenciamento DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ. As sequencias de DNA geradas foram analisadas com a ajuda dos softwares Bioedit (versão 7.0.5.3) e Mega (versão 4.0.2).

3.3. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos.

3.3.1. Difusão em ágar

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado nas 165 amostras de *K. pneumoniae* segundo o método de difusão em ágar.

A partir de cultura recente em ágar nutriente (Oxoid) foram selecionadas de 1 a 2 colônias para obtenção de uma suspensão padronizada, em solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente a do padrão 0,5 na escala de MacFarland. Esta suspensão foi semeada com auxílio de swab estéril em toda a superfície do meio Mueller Hinton Agar (MHA; Oxoid) para obtenção de crescimento semi-confluente. Após no máximo 15 minutos, foram aplicados os discos de antimicrobianos (OXOID), mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles. Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: cefoxitina (10 µg); cefepime (30µg); ceftazidima (30µg); cefotaxima (5µg); piperacilina/ tazobactam (110 µg); gentamicina (10µg); amicacina (30µg); ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazole/ trimetoprima (25 µg) e fosfomicina/trometanol (200µg).

Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas em estufa a 35°C, em aerobiose por 16-18h e após esse período, foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano de acordo com o CLSI 2011 (116). Como controle do teste foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218.

3.3.2. Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B.

A determinação da concentração inibitória mínima das 165 amostras foi realizada através de Etest® (AB Biodisk, Solna, Suécia), para os seguintes antimicrobianos: imipenem, meropenem, ertapenem, polimixina B e tigeciclina, de acordo com os critérios interpretativos estabelecidos pela nota técnica da Anvisa nº1/2010 (99).

Nesta metodologia, a preparação das amostras e a semeadura em ágar Mueller Hinton foram efetuadas da mesma maneira do método de difusão em ágar, entretanto, ao contrário de se utilizar discos impregnados com uma concentração fixa de antimicrobianos, foram empregadas tiras de Etest® que possuem concentrações distintas de cada antimicrobiano, possibilitando a determinação da concentração inibitória mínima para cada droga. Como controle do teste foram utilizadas as amostras *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *E. coli* ATCC 35218.

3.3.3. Análise de perfil de multirresistência

Avaliamos nas cepas o perfil de multirresistência, que foi definido como a resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos, baseados nos resultados obtidos no teste de difusão em ágar e Etest®. Sete classes de antimicrobianos foram testadas: beta-lactâmicos [representada pelas cefalosporinas de segunda geração (cefotaxima), terceira geração (ceftazidima e cefotaxima), quarta geração (cefepime), carbapenemas (imipenem, meropenem e ertapenem) e beta-lactâmico associado a inibidor (piperacilina/tazobactam)], aminoglicosídeos (representada pela amicacina e gentamicina), sulfamidas (sulfametoxazol/trimetoprima) e quinolonas (ciprofloxacina); glicilciclina (representada pela tigeciclina) polimixinas (polimixina B) e derivados de ácido fosfônico (fosfomicina/trometanol). As amostras consideradas resistentes a pelo menos um dos representantes de cada classe foram designadas como resistente a classe. As cepas que se apresentaram como intermediárias, foram agrupadas juntamente com as resistentes de modo a facilitar a análise.

3.4. Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases.

Foram realizadas reações de PCR para a detecção dos genes codificadores de beta-lactamases do tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, e *bla*_{CTX-M} nas 165 amostras de *K.pneumoniae*. Os iniciadores utilizados foram determinados em trabalhos científicos publicados recentemente (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Iniciadores específicos para a detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, e *bla_{CTX-M}* utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Sequencia do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-F-ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC CTX-R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG	593pb	Mulvey <i>et al</i> , 2003 (117).
<i>bla_{SHV}</i>	SHV-F-TTATCTCCCTGTTAGCCACC SHV-R-GATTTGCTGATTTTCGCTCGG	797pb	Hasman <i>et al</i> , 2005 (118).
<i>bla_{TEM}</i>	TEM-F-GCGGAACCCCTATTTG TEM-R-ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859pb	Hasman <i>et al</i> , 2005 (118).

A mistura da PCR para detecção de cada um dos genes *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico com aproximadamente 25 ng (extraído conforme descrito no tópico 3.2.1), 14,25 µl de água Milli-Q, 5 µl do tampão PCR 5X, 1,25 µl (25pmoles) de cada “primer”, 0,5 µl (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos, 1,5 µl (1,5 mM) de solução MgCl₂ e 0,25 µl de Taq DNA polymerase (1,25U) (GoTaq Flexi).

Para as condições de amplificação dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 53°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Para o gene *bla_{CTX-M}* a temperatura de anelamento utilizada foi 60°C. Após a reação de PCR, a visualização dos fragmentos amplificados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus biotecnologia.

3.5. Análise do polimorfismo genético através de PFGE.

A análise do polimorfismo genético das 165 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC incluídas no estudo foi realizada através de eletroforese em gel de campo pulsado (119).

Para a extração de DNA total, as amostras foram semeadas em tubos com ágar nutriente (Oxoid) e incubados a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana, adicionando 1 mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8) até alcançar o padrão de turvação 3 da escala de Mac Farland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram

transferidos para um microtubo tipo *Eppendorf* contendo 5 μL de proteinase K (50 mg/ μL - Sigma). Foram adicionados à suspensão de células 200 μL de agarose 1% (0,1 g de agarose *low melting* [Seaken gold], 0,5 mL de SDS 1%, 9,4 mL de TE [TRIS-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 0,1 MM pH 8,0]). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes. Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (plugs), os mesmos foram transferidos para tubos Falcon (15mL) contendo 2 mL de solução de lise (NaCl 1M, TRIS-HCl 6 mM pH 7,6, EDTA 100mM pH 8,0, BRIJ-58 0,5%, desoxicolato 0,2%, sarcosina 0,5%, lisozima 1 mg/mL) e 5 μL de proteinase K (50 mg/ μL) e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, os blocos foram lavados 3 vezes com 10 mL de água milli Q a 50°C por 15 minutos e uma vez com 7mL de Tampão TE a 50°C por 15 minutos. Posteriormente os blocos foram armazenados em geladeira em 2ml de tampão TE.

Para a realização da digestão enzimática, um pedaço correspondente a um terço de um bloco foi transferido para um microtubo tipo *eppendorf* contendo solução tampão da enzima *XbaI* (90 μL de água esterilizada e 10 μL de solução tampão da enzima - Roche) e incubadas a 4°C por 30 minutos. Posteriormente, os plugs foram tratados com a enzima de restrição *XbaI* (20U) (Roche) por 3 horas a 37°C.

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1,1% (Seaken gold), preparado em TBE 0,4X (TRIS 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1mM pH 8,3), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 0,5 a 35 segundos, por 15 horas a 6V/cm, na temperatura de 13°C. Foram utilizados padrões de peso molecular Lambda DNA *Leader Pulse* (50-1000 Kb - Sigma) nas corridas.

Após as corridas eletroforéticas, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), visualizados sob luz ultravioleta e fotografados, utilizando-se ferramenta de fotodocumentação L-Pix EX- Loccus biotecnologia.

As análises dos géis e a confecção do dendrograma foram realizadas com auxílio do *software GelCompar II* (versão 1.50, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância utilizados para análise foram fornecidos pelo próprio programa.

3.6. Análise do polimorfismo genético através de MLST.

3.6.1. Amplificação por PCR

De acordo com a análise dos dados obtidos por PFGE, pelo menos um representante de cada clone das amostras produtoras de KPC de cada estado brasileiro foi selecionado para serem processadas pelo MLST para a definição do “sequence typing”. Os *primers* utilizados nas reações estão na tabela abaixo (106).

Tabela 3.3: Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST utilizados nas reações de PCR.

Gene alvo	Primers utilizados	Tamanho do produto
<i>rpoB</i>	<i>rpoB</i> : F : Vic3 GCGCAAATGGCWGAGAACCA	501 pb
	<i>rpoB</i> : R : Vic2 GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	<i>gapA</i> : F : 173 TGAAATATGACTCCACTCACGG	450 pb
	<i>gapA</i> : R : 181 CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	<i>mdh</i> : F : 130 CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	477 pb
	<i>mdh</i> : R : 867 CCGTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	<i>pgi</i> : F : 1R GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432 pb
	<i>pgi</i> : R : 1F CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	<i>phoE</i> : F : 604.1 ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420 pb
	<i>phoE</i> : R : 604.2 TGATCAGAAGCTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	<i>infB</i> : 1F CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318 pb
	<i>infB</i> : 1R CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	<i>tonB</i> : 1F CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414 pb
	<i>tonB</i> : 2R ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	

A mistura da PCR para detecção desses genes foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico contendo aproximadamente 25 ng (extraído conforme tópico 3.2.1), 9,5 µl de água Milli-Q, 1,0 µl (20 pmoles) de cada “primer” e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma).

Para as condições de amplificação dos genes *rpoB*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE* foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 50°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Para os genes *tonB* e *gapA* a temperatura de anelamento utilizada Foi 45°C e 60°C, respectivamente.

Após a amplificação por PCR, a detecção dos fragmentos gerados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida, os géis foram corados com brometo de etídio (0,5g/L), observados e fotografados sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus biotecnologia.

3.6.2. Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados através do kit “GfX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare). Para o sequenciamento, os *primers* utilizados foram os mesmos usados para a reação de amplificação, exceto para os genes *infB* e *pgi*, cujos *primers* utilizados estão abaixo (106).

Tabela 3.4: Iniciadores específicos para o sequenciamento dos genes do esquema de MLST.

Gene alvo	<i>Primers</i> utilizados	Tamanho do produto
<i>pgi</i>	<i>pgi</i> : 2F	CTGCTGGCGCTGATCGGCAT
	<i>pgi</i> : 2R	TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT
<i>infB</i>	<i>infB</i> : 2F	ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems), na Plataforma de Sequenciamento DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ.

A análise da qualidade das sequências obtidas foi realizada com auxílio do software Phred (versão 19.0), onde somente as sequências que obtiveram $\text{score} \geq 20$ foram individualmente analisadas. Para a análise da composição das sequências obtidas, foram utilizados inicialmente os softwares Bioedit (versão 7.0.5.3) e Mega (versão 4.0.2). Posteriormente, essas sequências foram comparadas com as sequências já disponíveis no banco de dados de MLST de *K.pneumoniae*, para a determinação de cada um dos números de alelo e consequentemente a discriminação de cada ST, com a ajuda do website <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>.

Quando alguma das sequências encontradas não estava disponível no banco de dados, realizamos o depósito das novas sequências e consequentemente dos novos STs, através do contato com o curador do banco de dados do Instituto Pasteur.

3.7. Detecção das regiões flanqueadoras do gene *bla_{KPC}*.

A detecção do transposon Tn440 foi realizada através de reações de PCR, em pelo menos um representante de cada clone definido por PFGE/MLST utilizando os *primers* descritos na literatura (57,67).

Tabela 3.5: Iniciadores específicos utilizados para a detecção do transposon Tn4401.

<i>Primers</i> utilizados	Localização no Tn4401	Tamanho produto	Referência
1- CTGTCTTGTCTCTCATGGCC 2- CCTCGCTGTGCTTGTCATCC	Gene <i>bla_{KPC}</i>	795 pb	
3- GGCACGGCAAATGACTA 4- GAAGATGCCAAGGTCAATGC	<i>ISKpn6</i>	649 pb	Naas <i>et al.</i> , 2008 (57).
5- ACGACCACGCACGCACAAAC 6- GCATCAAACGGAAGCAAAAG	<i>IR</i> direita	220 pb	
7- TGACCCTGAGCGGCGAAAGC 8- CACAGCGGCAGCAAGAAAGC	<i>ISKpn7</i>	603 pb	Kitchel <i>et al.</i> , 2009 (67).
9- GCGACCGGTCAGTTCCTTCT 10- CACCTACACCACGACGAACC	<i>TnpA</i>	198 pb	Naas <i>et al.</i> , 2008 (57).
11- TCACCGGCCCTCACCTTTGG 12- CTTAGCAAATGTGGTGAACG	<i>IR</i> esquerda	462 pb	

A mistura de cada uma das reações de PCR foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA genômico contendo aproximadamente 25ng (extraído conforme tópico 3.2.1), 9,5 µl de água Milli-Q, 1,0 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma).

Para as condições de amplificação foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 55°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C. Após a amplificação por PCR, a detecção dos fragmentos gerados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X, realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L) e observado sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX- Loccus biotecnologia.

3.8. Identificação do plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}*

3.8.1. Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial.

Pelo menos um representante de cada clone definido por PFGE/MLST foi selecionado para investigação do plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}*. Assim, a primeira etapa foi a determinação do grupo de incompatibilidade (Inc) dos plasmídios dessas amostras. O

esquema de determinação do grupo foi proposto por Carattoli e colaboradores (2005) e se baseia na amplificação por PCR das regiões que controlam a replicação destes plasmídios, que é diferente para cada uma das classes. O esquema é composto por cinco reações de PCR multiplex e 3 reações simples de PCR, para a identificação dos seguintes grupos: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C,K, B/O, X, Y, F, e FIIA. Os *primers* utilizados estão na tabela abaixo (52).

Tabela 3.6: Iniciadores específicos para a determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial.

Grupo Inc	Região alvo	Primers utilizados	Tamanho do produto
HI	parA-parB	HI1 FW: GGAGCGATGGATTACTTCAGTAC HI1 RV: TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA	471pb
HI2	iterons	HI2 FW: TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC HI2 RV: GGCTCACTACCGTTGTCATCCT	644pb
I1	RNAI	I1 FW: CGAAAGCCGGACGGCAGAA I1 RV: TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT	139pb
X	ori γ	X FW: AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT X RV: TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC	376pb
L/M	repA,B,C	L/M FW: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG L/M RV: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785pb
N	repA	N FW: GTCTAACGAGCTTACCGAAG N RV: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559pb
FIA	iterons	FIA FW: CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG FIA RV: GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG	462pb
FIB	repA	FIB FW: GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG FIB RV: CTCCCGTCGTTTCAGGGCATT	702pb
W	repA	W FW: CCTAAGAACAACAAAGCCCCCG W RV: GGTGCGCGGCATAGAACCGT	242pb
Y	repA	Y FW: AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG Y RV: GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT	765pb
P	iterons	P FW: CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA P RV: TCACGCGCCAGGGCGCAGCC	534pb
FIC	repA2	FIC FW: GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG FIC RV: TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT	262pb
A/C	repA	A/C FW: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA A/C RV: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465pb
T	repA	T FW: TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT T RV: CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC	750pb
FII _s	repA	FII _s FW: CTGTCGTAAGCTGATGGC FII _s RV: CTCTGCCACAAACTTCAGC	270pb
F _{repB}	RNAI/repA	FREP _B FW: TGATCGTTTAAGGAATTTTG FREP _B RV: GAAGATCAGTCACACCATCC	270pb
K	RNAI	K/B FW: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC K RV: TCTTTCACGAGCCCGCCAAA	160pb
B/O	RNAI	K/B FW: GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC B/O RV: TCTGCGTTCCGCCAAGTTCGA	159pb

As reações de multiplex PCR foram agrupadas de acordo com os tamanhos de fragmentos gerados. O primeiro multiplex foi para a detecção dos grupos H1, H2 e I1; o segundo multiplex detectou os grupos: X, L/M e N; o terceiro multiplex os grupos FIA, FIB e W; o quarto multiplex os grupos: Y, P e FIC e o quinto multiplex: A/C, T, FIIA. A detecção dos grupos F, K e B/O foi realizada em reações em separado.

A mistura da PCR multiplex foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA total contendo aproximadamente 25ng (extraído conforme tópico 3.2.1), 10 µl de água Milli-Q, 0,25 µl (5 pmoles) de cada um dos 3 pares de *primers* utilizados em cada reação, além de 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma).

Para as reações simplex, a mistura da PCR foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico contendo aproximadamente 25ng (extraído conforme tópico 3.2.1), 9,5 µl de água Milli-Q, 1,0 µl (20 pmoles) de cada primer e 12,5 µl do JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix (Sigma).

Para as condições de amplificação foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 60°C para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C.

Após a amplificação por PCR, a detecção dos fragmentos gerados tanto no PCR multiplex quanto nas reações simplex foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 1,5% em TBE 0,4X. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L) e observado sob luz ultravioleta em equipamento L-Pix EX-Loccus biotecnologia.

3.8.2. Extração plasmidial

Foi realizada extração plasmidial utilizando metodologia baseada no método descrito por Kado e Liu em 1981 (120).

As amostras foram semeadas em placa de ágar Mueller Hinton (Oxoid), e foram incubadas a 37°C por 18-24 horas. Foi realizado um raspado da cultura bacteriana a ser testada com alça e este raspado foi suspenso em microtubos contendo 200 uL de solução de lise com pH ajustado (SDS 0,1M; TRIS 0,05M; pH12,6). As amostras foram incubadas em banho-maria a 55°C, sempre homogeneizando a mistura bactéria/solução de lise a cada 20 minutos. Após o período de uma hora, as amostras foram retiradas do banho-maria e ao microtubo foi adicionado 200 uL de fenol-clorofórmio não tamponado (1:1). Esta mistura foi homogeneizada até que se tornasse de coloração esbranquiçada e em seguida, foi centrifugada por 15 minutos (aproximadamente a 13.000 rpm). O sobrenadante translúcido foi cuidadosamente transferido para outro microtubo.

Para corrida eletroforética, foi adicionado em cada uma das amostras, o tampão de corrida azul de bromocresol (0,2 volumes), misturando com movimentos circulares e suaves. Esta mistura foi depositada nos poços do gel de agarose (0,8%) (Invitrogen) e em seguida este gel foi submetido a ensaio de eletroforese em tampão TAE 1x (Tris-Acetato 40mM; EDTA 1mM; pH8,0), com corrente de 50 volts por 2 horas e meia. O gel foi em seguida corado com brometo de etídio (0,5g/L) por 30 minutos e depois fotografado sobre luz UV. Os géis gerados foram analisados com ajuda do software *GelCompar II* (versão) e *Loccus LabImage* (versão).

3.8.3. Hibridização com sonda do gene *bla_{KPC}* e com as sondas dos grupos plasmidiais mais prevalentes.

Esta metodologia visa elucidar se o gene *bla_{KPC}* estava localizado em plasmídios nas amostras. Em caso positivo, foi analisado a que grupo plasmidial pertencia o plasmídio contendo o gene *bla_{KPC}*, através da hibridização das membranas com as sondas dos grupos plasmidiais mais prevalentes, de acordo com as reações de PCR.

A técnica utilizada foi a descrita por Sambrook & Russell em 2001 (121), e baseia-se na transferência de DNA contido em gel de agarose para membranas de nylon, e a posterior hibridização dessas membranas com sondas marcadas com digoxigenina. As sondas foram confeccionadas por PCR, utilizando além dos desoxinucleotídeos usuais, um nucleotídeo marcado com digoxigenina, 11-dUTP (Roche).

O primeiro passo foi a realização da extração plasmidial, como descrita acima. De posse do gel contendo os plasmídios, realizamos a transferência do DNA do gel para a membrana Hybond N+ (Amershan) através do equipamento VacuGene™ XL Vacuum Blotting System (GE Healthcare). Este sistema é composto de uma bomba de vácuo (mantido a uma pressão de 50 mbar durante a transferência) e um aparato onde o gel e a membrana são colocados. Durante a transferência, o gel foi primeiramente tratado com a solução de depurinação (HCl 0,25 M) por 10 minutos. Após esse tempo, essa solução foi retirada e foi adicionado ao gel a solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N), também por 10 minutos. Essa solução foi também retirada e adicionou-se a solução de neutralização (Tris-HCl 0,5 M pH 8,0 e NaCl 1,5 M) por 10 min. Por último, após a retirada da última solução, foi adicionado SSC 20 X (NaCl 3,0M; Citrato de sódio 0,3M), de modo a cobrir toda a superfície do gel, por 2 horas. Depois da etapa de transferência, a membrana foi exposta a

radiação ultravioleta (UV Crosslinker, Hoefer) por aproximadamente 20 segundos para fixação dos fragmentos de DNA. A membrana foi secada e guardada para utilização posterior.

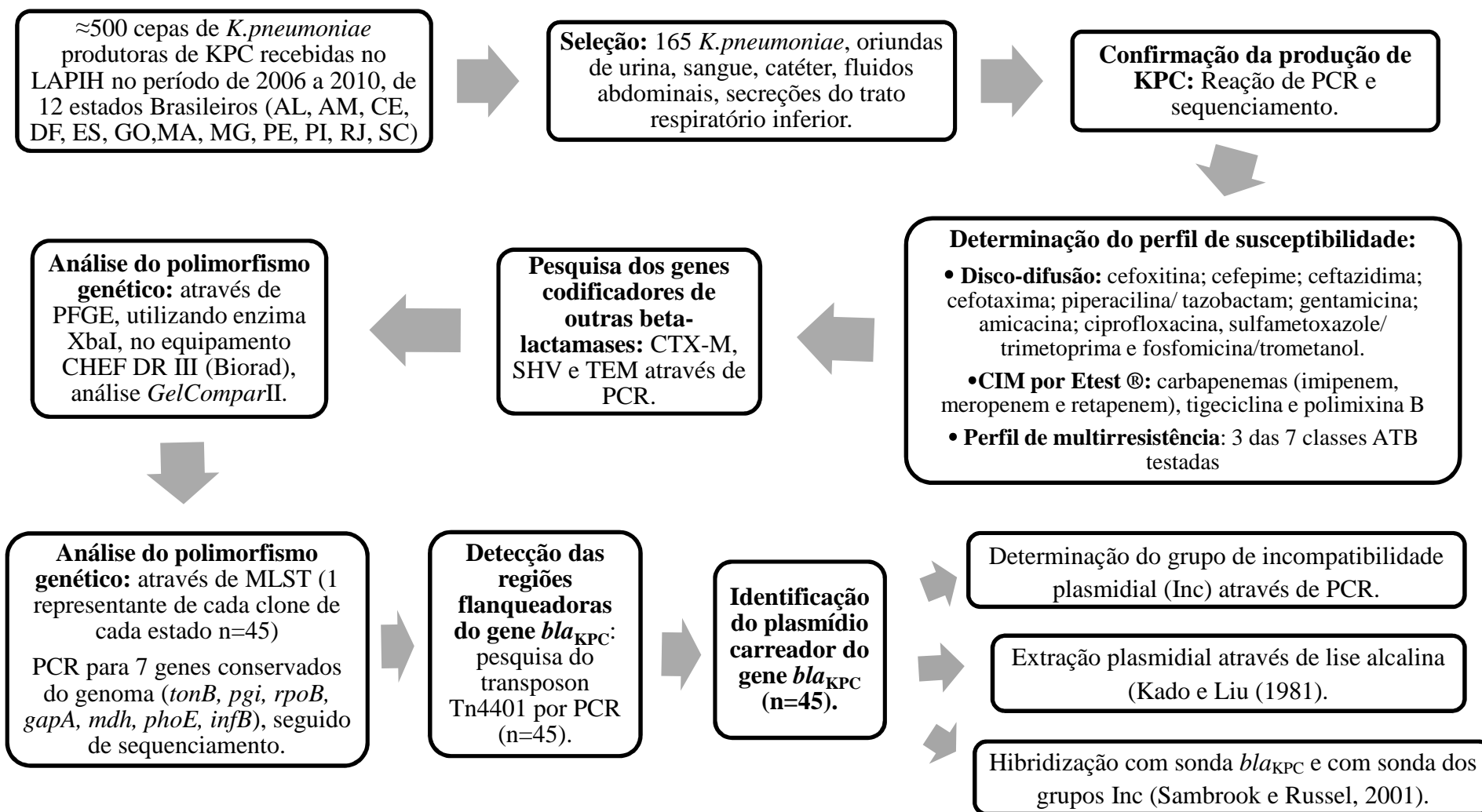
Após a transferência e fixação, deu-se início as etapas de hibridização. Inicialmente, as membranas foram incubadas em 10 mL solução de pré-hibridização [5X SSC, 2% agente bloqueador (Roche), 0,1% N-laurilsarcosil, 0,02% SDS] durante 1 hora a 62°C sob agitação, no forno de hibridização (Techne hybridiser HB-1D, Techne, Cambridge, U.K.). Um volume de 50 µL da sonda marcada preparada anteriormente foi desnaturado por fervura durante 10 minutos seguido de banho de gelo por cinco minutos. Após a etapa de pré-hibridização, a solução foi retirada e adicionou-se ao frasco 10 mL de solução de hibridização (10mL solução de pré-hibridização acrescida de 50µL da sonda desnaturada). A hibridização ocorreu no forno de hibridização, a 62° C, *overnight*.

No dia seguinte, as membranas foram lavadas com solução de baixa estringência (2X SSC, 0,1% SDS) por duas vezes durante 5 minutos a temperatura ambiente sob agitação. Em seguida, foram lavadas por duas vezes com solução de alta estringência (0,1% SSC; 0,1% SDS) a 62°C com agitação por 15 minutos.

Após, a membrana foi rinsada em tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl). Esta etapa foi seguida da incubação por 30 minutos da membrana em tampão 2 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% agente bloqueador), sob agitação. Realizou-se então tratamento da membrana com 25 mL de solução de anticorpo (25 mL tampão 1 e 5µL de anticorpo contra DIG conjugado a fosfatase alcalina - Roche), por 30 minutos sob agitação. Após, a membrana foi lavada por duas vezes com tampão 1 por 10 minutos sob agitação.

Para revelação, a membrana foi equilibrada por 2 minutos em tampão 3 (100 mM Tris-base; 100 mM NaCl; 50mM MgCl₂, pH 9,5). Depois, à membrana foram adicionados 15 mL da solução de revelação NBT (*Nitro blue tetrazolium chloride* - Roche), mantido a 37° C, ao abrigo de luz. O resultado pode ser observado de 2-24 horas após a adição do agente revelador. As membranas foram secas em estufa e guardadas em local seco ao abrigo de luz.

3.9. Fluxograma da metodologia



4. RESULTADOS

4.1. Amostras bacterianas

Foram estudadas 165 amostras no período de 2006 a 2010, uma de cada paciente, isoladas de materiais clínicos, sendo os mais prevalentes sangue (39%) e urina (37%). As amostras foram oriundas de doze estados brasileiros, sendo a maioria isolada no Rio de Janeiro (41% - n=68) e Distrito Federal (23% - n=39) (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Espécimes clínicos e estados de origem das 165 amostras de *K. pneumoniae* produtores de KPC.

Espécimes Clínicos	Número de amostras isoladas nos Estados – Regiões Geográficas												Total n(%)
	Norte e Nordeste						Sudeste e Sul				Centro-Oeste		
	AL	AM	CE	PE	MA	PI	ES	MG	RJ	SC	DF	GO	
Catéter vascular					1		1		9	1	10		22(13)
Líq. Abdom.				1			1	2	2				6(10)
Urina			4	2	1		8	5	28	5	7	1	61(37)
Sangue		1	7	5			1	3	23	1	20	3	64(39)
SRI				1		1			5		2	1	10 (6)
ND	1								1				2(1)
Total: n(%)	1 (0,6)	1 (0,6)	11 (7)	9 (5,5)	2 (1,2)	1 (0,6)	11 (7)	10 (6)	68 (41)	7 (4)	39 (23)	5 (3)	165(100)

Legenda: Líq. Abdom. = Líquidos abdominais; SRI = secreções do trato respiratório inferior; ND= não determinado.

A confirmação da produção e identificação da variante alélica do gene *bla_{KPC}* foi realizada por PCR seguido de sequenciamento em todas as 165 amostras incluídas no estudo. Através de sequenciamento, todas as amostras apresentaram 100% de similaridade com a variante alélica KPC-2.

4.2. Determinação do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.2.1. Difusão em ágar

Através do teste de difusão em ágar, foram observados altos percentuais de resistência a grande parte dos beta-lactâmicos testados. Observamos que 64,2% das amostras foram resistentes à cefalosporina de segunda geração, a cefoxitina. Já em relação às de terceira e quarta geração como cefotaxima, ceftazidima e cefepime, observamos 96%, 75% e 70% de resistência respectivamente. Quando as nossas amostras foram submetidas ao beta-lactâmico

piperacilina associado ao inibidor de beta-lactamases, tazobactam, observamos o maior percentual de resistência entre as drogas testadas: 99,4%.

Em relação às outras classes de antimicrobianos testadas, observamos 95,7% e 84,2% de resistência às quinolonas e sulfamidas, respectivamente. Os antimicrobianos que apresentaram menores taxas de resistência foram: fosfomicina (7,8%), amicacina (34%) e gentamicina (57%) (Figura 4.1).

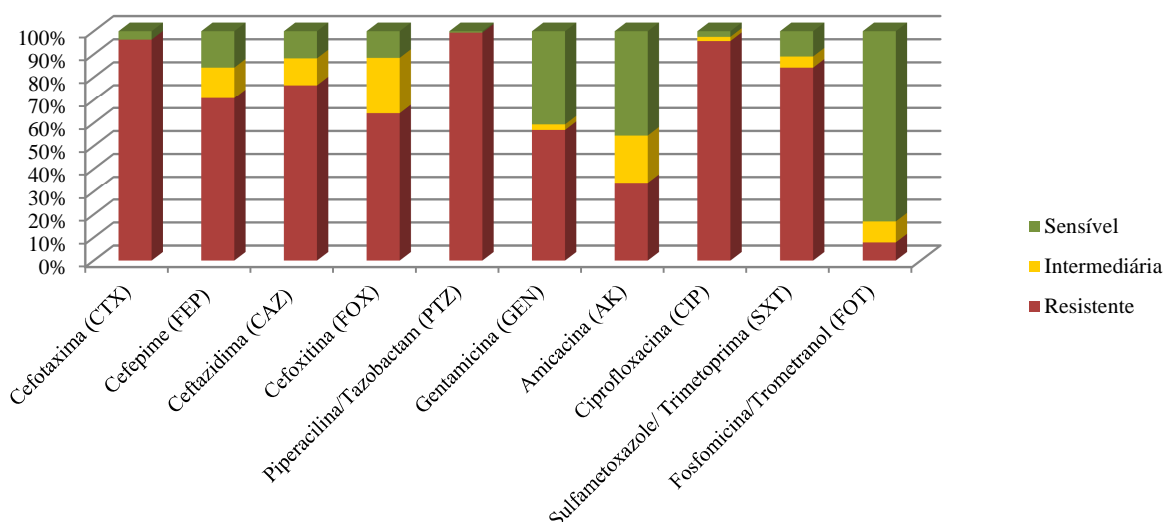


Figura 4.1: Susceptibilidade aos antimicrobianos de 165 cepas de *K.pneumoniae* produtores de KPC realizada através do método de difusão em ágar

4.2.2 Determinação da concentração inibitória mínima de carbapenemas, tigeciclina e polimixina B.

A determinação da concentração inibitória mínima através de Etest mostrou que todas as amostras foram resistentes ao ertapenem, 90% ao meropenem e 86% resistentes ao imipenem, com CIM₅₀ de ≥ 32 ug/mL para todos os carbapenemas. As amostras sensíveis a imipenem e meropenem, apresentaram CIM variando de 0,5 a 1 ug/mL (Figura 4.2).

Em relação à tigeciclina e polimixina B, 38% e 11% se mostraram resistentes a essas drogas, respectivamente. A CIM₅₀ e CIM₉₀ frente à polimixina foi 0.75 e 4.0 ug/mL, enquanto que para a tigeciclina, observou-se 2.0 e 6.0 ug/mL respectivamente (Figura 4.3).

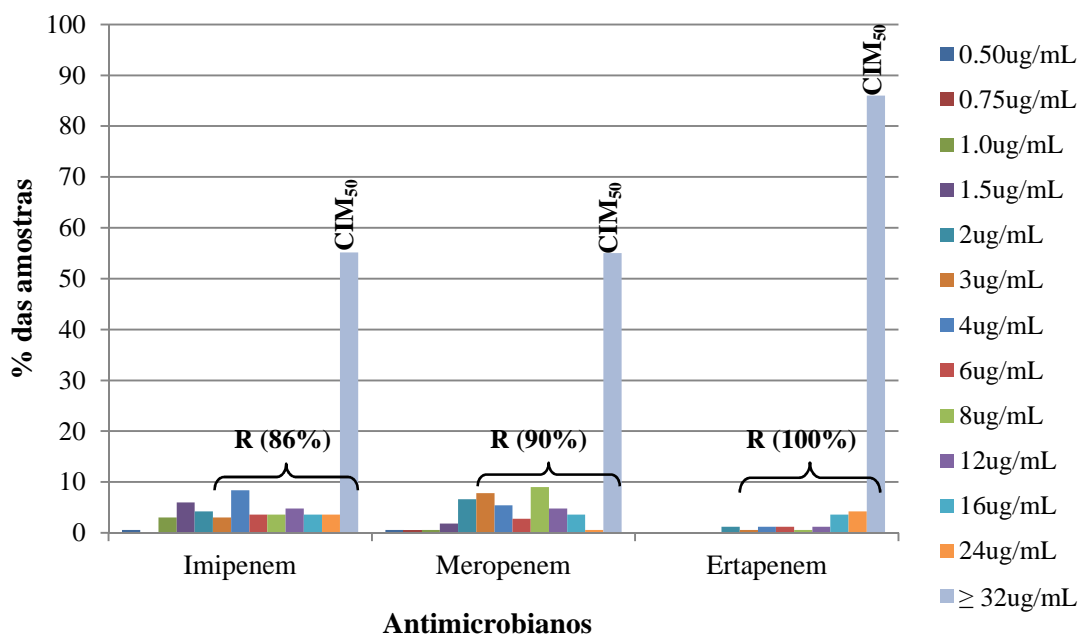


Figura 4.2: Concentrações inibitórias mínimas frente ao imipenem, meropenem e ertapenem nas 165 amostras produtoras de KPC. Critérios de interpretação segundo a Nota técnica da Anvisa, nº 1/2010: Sensibilidade para IMI e MEM < 1ug/mL, Intermediário IMI e MEM = 2ug/mL, Resistencia para IMI e MEM ≥ 4ug/mL; Sensibilidade para ERT < 0,5ug/mL, Intermediário para ERT = 0,5ug/mL, Resistencia para ERT ≥ 2ug/mL.

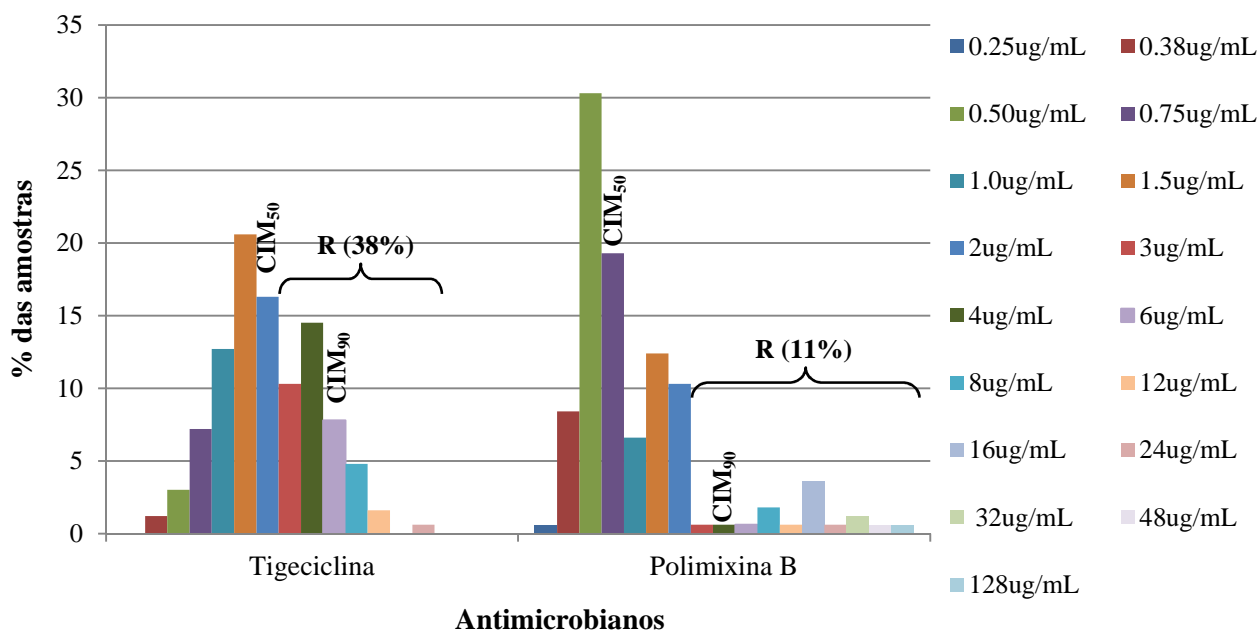


Figura 4.3: Concentrações inibitórias mínimas frente à tigeciclina e polimixina B nas 165 amostras produtoras de KPC. Critérios de interpretação segundo a Nota técnica da Anvisa, nº 1/2010: Sensibilidade para TIG < 1ug/mL, Intermediário para TIG = 2ug/mL, Resistencia para TIG ≥ 4ug/mL; Sensibilidade para POL < 2ug/mL, Resistencia para POL ≥ 4ug/mL.

4.2.3 Análise de perfil de multirresistência

Segundo o critério adotado, onde o perfil de multirresistência foi definido como resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos, observamos que a maioria das amostras 97% (n= 160) apresentou este perfil. Todas as amostras apresentaram resistência à classe dos beta-lactâmicos, pois todas apresentaram resistência ao ertapenem. Três amostras (1,8%) foram resistentes a todas as classes de antimicrobianos, 9 cepas (5,5%) foram sensíveis apenas a fosfomicina, 54 (32,8%) sensíveis somente a fosfomicina e polimixina B e 20,6% (n=34) sensíveis somente a fosfomicina, polimixina e tigeciclina (Tabela 4.2).

Tabela 4.2: Perfil de resistência das 165 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC estudadas.

Nº classes apresentando resistência	Classe Antimicrobianos							Nº cepas
	Beta-lactâmicos CEF/ CARB/ BLA+INIB	Aminoglic. AK/GN	Sulfam. SXT	Quinol. CIP	Glicilc. TIG	Polimixina B PB	Ac. Fosfônico FOSE	
7	R	R	R	R	R	R	R	3
6	R	R	R	R	R	R	S	9
6	R	R	R	R	R	S	R	8
6	R	R	R	R	S	R	R	1
5	R	R	R	R	R	S	S	54
5	R	R	R	R	S	R	S	2
5	R	R	R	R	S	S	R	11
5	R	R	S	R	R	R	S	1
5	R	S	R	R	R	S	R	3
4	R	R	R	R	S	S	S	34
4	R	S	R	R	R	S	S	10
4	R	S	R	R	S	S	R	1
3	R	R	S	R	R	S	S	1
3	R	R	R	S	S	S	S	1
3	R	R	S	R	S	S	S	7
3	R	S	R	R	S	S	S	10
3	R	S	S	R	R	S	S	2
3	R	S	S	R	S	R	S	1
3	R	S	S	R	S	S	R	1
2	R	S	S	R	S	S	S	2
2	R	S	S	S	S	R	S	1
2	R	S	S	S	S	S	R	1
2	R	R	S	S	S	S	S	1

Legenda= CEF: cefalosporinas, CARB: carbapenemas, BLA+INIB: beta-lactâmico associado a inibidor, Aminoglic.: aminoglicosídeos, Sulfam.: sulfamidas, Quinol.: quinolonas, Glicilc.: Glicilciclinas, Ac. Fosfônico: derivadas do ácido fosfônico.

4.3. Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases.

A pesquisa dos genes codificadores das beta-lactamases CTX-M, SHV e TEM foi realizada em todas as 165 amostras produtoras de KPC. Observamos alta prevalência dos genes *bla*_{CTX-M} (71%, n=117), *bla*_{SHV} (97%, n=160), *bla*_{TEM} (88,5%, n=146) entre as cepas.

Observamos associação de genes de beta-lactamases em 155 cepas, sendo a associação de *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} a mais prevalente (62,4% das amostras). Em duas amostras não foi observado nenhum dos genes pesquisados (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Associação de genes de beta-lactamases detectados nas 165 cepas de *K.pneumoniae* estudadas.

Perfil de produção de beta-lactamases	N° Amostras (%)
CTX-M(+),SHV(+),TEM(+)	103 (62,4)
CTX-M(+),SHV(+),TEM(-)	11 (6,7)
CTX-M(+),SHV(-),TEM(+)	1 (0,6)
CTX-M(+),SHV(-),TEM(-)	1 (0,6)
CTX-M (-),SHV(+),TEM(+)	40 (24,3)
CTX-M (-),SHV(+),TEM(-)	6 (3,7)
CTX-M (-),SHV(-),TEM(+)	1 (0,6)
CTX-M (-),SHV(-),TEM(-)	2 (1,2)

4.4. Análise do polimorfismo genético através de PFGE.

Foi observado um total de 28 grupos clonais (nomeados de A até AB) nas 165 amostras incluídas nesse estudo, considerando-se pertencentes ao mesmo grupo clonal amostras com no mínimo 80% de similaridade, com auxílio do software *GelComparII* (versão 1.50), utilizando o coeficiente de Dice. Os três grupos clonais mais prevalentes foram o A (67/165 -40,6%), seguido do C (38/165 -23%) e Q (16/165 – 9,7%) (Figura 4.4).

Seis grupos clonais foram encontrados em mais de um estado. Foram eles: grupo A (Ceará, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina), grupo C (Ceará, Distrito Federal, Minas Gerais, Goiás, Pernambuco e Rio de Janeiro), grupo Q (Alagoas, Espírito Santo, Distrito Federal e Piauí), grupo G (Espírito Santo e Distrito Federal), grupo K (Goiás e Minas Gerais) e grupo Y (Ceará, Minas e Pernambuco).

Observamos que o estado do Rio de Janeiro foi o que obteve um maior número de grupos clonais distintos dentro de seu território (nove grupos clonais em 68 amostras), seguido pelo Distrito Federal (sete grupos clonais em 39 amostras) e Espírito Santo (seis grupos clonais em 11 amostras). No Rio de Janeiro e Espírito Santo, apesar da grande diversidade clonal observada, grande parte das amostras pertencia ao grupo clonal A: 76%

(n=52) e 54% (n=6) respectivamente. No Distrito Federal, os grupos C (48%, n=19) e Q (8%, n=13) foram os mais prevalentes.

Abaixo podemos observar a lista de estados e o número de grupos clonais encontrados em cada um deles (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Distribuição dos genótipos de *K. pneumoniae* produtores de KPC nos estados brasileiros estudados.

Grupos Clonais	Estados – Regiões Geográficas											Total n(%):	
	Norte e Nordeste						Sudeste e Sul				Centro-Oeste		
	AL	AM	CE	PE	MA	PI	ES	MG	RJ	SC	DF		GO
A			2				6		52	7			67 (40,6)
B									3				3 (1,8)
C			4	5				7	1		19	2	38 (23,0)
D							1						1 (0,6)
E									2				2 (1,2)
F												1	1 (0,6)
G							1				1		2 (1,2)
H									1				1 (0,6)
I									1				1 (0,6)
J									3				3 (1,8)
K								1				1	2 (1,2)
L											2		2 (1,2)
M									1				1 (0,6)
N											2		2 (1,2)
O											1		1 (0,6)
P			3										3 (1,8)
Q	1					1	1				13		16 (9,7)
R									4				4 (2,4)
S		1											1 (0,6)
T											1		1 (0,6)
U												1	1 (0,6)
V							1						1 (0,6)
W							1						1 (0,6)
X								1					1 (0,6)
Y			2	1				1					4 (2,4)
Z					2								2 (1,2)
AA				1									1 (0,6)
AB				2									2 (1,2)
Total:	1	1	11	9	2	1	11	10	68	7	39	5	165 (100)
n(%):	(0,6)	(0,6)	(6,6)	(5,4)	(1,2)	(0,6)	(6,6)	(6)	(41,2)	(4,2)	(23)	(3)	

Agrupamos os grupos clonais em dendrograma com auxílio do software *GelComparII*, que podem ser observados na figura 4.4, onde estão representados os 28 perfis de fragmentação distintos, representativos dos grupos clonais encontrados em nosso trabalho.

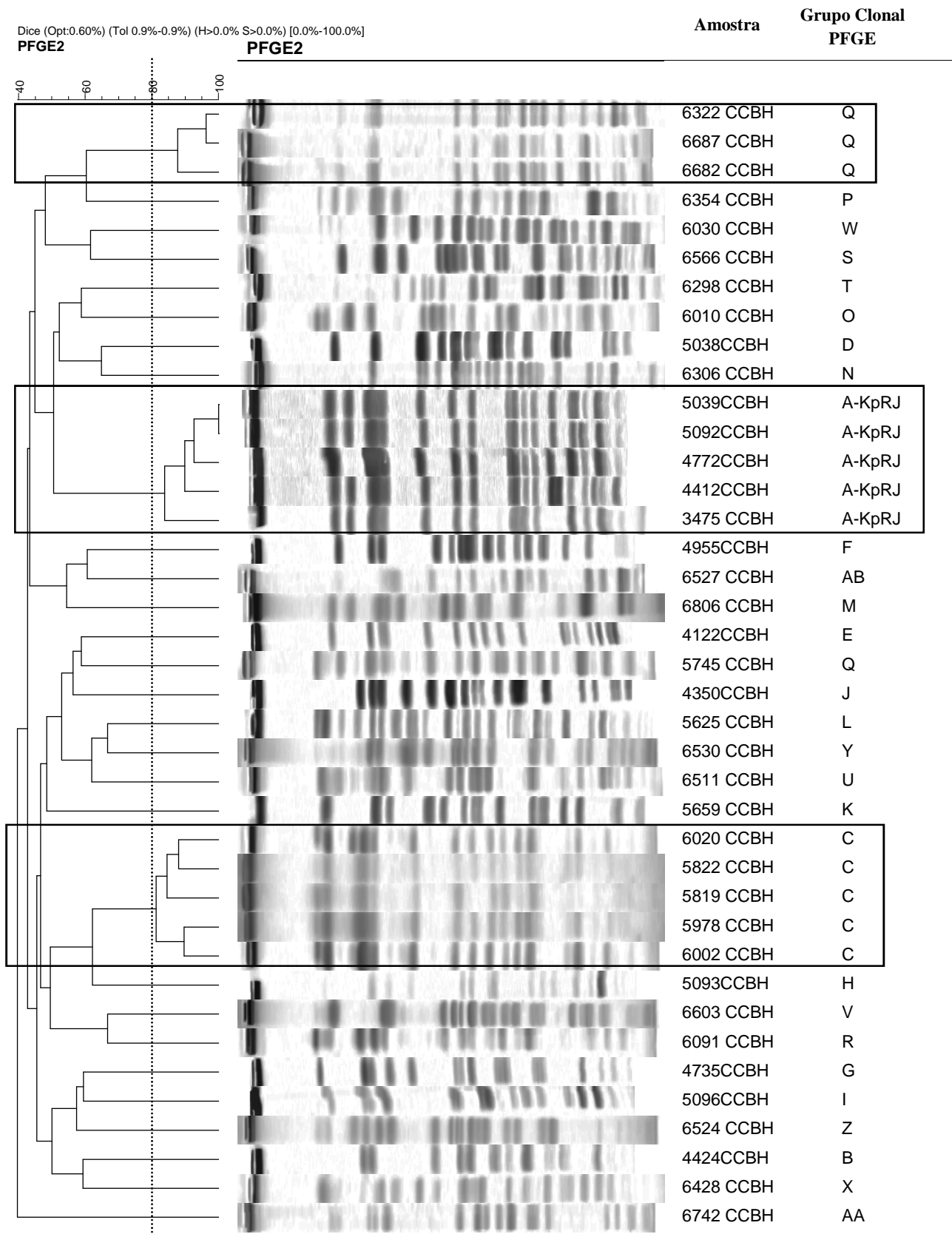


Figura 4.4: Dendrograma representativo dos 28 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 165 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC, onde podemos observar em destaque os grupos de clones mais prevalentes: A-KpRj, C e Q.

4.5. Análise do polimorfismo genético através de MLST.

A partir da análise da tipagem genética por PFGE, foi selecionado pelo menos um representante de cada clone de cada estado para serem processadas pelo MLST para a definição do “sequence type”, totalizando 45 amostras. Os resultados obtidos pelo MLST foram congruentes aos resultados de PFGE, onde cada perfil diferente designado por PFGE foi relacionado a um clone diferente por MLST (Tabela 4.5).

Os genótipos mais prevalentes por PFGE A/KpRj, C e Q foram designados por MLST como ST437, ST11 e ST340 respectivamente.

Os genes onde se observou um maior número de alelos diferentes foi o *tonB* (21 alelos) e *phoE* (14 alelos). Nos demais genes, observamos 10 alelos distintos no *pgi*, 9 diferentes no *infB* e 7 alelos distintos para os genes *rpoB*, *mdh* e *gapA*. (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Relação dos genótipos encontrados (PFGE) e dos respectivos “*sequence types*” e perfis alélicos correspondentes das 45 amostras de *K.pneumoniae* em que o MLST foi realizado.

N° CCBH	Estado	Perfil PFGE	CC	ST	Perfil alélico						
					<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
CCBH3589	RJ	A-Kp-RJ	CC11	437	3	3	1	1	1	1	31
CCBH 4640	RJ	A-Kp-RJ	CC11	437	3	3	1	1	1	1	31
CCBH 4698	ES	A-Kp-RJ	CC11	437	3	3	1	1	1	1	31
CCBH 5623	SC	A-Kp-RJ	CC11	437	3	3	1	1	1	1	31
CCBH 6366	CE	A-Kp-RJ	CC11	437	3	3	1	1	1	1	31
CCBH 5112	MG	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 5238	PE	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 5658	GO	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 5982	DF	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 5991	DF	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6209	DF	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6370	CE	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6633	DF	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6740	PE	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6798	RJ	C	CC11	11	3	3	1	1	1	1	4
CCBH 6354	CE	P	CC11	757	3	3	1	1	1	1	22
CCBH 5641	ES	Q	CC11	340	3	3	1	1	1	1	18
CCBH 5745	DF	Q	CC11	340	3	3	1	1	1	1	18
CCBH 6556	AL	Q	CC11	340	3	3	1	1	1	1	18
CCBH 6527	PE	AB	CC11	855	3	3	1	1	1	1	26
CCBH 4350	RJ	J	CC16-17	16	2	1	2	1	4	4	4
CCBH 6030	ES	W	CC16-17	17	2	1	1	1	4	4	4
CCBH 6511	GO	U	CC758-840	840	2	1	1	1	7	1	9
CCBH 6524	MA	Z	CC758-840	758	2	1	1	1	7	1	19
CCBH 4424	RJ	B	-	423	2	9	2	65	13	1	16
CCBH 5038	ES	D	-	443	2	1	1	4	89	4	4
CCBH4122	RJ	E	-	105	2	3	2	1	1	4	18
CCBH 4955	GO	F	-	442	10	20	2	1	9	11	14
CCBH 4735	ES	G	-	25	2	1	1	1	10	4	13
CCBH 6707	DF	G	-	25	2	1	1	1	10	4	13
CCBH 5093	RJ	H	-	101	2	6	1	5	4	1	6
CCBH 5096	RJ	I	-	70	2	6	17	1	20	10	25
CCBH 5659	GO	K	-	138	18	22	26	23	31	13	49
CCBH 5625	DF	L	-	755	4	1	1	1	25	1	35
CCBH 6806	RJ	M	-	760	2	1	71	1	4	3	18
CCBH 6306	DF	N	-	839	3	1	1	1	9	4	177
CCBH 6010	DF	O	-	837	29	24	21	27	44	22	175
CCBH 6091	RJ	R	-	756	2	9	1	1	13	1	10
CCBH 6566	AM	S	-	841	18	15	64	59	11	13	51
CCBH 6298	DF	T	-	838	16	24	21	49	47	22	176
CCBH 6603	ES	V	-	842	18	67	26	63	142	1	169
CCBH 5788	MG	Y	-	13	2	3	1	1	10	1	19
CCBH 6428	MG	X	-	323	2	1	1	1	9	1	93
CCBH 6530	PE	Y	-	13	2	3	1	1	10	1	19
CCBH 6742	PE	AA	-	759	2	1	1	6	7	1	4

Treze novos STs, que não haviam sido adicionados ao banco de dados do Instituto Pasteur (Paris) foram observados entre as nossas amostras. Os novos STs descritos foram: ST755, ST756, ST757, ST758, ST759, ST760, ST837, ST838, ST839, ST840, ST841, ST842 e ST855.

Observamos cinco novos alelos entre quatro desses novos STs. Em três deles, ST837, ST838 e ST839, o novo alelo observado foi do gene *tonB* (alelos 175, 176 e 177

respectivamente). No ST 842 observou-se um novo alelo do gene *infB* (alelo 67) e do gene *phoE* (alelo 142).

No banco de dados de MLST, existem, até a data de 05/01/12, 861 STs descritos. Dessa forma, com a ajuda do software *Eburst* disponível *on line* (<http://eburst.mlst.net/>), realizamos análise filogenética. As imagens geradas pelo software, onde podemos observar todos os STs descritos até o momento e conseqüentemente a proximidade filogenética dos nossos STs com os outros STs incluídos no banco de dados se encontram na figura 4.5. Os STs encontrados em nosso trabalho estão marcados em vermelho.

Considerando amostras pertencentes ao mesmo complexo clonal aquelas que apresentam diferença em apenas um *locus*, observamos três complexos clonais entre os 28 STs encontrados, o CC11 contendo os STs: ST11, ST340, ST437, ST757, ST855, o CC16-17, contendo os ST16 e ST17 e o CC758-840, contendo os STs 758 e ST840 (Figura 4.6).

Realizamos análise comparando cada um dos 28 STs descritos no trabalho com os 861 STs incluídos no banco de dados (presentes até 05/01/12). Observamos que 22 dos 28 STs (78,5%) apresentavam variação em apenas um *locus* com outros STs já descritos, ou seja, um clone considerado próximo filogeneticamente, quando comparados a todos os STs presentes no banco de dados (Figura 4.7).

As cepas pertencentes aos CC11, CC16-17 e CC758-840 permaneceram agrupadas juntamente com outras amostras. No CC11, além das cepas oriundas do nosso trabalho (ST11, ST340, ST437, ST757, ST855), observamos mais 11 STs (ST270, ST258, ST524, ST572, ST690, ST731, ST751, ST833, ST859, ST864). Neste mesmo complexo se encontra o ST258, que tem sido descrito como o clone epidêmico predominante produtor de KPC.

As cepas do CC16-17 ficaram agrupadas junto com mais cinco STs: ST60, ST109, ST294, ST657 e ST845. Já as cepas do CC758-840, foram agrupadas juntamente com outros três STs: ST 398, ST485, ST514.

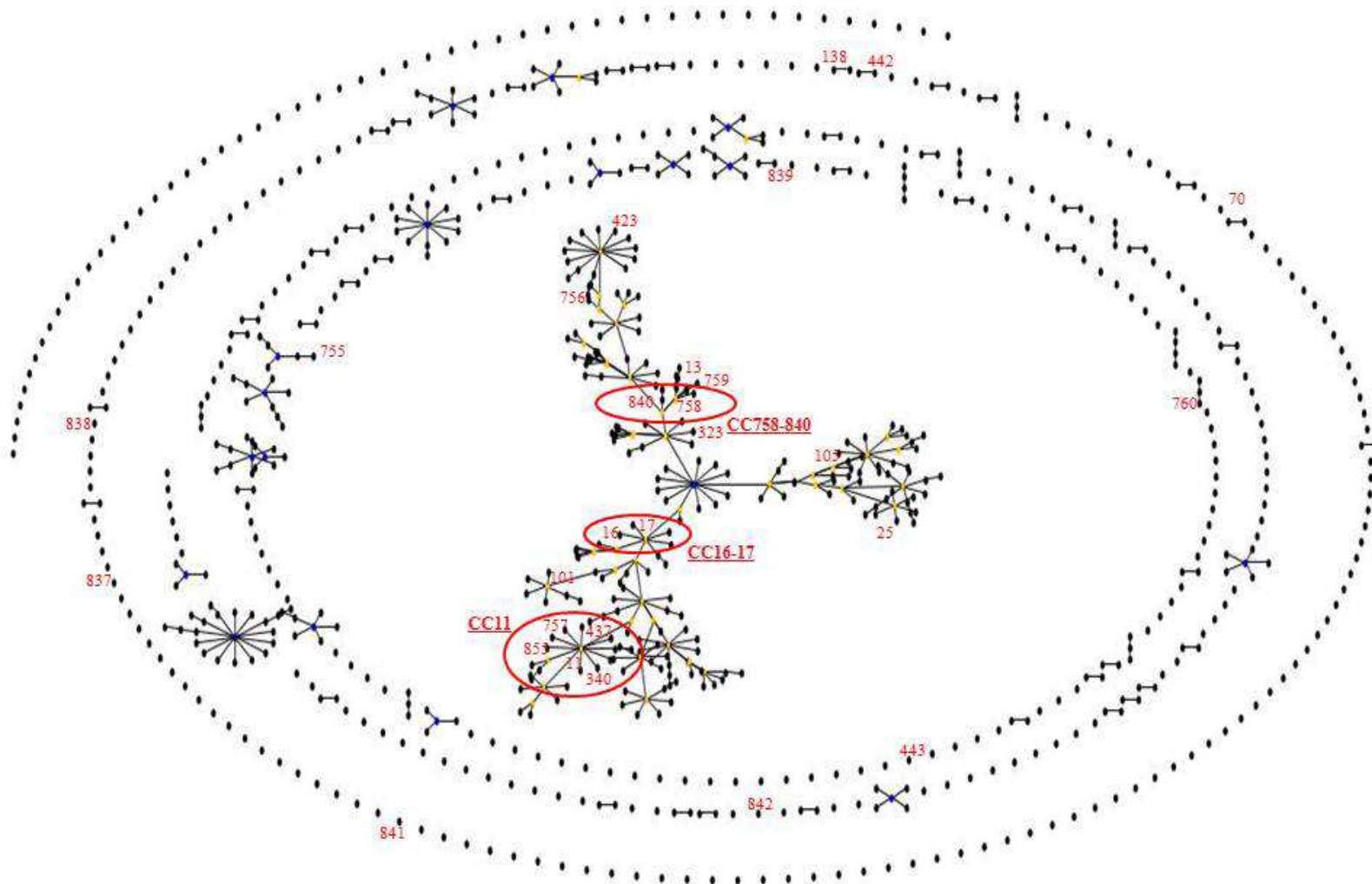


Figura 4.5: Figura gerada pelo software *Eburst*, onde podemos observar todos os STs de *K.pneumoniae* descritos até o momento (05/01/12). Destacados em vermelho estão os STs observados em nosso trabalho, assim como os respectivos complexos clonais aos quais pertencem.

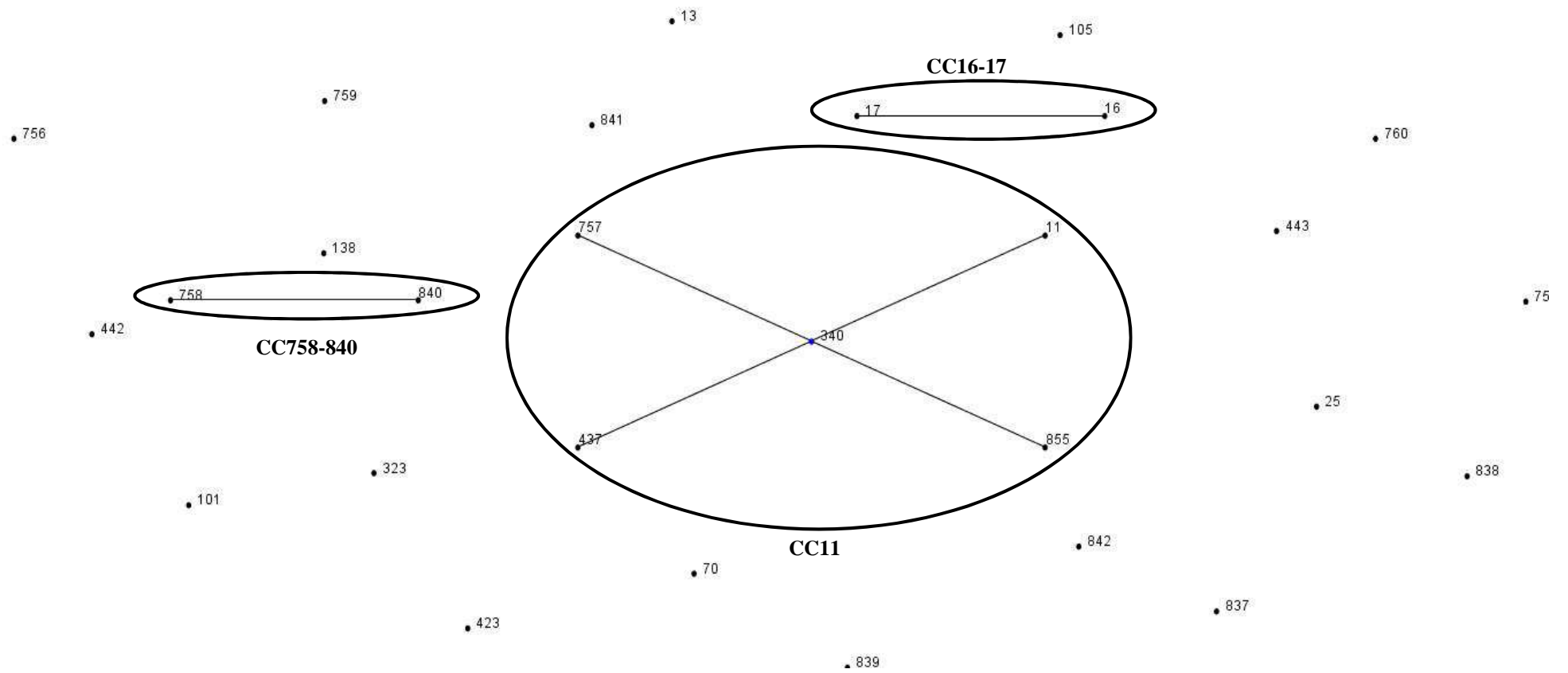


Figura 4.6: Figura gerada pelo software *Eburst*, onde podem ser observados os 28 STs descritos neste trabalho e os três complexos clonais encontrados: CC11, o CC16-17 e o CC758-840.

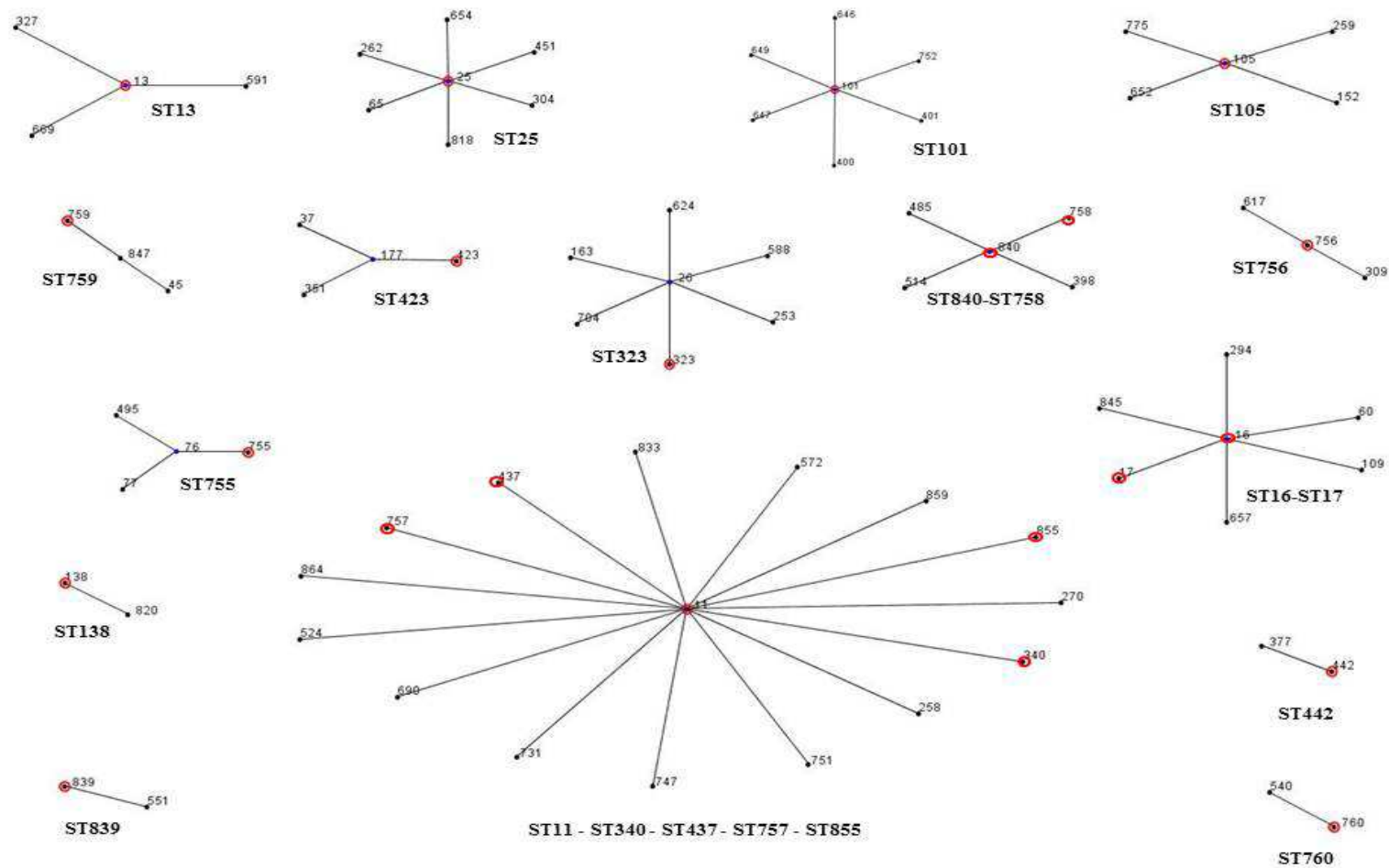


Figura 4.7: Figura gerada pelo software *Eburst*, onde podemos observar os 22 STs que apresentaram variantes em apenas um *locus* quando comparados ao banco de dados.

Os STs encontrados no nosso estudo, pertencentes ao complexo CC11, apresentaram diferenças nucleotídicas no gene *tonB*. Realizando alinhamento dos alelos, juntamente com o ST epidêmico ST258, encontramos sete diferenças nucleotídicas entre eles. Em 4 posições (95, 118, 288, 327) foi observada uma transição, ou seja mudança de nucleotídeos da mesma classe, (purina para purina ou pirimidina para pirimidinas). Nas outras 3 posições (85, 297, 370) foi observado o fenômeno de transversão, ou seja mudanças de purina para pirimidina ou vice-versa (Figura 4.8 e Tabela 4.6).

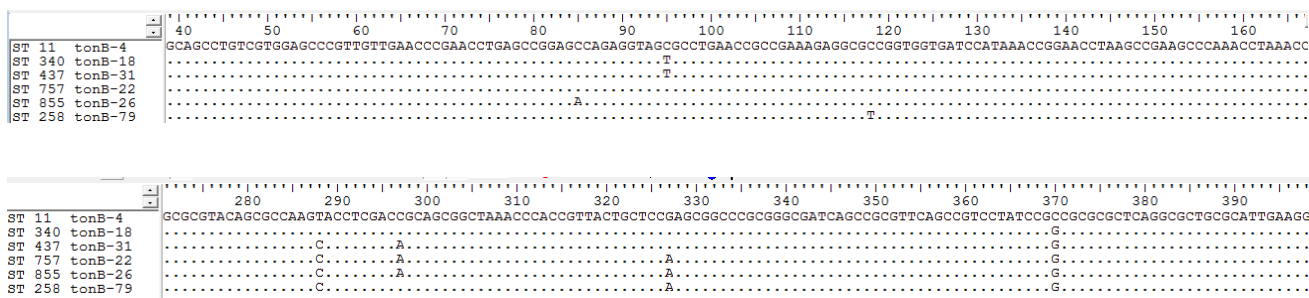


Figura 4.8: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos *tonB* do CC11.

Tabela 4.6: Diferenças nucleotídicas encontradas entre os alelos do gene *tonB* das cepas pertencentes ao CC11.

ST	Alelo <i>tonB</i>	Nucleotídeo encontrado							
		Posição:	85	95	118	288	297	327	370
ST11	4		C	C	C	T	C	G	C
ST340	18		C	T	C	T	C	G	G
ST437	31		C	T	C	C	A	G	G
ST757	22		C	C	C	C	A	A	G
ST855	26		A	C	C	C	A	A	G
ST258	79		C	C	T	C	C	A	G

Os STs pertencentes ao complexo CC16-17 apresentam somente uma diferença entre si, na posição 429 do gene *mdh*, onde foi observado o fenômeno de transição entre uma citosina e uma timina (Figura 4.9).

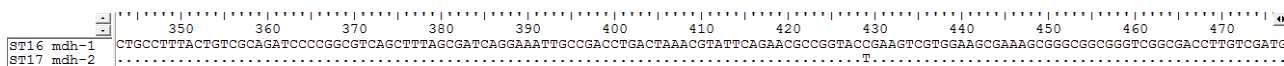


Figura 4.9: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos *mdh* do CC16-17.

Os STs pertencentes ao complexo CC758-840 também apresentaram somente uma diferença entre si, na posição 297 do gene *tonB*, onde foi observado o fenômeno de transversão entre uma adenina e uma citosina (Figura 4.10).

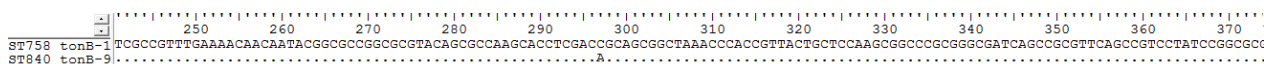


Figura 4.10: Figura exemplificando parte do alinhamento dos alelos *tonB* do CC758-840.

4.6. Detecção das regiões flanqueadoras do gene *bla_{KPC}*

A pesquisa do ambiente genético onde o gene *bla_{KPC}* está inserido foi realizada nas 45 amostras tipadas pelo PFGE e MLST. Em todas essas amostras, o gene *bla_{KPC}* se apresentou associado ao transposon *Tn4401*, onde foi possível amplificar as sequências *TnpA* e *ISKpn6*. Em 87% (39/45) das cepas, observamos a amplificação de 603 pb por PCR da região da sequência de inserção *ISKpn7*. Entretanto, em 13% (6/45) das cepas este componente do transposon não foi amplificado. Em todas as amostras não foi possível amplificar as sequências invertidas repetitivas IR, tanto da direita quanto da esquerda.

As amostras onde não foi possível amplificar a sequência *ISKpn7* pertenciam ao grupo clonal C/ST11 (n=5), oriundas de Minas Gerais, Distrito Federal, Ceará, Goiás e Pernambuco e ao grupo clonal K/ST138 (n=1), oriunda de Goiás.

Abaixo se encontram fotos alguns exemplos de géis de PCR realizados (Figura 4.11) e a Tabela 4.7 que apresenta com a distribuição dos clones em relação ao ambiente genético do gene *bla_{KPC}*.

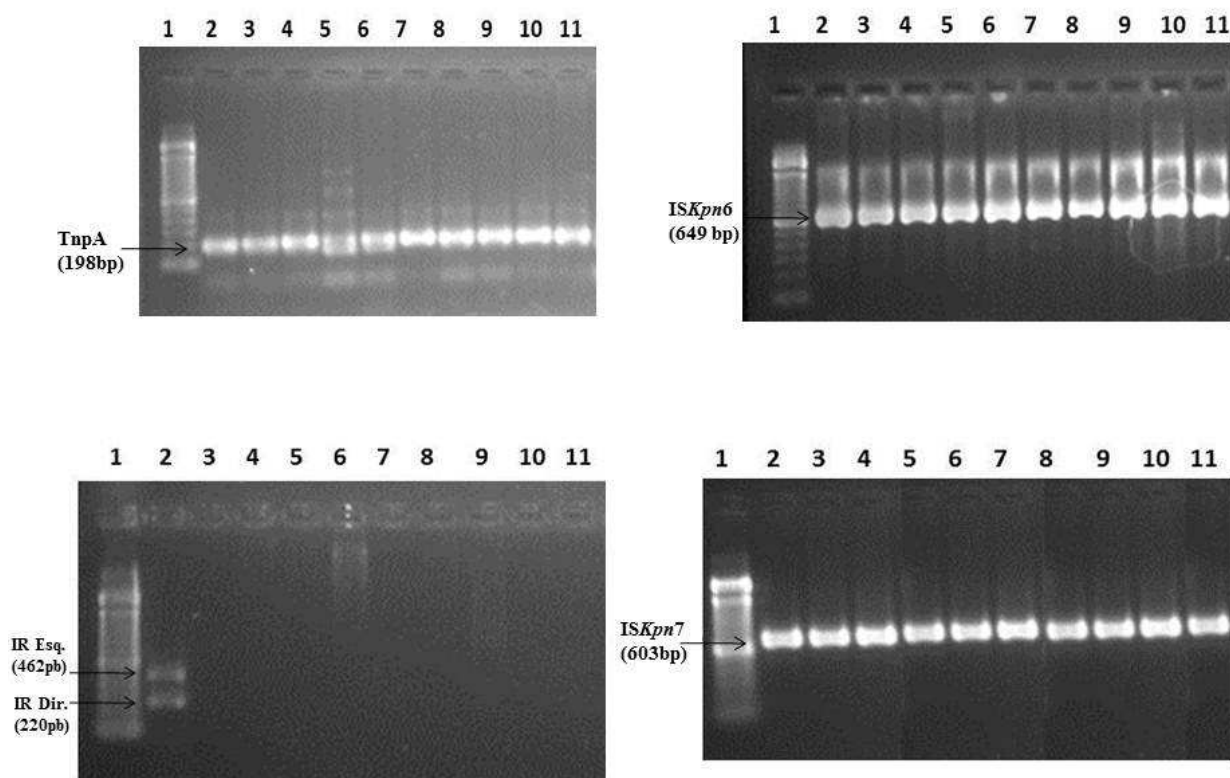


Figura 4.11: Imagens dos géis de PCR realizados para a detecção da região flanqueadora do gene *bla*_{KPC}. Legenda: 1- PM 100pb (Fermentas); 2- CCBH 8107 (Controle positivo *Tn4401*); 3- CCBH 3589; 4- CCBH 4640; 5- CCBH 4698; 6 – CCBH 4992; 7- CCBH 5092; 8-CCBH 5151; 9- CCBH 5629; 10- CCBH 5280; 11- CCBH 4424/ IR Esq.: IR Esquerda / IR Dir.: IR Direita.

Tabela 4.7: Relação dos clones definidos por PFGE/MLST em relação ao ambiente genético do gene *bla*_{KPC} (*Tn4401*).

Clone PFGE (MLST)	Estados	Partes do Transposon				
		TnpA	ISKpn6	ISKpn7	IR esquerda	IR direita
C (ST11) n=5	MG, DF, CE, GO, PE	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
C (ST11) n=5	DF, PE, RJ	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)
K (ST138) n=1	GO	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Demais clones	-	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)

4.7. Identificação do plasmídeo carreador do gene *bla_{KPC}*

4.7.1. Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial.

A pesquisa dos grupos de incompatibilidade plasmidial presentes nas amostras foi realizada nas 45 cepas tipadas pelo PFGE e MLST. O grupo de incompatibilidade plasmidial mais frequente foi o grupo N (37/45- 82,2%), seguido dos grupos FII (9/45 -20%), L/M (9/45 - 20%), e A/C (8/45 – 17,8%). Os percentuais de cada um dos grupos encontrados se encontram na tabela abaixo (Tabela 4.8).

Tabela 4.8: Relação dos grupos de incompatibilidade plasmidial encontrados nas 45 amostras de *K.pneumoniae* estudadas.

Grupo de Incompatibilidade	Frequência N(%)	Grupo de Incompatibilidade	Frequência N(%)
HI	1(1,8)	Y	-
HI2	1(1,8)	P	-
I1	-	FIC	1(1,8)
X	1(1,8)	A/C	8 (17,8)
L/M	9 (20)	T	-
N	37 (82,2)	FII _s	9 (20)
FIA	-	F _{repB}	-
FIB	-	K	-
W	-	B/O	1(1,8)

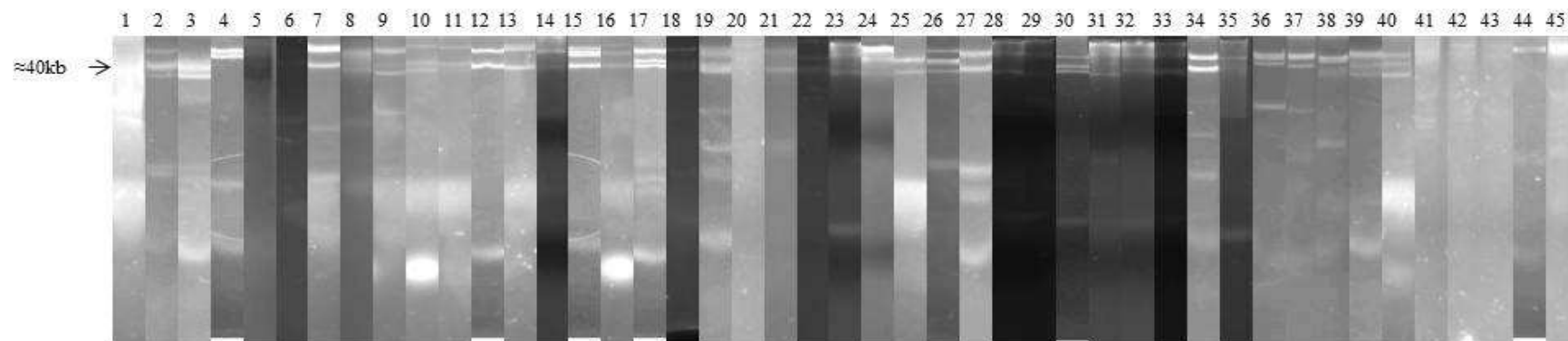
Correlacionando os grupos de incompatibilidade encontrados com os grupos clonais definidos por PFGE/MLST, observamos que todas as cepas dos complexos clonais CC16-17 e CC758-840 e maioria das cepas do CC11 apresentou grupo IncN, associados ou não a outros grupos de incompatibilidade. Apenas três amostras do grupo clonal C/ST11, uma do grupo clonal Q/ST340 e uma do P/ST757 não apresentaram amplificação do grupo IncN por PCR (Tabela 4.9).

Tabela 4.9: Relação dos perfis de grupos de incompatibilidade plasmidial em relação aos clones determinados por PFGE/MLST encontrados nas 45 amostras de *K.pneumoniae* estudadas.

Grupos Clonais/ ST	CC	Perfil de Grupos de Incompatibilidade plasmidial													Total perfis Inc. difer.:	
		N - HI1 HI2-	FIIa	N L/M	N FIIa	N A/C	L/M FIIa	A/C B/O	N	A/C	FIIa	FIC	L/M	X		Nenhum grupo típavel
A/437	CC11				1	2			2							3
C/11	CC11			1	2	1		1	2	1			1		1	8
P/757	CC11											1				1
Q/340	CC11								1					1		2
AB/855	CC11					1										1
J/16	CC16-17								1							1
W/17	CC16-17					1										1
U/840	CC758-840			1												1
Z/758	CC758-840								1							1
B/423	-								1							1
D/443	-						1									1
E/105	-								1							1
F/442	-			1												1
G/25	-			1					1							1
H/101	-								1							1
I/70	-								1							1
K/138	-	1														1
L/755	-								1							1
M/760	-								1							1
N/839	-				1											1
O/837	-								1							1
R/756	-				1											1
S/841	-			1												1
T/838	-								1							1
V/842	-			1												1
X/323	-					1										1
Y/13	-			1					1							2
AA/759	-										1					1
Total:	-	1	7	6	6	1	1	17	1	1	1	1	1	1	1	45 (100
n(%):	-	(1,8)	(15,5)	(13,3)	(13,3)	(1,8)	(1,8)	(37,7)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,8)	(1,8))

4.7.2. Extração plasmidial

Realizamos a extração plasmidial nas 45 amostras nas quais o ST foi determinado e observamos alto número de plasmídios entre as amostras estudadas, variando de 2 a 6, com peso molecular variando de 63 a 2 kb. A maioria das amostras apresentou um plasmídio de aproximadamente 40kb (Figura 4.12).



Legenda: 1- CCBH 5641, 2- CCBH 5112, 3- CCBH 6806, 4- CCBH 6030, 5- CCBH 6010, 6- CCBH 6798 , 7- CCBH 6298, 8- CCBH 3589, 9- CCBH 6209, 10- CCBH 5659, 11- CCBH 5658, 12- CCBH 6306, 13- CCBH 5745, 14 – CCBH 4424, 15- CCBH 6091, 16- CCBH 5991, 17- CCBH 6366, 18- CCBH 4698, 19- CCBH 6740, 20- CCBH 6566, 21- CCBH 5982, 22- CCBH 6370, 23- CCBH 5623, 24- CCBH 5238, 25- CCBH 4735, 26- CCBH 6633, 27- 5788, 27- CCBH 4122, 28- CCBH 5093, 29- CCBH 4640, 30- CCBH 5625, 31- CCBH 4350, 32- CCBH 5096, 33- CCBH 6354, 34- CCBH 6530, 35- CCBH 5038, 36- CCBH 6556, 37- CCBH 6742, 38- CCBH 6707, 39- CCBH 4955, 40- CCBH 6603, 41- CCBH 6511, 42- CCBH 6524, 43- CCBH 6528, 44- CCBH 6527, 45- CCBH 6030.

Figura 4.12: Imagem gerada pelo software *GelComparII*, onde podemos observar os plasmídios das 45 amostras estudadas.

4.7.3. Hibridização com sonda de *bla*_{KPC} e com as sondas dos grupos plasmidiais mais prevalentes.

Realizamos a metodologia de hibridização dos plasmídios com a sonda *bla*_{KPC} nas 45 amostras. Em 95,3% das amostras (43/45) pudemos observar o gene *bla*_{KPC} em plasmídios, entretanto em duas amostras CCBH6030 (Clone W/ST17) e CCBH5238 (Clone C/ST11) não foi possível observar marcação com a sonda.

Os plasmídios marcados com a sonda *bla*_{KPC} apresentaram tamanho variando de 58 a 3kb, sendo que 53% (23/43) deles tiveram o tamanho aproximado de 40kb. Em nove (20%) das nossas 43 amostras, o gene *bla*_{KPC-2} foi observado em mais de uma banda de plasmídio (Tabela 4.10). A marcação da sonda *bla*_{KPC} em um dos géis realizados e da membrana correspondente se encontra abaixo.

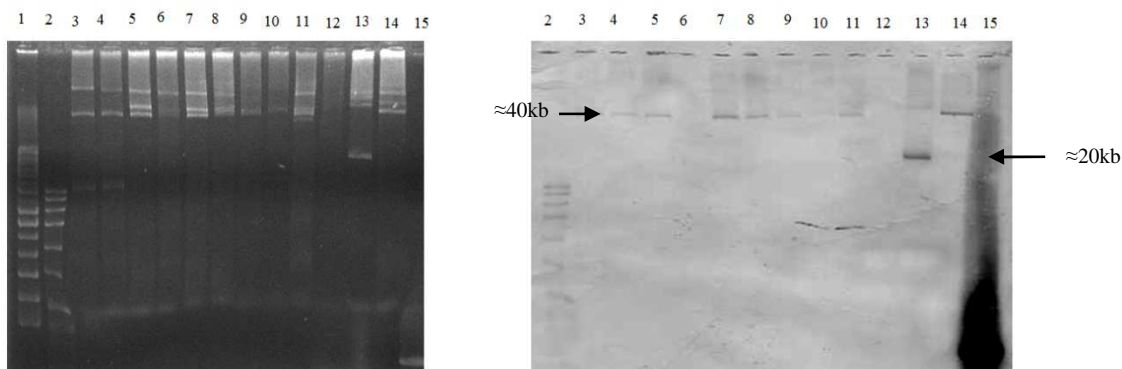


Figura 4.13: Foto de um dos géis realizados e da membrana correspondente, exemplificando a marcação dos plasmídios com a sonda *bla*_{KPC}. Legenda: 1- PM Supercoiled; 2- PM marcado com DIG; 3- CCBH 3475; 4- CCBH 3589; 5- CCBH 4640; 6- CCBH 4698; 7- CCBH 4992; 8- CCBH 5092; 9- CCBH 5151; 10- CCBH 5629; 11- CCBH 5280; 12- CCBH 4424; 13- CCBH 5038; 14- CCBH 4122; 15- Controle da Hibridização: Produto de PCR do gene *bla*_{KPC}.

Com a finalidade de tentar elucidar qual o grupo de incompatibilidade plasmidial do plasmídio carreador do gene *bla*_{KPC} nas 43 amostras, realizamos a metodologia de hibridização investigando os grupos plasmidiais mais observados por PCR: IncN, IncL/M, IncFII e IncA/C. Primeiramente realizamos a hibridização das amostras com o grupo mais observado, IncN (37 amostras positivas). Observamos que em 60% (22/37) ocorreu hibridização dos plasmídios com a sonda testada. Todas as amostras apresentaram hibridização com plasmídios de aproximadamente 40 kb, que foram os mesmos plasmídios que hibridizaram com a sonda *bla*_{KPC} (Figura 4.14).



Figura 4.14: Foto de um dos géis realizados e das membranas correspondentes, exemplificando a marcação dos plasmídios com a sonda *bla*_{KPC-2} e IncN. Legenda: 1- PM marcado com DIG; 2 – CCBH 1994; 3 - CCBH 3589; 4 – CCBH 4640; 5 – CCBH 5623; 6 - CCBH 5625; 7 - CCBH 4698; 8 - CCBH 5641; 9 - CCBH 5658; 10 - CCBH 5659; 11 - CCBH 5982; 12- CCBH 5745, 13- CCBH 6511, 14- Controle da Hibridização: Produto de PCR do gene *bla*_{KPC}, 15- Controle da Hibridização: Produto de PCR do grupo IncN.

Nas 21 amostras em que não houve hibridização com a sonda IncN, realizamos a pesquisa dos outros três grupos plasmidiais mais encontrados: IncL/M, IncFII e IncA/C.

Dessas 21 amostras, três foram positivas por PCR para o grupo IncA/C (CCBH 6370, CCBH6428 e CCBH 6527) e quatro para o grupo IncFII (CCBH 5038, CCBH 5641, CCBH 5659 e CCBH 6742). Realizamos a hibridização com as sondas correspondentes, entretanto nenhuma das amostras apresentou marcação em quaisquer dos plasmídios que possuíam.

Oito amostras se mostraram positivas por PCR para o grupo L/M. Observamos a hibridização da sonda específica em todas as amostras testadas, num plasmídio de aproximadamente 55kb. Entretanto, somente em duas cepas (CCBH 4955 e CCBH 5112), o plasmídio de 55kb marcado foi o mesmo que continha o gene *bla*_{KPC}. Nas seis outras cepas, os plasmídios marcados com a sonda *bla*_{KPC} possuíam tamanhos distintos (Figura 4.15).

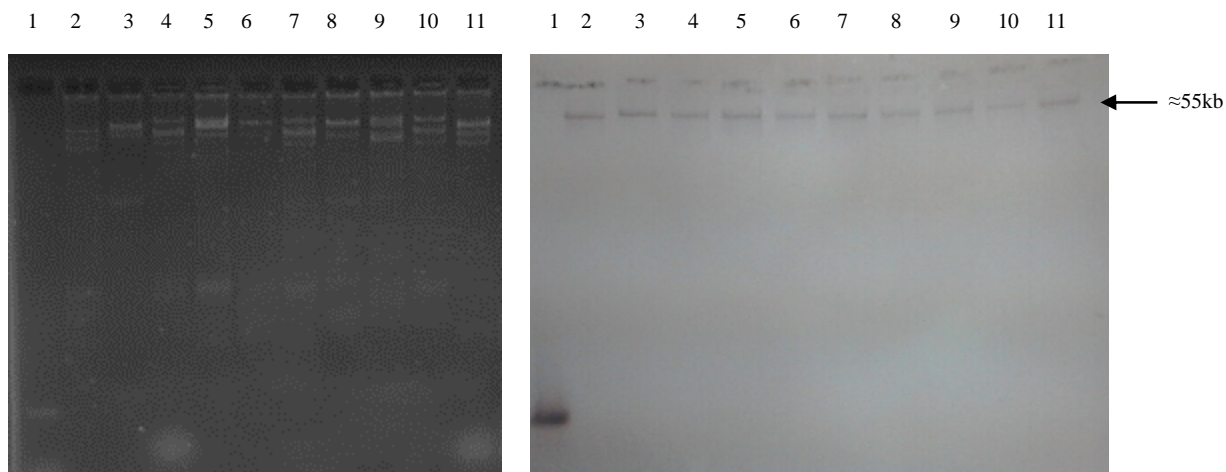


Figura 4.15: Foto de um dos géis realizados e da membrana correspondente, exemplificando a marcação dos plasmídios com a sonda IncL/M. Legenda: 1 - prod. PCR L/M; 2 – CCBH 4955; 3 - CCBH 5038; 4 – CCBH 5112; 5 – CCBH 5683; 6 - CCBH 5788; 7 - CCBH 6429; 8 - CCBH 6511; 9 - CCBH 6566; 10 - CCBH 6633; 11 - CCBH 6707.

Uma amostra havia sido positiva por PCR para o grupo X e outra para o grupo FIC, mas infelizmente não foi possível realizar a metodologia de hibridização. Quatro amostras foram positivas por PCR somente para o grupo IncN, inviabilizando a pesquisa de outros grupos. Uma amostra não foi positiva para nenhum grupo plasmidial por PCR.

Na tabela 4.10 podemos observar o número dos plasmídios, os pesos moleculares dos mesmos, além de observar qual o tamanho dos plasmídios marcados pelas sondas *bla_{KPC}*, IncN e IncL/M.

Tabela 4.10: Número de plasmídios, pesos moleculares dos mesmos e o tamanho dos plasmídios marcados pelas sondas *bla*_{KPC}, IncN e IncL/M das 45 amostras em que a extração plasmidial e hibridização foram realizadas.

N° CCBH	N° plasm.	Tamanhos aproximados dos plasmídios (kb)	Complexo clonal	Clone PFGE/ST	Tamanho aproximado dos plasmídios (kb)		
					Hibridização com sonda <i>bla</i> _{KPC}	Hibridização com sonda IncN	Hibridização com sonda IncL/M
CCBH 3589	4	53 – 40 – 13 – 4	CC11	A /437	40	40	ND
CCBH 4640	4	52 – 40 – 27 – 2	CC11	A /437	40	40	ND
CCBH 4698	4	58 – 40 – 4 – 2	CC11	A /437	40	40	ND
CCBH 5623	3	52 – 40 – 2	CC11	A /437	40	40	ND
CCBH 6366	6	55 – 45 – 40 - 6 - 4 - 3	CC11	A /437	40	40	ND
CCBH 5112	5	55 – 41 – 33 – 5 – 4	CC11	C/11	55 – 5 – 4	ND	55
CCBH 5658	3	60 – 41 – 3	CC11	C/11	60	NEG	ND
CCBH 5982	3	55 – 40 – 8	CC11	C/11	40	40	ND
CCBH 5991	4	63 – 53 – 40 – 3	CC11	C/11	40	40	ND
CCBH 6209	4	55 – 40 – 35 – 15	CC11	C/11	40	40	ND
CCBH 6370	5	48 – 39 – 25 – 4 – 3	CC11	C/11	48 – 25 – 3	ND	ND
CCBH 5238	2	48 – 35	CC11	C/11	NEG	ND	ND
CCBH 6633	5	55 – 46 – 43 – 36 – 5	CC11	C/11	43	NEG	55
CCBH 6740	5	52 – 37 – 15 – 7 – 5	CC11	C/11	15 – 7 – 5	NEG	ND
CCBH 6798	5	39 – 36 – 21 – 5 – 4	CC11	C/11	5	ND	ND
CCBH 6354	5	48 – 39 – 19 – 9 – 4	CC11	P/757	39	ND	ND
CCBH 5641	4	40 – 20 – 13 – 3	CC11	Q/340	20 – 13	NEG	ND
CCBH 5745	2	58 – 40	CC11	Q/340	40	40	ND
CCBH 6556	4	50 – 40 – 15 – 6	CC11	Q/340	50 – 15 – 6	ND	ND
CCBH 6527	4	61 – 21 – 7 – 3	CC11	AB/855	21 – 7 – 3	NEG	ND
CCBH 4350	3	52 – 40 – 2	CC16-17	J/16	40	40	ND
CCBH 6030	3	55 – 50 – 4	CC16-17	W/17	NEG	ND	ND
CCBH 6524	3	63 – 40 – 14	CC758-840	Z/758	40	40	ND
CCBH 6511	2	63 – 55 - 10	CC758-840	U/840	10	NEG	55
CCBH 4424	2	55 – 40	-	B/423	40	40	ND
CCBH 5038	3	55 – 42 – 17	-	D/443	42- 17	ND	55
CCBH 4122	4	54 – 40 – 4 – 2	-	E/105	40	40	ND
CCBH 4955	4	55 – 42 – 33 – 5	-	F/442	55	NEG	55
CCBH 4735	2	47 – 40	-	G/25	40	40	ND
CCBH 6707	3	55 – 41 – 33	-	G/25	33	NEG	55
CCBH 5093	4	53 – 40 – 19 – 2	-	H/101	40	40	ND
CCBH 5096	3	52 – 40 – 2	-	I/70	40	40	ND
CCBH 5659	3	60 – 41 – 3	-	K/138	60	NEG	ND
CCBH 5625	4	52 – 40 – 5 – 2	-	L/755	40	40	ND
CCBH 6806	5	40 – 33 – 20 – 5 – 4	-	M/760	40	40	ND
CCBH 6306	2	55 – 40	-	N/839	40	40	ND
CCBH 6010	3	58 – 44 – 33	-	O/837	44	NEG	ND
CCBH 6091	4	59 – 54 – 51 – 40	-	R/756	40	40	ND
CCBH 6566	5	63 – 55 – 39 – 8 – 6	-	S/841	6	NEG	55
CCBH 6298	4	59 – 40 – 11 – 4	-	T/838	40	40	ND
CCBH 6603	5	40 – 21 – 13 – 11 – 9	-	V/842	40	40	ND
CCBH 6428	2	58 – 6	-	X/323	58 – 6	NEG	ND
CCBH 5788	4	55 – 38 – 5 – 3	-	Y/13	5	NEG	55
CCBH 6530	4	49 – 39 – 14 – 2	-	Y/13	39	NEG	ND
CCBH 6742	5	48 – 46 – 35 – 8 – 3	-	AA/759	46 – 35 – 8	ND	ND

Legenda: NEG= realizado e resultado negativo; ND= não pesquisado.

Analisando o tamanho e o grupo de incompatibilidade do plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}* em relação aos grupos clonais, pudemos observar algumas diferenças entre as cepas pertencentes aos mesmos complexos clonais

Em relação ao CC11, nas cinco cepas do clone A/ST437, observamos que o plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}* foi do grupo N, de aproximadamente 40kb. Nas nove amostras do clone C observamos o gene *bla_{KPC}* num plasmídio do grupo N de aproximadamente 40 kb em três das amostras. Em três amostras, o gene *bla_{KPC}* hibridizou com 3 bandas: 55 – 5 – 4kb na cepa CCBH 5112, 48 – 25 – 3kb na cepa CCBH 6370 e 15 – 7 – 5kb na cepa CCBH 6740 , que não foram considerados do grupo N. A cepa CCBH 6798 apresentou marcação para a sonda *bla_{KPC}* em um plasmídio de aproximadamente 5kb. Em relação ao clone Q/ST340, observamos, em uma das amostras, o plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}* pertencente ao grupo N, de aproximadamente 40kb. Entretanto nas outras duas, encontramos mais de uma banda marcada com a sonda do gene *bla_{KPC}*: na CCBH6556, encontramos três bandas marcadas com a sonda *bla_{KPC}*, de aproximadamente 50, 15 e 6 kb e na CCBH 5641, encontramos em duas bandas, de 20 e 13 kb. Nas amostras do clone P/ST757, observamos a marcação com a sonda *bla_{KPC}* num plasmídio de 39kb e na amostra do clone AB/ST 855, observamos três plasmídios marcados com a sonda *bla_{KPC}*, de 21, 7 e 3kb. Contudo, não foi possível determinar o grupo Inc destes plasmídios.

Analisando as amostras do CC16-17, observamos que a cepa do clone J/ST16 apresentou marcação para sonda *bla_{KPC}* num plasmídio de aproximadamente 40 kb, do grupo IncN. Já a cepa do clone W/ST17, como dito anteriormente foi negativa para hibridização com a sonda *bla_{KPC}*.

Em relação ao CC758-840, a cepa do clone Z/ST758, apresentou marcação para sonda *bla_{KPC}* num plasmídio de aproximadamente 40 kb, do grupo IncN. Já a cepa do clone U/ST840, apresentou marcação num plasmídio de 10kb, no qual não foi possível determinar o grupo Inc.

Em relação às amostras que não foram agrupadas em complexos clonais, observamos o gene *bla_{KPC}* num plasmídio de 40kb, pertencente ao grupo N nos seguintes grupos clonais: B/ST423, E/ST105, G/ST25, H/ST101, I/ST70, L/ST755, M/ST760, N/ST839, R/ST756, T/ST838, V/ST842. O gene *bla_{KPC}* foi encontrado na cepa do grupo clonal F/ST442 num plasmídio de 55kb, do grupo IncL/M. Já nas cepas dos grupos clonais D/ST443, G/ST25,

K/ST138, O/ST837, S/ST841, X/ST323, Y/ST13 não foi possível identificar o grupo plasmidial do plasmídio carreador do gene *bla_{KPC}*.

5. DISCUSSÃO

Klebsiella pneumoniae é um bastonete Gram-negativo associado a infecções. Nas últimas décadas, devido ao aumento da utilização de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em unidades de terapia intensiva, tem-se observado mundialmente a emergência de bastonetes Gram-negativos multirresistentes, incluindo cepas de *K.pneumoniae*. Estas amostras vêm apresentando elevadas taxas de resistência às variadas classes de antimicrobianos, principalmente a classe dos beta-lactâmicos, devido à produção de carbapenemase do tipo KPC (73).

Infecções causadas por cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC tem sido reportadas na literatura em diferentes cidades e países e estão associados à alta morbidade e mortalidade. Inicialmente essa carbapenemase foi descrita nos Estados Unidos em 1996 (60), e atualmente, já foi encontrada em mais de 70% dos estados que compõem esse país (73). Em poucos anos, as cepas produtoras de KPC se espalharam globalmente e tem sido descritas particularmente em Porto Rico, Colômbia, Grécia, Israel e China, além de diversos surtos que têm sido relatados em muitos países europeus e da América do Sul (73, 122, 75).

Dados do SENTRY apontam que a KPC é a carbapenemase mais frequente em cepas de *K. pneumoniae* isoladas na América Latina e na América do Norte (123).

A cidade de Nova York, nos Estados Unidos, desde o ano 2000, têm apresentado diversos surtos e atualmente, é considerada endêmica em relação a essa carbapenemase. Em um estudo epidemiológico em 11 centros hospitalares dessa cidade, onde foram estudadas 602 cepas de *K.pneumoniae* isoladas entre 2002 e 2003, observou-se a presença de ESBLs em 45% das cepas, enquanto que 3,3% carregavam gene *bla*_{KPC} (124). Já em outro trabalho, mais recente com cepas do ano de 2004, observou-se que entre 257 amostras coletadas, 24% possuíam o gene *bla*_{KPC} e 42% possuíam ESBLs, onde a mortalidade dos indivíduos após 14 dias apresentando bacteremia desse microrganismo foi de 47% (125).

Em diversos centros de saúde de Israel a situação também é considerada endêmica. Estudo realizado por Navon-Venezia e colaboradores (2009) com 100 cepas originárias de oito hospitais e cinco centros de saúde das mais variadas regiões geográficas, mostrou que todas possuíam KPC-3 e pertenciam a um único clone, evidenciando a dispersão nacional de um único genótipo causador de surtos naquele país (75).

Em nosso país, nos últimos anos, a presença da resistência aos carbapenemas associada à presença da carbapenemase KPC tem aumentado enormemente. A primeira descrição ocorreu em cepas de *K. pneumoniae* isoladas em Pernambuco em 2006 (88) e alguns trabalhos já demonstraram a presença dessa carbapenemase, tanto em cepas de *K. pneumoniae* como em outros representantes da família Enterobacteriaceae, nos estados do Rio de Janeiro (54, 89, 92), São Paulo (90, 93, 126) e Rio Grande do sul (91).

Em nosso laboratório, que participa da rede de monitoramento da resistência a antimicrobianos do Ministério da Saúde recebendo amostras para análise fenotípica e genotípica de fenômenos de resistência de diversos estados, também pudemos observar esse crescimento. Nos anos de 2006 a 2009 recebemos ao todo 50 amostras resistentes aos carbapenemas produtoras de KPC. Já em 2010, esse número apresentou um aumento expressivo, visto que foram recebidos 445. Estes dados reforçam a necessidade de estudos sobre os mecanismos de disseminação deste gene de resistência, assim como da relação clonal entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em nosso país, visando a implementação de medidas de controle da utilização de antimicrobianos e da disseminação dessas amostras no ambiente hospitalar.

Atualmente, já foram descritas na literatura onze variantes alélicas do gene *bla*_{KPC}. As mais frequentes são KPC-2 e KPC-3, sendo a KPC-2 a mais prevalente no mundo e até hoje é a única que foi descrita em cepas brasileiras (49). No nosso estudo, com 165 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC oriundas de doze estados brasileiros, observamos a presença dessa mesma variante alélica em todas as amostras.

As amostras produtoras de KPC foram isoladas de doze estados de todas as cinco regiões geográficas do nosso país (Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro e Santa Catarina), demonstrando a extensa disseminação desse mecanismo de resistência, fato que ainda não havia sido reportado anteriormente na literatura.

Em dois desses estados, recebemos o maior número de amostras: Rio de Janeiro (41%, n=68) e Distrito Federal (23%, n=39). Anteriormente, já havia sido relatada a presença desse mecanismo de resistência no Rio de Janeiro, entretanto no Distrito Federal, esse número expressivo de amostras recebidas foi atribuído a surtos ocorridos em hospitais dessa localidade.

Em 2010, foram registradas 18 mortes no Distrito Federal e acredita-se que pelo menos 170 pessoas internadas nos centros de saúde deste estado tenham sido infectados por microrganismos com este mecanismo de resistência. Houve extensa divulgação desses surtos nos mais diversos meios de comunicação, causando grande repercussão em nosso país e gerando apreensão popular (127).

Dessa forma, durante o surto, foi expedido pela secretaria de saúde do Distrito Federal um documento com orientações sobre o manejo de surtos de bactérias multirresistentes, com protocolos de detecção desse mecanismo de resistência e cuidados com o paciente (128). A ANVISA também se pronunciou, expedindo nova resolução restritiva ao uso de antimicrobianos (RDC 20/ 2011), também com o objetivo de diminuir a ocorrência de bactérias multirresistentes (129). Acredita-se que a aplicação dessas medidas pelo governo, juntamente com adoção das mesmas pelos profissionais de saúde envolvidos possam ajudar a diminuir a ocorrência de surtos de patógenos multirresistentes dessa natureza.

A presença de carbapenemase do tipo KPC confere resistência aos antibióticos mais prescritos na prática clínica: beta-lactâmicos. Acredita-se que esse mecanismo confira resistência a todos os antimicrobianos dessa classe sintetizados até o momento: penicilinas; cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações; carbapenemas; monobactâmicos e associações de beta-lactâmicos com inibidores (10). Entretanto em algumas amostras produtoras dessa carbapenemase, podemos observar sensibilidade *in vitro* a algum dos representantes dessa classe. Castanheira e colaboradores em 2008 (130) encontraram 40% de sensibilidade ao cefepime e Bratu e colaboradores (2005) observaram 40% de sensibilidade ao cefepime e 2% de sensibilidade a ceftazidima (131). Em nosso estudo também observamos cepas sensíveis a estas drogas: 15,7% de sensibilidade a cefepime, 11,5% de sensibilidade a cefoxitina e ceftazidima, e 3,6% de sensibilidade a cefotaxima.

Entretanto, apesar da sensibilidade *in vitro* apresentada, acredita-se que a presença do gene *bla_{KPC}* confira resistência *in vivo* a essa classe de drogas. Dessa forma o uso de beta-lactâmicos não é aconselhado para o tratamento das infecções causadas por KPC, visto que ainda são escassos os relatos de tratamento bem sucedidos utilizando beta-lactâmicos, assim como não se sabe se a concentração que essa droga atinge no sítio de infecção seria suficiente para atingir o êxito. Além disso, com a utilização dessa classe de drogas, existe a possibilidade de seleção *in vivo* de cepas mais resistentes, que tenham outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos associados, como a diminuição da expressão de porinas (73).

De acordo com o CLSI, os breakpoints de susceptibilidade aos carbapenemas, para discriminação entre sensível, intermediário e resistente para imipenem e meropenem são respectivamente 1/2/4 ug/mL. Já para ertapenem esses valores são 0,25/0,5/1ug/mL (116). De acordo com os critérios estabelecidos pela ANVISA, os breakpoints de susceptibilidade à imipenem e meropenem são 1/2/4 ug/mL e em relação ao ertapenem 0,5/1/2ug/mL (99). Ambos os órgãos preconizam que as cepas consideradas não sensíveis (agrupadas em resistentes e intermediárias) ao imipenem e meropenem devem ser consideradas possíveis produtoras de carbapenemases e nessas cepas deve ser realizada a detecção molecular do mecanismo de resistência (PCR para detecção de KPC, NDM, VIM entre outros).

Em nosso estudo, observamos que todas as amostras se mostraram resistentes ao ertapenem, 98,1% não sensíveis ao meropenem (sendo 90% com resistência plena) e 96% não sensíveis ao imipenem (86% com resistência plena). Apesar de todas as nossas amostras terem sido resistentes ao ertapenem, dados da literatura têm demonstrado que o ertapenem não tem se apresentado como bom marcador para amostras produtoras de carbapenemases. Isso ocorre porque cepas produtoras de cefotaximases (e outras ESBLs) podem apresentar simultaneamente perda de porinas e outros mecanismos de resistência. Dessa forma, essas cepas podem ser falsamente detectadas como produtoras de carbapenemases (99).

Seguindo os critérios da nota técnica da ANVISA ou o CLSI 2011, as nossas amostras seriam consideradas possíveis produtoras de carbapenemase, com exceção de uma cepa que foi considerada sensível ao imipenem e meropenem e foi produtora de KPC. Nesses casos, laboratorialmente pode ocorrer problemas na detecção da produção de carbapenemases utilizando essas drogas e conseqüentemente, ocorrer falha terapêutica, prejudicando o tratamento do paciente.

Além da resistência aos beta-lactâmicos gerada pela presença do gene codificador da carbapenemase KPC, altas taxas de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, principalmente a quinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos têm sido relatadas em amostras produtoras dessa carbapenemase (132).

Observamos em nosso trabalho 95,7% de resistência entre as amostras ao representante da classe das quinolonas, a ciprofloxacina. Outros estudos também têm mostrado altas taxas de resistência a ciprofloxacina em amostras produtoras de KPC: 80% e 91% em Israel (56,133) e 88,1% nos EUA (134).

Em relação ao grupo das sulfonamidas, representado pelo sulfametoxazole/trimetoprima obtivemos 84,2% de resistência. Em outros estudos também foram observados altos percentuais em relação a esta droga: 97,6% das cepas produtoras de KPC dos EUA (134) e 81,5% em estudo com cepas produtoras dessa carbapenemase de seis países (EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia) (53).

O percentual de resistência encontrado frente aos aminoglicosídeos, gentamicina e amicacina, foram 57% e 34% respectivamente nas amostras de nosso estudo. Na literatura, percentuais variáveis de resistência a essa classe tem sido relatados e em algumas cepas produtoras de KPC, os aminoglicosídeos tem sido utilizados como opção de tratamento (135). Em relação à gentamicina, foi observado 6% de resistência na Grécia (136) e 31% de resistência nos EUA (130), enquanto que em relação a amicacina os percentuais de resistência nesses mesmos estudos foram 86% e 13% respectivamente

Devido a alta resistência as variadas classes de antimicrobianos, poucas são as opções de tratamento para indivíduos infectados com bactérias produtoras de KPC. Essas drogas são principalmente as polimixinas, a tigeciclina e a fosfomicina, que possuem amplo espectro de atividade e tem demonstrado potencial terapêutico contra representantes da família *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases (135).

Entretanto, estas drogas apresentam algumas limitações na sua utilização. As polimixinas podem ser uma opção de tratamento efetiva, mas o seu potencial tóxico e a necessidade de associação com outros agentes limita o seu uso (16). A tigeciclina ainda não foi aprovada para tratamento de infecções sanguíneas e mais experiências são necessárias para um melhor entendimento sobre o seu papel no tratamento das infecções graves por KPC (14). Já a fosfomicina, deve ser administrada associada a outras drogas, visto que quando utilizada isoladamente fenômenos de resistência tendem a surgir (137).

Mesmo com as limitações de uso, estas drogas têm sido cada vez mais utilizadas, embora relatos na literatura de cepas resistentes a estas classes de drogas tem sido cada vez mais frequentes (130).

Em relação à polimixina B, já foi observada resistência em 6,8% das amostras na Coreia do Sul (138), 11,9% em cepas do programa de vigilância SENTRY (130) e 27% das amostras isoladas em Nova York (131). Em relação à tigeciclina, foi realizada por Kelesidis e colaboradores (2008) uma revisão sistemática baseada nos dados de 36 trabalhos com cepas

multirresistentes, observou-se 11,5% de resistência (139). Já na China, Chen e colaboradores (76) encontraram 33,9% de resistência. Em relação à fosfomicina, observou-se 7% de resistência nos EUA (137), 46% na Grécia (140) e 55% na China (76).

No Brasil, em estudo de Andrade e colaboradores (2011), com cepas oriundas de São Paulo e do Rio de Janeiro, nenhuma cepa foi observada apresentando resistência a tigeciclina e polimixina B (54). Nossos resultados apresentaram 11% de resistência a polimixina B, 38% resistentes a tigeciclina e 7,8% de resistência a fosfomicina.

Os percentuais relativamente elevados em relação à polimixina B e tigeciclina encontrados em nosso trabalho podem refletir o aumento da utilização dessas drogas de última escolha para o tratamento de infecções graves geradas por cepas produtoras de KPC em nosso país. A dificuldade do tratamento dessas cepas aliada ao aumento da utilização dessas drogas podem levar ao surgimento de um número maior de cepas resistentes. Assim, medidas de restrição no uso de antimicrobianos, como a RDC 20/2011 expedida pela ANVISA, e a adoção de boas práticas clínicas como a lavagem das mãos, uso de equipamentos de proteção individual (luvas, avental e máscaras), higienização e limpeza das superfícies ambientais dentro do ambiente hospitalar podem ter efeitos positivos para redução e dispersão de bactérias resistentes.

Além disso, um percentual significativo das cepas que apresentaram resistência a polimixina B e tigeciclina, pertencia ao complexo clonal dominante em nosso trabalho (CC11): 32 de 64 amostras em relação à tigeciclina (50% - 20 cepas do clone A-KpRJ/ST437, 10 cepas do clone C/ST11 e 2 cepas do clone Q/ST340) e 11 de 18 amostras em relação a polimixina B (61% - 7 cepas do clone A-KpRJ/ST437 e 4 amostras do clone C/ST11). Assim, o percentual de resistência encontrado para essas drogas também pode refletir uma característica deste complexo clonal prevalente.

Alguns surtos de *K.pneumoniae* produtoras de KPC extremamente multirresistentes (XMDR), ou seja, que apresentam resistência a quase todas as classes de antimicrobianos disponíveis para o tratamento, já foram reportados na literatura. Oito cepas produtoras de KPC de hospitais da região nordeste da Hungria foram isoladas, todas apresentando altos níveis de resistência a carbapenemas, quinolonas, aminoglicosídeos e colistina, pertencentes ao ST258 (141). Na Grécia, sete amostras associadas a surtos em dois hospitais distintos apresentaram esse fenótipo. Todos apresentaram resistência aos beta-lactâmicos, ciprofloxacina, aminoglicosídeos e colistina, além de demonstrarem susceptibilidade

intermediária a tigeciclina (142). Em dois hospitais italianos, foi observado um surto de oito cepas pertencentes ao ST258 produtoras de KPC-3 resistentes a colistina, mas sensíveis a tigeciclina e gentamicina, oriundas de oito pacientes internados (143).

Em nosso trabalho foi observado que 98% (n= 162) das cepas apresentaram fenótipo de multirresistência (resistência a pelo menos três classes de antimicrobianos). Seis cepas apresentaram fenótipo extremamente multirresistentes (XMDR), ou seja, resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, sulfamidas, quinolonas, glicilciclinas, polimixinas e derivadas do ácido fosfônico). Vinte e uma cepas (13%) foram sensíveis apenas a fosfomicina, 42 (25%) sensíveis somente a fosfomicina e polimixina B e 18% (n=31) sensíveis somente a fosfomicina, polimixina e tigeciclina. A observação desses fenômenos de multirresistência na maioria das cepas estudadas é de extrema importância, já que as cepas que apresentam resistência a variadas classes de antimicrobianos são de tratamento difícil e custoso, restringindo as opções de tratamento que podem ser utilizadas. Esse fenômeno é considerado um problema de saúde pública, onde soluções e controle dependem de políticas de restrição do uso de antimicrobianos (132).

Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) tem sido frequentemente encontradas em bastonetes Gram-negativos da família Enterobacteriaceae, principalmente em cepas de *K.pneumoniae*. Existem diferentes tipos de ESBLs, entretanto os tipos CTX-M, SHV e TEM são os mais reportados na literatura. Dentre estas, a enzima CTX-M tem sido a mais prevalente, encontrada em diversas regiões do mundo, sendo as variantes alélicas CTX-M-14 e CTX-M-15 as mais encontradas (144).

A associação de ESBLs com carbapenemases do tipo KPC tem sido usualmente observada em diversas cepas e tem sido frequentemente reportadas na literatura. Em estudo grego, observou-se que 95% carregavam o gene *bla*_{SHV-12} (145). Em um estudo brasileiro, realizado por Peirano e colaboradores, observou-se que nas seis amostras estudadas, todas possuíam beta-lactamases do tipo CTX-M (CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8) (89). Em um estudo conduzido na China, observou-se que 59,6 % das cepas apresentavam as beta-lactamases CTX-M-14 ou CTX-M-15 (76). Outro estudo, com 16 cepas oriundas dos EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia observou-se a presença de CTX-M-2 (31.3%), CTX-M-12 (12.5%), CTX-M-15 (18.7%) (53).

Em nossas amostras observamos alta produção de beta-lactamases, visto que 71% produziram enzimas do tipo CTX-M, 97% produziram enzimas do tipo SHV e 88,5%

produziram enzimas do tipo TEM. O perfil de produção mais encontrado foi a produção de todas as beta-lactamases testadas em 103 (62,4%) amostras, seguido da produção de SHV e TEM, em 40 (24,3%).

Nas amostras que apresentaram os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, infelizmente não foi possível confirmar se estas eram classificadas como ESBLs. Para a determinação de qual tipo de beta-lactamase presente nessas cepas seria preciso realizar sequenciamento dos produtos amplificados dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}, já que algumas das enzimas do tipo SHV e TEM não apresentam fenótipo ESBL (SHV-4, SHV-10, SHV-11, TEM-1, TEM-2 e TEM-13) (36). Dessa forma, podemos afirmar que 71% das nossas amostras eram produtoras de ESBL, visto que todas as enzimas do tipo CTX-M são consideradas ESBLs.

O alto percentual de cepas que possuíam beta-lactamases do tipo SHV em nosso trabalho (97%, n=160) pode ser explicada pelo fato de se acreditar que esta enzima está presente em todos os representantes da espécie *K.pneumoniae*. No estudo realizado por Babini e Livermore publicado em 2000, observou-se que de um grupo de 19 *K.pneumoniae*, todas apresentaram o gene *bla*_{SHV} por PCR, e que em 16 pode-se observar a presença da beta-lactamase expressa através de focalização isoelétrica (146). Nas cepas incluídas em nosso trabalho nas quais não foi possível obter a amplificação desse gene (3%, n=5), acredita-se que possa ter ocorrido alguma mutação ou alguma deleção/inserção de sequências de inserção/transposons no local onde se anelam os oligonucleotídeos para efetuar a amplificação por PCR, impossibilitando a amplificação desse gene.

A frequente associação de ESBL e KPC pode refletir a provável aquisição de plasmídios carreadores de KPC por amostras locais endêmicas ou a aquisição de plasmídios carreadores de ESBLs por clones epidêmicos produtores de KPC (54).

A produção de carbapenemase do tipo KPC por amostras clínicas se tornou um grande problema de saúde pública, tanto no Brasil, como em outros países, visto que este mecanismo de resistência se encontra disseminado. Assim, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC de diferentes localidades, através de métodos de tipagem molecular, como PFGE e MLST, que são considerados métodos de referência devido ao alto poder discriminatório e reprodutibilidade, podem auxiliar na compreensão da disseminação deste tipo de resistência (107).

Assim, através da metodologia de PFGE, observamos 28 grupos clonais entre as 165 amostras incluídas em nosso trabalho. O Rio de Janeiro foi o estado que obteve um maior número de grupos clonais diferentes dentro de seu território (nove grupos clonais em 68 amostras), seguido pelo Distrito Federal (sete grupos clonais em 39 amostras) e Espírito Santo (seis grupos clonais em 11 amostras).

Apesar da grande diversidade genética, três grupos foram mais prevalentes (grupos A, C e Q), encontrados em diferentes estados brasileiros. Nos dois estados com maior número de amostras, observamos o predomínio do grupo clonal A (76% / n=52) no Rio de Janeiro e do grupo clonal C (48% / n=19) no Distrito Federal.

A metodologia PFGE é provavelmente a técnica de DNA *fingerprinting* mais utilizada para tipagem de uma variedade de bactérias. Entretanto, esta técnica, por ser baseada em padrões de bandas de DNA em gel, é de difícil comparação inter-laboratorial. Dessa forma, a metodologia de *Multilocus sequence typing* (MLST), que se baseia na análise de sequências de genes conservados do DNA bacteriano e não em padrões de bandas, gera resultados que podem ser comparados em qualquer lugar do mundo, sem que haja critérios interpretativos envolvidos. Assim, esta metodologia se apresenta mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de cepas não relacionadas geograficamente (1,107).

Em nosso estudo, obtivemos 28 clones através da metodologia de MLST, onde cada grupo clonal de PFGE foi relacionado a um ST distinto, demonstrando boa correlação entre as duas metodologias de tipagem utilizadas. Os genótipos mais prevalentes por PFGE A/KpRj, C e Q foram designados por MLST como ST437, ST11 e ST340 respectivamente. Em um estudo conduzido no CDC, foram estudadas 248 amostras de *K.pneumoniae* produtoras de KPC enviadas para este centro de referência. Foi realizada a metodologia de PFGE e observou-se 13 grupos clonais apresentando entre si 80% de similaridade. Um dos grupos clonais abrigou 172 amostras (69% das amostras). Assim, foram selecionadas para a tipagem por MLST, 23 cepas baseado nas diferenças de padrões de banda e diversidade geográfica, sendo 13 do grupo clonal dominante e 10 grupos clonais que apresentaram variações entre 56 e 76%. Observou-se ótima correlação entre as duas metodologias, visto que foram observados 12 STs entre as amostras, sendo todas pertencentes ao mesmo grupo clonal por PFGE agrupadas no mesmo ST, excetuando-se duas amostras, que apresentaram 76% de similaridade e apresentaram o mesmo ST (67). Em estudo grego, com 378 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC-2, observou-se 11 grupos clonais de PFGE (considerando-

se 85% de similaridade) e 11 STs, sendo que todas as amostras pertencentes ao mesmo grupo clonal por PFGE foram agrupadas no mesmo ST (136).

Entretanto, o estudo realizado por Vimont e colaboradores, publicado em 2008, entre 63 amostras estudadas, observou-se 39 STs e 56 perfis de PFGE, quando adotados os critérios de Tenover (considerados clones distintos amostras com diferenças de três ou mais bandas). Todas as amostras pertencentes ao mesmo clone de PFGE pertenceram ao mesmo ST, entretanto alguns STs foram subdivididos entre diferentes grupos PFGE, visto que o PFGE possui maior poder discriminatório (107).

O poder discriminatório mais baixo do MLST em relação ao PFGE representa uma vantagem na identificação de complexos clonais internacionais. Através de análise filogenética, observamos três complexos clonais (amostras que apresentam diferença em apenas um dos genes de MLST) entre nossas amostras, o CC11, onde cinco clones foram agrupados: ST11, ST340, ST437, ST757, ST855; o CC16-17, composto pelos STs 16 e 17; e pelo CC758-840, com dois componentes: ST758 e ST840.

Quando comparamos os 28 STs descritos no trabalho com os 861 STs incluídos no banco de dados, observamos que 15 já haviam sido incluídos no banco de dados (ST11, ST13, ST16, ST17, ST25, ST70, ST101, ST105, ST138, ST323, ST340, ST423, ST437, ST442 e ST443) e 22 STs (78,5%) possuíam alta similaridade filogenética com ao menos um clone presente no banco de dados, ou seja, variação em apenas um *locus* do MLST (SLV).

Através de uma revisão bibliográfica encontramos cinco STs com variantes em apenas um *locus* (SLV) já descritos como produtores de KPC. O ST13, encontrado em nosso trabalho, foi considerado SLV do ST327, que já foi descrito em cepas produtoras de KPC Brasileiras (54) e de Israel (56). O ST 423 teve como variante o ST37, que já havia sido descrito nos EUA (67). O ST105 teve com SLV o ST259, também descrito nos EUA (67). O ST755 foi considerado próximo ao ST495, que já foi observado na Grécia (136). E o ST756 teve como variante em apenas um *locus* o ST617, descrito em cepas Brasileiras produtoras de KPC-2 (147).

Comparando os três complexos clonais descritos entre as 28 cepas do nosso trabalho (CC11, CC16-17 e CC758-840) com a literatura, pudemos observar que as cepas pertencentes aos complexos CC16-17 e CC11 também já haviam sido publicados previamente, inclusive como produtores de KPC e outras beta-lactamases.

Tratando-se do CC16-17 (ST16 e ST17), observou-se uma cepa do ST16 no Canadá, possuindo a enzima NDM-1 (148). Cepas deste clone também foram observadas em Taiwan (149) e em Copenhague portando CTX-M-15 (150). Já o ST17, foi encontrado em Barcelona, na Espanha, produzindo uma beta-lactamase do tipo AmpC (DHA-1) (151) e na Grécia produzindo KPC-2 (136).

Já em relação ao CC11, no qual amostras do nosso estudo estão incluídas, tem sido bastante abordado na literatura. Esse complexo comporta os dois STs que têm apresentado maior importância em relação à disseminação do gene *bla*_{KPC}: ST258 e ST11. O ST258, que é atualmente considerado clone epidêmico mundial, foi inicialmente descrito nos Estados Unidos, mas hoje já foi descrito em diversos lugares do mundo, como Europa, Ásia e América Latina, associado às variantes alélicas KPC-2 e KPC-3 (73). Já o ST11 tem sido relacionado à dispersão de duas beta-lactamases. Em alguns países como: Hungria (152), Coreia do sul, Hong Kong, Indonésia, Singapura (149) e Espanha (153) esse ST tem sido relacionado à ESBL CTX-M-15, que vem causando surtos em diversos centros de saúde desses países. Já na China (77), Coreia do sul (154), Brasil(54) e Hungria(141), representantes desse clone têm sido associados à dispersão da carbapenemase do tipo KPC.

No Canadá, realizou-se estudo com 15 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC e foi observado que 13 amostras pertenceram ao ST258 e duas cepas apresentaram o ST437, ST prevalente entre nossas amostras (155).

Em um estudo Grego, com 378 amostras produtoras de KPC-2, observou-se 11 STs distintos, sendo que quatro deles também foram observados em nosso trabalho, dois do CC11: ST11 e ST340; além do ST17 e ST323 (136).

Num artigo onde se estudou o polimorfismo genético de 55 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 de nove países Asiáticos (Hong Kong, Índia, Indonésia, Coreia do Sul, Malásia, Filipinas, Singapura, Taiwan e Tailândia), observou-se 25 STs, sendo três deles pertencentes ao CC11: ST11, ST340 e ST437. O ST11 (20 cepas; 36,4%) foi o mais prevalente, encontrado distribuído em todos os países asiáticos incluídos no estudo, exceto Taiwan. Os STs 340 (7 cepas, 12,7%) e 437 (3 cepas, 5,4%) foram encontrados na Índia, Filipinas e Tailândia (149).

Qi e colaboradores estudaram 57 cepas panresistentes de *K.pneumoniae* da China, e observaram dois STs entre as amostras. O ST11 foi o mais prevalente (91,2% n= 52), seguido do ST423 (8,8%, n=5), que também foi observado em nosso trabalho (77).

Em estudo com 281 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de CTX-M-15 da Hungria, observou-se que 7,5% das cepas foram do ST11 (152). Num estudo conduzido em Tel Aviv, Israel, estudou-se 10 cepas produtoras de KPC-2 e KPC-3. Foram observados três STs: ST340 (n=2), ST277 (n=2) e ST376 (n=4) (56).

Em nosso estudo, encontramos amostras pertencentes a cinco STs deste complexo clonal: ST11, ST340, ST437, ST757, ST855. Em alguns trabalhos brasileiros publicados na literatura, também é possível observar a presença de cepas pertencentes a esse complexo clonal. Num trabalho apresentado no 51º ICAAC (Chicago, EUA), onde foram estudadas 34 amostras de *K.pneumoniae* produtores de KPC-2 originários de 13 hospitais de sete estados brasileiros, foram identificados sete STs distintos, sendo o ST437 o mais prevalente (n=18), seguido pelo ST11 (n=10), ST17 (n=1), ST70 (n=2), ST133 (n=1), ST340 (n=1) e ST617(n=1). Dois desses STs foram pertencentes ao CC11 (ST11 e ST340) e outros dois foram descritos também em nosso trabalho (ST17 e ST70) (147).

Em outro trabalho, publicado em 2011, estudaram-se 57 cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC-2 do Rio de Janeiro e de Ribeirão Preto (São Paulo), principalmente envolvidas em surtos. Foram observados seis STs: ST258 (n=51), ST11 (n=1), ST327 (n=1), ST44 (n=2), ST437 (n=1) e ST48 (n=1) e dois deles, pertencentes ao CC11, também foram descritos em nosso trabalho (ST11 e ST437) (54). Vale ressaltar que nesse artigo, foi encontrado em território brasileiro, mais precisamente no estado de São Paulo, o ST 258, clone epidêmico altamente relatado na literatura.

As amostras do CC11 são bastante próximas geneticamente quando comparadas em relação aos genes utilizados no MLST. Comparando o gene no qual encontramos diferenças entre os alelos, *tonB*, observamos sete posições onde ocorreram variações entre os nucleotídeos. Os STs 757 e 855 foram considerados os mais próximos, onde se observou somente a diferença de uma base nitrogenada na posição 85 do gene. Entre os STs 11 e 340; 437 e 757; e 757 e 258, observamos diferenças de apenas duas bases. Entre os STs 340 e 855 observamos o maior número de diferenças entre bases, cinco ao todo.

Acredita-se que a dispersão de clones epidemiologicamente relacionados em diversas localidades de um mesmo país e até em distintas partes do mundo, como é o caso das cepas pertencentes ao CC11, deva ocorrer pelo fato destes clones possuírem melhor capacidade adaptativa. Além disso, a migração humana para diversas partes do globo tem propiciado que cepas que já se encontravam estabelecidas em certas regiões, tenham a capacidade de atingir novas populações, disseminando ainda mais os mecanismos de resistência (73). Por outro lado, cepas já adaptadas possuem a capacidade de adquirir novos mecanismos de resistência. Como exemplo, podemos citar cepas do ST11 oriundas da Coreia do Sul (138, 135) e Hungria (141,152). Há alguns anos atrás, amostras deste clone foram descritas carregando a ESBL CTX-M-15. Entretanto, mais recentemente, tem se observado cepas do mesmo clone portando gene *bla_{KPC}*.

Dessa forma, não podemos afirmar se as cepas encontradas no nosso trabalho pertencentes ao CC11 foram introduzidas em nossa população já contendo o gene *bla_{KPC}*, ou se este gene, através de plataformas genéticas como o transposon *Tn4401* foi inserido nessas cepas, que já se encontravam bastante adaptadas a nossa população.

Apesar da disseminação clonal descrita em várias localidades , principalmente dos STs 258 e 11, o alto grau de variabilidade genética encontrado entre as amostras produtoras de KPC de nosso estudo indica que a transferência horizontal do gene seja muito importante para a disseminação deste mecanismo de resistência.

O elemento genético que tem apresentado maior importância no cenário global associado a KPC-2 e KPC-3 é o *Tn4401*. Esse transposon de aproximadamente 10 kb, da família dos transposons *Tn3*, é composto por uma tranposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), o gene *bla_{KPC}*, duas sequencias de inserção, *ISKpn7* e *ISKpn6*, além das sequencia invertidas repetidas de 39 pb que flanqueiam o transposon. Já foram documentadas algumas isoformas desse elemento genético, que são caracterizadas por variações na região da sequencia de inserção *ISKpn7* (57).

Algumas isoformas desse transposon já foram observadas, sendo as isoformas “a”, “b” e “c” as mais descritas até o momento (67). Mais recentemente, outras variações foram descritas, possuindo deleções nessa mesma região de 68pb, 215pb e 255pb (156). No final de 2011, um artigo foi publicado descrevendo a isoforma “d”, na qual parte do gene *bla_{KPC}*, da *ISKpn7* e do *tnpA* foram excisados (157).Um estudo recente publicado em 2011, que estudou a frequência de transposição desse elemento, observou que esse transposon teve a capacidade

de mobilização do gene *bla*_{KPC} na frequência 4.4×10^{-6} / célula recipiente. Dessa forma, esse estudo demonstrou que esse elemento genético é um transposon ativo, capaz de mobilizar o gene *bla*_{KPC} em alta frequência, reforçando a sua importância na disseminação desse gene (158).

Em nosso trabalho, encontramos o gene *bla*_{KPC-2} também associado ao Tn4401. Todas as cepas apresentaram a tranposase (*tnpA*), resolvase (*tnpR*), o gene *bla*_{KPC} e a sequência de inserção *ISKpn6*, mas em nenhuma delas pudemos amplificar as sequências repetidas invertidas utilizando os iniciadores propostos por Naas e colaboradores, 2008. Entretanto, a sequência de inserção *ISKpn7* foi observada em 86% (39/45), onde observamos a amplificação de um fragmento de 604pb, caracterizando a presença da isoforma “a” entre as cepas de nosso estudo. Assim, pudemos observar que em nosso estudo que todas as amostras, mesmo as pertencentes a grupos clones distintos, o gene *bla*_{KPC-2} estava associado a mesma plataforma genética Tn4401.

Esta isoforma também já foi descrita em outros países como Espanha (159), Argentina (82), Polônia (160) e Suíça (161).

Comparando os nossos resultados com outros de trabalhos brasileiros, observou-se no estudo de Cuzon e colaboradores de 2010, em cepas do ST11, o gene *bla*_{KPC-2} associado a isoforma “b”, ou seja, que não possui deleção (53). Já no estudo de Andrade e colaboradores (2011), uma cepa do ST11 possuía o gene *bla*_{KPC-2} associado a isoforma “a” enquanto que uma cepa do ST437 possuía o gene *bla*_{KPC-2} associado à isoforma “b”(54).

Elementos genéticos móveis como transposons e sequências de inserção geralmente estão inseridos em plasmídios. O transposon Tn4401 tem sido descrito associado a plasmídios de diferentes tamanhos (de 5 a 180kb) e grupos de incompatibilidade: IncFII, IncN, IncA/C, IncL/M (56, 58, 75).

Plasmídios são fragmentos de DNA bacteriano extracromossomal, que possuem a capacidade de serem transferidos de uma bactéria para outra e que tem contribuído enormemente para a aquisição e disseminação de genes de resistência (50,51). Os plasmídios podem ser classificados de acordo com o grupo de Incompatibilidade a que pertencem (Inc), baseados nas regiões que controlam a replicação: FIA, FIB, FIC, HI1, HI2, I1, L/M, N, P, W, T, A/C,K, B/O, X, Y, F, e FIIA. A classificação dos plasmídios em diferentes grupos de

incompatibilidade tem sido uma importante ferramenta para o rastreamento de plasmídios que carregam importantes determinantes de resistência, como o gene *bla*_{KPC} (52).

Com o objetivo de detectar e identificar o plasmídio carreador do gene *bla*_{KPC-2} nas amostras realizamos a extração plasmidial, PCRs e hibridização para a identificação dos grupos de incompatibilidade. Assim, observamos o gene *bla*_{KPC-2} associado a plasmídios em 95,3% (43/45) sendo a maior parte deles (53%), com peso em torno 40 kb. Somente pudemos confirmar qual o grupo de incompatibilidade do plasmídio carreador do gene *bla*_{KPC} de 56% (24/43) das amostras. Destas, o gene *bla*_{KPC-2} estava associado a plasmídios de 40kb do grupo IncN em 92% (22/24) das amostras e a plasmídios de 55kb do grupo IncL/M em 8% (2/25) das amostras.

Na literatura, o gene da carbapenemase KPC tem sido associado a plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade, inclusive os que foram encontrados em nosso trabalho: IncN e IncL/M (53, 54).

No estudo de Cuzon e colaboradores (2010), com cepas produtoras de KPC-2 oriundas dos EUA, Colômbia, Brasil, Israel, Grécia e Suécia, observou-se que os plasmídios que continham o gene *bla*_{KPC-2} eram dos grupos plasmidiais IncN (35, 70, 75 e 80 kb) e IncL/M (12, 35 e 75kb), além do grupo IncFII (80kb) (53).

Andrade e colaboradores (2011) observaram o gene *bla*_{KPC-2} associado aos plasmídios: IncN(40kb), IncL/M (50 a 60kb) e IncFII (130kb), além da presença desse gene em dois plasmídios não tipáveis de 20 e 50kb (54).

Em estudo com cepas portuguesas, de um hospital universitário de Lisboa, foi observado que a transmissão do gene *bla*_{KPC-3} nas amostras da família Enterobacteriaceae estava associado a plasmídios do grupo IncF em 90.5% das amostras (55).

Cepas de Israel, pertencentes ao ST258, tem sido reportadas possuindo gene *bla*_{KPC-3} associada à isoforma Tn4401 a, inseridos em plasmídios do grupo IncFII de aproximadamente 130kb (56).

Nas amostras pertencentes ao CC11, do nosso estudo, observamos algumas diferenças em relação aos plasmídios carreadores do gene *bla*_{KPC}. Todas as cepas do grupo clonal A/ST437 apresentaram o gene *bla*_{KPC-2} em plasmídios de 40Kb do grupo IncN. Já entre as cepas do grupo clonal C/ ST11, em três amostras, os plasmídios contendo gene *bla*_{KPC} eram de

40kb, do grupo IncN e em uma amostra, o plasmídio era do grupo IncL/M, de 55kb. Nas outras seis amostras desse grupo clonal não foi possível identificar o plasmídio carreador do gene *bla*_{KPC}. Em uma amostra do grupo Q/ST340, o gene *bla*_{KPC} foi encontrado em plasmídios de 40kb, do grupo IncN. Nas demais amostras desse grupo e nas do grupo P/ST757 e AB/ST855 não foi possível identificar o plasmídio carreador do gene *bla*_{KPC}.

Em nove das 45 amostras testadas, o gene *bla*_{KPC-2} foi observado em mais de uma banda (em três das amostras foi encontrado em duas bandas e em seis delas, encontrado em três). Este fenômeno já havia sido reportado previamente na literatura. No trabalho de Naas e colaboradores, publicado em 2008, uma das amostras estudadas apresentou o gene em duas bandas, uma de 35 e outra de 75 kb (57). Contudo, com as metodologias utilizadas em nosso estudo, não podemos afirmar se as bandas marcadas são plasmídios diferentes ou isoformas de um mesmo plasmídio.

A presença de diferentes clones carreando diferentes plasmídios contendo a mesma estrutura genética (Tn4401) sugere que este transposon seja a origem da disseminação mundial do gene *bla*_{KPC-2}.

Em duas amostras não foi possível observar o gene *bla*_{KPC} em plasmídios através da metodologia de hibridização, apesar de termos conseguido amplificar esse gene por PCR usando DNA total. É possível que este gene esteja localizado no cromossomo. Contudo, não podemos descartar a possibilidade destas amostras terem perdido o plasmídio ao longo do estudo.

Analisando os dados obtidos pelo nosso trabalho, observamos que em todas as amostras testadas, o gene *bla*_{KPC} esteve associado a mesma plataforma genética: Tn4401. Dessa forma, pudemos concluir que em nosso país está ocorrendo a disseminação do gene *bla*_{KPC} tanto devido a dispersão de um mesmo plasmídio de aproximadamente 40kb do grupo IncN entre cepas de diferentes STs, como também a disseminação de um mesmo complexo clonal (CC11), onde os clones A-KpRJ/ST437 e C/ST11 tem desempenhado importante papel na dispersão desse gene.

Concluimos que a carbapenemase KPC se beneficia de todos os artifícios moleculares como, localização em transposon, plasmídios e eficientes clones, facilitando a sua rápida disseminação em *K. pneumoniae*, assim como, para outras espécies. Razão pela qual alerta-se para a necessidade de constante monitoramento deste mecanismo de resistência. Além disso,

é necessária a adoção de medidas eficazes no ambiente hospitalar para minimizar a disseminação de amostras deste fenótipo.

6. CONCLUSÕES

- ★ Observou-se como caráter inédito a grande disseminação do gene *bla*_{KPC-2} em cepas de *K.pneumoniae* oriundas de doze estados das cinco regiões geográficas de nosso país (AL, AM, CE, DF, ES, GO, MG, MA, PE, PI, RJ e SC).
- ★ A grande maioria das amostras 97% (n= 160) apresentou fenótipo de multirresistência, resultando-se três amostras (1,8%) resistentes a todas as classes de antimicrobianos testadas, fato preocupante devido a limitação das opções de tratamento.
- ★ Genes de beta-lactamases foram encontrados associados ao gene *bla*_{KPC-2} nas amostras estudadas, com a seguinte casuística: 71% a enzimas do tipo CTX-M, 97% do tipo SHV e 88,5% do tipo TEM.
- ★ Salienta-se a diversidade genética reconhecida através de PFGE na amostragem realizada (28 grupos clonais), na qual registra-se a disseminação de três grupos clonais em mais de um estado: grupo A (67/165 -40,6%) no ES, RJ, SC e CE; grupo C (38/165 -23%) no CE, DF, MG, GO, PE e RJ; grupo Q (16/165 - 9,7%) em AL, ES, DF e PI.
- ★ As metodologias de tipagem PFGE e MLST apresentaram boa correlação, pois através de MLST também foram reconhecidos 28 clones, com destaque para 13 observados pela primeira vez. Através de análise filogenética, três complexos clonais foram identificados: CC11 (ST11, ST340, ST437, ST757, ST855); CC16-17 (ST16 e ST17) e CC758-840 (ST758 e ST840).
- ★ Dois clones do CC11 (ST258 e ST11) tem apresentado destaque devido à disseminação do gene *bla*_{KPC}. O ST258 é atualmente considerado clone epidêmico mundial e o ST11, predominante também em nosso trabalho, tem sido associada à dispersão de KPC na Ásia, principalmente na China.
- ★ Em todas as amostras, mesmo as pertencentes a grupos clonais distintos, o gene *bla*_{KPC-2} estava associado a plataforma genética Tn4401, isoforma a, apontado na literatura como responsável pela disseminação desse gene.

★ O gene *bla*_{KPC-2} estava associado a plasmídios em 95,3% das amostras, sendo que em 58% foi possível identificar o grupo de incompatibilidade plasmidial. Nessa amostragem, o gene *bla*_{KPC-2} associou-se a plasmídios de 40kb do grupo IncN em 92% das amostras e a plasmídios de 55kb do grupo IncL/M em 8%.

★ Pela inclusão de amostras oriundas de várias regiões brasileiras, admite-se a ocorrência da disseminação do gene *bla*_{KPC} associado ao Tn4401, tanto devido a dispersão de um mesmo plasmídio de aproximadamente 40kb do grupo Inc N entre cepas de diferentes STs, assim como a disseminação de um mesmo complexo clonal (CC11), onde os clones A-KpRJ/ST437 e C/ST11 desempenham importante papel na dispersão desse gene.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry. 3ed. New York, USA: Springer; 2006.
2. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogen: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. Clin Microb Rev. 2008 ;11:589-603.
3. Martínez J, Martínéz L, Rosenblueth M, Silva J, Martínéz-Romero E. How are genes sequence analysis modifying bacterial taxonomy. Intern Microb. 2004; 7:261-268.
4. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico microbiológico. 5ed. Rio de Janeiro: Medisi; 2001.
5. McClelland M, Florea L, Sanderson K, Clifton SW, Parkhill J, Churcher C, Dougan G, Wilson RK, Miller W. Comparison of the *Escherichia coli* K-12 genome with sampled genomes of a *Klebsiella pneumoniae* and three *Salmonella enterica* serovars, Typhimurium, Typhi and Paratyphi. Nucleic Acids Res. 2000;28(24):4974-86.
6. Podschun R, Pietsch S, Ho C, Ullmann U. Incidence of *Klebsiella* Species in Surface Waters and Their Expression of Virulence Factors. Appl Environ Microbiol.2001;67(7):3325-27.
7. Madson B, Ofek I, Clegg S, Abraham SN. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. Infect Immun. 1994;62:843-8.
8. Kühn I, Ayling-Smith B, Tullus K, Burman LG. The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal Enterobacteriaceae strains in Swedish neonatal wards. J Hosp Infect. 1993; Apr;23(4):287-97.
9. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Med. 2006;119:S3-S10.
10. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: past, present, and future. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11): 4943-60.
11. BRASIL. ANVISA. Antimicrobianos - Base Teórica e Uso Clínico. 2007. [Internet] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicosauade/controlere/rede_rm/cursos/rm_controlere/opas_web/modulo1/conceitos.htm.
12. Silva JG, Carvalho I. New insights into aminoglycoside antibiotics and derivatives. Curr Med Chem. 2007;14(10):1101-19.
13. Walter Tavares. Antibióticos e Quimioterápicos para o clínico. 1ª ed. São Paulo: Atheneu; 2006.
14. Pankey, GA. Tigecycline. J Antimicrob Chemother. 2005;56(3):470-80.

15. Falagas ME, Kasiakou SK. Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *Clin Infect Dis*. 2005;40:133-41.
16. Mendes CAC, Burdmann EA. Polimixinas: revisão com ênfase na sua nefrotoxicidade. *Rev Assoc Med Bras*. 2009;55(6):752-59.
17. Shrestha NK, Tomford JW. Fosfomicin : a Review. *Infect Dis Clin Pract*. 2001;10:255–60.
18. Thomas TT. Hugo (Ugo) Schiff, Schiff Bases, and a Century of β -Lactam Synthesis. *Angew Chem Int*. 2007;46:2–7.
19. Drawz SM, Bonomo R. Three decades of beta-lactamase inhibitors. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):160-201.
20. Suarez C, Gudiol F. Antibióticos Betalactámicos. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009; 27(2):116-129.
21. Greenwood D. Antimicrobial Chemotherapy. 5ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.
22. Kropp H, Sundelof JG, Kahan JS, Kahan FM, Birnbaum J. MK0787 (N-formimidoyl thienamycin): evaluation of in vitro and in vivo activities. *Antimicrob Agents Chemother*. 1980 Jun;17(6):993-1000.
23. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs*. 2007;67(7):1027-52.
24. Sykes RB, Bonner DP. Aztreonam: The first monobactam. *Am J of Med*. 1985;78(2):2-10.
25. Chagas TPG, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect*. 2011 Mar;77(3):281.
26. Dzidic S, Suskovic J, Kos B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. *Food Technol Biotechnol*. 2008;46(1):11–21.
27. Abraham EP, Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*. 1940;146:837.
28. Ambler RP. The Structure of β -Lactamases. *Biological Sciences*. 1980;289(1036)321-331.
29. Tavares W. Resistência bacteriana. Em: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos. 3ed. São Paulo: Atheneu;2001.
30. Datta N, Kontomichalou P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208:239-44.

31. Bradford AP. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat Clin Microb Rev. 2001;4(14):933-51.
32. 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.
33. Stürenburg E, Mack D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. J Infect. 2003;47:273-95.
34. Pfaller MA, Segreti J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. Clinical Infectious Diseases. 2006;45:153-63.
35. Kliebe C, Nies BA, Meyer JF, Tolxdorff-Neutzling RM, Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. Antimicrob Agents Chemother. 1985;28:302–307.
36. Jacob G, Bush K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes-LAHEY STUDIES [Internet] 2011. Disponível em <http://www.lahey.org/Studies/>
37. Paterson, DL. Resistance in Gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. American Journal of Medicine. 2006;119:S20-S28.
38. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update Clinical Microbiology Reviews.2005;18: 657–86.
39. Dropa M. Caracterização genotípica de cepas da família Enterobacteriaceae produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo [Dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP; 2006.
40. Mohammad S, Anuradha S, Farrukh S, Mitul P, Haris MK, Abida M, Indu S. An overview of CTX-M β -lactamases. Reviews in Medical Microbiology. 2011;22(2):28-40.
41. Knothe H, Shah P, Krcmery V, Antal M, Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. Infection. 1983 Nov-Dec;11(6):315-7.
42. Chaudhary U, Aggarwal R. Extended spectrum Beta- lactamases (ESBL): An emerging threat to clinical therapeutics. Indian Journal of Medical microbiology.2004;22(2)75-80.
43. Coque TM, Baquero F, Canton R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. Eurosurveillance. 2008; 13(47).
44. Sader HS, Jones RN, Gales AC, Silva JB, Pignatari AC; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. Braz J Infect Dis. 2004 Feb;8(1):25-79.

45. MARTINS IS. *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no CTI de um hospital universitário. [Dissertação de mestrado] Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes; 2001.
46. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440-58.
47. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011 Dec;19(12):588-95.
48. Walther-Rasmussen J, Høiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Sep;60(3):470-82.
49. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* 2010;36(3): S8-S14.
50. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun;53(6):2227-38.
51. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol.* 2011 Dec;301(8):654-8.
52. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods.* 2005 Dec;63(3):219-28.
53. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide Diversity of *Klebsiella pneumoniae* That Produce Beta-Lactamase blaKPC-2 Gene. *Emerg Infect Dis.* 2010 Sep;16(9):1349-56
54. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul;55(7):3579-83.
55. Calisto F, Lito L, Melo-Cristino J, Duarte A. INCF plasmids responsible by dissemination of blaKPC gene among enterobacteriaceae. International Conference on Prevention & Infection Control (ICPIC 2011) Geneva, Switzerland. 2010.
56. Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jul;54(7):3002-6.
57. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPCgene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr;52(4):1257-63.

58. Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, Li L. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Oct;53(10):4333-8.
59. Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):557-62.
60. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2001 Apr;45(4):1151-61.
61. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2003 Mar;51(3):711-4.
62. Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, Rahal JJ, Brooks S, Cebular S, Quale J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis.* 2004 Jul 1;39(1):55-60.
63. Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Dec;48(12):4793-9.
64. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006 Dec;56(4):367-72.
65. Landman D, Bratu S, Kochar S, Panwar M, Trehan M, Doymaz M, Quale J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Jul;60(1):78-82.
66. Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM Jr, Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in Enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2009 Jan;47(1):239-41.
67. Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Aug;53(8):3365-70
68. Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae*

- isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Apr;63(4):654-8.
69. Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Oct;53(10):4565-7.
 70. Osterblad M, Kirveskari J, Koskela S, Tissari P, Vuorenoja K, Hakanen AJ, Vaara M, Jalava J. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. *Euro Surveill.* 2009 Oct 8;14(40).
 71. Giani T, D'Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F, Bartoloni A, Rossolini GM. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. *J Clin Microbiol.* 2009 Nov;47(11):3793-4.
 72. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Oct;49(10):4423-4.
 73. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2011 Oct;17(10):1791-8.
 74. Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill.* 2010 Nov 18;15(46).
 75. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y; Israeli KPC Kpn Study Group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Feb;53(2):818-20.
 76. Chen S, Hu F, Xu X, Liu Y, Wu W, Zhu D, Wang H. High prevalence of KPC-2-type carbapenemase coupled with CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a teaching hospital in China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 May;55(5):2493-4.
 77. Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Feb;66(2):307-12.
 78. Ge C, Wei Z, Jiang Y, Shen P, Yu Y, Li L. Identification of KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates in China. *J Antimicrob Chemother.* 2011 May;66(5):1184-6.
 79. Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Peck KR, Song JH, Ko KS. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 May;54(5):2278-9.
 80. Roh KH, Lee CK, Sohn JW, Song W, Yong D, Lee K. Isolation of a *Klebsiella pneumoniae* isolate of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Korea. *Korean J Lab Med.* 2011 Oct;31(4):298-301.

81. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1354-7.
82. Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M; KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Oct;17(10):1520-4.
83. Goldfarb D, Harvey SB, Jessamine K, Jessamine P, Toye B, Desjardins M. Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *J Clin Microbiol*. 2009 Jun;47(6):1920-2.
84. Akpaka PE, Swanston WH, Ihemere HN, Correa A, Torres JA, Tafur JD, Montealegre MC, Quinn JP, Villegas MV. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Trinidad and Tobago. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2670-1.A
85. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006 Aug;50(8):2880-2.
86. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr;53(4):1660-4.
87. Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):2968-70.
88. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jan;53(1):333-4.
89. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Feb;63(2):265-8.
90. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2702.
91. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Sep;34(3):286-8.
92. D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leão RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, Marques EA. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Nov;68(3):337-8.

93. Beirão EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011 Jan-Feb;15(1):69-73.
94. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S19 CLSI, Wayne, PA, 2010.
95. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect*. 2001 Feb;7(2):88-91.
96. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol*. 2010 Apr;48(4):1323-32.
97. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S20–U CLSI, Wayne, PA, 2010.
98. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 1.3 2011-01-05, *Enterobacteriaceae*; 2011.
99. Anvisa. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. [Internet] 2010. Disponível em http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/ih/pdf/nota_tecnica2_IH.pdf
100. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society for Healthcare Epidemiology of America. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1997 Jun;18(6):426-39.
101. Lopes AC, Rodrigues JF, Clementino MB, Miranda CA, Nascimento AP, de Moraes Júnior MA. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Nov;102(7):827-32.
102. Jonas D, Spitzmüller B, Daschner FD, Verhoef J, Brisse S. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of amplified fragment length polymorphism. *Res Microbiol*. 2004 Jan-Feb;155(1):17-23.
103. Fernández-Cuenca F. Applications of PCR techniques for molecular epidemiology of infectious diseases. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2004 Jun-Jul;22(6):355-60.
104. Poh CL, Yap SC, Yeo M. Pulsed-field gel electrophoresis for differentiation of hospital isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J Hosp Infect*. 1993 Jun;24(2):123-8.
105. Hansen DS, Skov R, Benedí JV, Sperling V, Kolmos HJ. *Klebsiella* typing: pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) in comparison with O:K-serotyping. *Clin Microbiol Infect*. 2002 Jul;8(7):397-404.

106. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J Clin Microbiol.* 2005 Aug;43(8):4178-82.
107. Vimont S, Mnif B, Fevre C, Brisse S. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Med Microbiol.* 2008 Oct;57(Pt 10):1308-10.
108. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis.* 2001 May 15;32
109. Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, Sader HS, Kugler K, Beach M. Survey of bloodstream infections due to Gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis.* 1999 Sep;29(3):595-607.
110. Stamm WE, Weinstein RA, Dixon RE. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. *Am J Med.* 1981 Feb;70(2):393-7.
111. Organização Mundial da Saúde [Internet]. 2011. Disponível em <http://www.who.int>
112. Organização Panamericana da Saúde [Internet]. 2011. Disponível em: <http://www.opas.org.br>
113. Gales AC, Sader HS, Dainesi SM, Mimica I I, Sampaio J, Zoccoli C, Oplustil C, Mendes C. Comparative in vitro Activity of Meropenem Versus Other Extended-Spectrum Antimicrobial Agents Against 2,085 Clinical Isolates Tested in 13 Brazilian Centers. *Braz J Infect Dis.* 1997 Dec;1(6):294-305.
114. Anvisa. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano III Edição nº 1 de 10 de julho de 2009. [Internet]. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilizada.htm
115. Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. DNA markers: protocols, applications and overviews. New York, NY: J. Wiley and Sons. p.151-171, 1997.
116. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S21 CLSI, Wayne, PA, 2011.
117. Mulvey MR, Soule G, Boyd D, Demczuk W, Ahmed R; Multi-provincial Salmonella Typhimurium Case Control Study Group. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing Salmonella isolate identified in Canada. *J Clin Microbiol.* 2003 Jan;41(1):460-2.
118. Hasman H, Mevius D, Veldman K, Olesen I, Aarestrup FM. Beta-Lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant Salmonella from poultry, poultry products and human patients in The Netherlands. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):115-21.

119. Ribot EM, Fair MA, Gautom R, Cameron DN, Hunter SB, Swaminathan B, Barrett TJ. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog Dis.* 2006 Spring;3(1):59-67.
120. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 1981 Mar;145(3):1365-73.
121. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
122. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis.* 2009 Apr;9(4):228-36.
123. Castanheira M, Woosley LN, Mendes RE, Deshpande LM, Jones RN. Increasing prevalence of KPC-producers as an emerging resistance mechanism among carbapenem non-susceptible isolates: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2008.
124. Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med.* 2005 Jun 27;165(12):1430-5.
125. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Jul;49(7):3018-20.
126. Bergamasco MD, Barroso Barbosa M, de Oliveira Garcia D, Cipullo R, Moreira JC, Baia C, Barbosa V, Abboud CS. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation. *Transpl Infect Dis.* 2011 Oct 28.
127. Brasil. TV Câmara- Câmara dos deputados. Superbactéria já causou 18 mortes no Distrito Federal. [Internet] Disponível em: <http://www2.camara.gov.br/tv/materias/CAMARA-HOJE/190221-SUPERBACTERIA-JA-CAUSOU-18-MORTES-NO-DISTRITO-FEDERAL.html>
128. Governo do Distrito Federal, Secretaria de Estado de Saúde, Subsecretaria de Vigilância a saúde, Gerência de investigação e prevenção à infecção e eventos adversos em serviços de saúde. Protocolo para manejo se surto de Enterobactérias produtoras de carbapenemase tipo KPC. 2011. [Internet] Disponível em: www.saude.df.gov.br/sites/300/313/00000048.pdf
129. Anvisa. Informe Técnico sobre a RDC nº20/2011. Orientações de procedimentos relativos ao controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição isoladas ou em associação. 2011. [Internet] Disponível em: www.crfms.org.br/_arquivos/diversos/anvisa-antibioticos.pdf
130. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report

- from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Feb;52(2):570-3.
131. Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Jul;56(1):128-32.
 132. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jun;65(6):1119-25.
 133. Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Detection of aac(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Oct;64(4):718-22.
 134. Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, Oethinger M, Paterson DL, Adams MD, Jacobs MR, Diekema DJ, Hall GS, Jenkins SG, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Mar;63(3):427-37.
 135. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS, Cohen AB, Furuya EY, Wilson SJ, Jenkins SG, Calfee DP. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec;55(12):5893-9.
 136. Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouveleki LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother.* 2011 Jul;66(7):1510-3.
 137. Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):526-9.
 138. Suh JY, Son JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH. Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan;54(1):560-2.
 139. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62(5):895-904.
 140. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, Vourli S, Zerva L, Armaganidis A, Kanellakopoulou K, Giamarellou H. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing K. pneumoniae in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis.* 2010 Feb 1;50(3):364-73.

141. Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010 Jul;29(7):765-9.
142. Kontopoulou K, Protonotariou E, Vasilakos K, Kriti M, Koteli A, Antoniadou E, Sofianou D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. *J Hosp Infect*. 2010 Sep;76(1):70-3.
143. Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Petrolito V, Sciortino D, Sciacca A, Santangelo C, Stefani S. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Sep;17(9):1444-7. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03572.x.
144. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol*. 2006 Oct;9(5):466-75.
145. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Aug;64(2):348-52.
146. Babini GS, Livermore DM. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother*. 2000 Aug;44(8):2230.
147. Lorena C Fehlberg , Ana C Gales , Fernanda M Inoue, Adriana G Nicoletti, Bruna Nonato, Renata C Picão Molecular Epidemiology of KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae* (KPN) Isolated Throughout Brazil: Identification of a New Sequence Type, ST617. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2011.
148. Mulvey MR, Grant JM, Plewes K, Roscoe D, Boyd DA. New Delhi metallo- β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*, Canada. *Emerg Infect Dis*. 2011 Jan;17(1):103-6.
149. Lee MY, Ko KS, Kang CI, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 Aug;38(2):160-3.
150. Nielsen JB, Skov MN, Jørgensen RL, Heltberg O, Hansen DS, Schønning K. Identification of CTX-M15-, SHV-28-producing *Klebsiella pneumoniae* ST15 as an epidemic clone in the Copenhagen area using a semi-automated Rep-PCR typing assay. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2011 Jun;30(6):773-8.
151. Diestra K, Miró E, Martí C, Navarro D, Cuquet J, Coll P, Navarro F. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. *Clin Microbiol Infect*. 2011 Jul;17(7):1032-6.
152. Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J Antimicrob Chemother*. 2008 Nov;62(5):978-85.

153. Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64(3):524-8.
154. Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol.* 2010 Jul;59(Pt 7):822-8.
155. Lastovetska O., Lo S., Patel S., Melano R. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Ontario, Canada: continuous surveillance of a worldwide disseminated lactamase. European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010.
156. Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Oct;54(10):4201-7.
157. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial Excision of blaKPC from Tn4401 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Dec 27.
158. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):5370-3.
159. Curiao T., Morosini M.I., Ruiz-Garbajosa P., Baquero F., Coque T.M., Cantón R. Outburst emergence of blaKPC-3-Tn4401a in Madrid (Spain) is associated with a pKPN3/4-like plasmid carried by a newly epidemic ST384-*Klebsiella pneumoniae* clone. 20th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. 2010.
160. Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, Jagielski M, Gierczynski R. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jan;55(1):443-6.
161. Poirel L, Lienhard R, Potron A, Malinverni R, Siegrist HH, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Mar;66(3):675-6.

8. ANEXO

Parte dos resultados obtidos nessa dissertação foi publicado na *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* sob o título “Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437”, com a autoria de Liliane M. Seki, Polyana S. Pereira, Maria da Penha A.H. de Souza, Magda de S. Conceição, Elizabeth A. Marques, Carlos Oliveira Porto, Elvira Maria L. Colnago, Carlene de F.M. Alves, Deize Gomes, Ana Paula D.A. Carvalho Assef, Ørjan Samuelsen e Marise D. Asensi.

Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437[☆]

Liliane M. Seki^a, Polyana S. Pereira^a, Maria da Penha A.H. de Souza^b, Magda de S. Conceição^c, Elizabeth A. Marques^d, Carlos Oliveira Porto^e, Elvira Maria L. Colnago^f, Carlene de F.M. Alves^g, Deize Gomes^h, Ana Paula D.A. Carvalho Assef^a, Ørjan Samuelsen^{i,1}, Marise D. Asensi^{a,*}

^aLaboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo, Rua Marechal Mascaranhas de Moraes 2025, 29052-121, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^cHospital Geral de Bonsucesso, Avenida Londres 616, 21041-030, Rio de Janeiro, Brazil

^dHospital Universitário Pedro Ernesto–UERJ, Avenida Vinte Oito de Setembro 77, 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil

^eLaboratório Central de Saúde Pública de Goiás, Avenida Contorno 3556, 74853-120, Goiânia-Goiás, Brazil

^fLaboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro, Rua do Resende 118, 20231-092, Rio de Janeiro, Brazil

^gLaboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Rua Conde Pereira Carneiro 80, 30510-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^hLaboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco, Rua João Fernandes Vieira, 50050-210, Recife, Pernambuco, Brazil

ⁱReference Centre for Detection of Antimicrobial Resistance, Department of Microbiology and Infection Control, University Hospital of North Norway, N-9038 Tromsø, Norway

Received 11 August 2010; accepted 11 January 2011

Abstract

The aim of this study was to investigate the genetic relatedness of 57 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from 5 states in Brazil, during 2006–2009. Pulse-field gel electrophoresis analysis identified 10 pulsotypes. The pulsotype designated as *Kp-RJ* (*Klebsiella pneumoniae*–Rio de Janeiro) was the dominant clone found in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo. Multilocus sequence typing of *Kp-RJ* assigned it to ST 437. Sequence types ST11, ST16, ST25, ST70, ST101, ST105, ST423, ST442, and ST443 were also identified. These results indicate the dissemination of a successful KPC-producing clone (ST437) in Brazil, which is a single locus variant of ST258. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *K. pneumoniae*; KPC-2; PFGE; MLST; Brazil

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) was first reported in a *K. pneumoniae* strain from the USA in 1996 (Yigit et al., 2001), since then it has been described worldwide (Cuzon et al., 2010). In Brazil, the first detection

of KPC-2 in *K. pneumoniae* occurred in 2006 from patients hospitalized in Pernambuco, Rio de Janeiro, and São Paulo states (Monteiro et al., 2009; Pavez et al., 2009; Peirano et al., 2009). In addition, KPC-2 has been reported in *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* isolated in the states of Rio Grande do Sul and Rio de Janeiro (Leão et al., 2011; Zavascki et al., 2009).

The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of 57 clinical isolates of KPC-2-producing *K. pneumoniae* from hospitalized patients. The isolates were submitted to our laboratory in the period of 2006–2009 from 11 tertiary-care hospitals located in the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais (Southeastern Brazil), Goiás (Midwestern Brazil), and Pernambuco (Northeastern Brazil), as part of the Bacterial Nosocomial Infection

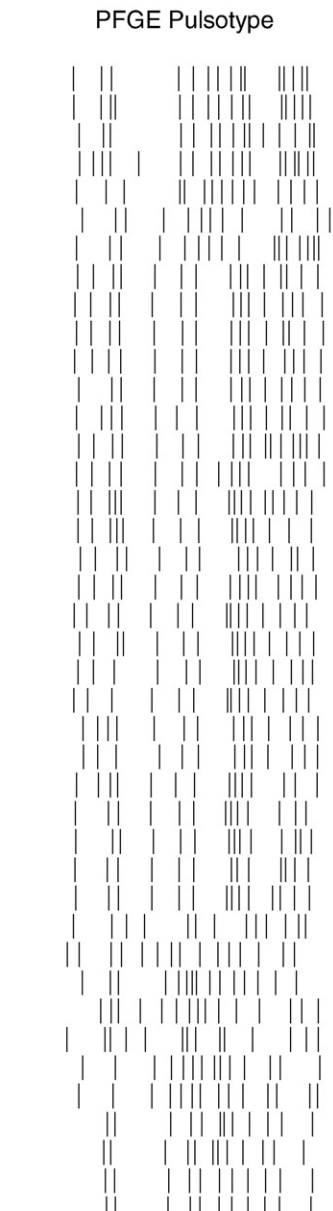
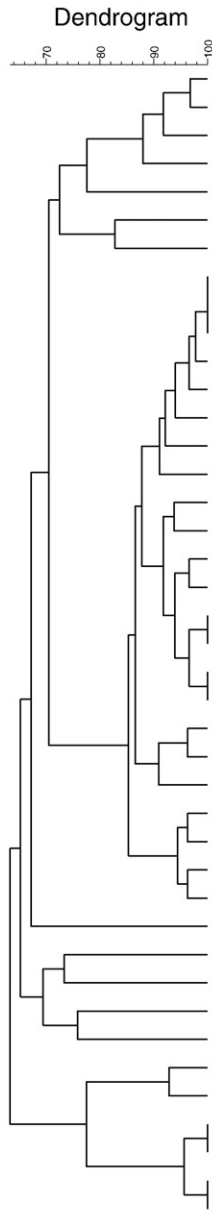
[☆] This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Organização Pan-Americana de Saúde–Brasil (OPAS-Brasil), and Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2598-4277x319; fax: +55-21-2270-6565.

E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br (M.D. Asensi).

¹ Ø. Samuelsen is supported by a grant from the Northern Norway Regional Health Authority Medical Research Program.

Dice (Opt:1.50%) (Tol 1.5%-1.5%) (H>0.0% S>0.0%) [0.0%-100.0%]
 PFGE2 PFGE2



Isolate	Hospital	Year	Geographic Area	Pulsotype/ST	Specimen
5333CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Blood
5238CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Blood
5237CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Tracheal aspirate
5112CCBH	H3	2006	MG	C / 11	Abdominal fluid
5096CCBH	H5	2009	RJ	I / 70	Blood
4169CCBH	H11	2008	RJ	E / 105	Tracheal aspirate
4122CCBH	H11	2008	RJ	E / 105	Blood
4414CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Feces
5039CCBH	H4	2009	ES	A-KpRJ / 437	Urine
5092CCBH	H5	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5178CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
4772CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
4992CCBH	H10	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Feces
4412CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
3475CCBH	H7	2007	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
5120CCBH	H4	2009	ES	A-KpRJ / 437	Blood
4698CCBH	H4	2008	ES	A-KpRJ / 437	Urine
4929CCBH	H11	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
4267CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
5152CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
4949CCBH	H11	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Abdominal fluid
4641CCBH	H9	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5160CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
4170CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
3451CCBH	H11	2007	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
3361CCBH	H11	2007	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5151CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Urine
5150CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5148CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5155CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRJ / 437	Blood
5093CCBH	H5	2009	RJ	H / 101	Blood
ATCC700603	-	-	-	-	-
4955CCBH	H2	2009	GO	F / 442	Blood
4350CCBH	H6	2008	RJ	J / ST16	Blood
4735CCBH	H4	2008	ES	G / 25	Urine
5037CCBH	H5	2009	ES	D / 443	Wound
5038CCBH	H4	2009	ES	D / 443	Urine
4427CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Skin
4424CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Tracheal aspirate
4426CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Urine
4425CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Urine

Fig. 1. Clinical data and molecular typing of representative isolates of all PFGE pulsotypes of KPC-2–producing *K. pneumoniae* isolates detected in 5 states in Brazil. *Kp-RJ* = *Klebsiella pneumoniae*–Rio de Janeiro clone.

Resistance Surveillance network (Fig. 1). These isolates were submitted based on resistance or reduced susceptibility for carbapenems (MIC of ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to ertapenem or MIC of 2–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to meropenem or imipenem). Species identification was performed with the automated Vitek System (bioMérieux, Marcy, l'Etoile, France).

All isolates were positive by the modified Hodge test. *bla*_{KPC} gene was detected in all isolates by polymerase chain reaction, and sequencing of the amplicons showed 100% sequence identity with *bla*_{KPC-2}. Sequencing and analysis were performed according to Otto et al. (2008). *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} were detected in 74%, 91%, and 67% of the isolates, respectively. These findings are in agreement with previous Brazilian reports which described the co-production of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} in KPC-producing *K. pneumoniae* isolates (Cuzon et al., 2010; Monteiro et al., 2009; Peirano et al., 2009).

Antimicrobial susceptibility testing was performed using Etest (bioMérieux) and disk diffusion. The MIC_{50/90} values for imipenem, meropenem, and ertapenem were 4/32, 8/32, 32/32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Considering the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints of January 2010 and June 2010, the percentage of resistance for imipenem, meropenem, and ertapenem was 42/86%, 53/91%, and 95/100%, respectively (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010a,b). These data demonstrated that the CLSI breakpoints of January 2010 would result in underdetection (phenotypically) of KPC-producing isolates. All isolates were resistant to third-generation cephalosporins and monobactams (aztreonam), while 81% were resistant for cefepime. In addition, co-resistance for amikacin (28%), ciprofloxacin (97%), gentamicin (49%), colistin (14%; MIC_{50/90}: 2/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and trimethoprim–sulfamethoxazole (81%) was observed. The co-resistance for colistin has been recently reported (Suh et al., 2010; Tóth et al., 2010) which has served to limit the available therapeutic options. Based on the US FDA Enterobacteriaceae breakpoints (≤ 2 , 4, and ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), all the isolates were susceptible or showed intermediate susceptibility for tigecycline (MIC_{50/90} value of 2/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as described previously (Bogaerts et al., 2010).

The pulse-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, after digestion with *Xba*I, resulted in 10 pulsotypes (A–J) displaying >80% similarity (Dice coefficient) within each type. The results showed that 68% (39/57) of these isolates were clonally related (pulsotype A), designated as *Kp-RJ* (*Klebsiella pneumoniae*–Rio de Janeiro). The *Kp-RJ* clone was identified in 6 different hospitals in the states of Rio de Janeiro ($n = 36$) from 2007 until 2009 and in 2 hospitals in the state of Espírito Santo ($n = 3$) between 2008 and 2009. The pulsotype C ($n = 5$) from 2006 to 2009 was found in 2 states (Pernambuco and Minas Gerais). The other pulsotypes represented single clones (F, G, H, I, and J) or clones disseminated within the same hospital (B, D, and E) (Fig. 1).

Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to the *K. pneumoniae* MLST website (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>)

for 18 selected isolates, including all pulsotypes from different hospitals of 5 states in Brazil. The dominant *Kp-RJ* clone was typed to sequence type (ST) 437 (allelic profile: 3-3-1-1-1-31). ST437 is a single-locus variant (SLV) of the ST258 (allelic profile: 3-3-1-1-1-79) clone that has been associated with the dissemination of KPC worldwide (Fig. 1).

The pulsotype C belonged to ST11 (allelic profile: 3-3-1-1-1-1-4; Fig. 1). ST11 is also a SLV of ST258 (Samuelsen et al., 2009) which has been associated with KPC-producing isolates from South Korea (Rhee et al., 2010), CTX-M-15–producing *K. pneumoniae* isolates from Hungary and Spain (Damjanova et al., 2008; Oteo et al., 2009), as well as colistin-resistant *K. pneumoniae* from South Korea (Suh et al., 2010). Recently, Cuzon et al. (2010) described *bla*_{KPC-2}–positive ST11 isolates from Pernambuco. The genetic relatedness of ST437 and ST11 with ST258 is of concern as these likely represent clones with a large epidemic potential for further dissemination.

ST16, ST70, ST101, ST105, and ST423 were also detected in Rio de Janeiro, as well as ST25, ST442, and ST443 identified in Espírito Santo and Goiás (Fig. 1). This indicates a horizontal gene transfer of *bla*_{KPC} to different clones of *K. pneumoniae* through the transfer of either plasmids or transposons (*Tn4401*) previously proven to be able to mobilize *bla*_{KPC} mobility (Cuzon et al., 2010; Nordmann et al., 2009).

In conclusion, although several PFGE and MLST types were identified, the dissemination of KPC-producing *K. pneumoniae* in Brazil is dominated by 2 sequence types (ST437 and ST11) that are closely related to the epidemic ST258 clone which has disseminated worldwide. The recognition of a particular KPC clone is an important step toward developing additional targeted strategies to prevent the spread of this pathogen in our country.

Acknowledgments

We thank the Institute Pasteur MLST database curators for coding the MLST alleles and profiles, the Genomic Platform for DNA Sequencing PDTIS (Instituto Oswaldo Cruz), and all the contributing laboratories that provided isolates for this study.

References

- Bogaerts P, Montesinos I, Rodrigues-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y (2010) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 65:361–376.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement (January 2010), M100–S20. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010b) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement (June 2010 Update), M100–S20–U. Wayne, PA: CLSI.
- Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P (2010) Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis* 16:1349–1356.

- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Füzi M (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’? *J Antimicrob Chemother* 62:978–985.
- Leão RS, Carvalho-Assef APDA, Correal JCD, Silva RV, Goldemberg DC, Asensi MD, Marques EA (2011) KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter-related infection. *Clin Microbiol Infect* 17:380–382.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC (2009) First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53:333–334.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9:228–236.
- Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vásquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J (2009) Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother* 64:524–528.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraeve WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M (2008) ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7:861–871.
- Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N (2009) Early dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2702.
- Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD (2009) Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 63:265–268.
- Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Ran Peck K, Song JH, Ko KS (2010) KPC-producing extreme-drug resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetic mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2278–2279.
- Samuelsen O, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG (2009) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 63:654–658.
- Suh JY, Song JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH (2010) Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 54:560–562.
- Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári E, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:765–769.
- Yigit H, Queenam AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC (2001) Novel carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenemase-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1151–1161.
- Zavascki AP, Machado AB, Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberknecht AC, Barth AL (2009) KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34:286–288 (Letter).