

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA PADILHA TAVARES

Caracterização molecular de *Enterobacteriaceae* não-*Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em diferentes estados brasileiros

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

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

RIO DE JANEIRO

2014

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

T231 Tavares, Carolina Padilha

Caracterização molecular de *Enterobacteriaceae* não-*Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em diferentes estados brasileiros. / Carolina Padilha Tavares. – Rio de Janeiro, 2014.

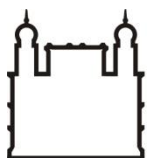
xviii, 130 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2014.

Bibliografia: f. 81-99

1. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. 2. Enterobacteriaceae. 3. Tn4401. 4. Epidemiologia molecular. I. Título.

CDD 579.34



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CAROLINA PADILHA TAVARES

Caracterização molecular de *Enterobacteriaceae* não-*Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas em diferentes estados brasileiros

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef

Aprovada em: 11/07/2014

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Milton Ozório de Moraes – Presidente

Profa. Dra. Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino

Profa. Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Prof. Dr. Robson de Souza Leão

Profa. Dra. Marisa Zenaide Ribeiro Gomes

Rio de Janeiro, 11 de julho de 2014.

À minha querida avó Iracy, por
todo o amor e dedicação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço profundamente a Deus por todas as oportunidades que me foram e estão sendo dadas, pelas pessoas que Ele colocou na minha vida para me ajudar a trilhar meu ainda recente caminho profissional.

Meus pais João Carlos e Valéria pelo apoio e amor mais do que incondicionais. Sem vocês, eu nada seria! Minha amada vovó Iracy por toda a paciência e carinho comigo desde sempre. Minha tia-madrinha Regina Helena e meu irmão Bruno, por todo o apoio. Agradeço novamente ao meu irmão canino Billy, meu fiel escudeiro.

Agradeço muito ao meu amor, Rodrigo, por ter proporcionado os melhores momentos que já vivi, por toda a felicidade e apoio nas crises momentâneas. Obrigada por me aturar sempre! Eu te amo!

Agradeço aos meus queridos amigos, que mesmo sem podermos nos ver com a frequência que gostaríamos, sei que posso sempre contar com vocês: Isabela best, Natália, Gisella, Ana Carolina, Aline, Luiz Cláudio, Luciana, Elaini, Mariana Soares e Max.

Meus colegas do LAPIH, pela ajuda e risada diárias. Muito obrigada! Agradeço em especial à minha orientadora por ter me aceitado como sua aluna e por ter dividido comigo um pouquinho do seu conhecimento, me ajudando assim a alicerçar o saber que levarei para a vida. Agradeço à chefe do laboratório, Marise, pela oportunidade de fazer parte da equipe do laboratório. Devo a todos vocês grande parte do conhecimento que adquiri até hoje.

Aos técnicos do meio de cultura (em especial o Sr. Evaldo e Davi), por auxiliarem não só o meu projeto de pesquisa, como também todos os outros projetos dos laboratórios do nosso andar. A ajuda de vocês foi imprescindível.

Agradeço também aos meus professores da Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular e à coordenação por todo o apoio.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Milton Ozório, Profa. Dra. Flávia Pellegrino, Profa. Dra. Elizabeth Marques, Prof. Dr. Robson Leão e à minha revisora Profa. Dra. Marisa Zenaide, muito obrigada por terem aceitado o convite.

Agradeço às agências de fomento, CAPES, CNPQ e Faperj por terem aceitado esse projeto e permitido que ele fosse realizado.

Agradeço a todos, que de alguma forma, tornaram esse trabalho possível.

Muito obrigada!

*“Messieurs, c'est les microbes
qui auront le dernier mot.”*

(Louis Pasteur)

*“O sucesso nasce do querer, da determinação e
persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não
atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no
mínimo fará coisas admiráveis.”*

(José de Alencar)

*“Se não podes entender, crê para que entendas.
A fé precede, o intelecto segue.”*

(Santo Agostinho)

SIGLAS E ABREVIATURAS

AmpC	Tipo de beta-lactamase cromossomal
AK	Amicacina
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	do inglês, “American Type and Culture Collection”
BHI	do inglês, “Brain Heart Infusion” Agar
BGN	Bacilo Gram-negativo
CAZ	Ceftazidima
CC	Complexo clonal
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias de Origem Hospitalar
CDC	do inglês, “Centers for Disease Control and Prevention”
CESP	Grupo CESP formado por <i>Citrobacter freundii</i> , <i>Enterobacter</i> spp., <i>Serratia</i> spp., <i>Providencia</i> spp., <i>Morganella</i> spp. e <i>Hafnia alvei</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	do inglês, “Clinical and Laboratory Standards Institute”
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
ECCMID	do inglês, European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMB	do inglês, “Eosin Methylene- blue” Agar
ETP	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
EUCAST	do inglês, “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”
FEP	Cefepime
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
GES	do inglês, Guiana extended spectrum beta-lactamase

GEN	Gentamicina
HPA	do inglês, “Health Protection Agency”
H₂S	Gás Sulfídrico
ICARE	do inglês, “Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”
Inc	Grupo de incompatibilidade plasmidial
IPM	Imipenem
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
IP	Instituto Pasteur
IR	Sequencia repetitiva invertida
IS	Sequência de inserção
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LPS	Lipopolissacarídeo
MEM	Meropenem
MHA	do inglês, “Müeller Hinton Agar”
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MLST	do inglês, “Multilocus sequence typing”
NBT	do inglês, “Nitro blue tetrazolium chloride”
NDM	“New Delhi” Metalobetalactamase
NHSN	do inglês, “National Healthcare Safety Network”
OMP	do inglês, “Outer membrane porin”
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
pb	Pares de bases
PB	Polimixina B
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	Eletroforese em gel de campo pulsado
Rede RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
RNA	Ácido ribonucleico

SENTRY	do inglês, “SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”
SHV	Beta-lactamase “Sulphydryl variable”
ST	do inglês, “Sequence type”
SXT	Sulfametoxazol/ Trimetropima
TAE	Tampão Tris- Acetato EDTA
TBE	Tampão Tris- Borato EDTA
TGC	Tigeciclina
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira
UTI	Unidade de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
UoW	Universidade de Warwick

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Figura representando o mecanismo de ação das beta-lactamases.	9
Figura 1.2. Representação esquemática do transposon Tn4401 segundo Naas e colaboradores (2008).	19
Figura 3.1. Representação da microplaca para a determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B.	30
Figura 4.3. Figura representativa do alinhamento das sequências de nucleotídeos do gene <i>bla</i> _{TEM} das amostras positivas com as sequências dos genes <i>bla</i> _{TEM-1} (Genbank JQ423955.1) e <i>bla</i> _{TEM-141} (Genbank AY956335.1).	47
Figura 4.3. Gel representativo de extração plasmidial e posterior hibridação em membrana de nylon com sonda <i>bla</i> _{KPC}	54
Figura 4.5. Dendrograma representativo dos 9 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 38 amostras de <i>E. aerogenes</i> produtoras de KPC-2.	58
Figura 4.6. Dendrograma representativo dos 12 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 13 amostras de <i>E. coli</i> produtoras de KPC-2.	59
Figura 4.7. Dendrograma representativo dos 16 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 17 amostras de <i>E. cloacae</i> produtoras de KPC-2.	60
Figura 4.8. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 4 amostras de <i>P. stuartii</i> produtoras de KPC.	61
Figura 4.9. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 3 amostras de <i>C. freundii</i> produtoras de KPC-2.	61
Figura 4.10. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 2 amostras de <i>K. oxytoca</i> produtoras de KPC-2.	61
Figura 4.11. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 4 amostras de <i>P. agglomerans</i> produtoras de KPC-2.	62

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1.1 Classificações das beta-lactamases.	11
Tabela 3.1. Iniciadores específicos utilizados para a detecção de regiões do transposon Tn4401.	26
Tabela 3.2. Iniciadores específicos para a detecção dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i> , e <i>bla_{CTX-M-15}</i> utilizados nas reações de PCR.	27
Tabela 3.3. Iniciadores específicos para a determinação dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial nas amostras de Enterobacteriaceae.	32
Tabela 3.4. Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST-IP para as amostras de <i>E. coli</i> conforme descrito no site do Instituto Pasteur.	37
Tabela 3.5. Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST-UoW para as amostras de <i>E. coli</i> conforme, descrito no site da Universidade de Warwick.	39
Tabela 4.1. Sítios de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.	41
Tabela 4.2. Período de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.	41
Tabela 4.3. Origem de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.	42
Quadro 4.1. Perfis de combinações de detecção das regiões do transposon Tn4401.	44
Tabela 4.4. Perfis do transposon Tn4401 encontrados em diferentes espécies de Enterobacteriaceae.	44
Tabela 4.5. Percentual de amostras produtoras de <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i> e <i>bla_{CTX-M}</i> associadas à KPC-2.	46
Tabela 4.6. Taxa de resistência aos antimicrobianos (incluindo resistentes e intermediárias) das diferentes espécies de Enterobacteriaceae produtoras de KPC através da técnica de difusão em ágar.	50
Tabela 4.7. Concentração inibitória mínima das diferentes espécies de Enterobacteriaceae produtoras de KPC para os carbapenemas, tigeciclina e polimixina B através do E-test.	53
Tabela 4.8. Variação de tamanho dos plasmídios carreadores de <i>bla_{KPC-2}</i> nas diferentes espécies de Enterobacteriaceae.	55
Tabela 4.9. Tamanho dos plasmídios marcados pelas sondas <i>bla_{KPC-2}</i> , <i>IncN</i> , <i>IncA/C</i> e <i>IncL/M</i>	57

Tabela 4.10. Tipagem molecular por MLST (esquema Instituto Pasteur e UoW) e PFGE das 13 amostras de <i>E. coli</i> produtoras de KPC-2.	63
Tabela 4.11. Alelos dos STs 131 e 4354, mostrando diferença em apenas um alelo do gene <i>fumC</i>	63
Tabela 4.12. Alelos dos STs 167 e 4352, mostrando diferenças em dois alelos dos genes <i>purA</i> e <i>gyrB</i>	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 4.1. Frequência de amostras de Enterobacteriaceae (não- <i>K. pneumoniae</i>) produtoras de KPC e distribuição por espécies.....	40
Gráfico 4.2. Frequência de detecção das sequências do Tn4401 entre as amostras produtoras de KPC-2.....	43
Gráfico 4.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC-2 através da técnica de difusão em ágar.....	49
Gráfico 4.4. Concentração inibitória mínima de ertapenem, meropenem e imipenem das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC-2.	51
Gráfico 4.5. Concentração inibitória mínima frente à tigeciclina e polimixina B das amostras de Enterobacteriaceae analisadas.....	52

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Família Enterobacteriaceae	2
1.2 Importância clínica e epidemiologia	3
1.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos	6
1.4 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos	7
1.4.1 Alteração do sítio ativo	8
1.4.2 Diminuição da expressão de porinas (OMPs)	8
1.4.3 Aumento da expressão de bombas de efluxo	8
1.4.4 Beta-lactamases	9
1.5 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)	12
1.6 Carbapenemases	13
1.6.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)	15
1.7 Estruturas associadas ao gene bla_{KPC}	17
1.7.1 Plasmídios	17
1.7.2 Transposon Tn4401	18
1.8 Técnicas de tipagem molecular	20
1.9 Justificativa e relevância	20
2. Objetivo geral	22
2.1 Objetivos específicos/ metas	22
3. Metodologia	23
3.1 Seleção das amostras	23
3.2 Identificação da variante alélica do gene bla_{KPC} e de suas regiões flanqueadoras 24	
3.2.1 Extração de DNA total	24
3.2.2 Confirmação da produção de KPC	25
3.2.3 Identificação da variante alélica de KPC	25

3.2.4.	Avaliação das regiões flanqueadoras de KPC	26
3.3.	Detecção de genes codificadores de ESBLs.....	27
3.4.	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	28
3.4.1.	Teste de difusão em ágar	28
3.4.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	29
3.4.3.	Análises estatísticas.....	31
3.5.	Extração plasmidial.....	31
3.6.	Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial	32
3.7.	Hibridação com sonda para o gene <i>bla</i> _{KPC} e grupos de incompatibilidade plasmidial	33
3.7.1.	Transferência dos plasmídios para membrana de nylon	33
3.7.2.	Hibridação com sonda de <i>bla</i> _{KPC-2} , <i>IncN</i> , <i>IncL/M</i> , <i>IncA/C</i> e <i>IncFII</i> marcadas com digoxigenina.....	34
3.7.3.	Detecção do DNA marcado	34
3.8.	Determinação do polimorfismo genético através de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE)	35
3.8.1.	Extração do DNA	35
3.8.2.	Digestão com enzima de restrição e corrida eletroforética	36
3.9.	Análise do polimorfismo genético das amostras de <i>E. coli</i> por MLST	37
3.9.1.	MLST segundo o Instituto Pasteur (IP).....	37
3.9.2.	MLST segundo a Universidade de Warwick (UoW)	38
4.	Resultados.....	40
4.1.	Seleção das amostras	40
4.2.	Detecção e identificação da variante alélica do gene <i>bla</i> _{KPC} e de suas regiões flanqueadoras	43
4.3.	Detecção de outros genes codificadores de beta-lactamases.....	45
4.4.	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	48
4.4.1.	Teste de difusão em ágar	48

4.4.2.	Determinação da concentração inibitória mínima.....	51
4.5.	Extração plasmidial e Hibridação com sonda para bla _{KPC}	54
4.6.	Análise do grupo de incompatibilidade plasmidial	55
4.8.	Determinação do polimorfismo genético por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE).....	57
4.9.	Tipagem molecular por “Multilocus Sequence Typing” (MLST) para E. coli	62
5.	Discussão.....	64
6.	Conclusões	79
7.	Referências	81
8.	Informações complementares	100
9.	Anexos.....	107

RESUMO

A produção de carbapenemases do tipo KPC tem se tornado um importante mecanismo de resistência aos carbapenemas na família Enterobacteriaceae. Embora seja descrita predominantemente em *Klebsiella pneumoniae*, a enzima KPC também tem sido encontrada em diferentes espécies de Enterobacteriaceae. Contudo, pouco se sabe sobre a epidemiologia da disseminação do gene *bla*_{KPC-2} nestas outras espécies. No Brasil, a enzima KPC foi relatada inicialmente em *K. pneumoniae* no Recife, em 2006, mas atualmente já se encontra disseminada pelo país, onde sua incidência tem aumentado significativamente. Portanto, o objetivo desse trabalho foi realizar a caracterização molecular de amostras brasileiras produtoras de KPC pertencentes a diferentes espécies de Enterobacteriaceae (excluindo *K. pneumoniae*), isoladas de diferentes estados brasileiros no período de 2009 a 2011. O perfil de resistência foi avaliado por difusão em ágar e E-test. A variante alélica de *bla*_{KPC}, assim como a participação do transposon Tn4401 e a análise da presença de outros genes de beta-lactamases (TEM, SHV e CTX-M) foram realizadas por PCR e sequenciamento. Análise plasmidial e hibridação foram realizadas para determinar o ambiente genético do gene *bla*_{KPC}. Para a tipagem molecular foi realizado PFGE e MLST (somente para *Escherichia coli*). Foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar da Fundação Oswaldo Cruz, 83 amostras produtoras de KPC-2 (correspondendo as espécies: *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* e *Serratia marcescens*) provenientes de 9 estados das regiões sudeste, nordeste e centro-oeste do país. Em amostras KPC positivas, foram encontrados altos percentuais de resistência à maioria dos antimicrobianos testados, inclusive tigeciclina (36,1% não sensíveis) e polimixina B (16,5%). As espécies mais resistentes foram *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *C. freundii* e *K. oxytoca*. A associação de KPC com outras beta-lactamases foi encontrada em 53% das amostras (45,8% produtoras de TEM, 6% produtoras de SHV e 22,9% produtoras de CTX-M). O gene *bla*_{KPC-2} foi encontrado associado a uma estrutura parcial do transposon Tn4401 com diferentes isoformas. Todas as amostras apresentaram o gene *bla*_{KPC-2} inserido em plasmídios de vários tamanhos e grupos de incompatibilidade. Observamos grande diversidade genética entre todas as espécies estudadas, mas encontramos, para algumas espécies, a presença de alguns grupos clonais prevalentes em determinados estados. A maioria das amostras de *E. aerogenes* pertenciam ao grupo clonal A e foram isoladas no DF e GO persistindo por 11 meses, sugerindo a possibilidade de um surto. Dessa forma, este estudo demonstrou a disseminação do gene *bla*_{KPC-2} em 9 Enterobacteriaceae de diferentes regiões do Brasil, incluindo espécies nas quais o gene não havia sido previamente descrito, como *P. agglomerans* e *P. Stuartii*. Evidenciou ainda as diversas ferramentas moleculares que o gene *bla*_{KPC-2} se beneficia para disseminar entre espécies de Enterobacteriaceae.

Palavras- chave

Klebsiella pneumoniae carbapenemases, Enterobacteriaceae, Tn4401, epidemiologia molecular

ABSTRACT

The production of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-type enzymes has become an important mechanism of carbapenem resistance in the Family Enterobacteriaceae. Although it is predominantly described in *Klebsiella pneumoniae*, the KPC enzyme has also been found in different species of Enterobacteriaceae. Moreover, little is known about the epidemiology of the dissemination of *bla*_{KPC} gene in other Enterobacteriaceae species. In Brazil, KPC was initially described in *K. pneumoniae* in Recife, state of Pernambuco, in 2006, but currently this enzyme is already disseminated throughout the country, where its incidence has increased significantly. Thus, this study aimed to perform the molecular characterization of KPC-producing Brazilian isolates belonging to different species of Enterobacteriaceae (non-*K. pneumoniae*) originated from different Brazilian states between 2009 and 2011. The resistance profile was evaluated by disc-diffusion method and E-test. The allelic variant of the *bla*_{KPC} gene, as well as the participation of Tn4401 and the presence of other beta-lactamase genes (TEM, SHV and CTX-M) were analyzed by PCR and genome sequencing. Plasmid analysis and hybridization were used to determine the genetic environment of the *bla*_{KPC} gene. Molecular typing was done by PFGE and MLST (only for *Escherichia coli*). Eighty three unique clinical isolates of Enterobacteriaceae KPC-2-producers were referred to the Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar from Fundação Oswaldo Cruz, corresponding to 9 different species (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*, *Pantoea agglomerans*, *Providencia stuartii*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii* and *Serratia marcescens*) isolated from 9 states located in northeast, southeast and central regions of Brazil. High resistance rates towards most of the antimicrobial agents tested, including tigecycline (36.1% nonsusceptible) and polymyxin B (16.5%) were detected. *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *C. freundii* and *K. oxytoca* were the most resistant species. The association of the *bla*_{KPC-2} gene with other beta-lactamase genes was found in 53% of the isolates (45.8% producing TEM, 6% producing SHV and 22.9% producing CTX-M). The *bla*_{KPC-2} gene was found associated with a partial Tn4401 structure with different isoforms. All of the isolates had the *bla*_{KPC-2} gene inserted within plasmids of different sizes and incompatibility groups. We found great clonal diversity among all of the studied species, but we found the presence of a few prevalent clonal groups in some regions. The majority of *E. aerogenes* isolates belonged to clonal group A, isolated from the central regions of Brazil (GO and DF), persisting for 11 months, suggesting the possibility of an outbreak. Therefore, this study demonstrated the dissemination of the *bla*_{KPC-2} gene among different Enterobacteriaceae in Brazil, including species in which this gene was not previously reported, such as *P. agglomerans* and *P. stuartii*. The study also showed the different molecular tools in which the *bla*_{KPC-2} gene benefits to disseminate between Enterobacteriaceae.

Keywords

Klebsiella pneumoniae carbapenemases, Enterobacteriaceae, Tn4401, molecular epidemiology.

1. Introdução

Antes do início da era antimicrobiana, a taxa de mortalidade devido a infecções bacterianas era muito alta. No entanto, após a descoberta da penicilina (primeiro antimicrobiano da classe dos beta-lactâmicos a ser descoberto), a chance de cura dos pacientes aumentou de forma significativa, fato importante devido ao momento histórico em que o planeta se encontrava – no auge da segunda guerra mundial onde os soldados eram acometidos por infecções causadas pelos mais diversos agentes etiológicos (1).

Entretanto, apesar da euforia inicial após a descoberta e início da comercialização dos antimicrobianos, a evidência de bactérias com resistência a essas drogas vem sendo cada vez mais comum. Essa resistência se dá por mecanismos complexos e diversos, o que torna o tratamento cada vez mais difícil, por conta do surgimento de amostras multirresistentes.

A resistência microbiana acarreta vários problemas relacionados à falha terapêutica, aumentando assim a morbidade e mortalidade de pacientes, além do custo do tratamento por conta do prolongamento do tempo de internação e gastos com outros antimicrobianos (2).

A preocupação em torno da resistência bacteriana aumentou no final da década de 90. A partir desse período, vários relatórios têm sido publicados por órgãos governamentais e programas de vigilância epidemiológica, e todos aconselham: (a) a diminuição do uso dos antimicrobianos, (b) a melhor escolha do antimicrobiano e da posologia, (c) a prevenção da infecção cruzada, e (d) o desenvolvimento de outros agentes antimicrobianos. Há correntes otimistas que acreditam que poderemos reverter essa tendência da resistência bacteriana, mas há correntes pessimistas que acham que só será possível reduzir o acúmulo de resistência de forma suficiente a conseguir permanecer um passo a frente da evolução bacteriana (3).

De acordo com Livermore (3), a redução do uso dos antimicrobianos nem sempre leva à redução da resistência, talvez pelo fato de que as bactérias já estejam bem adaptadas a carrearem determinantes de resistência. Talvez o foco devesse ser, ao invés de tentar controlar a resistência bacteriana, tentar reduzir o desenvolvimento de novos mecanismos de

resistência e, ao mesmo tempo, a tentativa contínua de desenvolver novos agentes antimicrobianos em taxa suficiente a nos mantermos a frente das bactérias.

No entanto, não podemos deixar de salientar que a resistência crescente aos antimicrobianos utilizados em patógenos comumente isolados é um resultado da pressão seletiva causada pelo uso frequente de antimicrobianos (4).

Um dos grandes problemas em relação à resistência a antimicrobianos no mundo, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, é a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) por bactérias da família Enterobacteriaceae, que causam resistência a penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de 3ª geração e monobactâmicos (5).

Com o surgimento das ESBLs, os carbapenemas passaram a ser utilizados com mais frequência para o tratamento das infecções por enterobactérias. Devido à pressão seletiva criada pelo uso dos carbapenemas, têm sido observados índices crescentes de resistência a estas drogas. O principal mecanismo de resistência aos carbapenemas em amostras da família Enterobacteriaceae é a produção de carbapenemases (6). Do ponto de vista epidemiológico, a carbapenemase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma das mais importantes, pois apresentou rápida disseminação mundial após sua descrição inicial.

1.1 Família Enterobacteriaceae

A família Enterobacteriaceae forma um grupo heterogêneo de bacilos Gram-negativos (BGN) que abrange diversos gêneros. Esses micro-organismos são amplamente encontrados na natureza, como no solo, nas plantas, na água e no trato gastrointestinal de animais e humanos (7).

A taxonomia desta família é complexa e vem sendo rapidamente modificada com a introdução de novos métodos de tipagem, como hibridação e metodologias de sequenciamento. De acordo com a “National Library of Medicine’s Internet Taxonomy database”, existem 53 gêneros definidos e 308 espécies documentadas (8). No entanto, cerca de 20 a 25 gêneros são causadores de patologias e os outros são raramente isolados (9).

Enterobacteriaceae pertence ao Domínio: Bactéria; Divisão: Proteobactéria; Classe: Gammaproteobacteria; Ordem: Enterobacteriales, sendo os gêneros *Klebsiella* spp., *Escherichia* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Providencia* spp., *Salmonella* spp. e *Shigella* spp. os mais frequentemente isolados (7).

Os micro-organismos pertencentes a essa família não formam esporos, são anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose com produção de ácido, reduzem nitrato a nitrito, são catalase-positivos (exceto *Shigella dysenteriae*) e oxidase-negativos, com exceção de *Plesiomonas*, gênero recentemente incluído nesta família (10). Podem ser móveis com flagelos peritríquios ou imóveis, podem produzir cápsula ou não, produzem diversas toxinas e fatores de virulência e têm uma complexa estrutura antigênica (11). São cultivadas em meios de peptona ou extrato de carne, sem acréscimo de cloreto de sódio ou outros suplementos. Os meios de cultura mais comumente utilizados para seu isolamento são ágar McConkey ou Eosina-azul de metileno (EMB) (9).

1.2 Importância clínica e epidemiologia

A família Enterobacteriaceae corresponde a 90% dos Gram-negativos de importância médica (12,13) e compreende cerca de 50% das bactérias isoladas nos laboratórios clínicos (11, 14, 15). Podem causar infecções comunitárias ou hospitalares, podendo ser oportunistas ou não. No homem, podem causar infecções em diferentes sítios, como no trato urinário, trato gastrointestinal, pneumonias, meningites e inclusive sepse (7). Alguns gêneros e espécies como: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. são reconhecidas como importantes agentes etiológicos de infecções hospitalares, sendo responsáveis por cerca de 70% das infecções do trato urinário (ITU) e 50% dos casos de sepse (16).

Um estudo de vigilância realizado em hospitais americanos no período de 2009 a 2010 pela “National Healthcare Safety Network” (NHSN), do “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) mostrou que cinco gêneros de Enterobacteriaceae estavam entre os 10 micro-organismos mais frequentemente isolados de infecções hospitalares. *E. coli* foi o terceiro mais isolado (11,5%), *Klebsiella* spp. foi o sexto (8%), *Enterobacter* spp.

encontrava-se em oitavo lugar (4,7%), seguido de *Proteus* spp. (2,5%) e *Serratia* spp. (2,1%) (17).

Gales e colaboradores (15) em um estudo associado ao sistema de vigilância SENTRY (“SENTRY Antimicrobial Surveillance Program”) avaliaram a prevalência de bactérias causadoras de infecções em hospitais de países da América Latina em diferentes sítios e encontraram que em infecções pulmonares, a espécie *K. pneumoniae* foi o quarto micro-organismo mais isolado (10,2%), seguido de outras enterobactérias: *Enterobacter* spp. (5,1%), *E. coli* (4,7%) e *Serratia marcescens* (3%). Enquanto em infecções de pele e tecidos moles, *E. coli* foi o segundo mais isolado (19,7%) e *K. pneumoniae*, o quarto (10,4%). Em infecções da corrente sanguínea, *E. coli* foi o segundo micro-organismo mais isolado (19%), seguido de *K. pneumoniae* (12,3%).

Dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM), obtidos no ano de 2012, em que foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes adultos internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) de 908 hospitais no Brasil, mostraram *K. pneumoniae* como o 3º micro-organismo mais isolado (12,4%), *E. coli* em sétimo lugar (5,9%) e *Enterobacter* spp. em nono (4,9%) (18).

Geralmente, os micro-organismos mais frequentemente isolados em infecções de corrente sanguínea são *Staphylococcus* coagulase-negativa e *Staphylococcus aureus* (15). Entretanto, de acordo com dados apresentados no 24th “European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases” (ECCMID 2014) por Stewardson e colaboradores (19) foi observado, em um estudo realizado em 10 hospitais de cinco países europeus (Itália, Reino Unido, Alemanha, Espanha, França e Suíça) entre 2010 e 2011, que 2.460 casos de infecções de corrente sanguínea foram causadas por Enterobacteriaceae, enquanto para *S. aureus* foram 1.048. Estes dados mostram um aumento da incidência de Enterobacteriaceae causando infecções da corrente sanguínea quando comparado com *S. aureus*. Esse fato pode estar associado ao aumento das taxas de resistência entre os BGNs, principalmente pela produção de ESBLs e carbapenemases, aumentando significativamente a frequência de isolamento em diversas infecções e a taxa de mortalidade dos pacientes.

De acordo com o relatório da Organização Mundial da Saúde (OMS) publicado em 2014, o percentual de amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenemas varia de 0 a 4% no continente Africano, de 0 a 11% nas Américas e de 0 a 8% no Sudeste Asiático e na região do Oeste do Pacífico. Em países europeus e no leste do mediterrâneo, o percentual é muito mais elevado, variando de 0 a 68% e 0 a 54%, respectivamente (20).

Nos EUA, o relatório da NCHS publicado em 2013 mostrou, para *E. coli*, um percentual de 19% de amostras resistentes a cefalosporinas de terceira geração (sugerindo fenótipo ESBL) e 3,5% de amostras resistentes aos carbapenemas (sugerindo fenótipo de carbapenemase) e 41,8% resistentes a quinolonas. Para *Enterobacter* spp. foi encontrado um percentual de 38,5% de amostras resistentes a cefalosporinas de terceira geração e 4,6% de amostras resistentes aos carbapenemas. Para *K. pneumoniae*, foi encontrado um percentual de 28,8% de amostras resistentes a cefalosporinas de terceira geração e 12,8% de amostras resistentes aos carbapenemas (17).

No Brasil, dados da Rede RM em 2012 mostraram que 35,3% das amostras de *K. pneumoniae* eram resistentes a cefalosporinas de amplo espectro e sensíveis aos carbapenemas e 25,3% mostraram-se resistentes a ambas as drogas. Para *E. coli*, foi encontrado um percentual de 26,7% de amostras resistentes a cefalosporinas e sensíveis aos carbapenemas e 6,3% de amostras resistentes a ambos os antimicrobianos. Para *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. foi encontrado um percentual de 32,9% e 37,5% de amostras resistentes a cefalosporinas e sensíveis aos carbapenemas, respectivamente. Para ambas as drogas, foram encontrados percentuais de 11,4% e 7,2% de amostras resistentes, respectivamente (18).

A crescente prevalência de amostras resistentes aos carbapenemas tem se tornado um grave problema de saúde pública de âmbito mundial. Como consequência, devido aos altos índices de resistência, o uso de antimicrobianos mais potentes se faz necessário, elevando os custos e o tempo de internação do paciente e gerando um aumento da taxa de mortalidade (21,22).

1.3 Mecanismos de resistência aos antimicrobianos

Para o antimicrobiano ser efetivo, ele deve ser transportado do ambiente externo até o interior da célula bacteriana e encontrar seu sítio de ação, sem perder sua estrutura molecular biologicamente ativa. Além disso, é importante que o sítio de ação esteja acessível e inalterado (23). Com a pressão seletiva contínua em decorrência do uso de antimicrobianos, muitas espécies adquirem estratégias para se protegerem, surgindo assim, amostras resistentes.

Existem inúmeros trabalhos publicados com o objetivo de elucidar o fenômeno da resistência bacteriana (24). Os mecanismos podem ser divididos em intrínsecos ou adquiridos. Uma bactéria pode ser intrinsecamente resistente a uma ou mais classes de antimicrobianos ou pode se tornar resistente a determinados antimicrobianos através de mutações espontâneas ou aquisição de genes a partir de outros micro-organismos. A resistência adquirida desenvolvida devido a mutações cromossômicas espontâneas e passada da célula-mãe para célula-filha é chamada resistência vertical, enquanto a aquisição de um novo material genético a partir de outros micro-organismos resistentes se chama resistência horizontal. Este tipo de resistência pode ocorrer entre amostras da mesma espécie ou entre diferentes espécies e gêneros (24).

A partir de mutações espontâneas, a bactéria pode passar a expressar sistemas de efluxo, modificar seu sítio-alvo, produzir uma via metabólica alternativa para driblar a ação da droga ou diminuir a expressão de genes que sinalizam a produção de porinas, para evitar que a droga penetre na célula e alcance seu alvo intracelular (ex.: ompF produzida pela *E. coli*). A partir da aquisição de genes de resistência, a bactéria pode produzir enzimas (ex.: beta-lactamases) capazes de inativar o antimicrobiano (23,24).

Os mecanismos de trocas genéticas incluem a conjugação, transdução e transformação. Em cada um desses processos, os transposons podem participar facilitando a incorporação dos genes de resistência no genoma do hospedeiro ou em plasmídios. Através destes mecanismos de trocas genéticas, muitas bactérias tornaram-se resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos e essas amostras multirresistentes são causa de grande preocupação, particularmente em hospitais e outras instituições de saúde, onde ocorrem com maior frequência (24).

Uma vez adquiridos, os genes de resistência não são perdidos facilmente. Na verdade, eles tornam-se uma parte relativamente estável do genoma bacteriano. Além disso, outros determinantes de resistência também podem ser passados junto com o gene de resistência, ampliando ainda mais o fenótipo multirresistente e diminuindo as opções terapêuticas (25).

1.4 Resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais utilizados na prática clínica por serem os que apresentam menor toxicidade ao ser humano (11). Seu mecanismo de ação envolve o impedimento da síntese da parede celular bacteriana (estrutura ausente em células eucariotas). Ao se ligarem às chamadas proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), que são enzimas da família das serino-proteases, impedem a ligação cruzada dos peptídeoglicanos da parede celular bacteriana, impedindo a transpeptidação e ocasionando a instabilidade da estrutura e posterior destruição por autolisinas, levando à morte do micro-organismo. Por esta razão são considerados bactericidas (11,26).

A característica comum dos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos é a presença do anel beta-lactâmico na estrutura da molécula. A associação de diferentes cadeias lineares aos anéis beta-lactâmicos modifica as propriedades do composto, resultando nos quatro tipos de beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Pequenas alterações dentro de cada grupo são capazes de modificar as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência às beta-lactamases (27).

Os quatro principais mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos são: (a) alteração do sítio ativo; (b) diminuição da expressão de porinas; (c) aumento da expressão de bombas de efluxo; (d) produção de enzimas beta-lactamases (28).

1.4.1 Alteração do sítio ativo

O sítio alvo dos beta-lactâmicos são as PBPs. Alterações nessas enzimas podem causar a diminuição da afinidade dos beta-lactâmicos ao seu sítio-alvo, fazendo assim, com que aumente a resistência da bactéria a esse antimicrobiano (26).

Devido ao uso extenso da penicilina desde o seu descobrimento, algumas espécies bacterianas, como *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus* spp. desenvolveram resistência a partir da síntese de PBPs mutantes (26).

1.4.2. Diminuição da expressão de porinas (OMPs)

Para atingirem seu alvo intracelular, os antimicrobianos necessitam atravessar a parede celular através das porinas localizadas na membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas. Devido à diminuição da expressão das porinas ou produção de porinas mutantes o antimicrobiano simplesmente não consegue penetrar na célula bacteriana e atingir seu alvo, ocasionando resistência aos antimicrobianos dessa classe (26).

Algumas espécies de Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *E. coli*) podem apresentar resistência aos carbapenemas devido a esse fenômeno geralmente associado a outros mecanismos de resistência. Este mecanismo também tem sido associado a resistência aos carbapenemas em outras bactérias Gram-negativas como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (26).

1.4.3. Aumento da expressão de bombas de efluxo

As bombas de efluxo têm função de expulsar substâncias do interior da célula bacteriana ao ambiente externo, funcionando assim como um mecanismo de proteção ao micro-organismo. O aumento da expressão de bombas de efluxo pode ser tanto um mecanismo intrínseco como adquirido. Desse modo, quando esse fenômeno ocorre, o antimicrobiano pode ser bombeado diretamente para fora da célula bacteriana antes que atinja seu alvo intracelular, ocasionando resistência aos beta-lactâmicos (26).

Em Enterobacteriaceae, o aumento da expressão da bomba de efluxo AcrAB-TolC pode contribuir para a redução da sensibilidade a diferentes classes de antimicrobianos. Em

E. coli, por exemplo, a superexpressão de AcrAB-TolC pode ser responsável pela resistência a quinolonas (29).

1.4.4. Beta-lactamases

A produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos. A primeira enzima beta-lactamase foi identificada em *E. coli* antes do uso clínico da penicilina. Este relato foi publicado há mais de 70 anos por Abraham e Chain onde foi descrita a “*B. coli* penicilinase” (26). O uso de antimicrobianos beta-lactâmicos vem aumentando a pressão seletiva nas bactérias, promovendo a sobrevivência de microorganismos com múltiplas beta-lactamases. Atualmente, mais de 850 beta-lactamases já foram identificadas, o que é um problema mundial (26).

As beta-lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Seu mecanismo de ação envolve a hidrólise do anel beta-lactâmico presente em todas as drogas dessa classe, fazendo com que elas percam a sua ação antimicrobiana (30) (Figura 1.1).

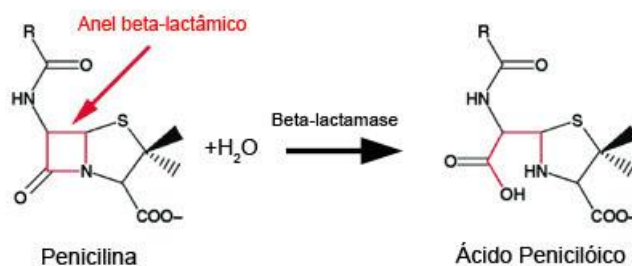


Figura 1.1. Figura representando o mecanismo de ação das beta-lactamases.

Tão logo a penicilina começou a ser comercializada, já foram documentados casos de *S. aureus* resistentes através da aquisição de um tipo de penicilinase plasmidial. Essa beta-lactamase se disseminou para quase todas as amostras clínicas de *S. aureus* e também para outras espécies de *Staphylococcus* (31).

Vários gêneros de bactérias Gram-negativas possuem a beta-lactamase cromossomal AmpC, e acredita-se que essa enzima tenha evoluído a partir das PBPs, pois elas têm

sequências homólogas entre si. A ocorrência dessas enzimas deu-se muito antes da introdução da terapia antimicrobiana (31).

O gene que codifica a AmpC pode sofrer uma desrepressão quando a bactéria é submetida a tratamento com antimicrobianos beta-lactâmicos (principalmente a cefoxitina), resultando em resistência aos mesmos (32,33). Esse mecanismo é muito comum na família Enterobacteriaceae, principalmente entre as espécies do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella* spp. e *Hafnia alvei*) e *E. coli* (16,33).

A expressão desta enzima combinada com uma mudança na permeabilidade na membrana por conta de alterações nas porinas pode resultar em resistência aos carbapenemas. Esse mecanismo foi descrito em bactérias dos gêneros: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia* e das espécies: *Buttiauxella agrestis*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia rhapontici*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* e *Serratia marcescens* (33).

A primeira enzima plasmidial identificada em Gram-negativos (TEM-1) só foi descrita no início dos anos 60, em uma amostra de *E. coli* isolada de uma paciente em Atenas, Grécia, com o nome Temoniera (por isso a designação da enzima TEM). Por ser uma enzima associada a plasmídios e transposons, sua disseminação para outras espécies de bactérias ocorreu de forma muito rápida, inclusive em nível mundial (31).

Existem duas grandes classificações para as beta-lactamases: a classificação proposta por Ambler (30), baseada na homologia de sequência dos aminoácidos (classes A – D), e a classificação de Bush-Jacoby-Medeiros, que vai dos grupos 1 a 4 e diversos subgrupos, baseada no perfil de substrato e inibidores dessas enzimas (34,35) (Tabela 1.1).

Tabela 1.1 Classificações das beta-lactamases.

Grupo Funcional (Bush-Jacoby)	Classe Molecular (Ambler)	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.
2 ^a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> sp.	Penicilinases 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 de primeira geração, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBLs: CTX-M-15, CTXM- 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 de primeira geração, 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.	Cefalosporinases 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.

Adaptado de Bush, 2011 (35).

1.5. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

As beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) pertencem às classes A e D de Ambler ou 2be e 2d de Bush-Jacoby-Medeiros (35). Essas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas de amplo espectro, cefalosporinas de 3ª geração e monobactâmicos (5). Atualmente, existem mais de 500 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas TEM ou SHV. 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 (5).

A primeira ESBL descrita foi a SHV-2, encontrada em uma amostra de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha em 1983. Ela possuía capacidade de hidrolisar cefotaxima e, em menor grau, ceftazidima. Após o sequenciamento desse gene, foi visto que essa beta-lactamase diferia da SHV-1 através da modificação de uma glicina por uma serina na posição 238. Essa mutação sozinha aumentou o espectro de hidrólise dessa enzima (5).

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 não tem ação contra cefalosporinas de amplo espectro e é inibida por ácido clavulânico. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico, entretanto difere de TEM-1, pois tem um promotor mais ativo e difere no ponto isoelétrico. TEM-13 também é similar a TEM-1 e TEM-2. Essas três enzimas não são ESBLs (5).

A primeira ESBL do tipo TEM descrita foi isolada em Liverpool, Inglaterra, em 1982 em uma amostra de *Klebsiella oxytoca*. De forma interessante, essa amostra era proveniente de uma unidade neonatal onde já havia tido um surto de *K. oxytoca* produtora de TEM-1. Foi utilizada ceftazidima para tratar os pacientes infectados. Esse é um bom exemplo de como a pressão seletiva induzida pelo uso do antimicrobiano induziu a produção de uma ESBL (5).

A maioria das ESBLs derivadas de TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 diferem de suas progenitoras por apenas um aminoácido. Isso resulta em uma mudança profunda na atividade enzimática das ESBLs, permitindo que elas sejam capazes de hidrolisar as cefalosporinas de 3ª geração e o aztreonam (5).

As ESBLs do tipo CTX-M hidrolisam preferencialmente a cefotaxima, mas também hidrolisam as outras cefalosporinas. São inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (5,36). Estas enzimas são as mais difundidas no mundo. Foram inicialmente reportadas na segunda metade dos anos 80 e sua disseminação ao redor do mundo tem aumentado dramaticamente desde 1995. A primeira amostra clínica produtora de CTX-M foi isolada na Alemanha, em 1989 em uma amostra de *E. coli* e foi designada CTX-M-1 por conta da sua atividade hidrolítica contra a cefotaxima (36). No mesmo período em que foi descrita a CTX-M-1, houve uma disseminação muito grande de amostras de *Salmonella* resistentes à cefotaxima na América do sul (36).

As enzimas CTX-M estão disseminadas mundialmente, particularmente entre amostras da família Enterobacteriaceae, e foi visto que as CTX-M encontradas são muito semelhantes à ESBL cromossomal presente no gênero *Kluyvera* (36).

A partir de relatos das agências de vigilância “Health Protection Agency” (HPA) e do “European Antimicrobial Resistance Surveillance System” observou-se que a resistência de amostras de *E. coli* para cefalosporinas tem crescido muito, devido à produção de ESBLs, particularmente as cefotaximases (CTX-Ms) (37).

Existem 158 variantes alélicas de CTX-M (38) e a mais disseminada no mundo é a CTX-M-15 (2, 39). Em 2008, amostras de *E. coli* pertencentes ao clone ST131, determinado pela técnica de MLST (“Multilocus sequence typing”), produtoras de CTX-M-15 foram identificadas simultaneamente em nove países diferentes, englobando três continentes. Portanto, acredita-se que a disseminação intercontinental desse clone tenha contribuído muito para a disseminação da CTX-M-15 em nível mundial (40).

1.6. Carbapenemases

A produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre os carbapenemas) é um dos principais mecanismos de resistência a estas drogas em espécies da família Enterobacteriaceae. As carbapenemases descritas pertencem a três grupos de classificação de Ambler, grupo A, B e D.

As carbapenemases da classe A de Ambler e 2f de Bush-Jacoby-Medeiros incluem as serino-carbapenemases (NMC/IMI, SME e KPC). Essas enzimas podem hidrolisar carbapenemas, assim como cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e aztreonam. Foram primariamente identificadas em *E. cloacae*, *Serratia marcescens* e *K. pneumoniae*. Uma quarta enzima deste grupo é a GES, que foi originalmente identificada como da família das ESBLs, mas ao longo do tempo, algumas variantes com certo nível de hidrólise do imipenem foram identificadas (6). A representante deste grupo mais prevalente no mundo é a KPC, que será discutida mais profundamente posteriormente.

As carbapenemases da classe B, ou metalo-beta-lactamases (MBLs) mais comumente encontradas são IMP e VIM, encontradas principalmente em países Europeus e nos EUA (41); e mais recentemente a NDM (“New Delhi” metalo-beta-lactamase). Esta enzima foi descrita inicialmente em 2008 na Suécia, a partir de um paciente que foi submetido a um procedimento cirúrgico em Nova Deli, na Índia. Essa enzima tem sido relatada mundialmente, principalmente em Enterobacteriaceae, como *Klebsiella* spp. e *E. coli* (41).

NDM-1 foi recentemente descrita pela primeira vez no Brasil em 2013 em uma amostra de *P. rettgeri* produtora da NDM-1 isolada de um paciente no Rio Grande do Sul. (42). Posteriormente, esta enzima foi detectada em amostras de *Enterobacter hormaechei* isoladas no mesmo hospital em que foi detectada a *P. rettgeri* (43).

As carbapenemases da classe D são as chamadas oxacilinasas (OXAs). Entre as enterobactérias, a OXA-48 é a mais importante. Estas enzimas apresentam boa atividade contra penicilinas, hidrolisam fracamente os carbapenemas, oxamino-cefalosporinas (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) e aztreonam. O primeiro relato dessa enzima foi em uma amostra de *K. pneumoniae* na Turquia, em 2001 (44). Após, houve relatos em 2007 na Bélgica (45), em diversos outros países europeus (França, Espanha, Alemanha, Holanda e Reino Unido) e no norte do continente Africano (Marrocos e Tunísia). Essas enzimas têm sido identificadas principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae* e não são inibidas por quelantes (EDTA) ou inibidores clássicos de beta-lactamases, como ácido clavulânico ou tazobactam (46).

1.6.1. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

A carbapenemase do tipo KPC foi descrita pela primeira vez, através de um projeto de vigilância (ICARE- “Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”), em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente da Carolina do Norte em 1996. Essa amostra era resistente a todos os beta-lactâmicos testados, mas a concentração inibitória mínima (CIM) dos carbapenemas diminuía na presença do ácido clavulânico. A enzima foi chamada KPC-1 (47).

Dois anos depois, Yigit e colaboradores reportaram, a partir do mesmo projeto de vigilância (ICARE), uma amostra de *K. oxytoca* KPC- positiva, mas foi constatado que havia a diferença de um aminoácido com relação à KPC-1. Assim, esta enzima foi chamada KPC-2 (48). Porém, uma correção da sequência nucleotídica de KPC-1 indicou que os genes *bla*_{KPC-1} e *bla*_{KPC-2} são idênticos (49).

Uma variação de um único aminoácido da KPC-2, designada KPC-3, foi reportada em um surto de *K. pneumoniae* em um centro médico de Nova Iorque (50). A KPC-4 também vem de uma mutação da KPC-2, assim como a KPC-5, descrita em uma amostra de *P. aeruginosa* (51). Atualmente já foram depositados na base de dados disponível online do “Lahey Hospital & Medical Center” (38), 18 variantes alélicas (*bla*_{KPC-2} a *bla*_{KPC-19}), sendo as enzimas KPC-2 e KPC-3 as mais prevalentes no mundo (52).

Fora dos EUA, o primeiro caso de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi, em 2005 na França, isolada de um paciente originário dos EUA (53). Já existem relatos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC na Europa, Ásia e América do Sul (54,55,56). Atualmente, essa enzima é considerada endêmica nos EUA, Grécia e Israel (46),

No Brasil, a KPC foi inicialmente descrita em quatro amostras de *K. pneumoniae* isoladas em Recife em 2006 (57), mas logo houve relatos no Rio de Janeiro (58) e em São Paulo (59).

Em 2010, foram relatados com grande repercussão na mídia, surtos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em vários estados brasileiros, causando grande apreensão na comunidade médica e científica. Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária

(ANVISA) divulgou, através de uma nota técnica, medidas para o controle da disseminação de bactérias multirresistentes incluindo enterobactérias produtoras de KPC (60).

Hoje já existem relatos de *K. pneumoniae* produtora de KPC em vários estados brasileiros, como Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina (61), Mato Grosso do Sul (62), Paraíba (63) e Recife (64).

Como o próprio nome diz, essa enzima é mais frequentemente isolada em amostras de *K. pneumoniae* e dados do SENTRY mostram que a KPC é a carbapenemase mais associada a amostras de *K. pneumoniae* nas Américas do Norte e do Sul (65). Contudo esta enzima também tem sido descrita em diferentes espécies de Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (66,67,68).

No Brasil, ainda existem poucos relatos da presença de KPC em outras espécies de Enterobacteriaceae. O primeiro relato mostrou a presença do KPC-2 em duas amostras de *E. cloacae* no Rio Grande do Sul (69). Em 2010, foi descrita a presença de cinco clones de *E. coli* produtoras de KPC-2 em um hospital no Rio de Janeiro (70). Del Peloso e colaboradores, em 2010 (71), descreveram um caso de sepse por *S. marcescens* produtora de KPC e Andrade e colaboradores (52), mostraram a presença de KPC em *C. freundii*, *S. marcescens* e *E. cloacae* em amostras isoladas no Rio de Janeiro e em São Paulo. Mais recentemente foi relatada a presença de KPC em uma amostra de *K. oxytoca* isolada em Recife (72). Esta enzima também já foi descrita em *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida* (73,74).

Além disso, há relatos da presença de bactérias produtoras de ESBLs e amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 encontradas em efluentes de esgoto de um hospital do Rio de Janeiro (75). Outro grupo também relatou a presença de amostras de Enterobacteriaceae, *Aeromonas* spp. e *Kluyvera* spp. produtoras de KPC-2 isoladas em efluentes de esgoto de um hospital universitário localizado em São Paulo (SP) (76). Também foram encontradas três amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 pertencentes ao complexo clonal 11 isoladas no rio Tietê e rio Pinheiros (SP) (77), demonstrando o problema da falta de tratamento do esgoto hospitalar, o que ocasionou o isolamento de amostras altamente resistentes em rios urbanos.

Enterobacteriaceae produtoras de KPC geralmente apresentam coprodução de ESBLs e resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Desta forma, as polimixinas (colistina e polimixina B) e tigeciclina têm sido utilizadas para o tratamento das infecções por bactérias resistentes aos carbapenemas. As polimixinas apresentam alta toxicidade e a tigeciclina, ainda não tem teste de sensibilidade padronizado no CLSI e não é recomendada para infecções de corrente sanguínea (57).

Recentemente, foram descritas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC resistentes a colistina na Grécia (78), nos EUA (79) e na Hungria (80), o que torna ainda mais difícil o tratamento dessas infecções.

O que torna a KPC mais importante do que as outras enzimas da classe A é o fato do gene *bla*_{KPC} ser encontrado em elementos móveis, o que garante a sua dispersão não só entre as espécies de *Klebsiella*, mas entre outros gêneros (81). Muitos trabalhos têm relatado que o gene *bla*_{KPC} é carregado pelo transposon Tn4401 inserido em plasmídios (26,56,82).

1.7. Estruturas associadas ao gene *bla*_{KPC}

1.7.1. Plasmídios

Plasmídios são moléculas de DNA circular dupla-fita extracromossomal capazes de se auto-replicarem. Eles possuem sistemas que garantem sua replicação de forma autônoma e também têm mecanismos de controle do seu número de cópias e garantindo sua perpetuação durante a divisão celular. Essa molécula de DNA é capaz de ser transferida entre bactérias de diferentes gêneros através do processo de conjugação (83,84).

Para tentar classificá-los, foi proposto um esquema baseado na estabilidade dos plasmídios durante o fenômeno da conjugação, chamado de incompatibilidade plasmidial. Dessa forma, plasmídios que fazem parte do mesmo grupo de incompatibilidade plasmidial (Inc) apresentam os mesmos controles de replicação. Sendo assim, a incompatibilidade plasmidial foi definida como a inabilidade de dois plasmídios relacionados entre si serem propagados de forma estável na mesma linhagem celular (83,84).

Em Enterobacteriaceae, os grupos Inc mais frequentemente encontrados carregando genes e determinantes de resistência, como por exemplo, o gene *bla*_{KPC} são: HI2, HI1, I1, X, L/M, N, FIA, FIB, FIC,W, Y, P, A/C, T, K, B/O, F e FIIA (83,84).

O gene *bla*_{KPC} tem sido descrito associado a plasmídios de diferentes tamanhos e de diferentes grupos de incompatibilidade, como no trabalho de Cuzon e colaboradores (56), no qual foram analisadas amostras provenientes da Suécia, Grécia, Estados Unidos, Colômbia, Israel e Brasil. Foram encontrados plasmídios de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade: IncFII (80kb), Inc L/M (912, 35 e 75kb) e IncN (35, 70, 75 e 80kb). Andrade e colaboradores (52), encontraram em diferentes espécies de Enterobacteriaceae, isoladas no Brasil, plasmídios pertencentes ao IncFII(130kb), IncN (40kb) e IncL/M (50 a 60kb). Em um trabalho do nosso grupo, com amostras de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes estados brasileiros, o gene *bla*_{KPC-2} foi também encontrado em plasmídios pertencentes ao IncN (40kb) (61).

1.7.2. Transposon Tn4401

Os transposons são elementos móveis que estão muitas vezes associados a plasmídios e promovem a mobilização de genes, inclusive genes de resistência, sendo assim importantes para a disseminação de genes entre diferentes espécies de bactérias (85).

Estudos avaliando o ambiente genético ao redor do gene *bla*_{KPC}, identificaram a presença de um transposon da família Tn3 de 10 kb, chamado de Tn4401. Esse transposon tem uma transposase (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*), o gene *bla*_{KPC}, duas sequências de inserção (IS) *ISKpn6* e *ISKpn7*, além de ser delimitado por duas sequências repetidas invertidas de 39pb (85) (Figura 1.2).

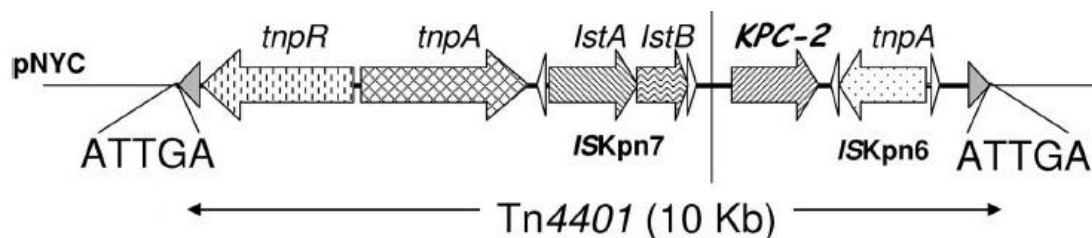


Figura 1.2. Representação esquemática do transposon Tn4401 segundo Naas e colaboradores (2008).

Cuzon (56) também conseguiu amplificar o transposon Tn4401 em 16 amostras de *K. pneumoniae* isoladas de diferentes países (Suécia, Grécia, Estados Unidos, Colômbia, Israel e Brasil). Este estudo mostrou a presença de três isoformas do transposon (“a”, “b” e “c”). No entanto, essas amostras eram de diferentes clones e o gene *bla*_{KPC-2} estava inserido em diferentes plasmídios pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial.

Andrade e colaboradores (52) encontraram as isoformas “a” e “b” do transposon associados ao gene *bla*_{KPC-2} em amostras brasileiras. Este transposon estava inserido em plasmídios de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade plasmidial. Pereira e colaboradores (61), encontraram somente a variante “b” do Tn4401 nas amostras de *K. pneumoniae* brasileiras estudadas. Entretanto, este estudo mostrou que apesar da prevalência de plasmídios IncN (40kb) foram encontrados plasmídios de outros grupos de incompatibilidade carregando o Tn4401 e o gene *bla*_{KPC-2}. Isso demonstra que o transposon Tn4401 pode ser a origem da disseminação do gene *bla*_{KPC}.

Além da participação de plasmídios de diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial e do transposon Tn4401 na disseminação de KPC, principalmente em *K. pneumoniae*, tem sido descrita a participação de clones epidêmicos (66).

Em outras espécies de Enterobacteriaceae, não há descrição de um clone prevalente responsável pela disseminação do gene. Por isso, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras de uma mesma espécie fazem-se necessários.

1.8. Técnicas de tipagem molecular

As duas principais metodologias utilizadas atualmente para a tipagem molecular de bactérias são as técnicas de PFGE (Eletroforese em gel de campo pulsado) e MLST. A metodologia de PFGE é a técnica de “DNA fingerprinting” mais utilizada para avaliação da relação genética de uma variedade de bactérias. Consiste na macrorrestrrição do DNA bacteriano através de enzimas de restrição e posterior separação desses fragmentos grandes em um gel de agarose ao aplicar pulsos alternados, de forma que o fragmento consiga se movimentar através da malha de agarose. No entanto, essa metodologia apresenta baixa capacidade de comparação interlaboratorial (86).

Contudo, através da técnica de MLST, a comparação entre amostras isoladas em regiões geográficas distintas e em períodos de tempo diferentes torna-se possível. Essa comparação é realizada através de diferenças no DNA genômico bacteriano. O esquema de MLST consiste no sequenciamento de genes conservados específicos (que variam entre as espécies). As sequências dos genes são depositadas em um banco de dados e a partir da análise de mutações pontuais no gene sequenciado, é fornecido um número de alelo correspondente à sequência (86).

Kitchel e colaboradores (66) mostraram, através de MLST, que 70% das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC oriundas de 16 estados americanos no período de 1996 a 2008, pertenciam ao clone ST 258 (através de MLST). Este mesmo clone tem sido descrito em Israel (87), Noruega, Suécia (88), Polônia (89), Finlândia (90) e Itália (91). No Brasil também foi descrita a disseminação de dois clones de *K. pneumoniae* produtores de KPC (ST437 e ST11). Estes dois clones são relacionados ao ST258 e fazem parte do mesmo complexo clonal (61).

1.9. Justificativa e relevância

A resistência bacteriana é complexa e dinâmica. Apesar de já termos compreendido grande parte dos mecanismos genéticos e bioquímicos envolvidos nessa questão, novos fatores continuam a ser descobertos (i. e. presença de integrons, plasmídios e transposons). Em amostras individuais, a complexidade da resistência vem aumentando, com o

carreamento de vários determinantes, com genes sendo adicionados, amplificados ou perdidos. Muitos problemas de resistência internacionais são devido à dispersão de poucos clones multirresistentes, mas as razões por trás do sucesso dessas linhagens em particular ainda são obscuras (3).

A localização genética do gene *bla*_{KPC}, assim como a diversidade genética dos clones de *K. pneumoniae* produtores de KPC tem sido bastante estudadas, contudo em outras espécies de Enterobacteriaceae, pouco se sabe sobre os mecanismos de disseminação destes genes. Assim, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras de Enterobacteriaceae e elucidem o ambiente genético em que os genes KPC estão inseridos, como a identificação da associação com transposons e a determinação do grupo de incompatibilidade do plasmídeo carreador do gene, auxiliarão 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 desse mecanismo de resistência em nosso meio.

2. Objetivo geral

Este estudo tem como objetivo a caracterização molecular de amostras produtoras de KPC pertencentes a diferentes espécies de Enterobacteriaceae (excluindo *K. pneumoniae*), isoladas de diferentes estados brasileiros encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar do Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ no período de 2009 a 2011.

2.1. Objetivos específicos/ metas

1. Avaliar a variante alélica do gene *bla_{KPC}* através de PCR e sequenciamento;
2. Investigar a associação do gene *bla_{KPC}* com o transposon Tn4401 através de PCR e sequenciamento;
3. Avaliar a presença de genes codificadores de beta-lactamases através de PCR e sequenciamento;
4. Analisar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos através da técnica de difusão em ágar e determinar a concentração inibitória mínima através de E-test;
5. Determinar a presença de plasmídios carreadores do gene *bla_{KPC}* através de extração plasmidial, investigação do grupo de incompatibilidade plasmidial e hibridação;
6. Realizar a tipagem molecular das espécies mais prevalentes por PFGE;
7. Realizar tipagem molecular das amostras de *E. coli* por MLST.

3. Metodologia

3.1. Seleção das amostras

Foram incluídas neste estudo 83 amostras de enterobactérias (não *K. pneumoniae*) positivas para o gene *bla_{KPC}* através de PCR realizado previamente no LAPIH-IOC no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011. As amostras pertencem à Coleção de Culturas de Bactérias de interesse Hospitalar/ CCBH (IOC) e eram originadas de serviços de saúde de oito estados brasileiros diferentes e do Distrito Federal.

O critério de seleção adotado foi a inclusão de uma amostra bacteriana por paciente, a não ser que o mesmo apresentasse duas espécies bacterianas diferentes produtoras de KPC. Nesse caso, foram estudadas as duas espécies.

A partir do estoque em nitrogênio líquido (-20°C), em meio BHI acrescido de glicerol, todas as amostras foram semeadas em meio Eosina-azul de metileno (EMB- Difco, New Jersey, USA) e incubadas a 35°C por 18 a 24 horas, para a avaliação de pureza.

A identificação das amostras foi confirmada através da caracterização morfo-tintorial após coloração pelo método de Gram e testes fisiológicos e bioquímicos convencionais. Após observação da morfologia colonial, essas amostras foram repicadas para um meio de triagem ágar TSI (“Triple sugar iron”- Difco) e incubadas a 35°C por 24 horas. Também foi avaliada a mobilidade das espécies bacterianas, a produção de indol e de gás sulfídrico através do meio de SIM (OXOID, Hampshire, UK); a capacidade da bactéria de utilizar o citrato como única fonte de carbono, a partir do meio de Citrato de Simmons (Difco); a presença das enzimas Lisina (Calbiochem, Merck, New Jersey, USA), Arginina (Millipore, Massachusetts, USA) e Ornitina (Millipore) descarboxilase utilizando a base de Møller (Difco); produção de DNase (Difco) e ausência de produção da enzima citocromo oxidase (Microbiology Bactident Oxidase – Merck, Darmstadt, Germany). Outros testes bioquímicos foram adicionados conforme necessidade com base nas recomendações de Koneman e colaboradores (7) e Farmer e colaboradores (11).

3.2. Identificação da variante alélica do gene *bla*_{KPC} e de suas regiões flanqueadoras

3.2.1. Extração de DNA total

O DNA (ácido desoxirribonucleico) total das amostras bacterianas foi extraído utilizando-se o Tiocianato de Guanidina, com base nos critérios descritos por Caetano-Annoles e Gresshoff (92).

A partir de cultura recente e meio ágar nutriente (OXOID), as células bacterianas foram suspensas em 3 mL de caldo BHI (“brain-heart infusion”- Becton Dickinson GmbH Bacto™, Heidelberg, Germany) e submetidas à agitação branda por 18 a 24h a 35°C. Primeiramente, foram adicionados 1,5 mL do caldo em um microtubo tipo *eppendorf*, e este foi submetido à centrifugação (10.000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o restante do caldo (1,5 mL) foi adicionado ao microtubo e, novamente, submetido à centrifugação (10.000 rpm) por 10 minutos com posterior descarte do sobrenadante. O sedimento formado foi ressuspense em 1 mL de solução salina e levado ao vórtex para homogeneização. Em seguida, a suspensão foi novamente centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. Esta etapa foi repetida duas vezes, com o objetivo de retirar o excesso de meio de cultura da suspensão bacteriana. O sedimento foi suspenso em 100 µL de tampão TE (100 mM Tris / 10 mM EDTA), e a ele foram adicionados 500 µL da solução de Guanidina (5 M de tiocianato de guanidina, 0,1 M de EDTA, sarcosil 0,5%). A suspensão foi homogeneizada por inversão e incubada em freezer (-20°C) por 5 minutos. Após a incubação, foi adicionado um volume de 500 µL de solução de clorofórmio-álcool isoamílico (24:1) e a mistura foi agitada em vórtex até sua completa homogeneização, onde pudemos observar uma solução de cor leitosa. Essa solução foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos, obtendo-se uma solução em duas fases. Aproximadamente 750 µL da fase superior foram retirados e transferidos para um novo microtubo tipo *eppendorf* contendo 380 µL de isopropanol gelado. A mistura foi levada ao freezer (-20°C) por 18-24h e, no dia seguinte, foi novamente centrifugada a 10.000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado, restando o DNA em forma de um pequeno sedimento no fundo do microtubo. A este sedimento foi adicionado um volume de 150 µL de álcool 70% e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. Esta etapa foi repetida duas vezes. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento, colocado em temperatura ambiente para que todo o álcool evaporasse. Posteriormente foi ressuspense em 100 µL de tampão TE por 3 horas em

estufa ou banho-maria a 37°C. O DNA foi mantido em freezer (-20°C) para a realização dos testes moleculares.

3.2.2. Confirmação da produção de KPC

A detecção e determinação da variante alélica do gene *bla_{KPC}* foi realizada através de PCR e sequenciamento, conforme descrito por Yigit *et al.* (47), utilizando os iniciadores KPC-F- CGGTTACGGCCAGTGGGAATA e KPC-R- GACGCAGACCGAAATCGAACT que geram um produto de 1011pb.

A reação para detecção do gene *bla_{KPC}* foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA cromossômico (extraído conforme descrito no tópico 3.2.1), 14,25 µL de água ultrapura do tipo 2, 5 µL do tampão PCR 5X, 1,25 µL de cada iniciador a 20 pmoles/µL, 0,5 µL da mistura de deoxinucleotídeos a 10mM (“Thermo Scientific”, San Jose/California, USA), 1,5 µL de solução MgCl₂ a 25 mM e 0,25 µL de GoTaqFlexi DNA polymerase (5 U/µL) (Promega, Madison, USA).

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 minutos a 72°C.

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose (Invitrogen, Carlsbed, USA) a 1,5% em TBE 0,4X (EDTA 0,5 M pH 8,0; Tris 1 M pH 8,0; Ácido Bórico 0,035M). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,4X, sob uma corrente de 100 volts por 40 minutos. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 g/L) e observado sob luz ultravioleta (UV) em equipamento “L-pix Molecular Imaging” (Loccus Biotecnologia, São Paulo, Brasil).

3.2.3. Identificação da variante alélica de KPC

Os “amplicons” gerados a partir da PCR foram purificados através do kit “GfX PCR DNA Purification Kit” (GE Healthcare, Little Chalfont, United Kingdom). Para o sequenciamento, os iniciadores utilizados foram os mesmos usados para a reação de amplificação.

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador 3730 DNA Analyser (Applied Biosystems, California, USA), na Plataforma de Sequenciamento de DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do IOC- FIOCRUZ. Para a análise das sequências geradas, foi utilizado o “software” Bioedit (versão 7.2.0).

3.2.4. Avaliação das regiões flanqueadoras de KPC

Para a detecção das regiões flanqueadoras deste gene, foram realizadas reações de PCR para as diferentes regiões do Tn4401, utilizando-se iniciadores descritos por Naas *et al.* (82) e Kitchel *et al.* (66), conforme tabela 3.1.

Tabela 3.1. Iniciadores específicos utilizados para a detecção de regiões do transposon Tn4401.

Iniciadores utilizados	Localização no Tn4401	Tamanho produto	Referência
F: GGCACGGCAAATGACTA R: GAAGATGCCAAGGTCAATGC	ISKpn6	649 pb	Naas et al., 2008
F: ACGACCACGCACGCACAAAC R: GCATCAAACGGAAGCAAAAG	IR direita	220 pb	
F: TGACCCTGAGCGGCGAAAGC R: CACAGCGGCAGCAAGAAAGC	ISKpn7	603 pb	Kitchel et al., 2009.
F: GCGACCGGTCAGTTCCTTCT R: CACCTACACCACGACGAACC	TnpA	198 pb	Naas et al., 2008
F: TCACCGGCCCTCACCTTTGG R: CTTAGCAAATGTGGTGAACG	IR esquerda	462 pb	

As reações foram preparadas em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA genômico (extraído conforme descrito no tópico 3.2.1), 9,0 µL de água ultrapura do tipo 2, 0,75 µL de cada iniciador a 20 pmoles/µL e 12,5 µL do “JumpStart™ REDTaq® ReadyMix™ Reaction Mix” (Sigma-Aldrich, Missouri, USA).

Para todas as reações foram utilizadas as mesmas condições de amplificação: 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 minutos a 72°C.

As condições da corrida de eletroforese e visualização do gel foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.2.

Para determinar a isoforma do transposon Tn4401, as condições de sequenciamento foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.3.

3.3. Detecção de genes codificadores de ESBLs

Através de reações de PCR, foi avaliada a presença de outros genes codificadores de beta-lactamases do tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Foram utilizados iniciadores para detecção do grupo *bla*_{CTX-M} e iniciadores específicos para a variante alélica *bla*_{CTX-M-15}. Os iniciadores utilizados estão mostrados na tabela 3.2.

Tabela 3.2. Iniciadores específicos para a detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{CTX-M-15} utilizados nas reações de PCR.

Região-alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-F: ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC CTX-R: TGGGTRAARTARGTSACCAGAAAYCAGCGG	593	Mulvey <i>et al.</i> (93)
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-15-F: TCCGTTTCCGTCATTACAAAC CTX-M-15-R: ACCGTCGGTGACGATTTTAG	875	Mendonça <i>et al.</i> (94)
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F: TTATCTCCCTGTTAGCCACC SHV-R: GATTTGCTGATTTGCTCGG	797	Hasman <i>et al.</i> (95)
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F: GCGGAACCCCTATTTG TEM-R: ACCAATGCTTAATCAGTGAG	859	Hasman <i>et al.</i> (95)

As misturas de PCR para detecção dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} foram preparadas em volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA total (extraído conforme tópico 3.2.1), 14,25 µL de água ultrapura do tipo 2, 5 µL do tampão PCR 5X, 1,25 µL de cada iniciador a 20pmoles/µL, 0,5 µL da mistura de deoxinucleotídeos a 10 mM (Thermo Scientific), 1,5 µL de solução MgCl₂ a 25 mM e 0,25 µL de GoTaqFlexi DNA polymerase (5 U/µL) (Promega).

A mistura da PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M-15} foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA total (extraído conforme tópico 3.2.1), 9,5 µL de água

ultrapura do tipo 2, 12,5 µL do “JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix” (Sigma) e 1 µL de cada iniciador a 20 pmoles/µL.

As condições de amplificação dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-15} foram: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos a 61°C (*bla*_{CTX-M}) ou 50°C (*bla*_{CTX-M-15}) para anelamento e 45 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

As condições de amplificação dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 53°C (*bla*_{TEM}) ou 51°C (*bla*_{SHV}) para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

As condições da corrida de eletroforese e visualização do gel foram de acordo com o tópico 3.2.2.

As condições de sequenciamento foram de acordo com o tópico 3.2.3. Após o sequenciamento, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados do Lahey (38).

3.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

3.4.1. Teste de difusão em ágar

A susceptibilidade aos antimicrobianos das 83 amostras foi determinada através da técnica de difusão em ágar de acordo com a metodologia descrita por Kirby-Bauer (96) conforme as recomendações do “Clinical and Laboratory Standards Institute” – CLSI (97).

A partir da cultura em ágar nutriente (OXOID), foi retirada uma pequena alçada, equivalente a 3 a 5 colônias para a obtenção de uma suspensão padronizada, em solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente à do padrão 0,5 na escala de McFarland. Esta suspensão foi semeada em toda a superfície do meio Müeller Hinton Agar (MHA; OXOID) utilizando um swab estéril, para obter-se um crescimento semi-confluyente. Após a semeadura,

foram aplicados os discos de antimicrobianos, mantendo-se um espaço de, no mínimo, 2,5 cm entre eles.

Foram utilizados os seguintes discos de antimicrobianos: ertapenem (10µg), meropenem (10µg), imipenem (10µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), cefepime (30µg), aztreonam (30µg), sulfametoxazol-trimetoprima (25µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg) e amicacina (30µg) (OXOID).

Após aplicação dos discos, as placas foram incubadas em uma estufa a 35°C, por 16 a 18h. Foram avaliados os diâmetros dos halos de inibição para cada antimicrobiano e a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações do CLSI – 2013, exceto para os antimicrobianos ertapenem, ceftazidima, cefepime e aztreonam, que foram usados os critérios da Nota Técnica da ANVISA Nº. 01/2013. Como controle do teste, utilizamos a amostra *E. coli* ATCC 25922.

3.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada através do método de Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden) para os seguintes antimicrobianos: ertapenem, meropenem, imipenem, tigeciclina e polimixina B, de acordo com as recomendações do fabricante.

O inóculo bacteriano, semeadura e incubação foram semelhantes à descrita no tópico 3.4.1 (Teste de difusão em ágar), somente diferenciando-se o fato de que ao longo das fitas, há diferentes concentrações do antimicrobiano testado. Isso possibilita a avaliação da concentração inibitória mínima para cada droga testada. A interpretação dos resultados foi realizada de acordo com as recomendações da Nota Técnica da ANVISA Nº. 01/2013. Como controle do teste, utilizamos a amostra *E. coli* ATCC 25922.

Para a confirmação da CIM para polimixina B, foi utilizada a metodologia da diluição em microplacas (padrão-ouro). Para a preparação da microplaca, foram colocados 384µL de uma solução de polimixina B a 1000µg/mL (Sigma-Aldrich) em 2616µL de caldo Müeller Hinton ajustado (20-25mg/L de Ca²⁺ e 10-12,5mg/L de Mg²⁺) em um tubo estéril. Em seguida, foram acrescentados 200µL desse caldo contendo polimixina B (128µg/mL) em cada poço da primeira coluna da placa. Foram adicionados 100µL de caldo ajustado sem

antibiótico a partir da segunda coluna da placa. Foi feita uma diluição seriada, retirando 100µL de cada poço por coluna, a partir da primeira coluna, e acrescentando na coluna seguinte, até a penúltima coluna da placa. Após o preparo da placa foi feita a semeadura dos poços.

A partir de cultura recente em ágar nutriente (OXOID), foi retirada uma pequena alçada, equivalente a 3 a 5 colônias para a obtenção de uma suspensão padronizada, em solução de salina fisiológica, com turbidez equivalente à do padrão 0,5 na escala de McFarland. Essa suspensão bacteriana foi diluída em 1:10 e em seguida foram aplicados 5µL da suspensão em cada poço, de forma com que cada linha representasse uma amostra (Figura 3.1). As placas foram incubadas em uma estufa a 35°C, por 16 a 18h. Os resultados foram interpretados de acordo com as recomendações da Nota Técnica da ANVISA N°. 01/2013 (16). Como controle do teste, utilizamos a amostra *E. coli* ATCC 25922.

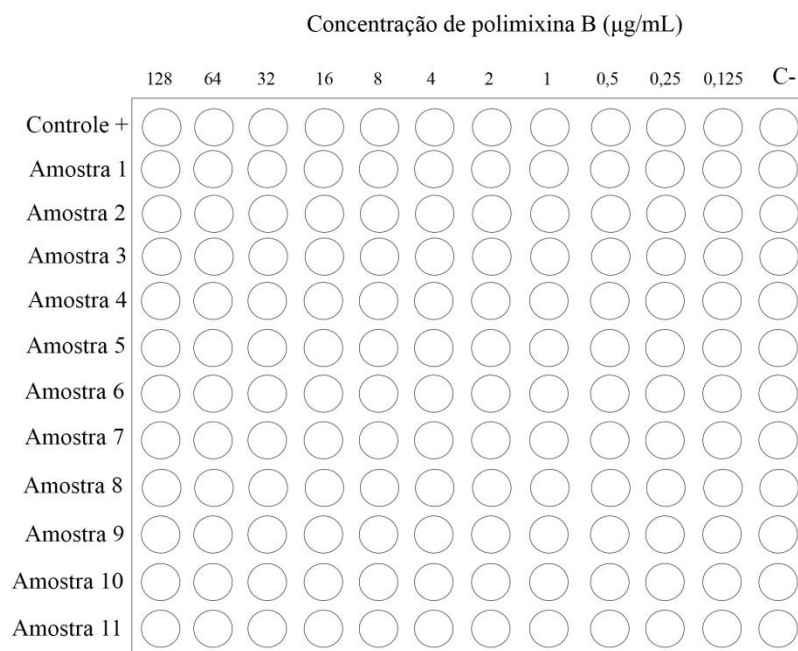


Figura 3.1. Representação da microplaca para a determinação da concentração inibitória mínima de polimixina B

Legenda: C- = caldo Müeller Hinton sem polimixina B.

3.4.3. Análises estatísticas

Para a comparação das taxas de resistência (incluindo amostras resistentes e intermediárias) entre as espécies com maior número de amostras, foi realizado o teste de Chi-quadrado, com correção de Yates quando necessário, ou o teste exato de Fisher, quando necessário. O valor de P menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

Para a comparação da CIM entre as espécies com maior número de amostras, foi realizado o teste t de Student não pareado, com correção de Welch para amostras que possuem variâncias diferentes. O valor de P menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

3.5. Extração plasmidial

Foi realizada extração plasmidial pela metodologia descrita por Kado e Liu (98). As amostras foram semeadas em placa de ágar nutriente (OXOID) e incubadas em estufa a 37°C por 18 a 24 horas. Uma alçada da cultura bacteriana foi depositada em um microtubo tipo *ependorf* contendo 200 µL de solução de lise com pH ajustado (SDS 0,1M; TRIS 0,05M; pH12,6). As amostras foram, então, incubadas em banho-maria a 55°C por uma hora, sendo os microtubos sempre homogeneizados por inversão a cada 20 minutos. No fim da incubação, foi adicionado um volume de 200 µL de fenol-clorofórmio não tamponado (1:1) à solução. A mistura foi homogeneizada até a obtenção de uma solução de cor branco-leitosa. Em seguida, os microtubos foram centrifugados por 15 minutos (13.000 rpm) a 4°C. O sobrenadante translúcido foi cuidadosamente retirado e transferido para outro microtubo.

Para a corrida eletroforética, foi misturado a cada sobrenadante obtido, o tampão de corrida contendo púrpura de bromocresol (0,25% de púrpura de bromocresol em 50% de glicerol a 0,05M e Tris-acetato pH7,9). Esta mistura foi depositada nos poços do gel de agarose 0,8% (Invitrogen) em TAE 1X (Tris-Acetato 40mM; EDTA 1mM; pH8,0) e em seguida, a corrida eletroforética foi realizada utilizando tampão TAE 1X a 50 volts por 2 horas e meia. O marcador de peso molecular utilizado foi o *supercoiled* (Boehringer Mannheim). Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (0,5g/L) e posteriormente visualizado sob luz UV e fotografado.

A estimativa do tamanho dos plasmídios foi realizada através de inspeção visual e comparação da marcação na membrana com as bandas do gel e, após isso, foi utilizado o “software” Bionumerics versão 6.6. Através do “software”, depositamos as imagens dos géis e marcamos somente as bandas nas quais vimos marcação na membrana. Após a marcação, o “software” fez a estimativa do tamanho dessas bandas ao compará-las com o peso molecular cadastrado: Supercoiled DNA ladder (Biolabs, New England, USA).

3.6. Determinação do grupo de incompatibilidade plasmidial

Para determinar o grupo de incompatibilidade plasmidial dos plasmídios presentes nas amostras, foi utilizado um esquema proposto por Carattoli e colaboradores (99). Esse esquema se baseia na amplificação por PCR das regiões de origem de replicação dos plasmídios, que diferem entre os diferentes grupos. Somente pesquisamos os grupos de incompatibilidade plasmidial mais frequentemente descritos em Enterobacteriaceae: IncN, IncL/M, Inc A/C e IncFII. Os iniciadores específicos encontram-se na tabela 3.3.

Tabela 3.3. Iniciadores específicos para a determinação dos principais grupos de incompatibilidade plasmidial nas amostras de Enterobacteriaceae.

Grupo Inc	Região-alvo	Sequência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
IncL/M	repA,B,C	L/M FW: GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG L/M RV: CTGCAGGGGCGATTCTTTAGG	785
IncN	repA	N FW: GTCTAACGAGCTTACCGAAG N RV: GTTCAACTCTGCCAAGTTC	559
IncA/C	repA	A/C FW: GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA A/C RV: ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT	465
IncFII	repA	FIIS FW: CTGTCGTAAGCTGATGGC FIIS RV: CTCTGCCACAACTTCAGC	270

A mistura da PCR para detecção dos grupos de incompatibilidade plasmidial foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA total (extraído conforme

tópico 3.2.1), 9,5 µL de água ultrapura do tipo 2, 12,5 µL do “JumpStart REDTaq ReadyMix Reaction Mix” (Sigma) e 1 µL de cada iniciador a 20 pmoles/µL.

As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos 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 a 72°C por 10 minutos.

As condições da corrida e visualização do gel foram realizadas conforme o tópico 3.2.2.

3.7. Hibridação com sonda para o gene *bla*_{KPC} e grupos de incompatibilidade plasmidial

Para avaliar se o gene *bla*_{KPC} estava localizado em plasmídios e para determinar qual o grupo de incompatibilidade plasmidial deste plasmídio foi realizada a metodologia de Southern Blotting, descrita por Sambrook e Russel (100). Ela é baseada na transferência de DNA contido no gel de agarose, para uma membrana de nylon e posterior hibridação das membranas com sonda marcada com digoxigenina. Foram realizadas hibridações com sonda do gene *bla*_{KPC} e com os grupos de incompatibilidade encontrados em cada amostra conforme tópico 3.6. As sondas foram confeccionadas por reação de PCR usando o kit “digoxigenin PCR DIG probe synthesis” (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) que além dos nucleotídeos usuais, contém nucleotídeos marcados com digoxigenina, 11-dUTP.

3.7.1. Transferência dos plasmídios para membrana de nylon

Após a extração plasmidial, descrita no tópico 3.5., transferimos os plasmídios do gel de agarose para a membrana “Hybond N+” (Amersham Hybond -N Blotting Membranes, GE Healthcare Life Sciences) através do equipamento “VacuGene™ XL Vacuum Blotting System” (GE Healthcare). Esse equipamento consiste em uma bomba de vácuo (pressão mantida a 50 mbar durante a transferência) e um aparato onde a membrana é posicionada abaixo do gel. Durante a transferência, foi depositada em cima do gel uma solução de depurinação (HCl 0,25 M) por 10 minutos. Ao fim dos 10 minutos, essa solução foi retirada e adicionada a solução de desnaturação (NaCl 1,5 M e NaOH 0,5 N), também por 10 minutos. Essa solução foi retirada e, em seguida, adicionada a solução de neutralização (Tris-HCl 0,5

M pH 8,0 e NaCl 1,5 M) por 10 minutos. Após a retirada dessa solução, foi adicionada a solução de SSC 20 X (NaCl 3,0 M; citrato de sódio 0,3 M), por 2 horas para que ocorra a transferência do DNA. Depois desta etapa, a membrana foi exposta à radiação ultravioleta (UV Crosslinker, Hoefer) por 5 minutos para fixação dos fragmentos de DNA. A membrana foi secada e guardada para utilização posterior.

3.7.2. Hibridação com sonda de *bla*_{KPC-2}, *IncN*, *IncL/M*, *IncA/C* e *IncFII* marcadas com digoxigenina

Após a etapa de transferência dos plasmídios para a membrana, seguiu-se à etapa de hibridação. As membranas foram incubadas inicialmente em 10 mL da solução de pré-hibridação [5X SSC, 2% agente bloqueador (Roche), 0,1% N-laurilsarcosil, 0,02% SDS] durante uma hora a 62°C sob agitação no forno de hibridação (Techne hybridiser HB-1D, Techne, Cambridge, U.K.). Finda a incubação de uma hora, foi adicionada a solução de hibridação (10 mL de solução pré-hibridação acrescida de 50 µL da sonda desnaturada). Essa solução é preparada da seguinte forma: cerca de 50 µL da sonda obtida após a PCR foram desnaturados a 100°C por 10 minutos, seguida de um banho de gelo por 5 minutos. Após isso, a sonda foi adicionada a 10 mL da solução de pré-hibridação. As membranas foram, então, incubadas com essa solução a 62°C por 18 a 24 horas.

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

3.7.3. Detecção do DNA marcado

Após as duas lavagens, a membrana foi rinsada em tampão 1 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) e depois incubada por 30 minutos em tampão 2 (100 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 1% agente bloqueador), sob agitação branda em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com 25 mL de solução de anticorpo (25 mL tampão 1 e 5 µL de anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina - Roche), por 30 minutos em temperatura ambiente. Essa etapa foi realizada sob agitação branda, conforme recomendado (100). Ao fim desta etapa, a membrana foi duas vezes lavada com tampão 1 por 10 minutos.

Seguindo para a etapa de revelação, a membrana foi equilibrada em tampão 3 (100 mM Tris- base; 100 mM NaCl; 50mM MgCl₂, pH 9,5) por 2 minutos. Depois, foram adicionados 15 mL da solução de revelação NBT (“Nitro blue tetrazolium chloride” - Roche) em uma embalagem de plástico onde estava contida a membrana, e esta foi selada, de forma que a solução ficasse em contato com a membrana. A membrana foi incubada com essa solução em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 2-24 horas (até que fossem visualizadas as bandas marcadas). Após a revelação, as membranas foram secas em estufa e guardadas em local seco ao abrigo da luz, para posterior análise.

3.8. Determinação do polimorfismo genético através de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE)

A análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico através de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) foi realizada conforme descrito por Ribot e colaboradores (101), apenas para as espécies representadas por mais de uma amostra.

3.8.1.Extração do DNA

Para a extração de DNA total, as amostras foram semeadas em tubo contendo ágar nutriente e incubadas a 35°C por 24 horas. Após a incubação, as amostras bacterianas foram suspensas em 1mL de BSC (EDTA 0,5M pH 8,0, TRIS-HCl 1M pH 8,0) até alcançar a turvação 3 na escala de McFarland. Em seguida, foram colocados 200 µL desta suspensão em um microtubo tipo *ependorf* e adicionados 5 µL de proteinase K (Sigma) - 50 mg/ µL. Após essa etapa, os microtubos foram homogeneizados por inversão. Foram adicionados à suspensão de células, 200 µL de agarose 1% contendo SDS (0,1g de agarose - SeaKem Gold Agarose, 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 total, os mesmos foram transferidos para tubos Falcon de 15mL contendo 2 mL de solução de lise (Trisma base 1,0 M pH 8,0/ EDTA 0,5 M pH 8,0/ N-Lauril sarcosil 10%/ Água ultrapura do tipo 2 [q.s.p.] e 5 µL de proteinase K (50 mg/ µL-Sigma) e incubados a 50°C por 2 horas. Após a incubação, foi retirada a solução de lise, e foram feitas 3 lavagens acrescentando 10 mL de água ultrapura do tipo 2 esterilizada a 50°C

por 15 minutos e uma lavagem com 7 mL de Tampão TE a 50°C por 15 minutos. Em seguida, os blocos foram armazenados em 2 mL de TE na geladeira.

3.8.2. Digestão com enzima de restrição e corrida eletroforética

Para a maioria das espécies analisadas foi realizada a digestão com a enzima de restrição *XbaI* (10U/ µL - Promega). Para *P. stuartii* foi utilizada a enzima *SmaI* (10U/ µL – Fermentas, Massachusetts, USA) (102).

Um pedaço correspondente a um terço do bloco de agarose foi transferido para um microtubo tipo *ependorf* e tratados por 3 horas a 35°C, com o mix contendo a enzima de restrição *XbaI* (5 µL de solução tampão da enzima (10X), 0,5 µL de BSA, 3 µL da enzima e 42,5 µL de água ultrapura do tipo 2) ou *SmaI* (5 µL de solução tampão da enzima (10X), 4 µL da enzima e 41 µL de água ultrapura do tipo 2).

Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose - SeaKem Gold Agarose a 1,0%, preparados em TBE 0,4 X . Após a solidificação do gel, este foi submetido a eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DRIII (Bio-Rad, Richmond, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: espécies cujo DNA foi digerido com *XbaI* - pulso crescente de 5 a 35 segundos, por 15 horas, com ângulo de 120°, a 6 V/cm, na temperatura de 13°C. *P. stuartii* (digestão com *SmaI*) – pulso crescente de 0.5 a 15 segundos, por 18 horas, com ângulo de 120°, a 6 V/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 a ferramenta de fotodocumentação “L-pix Molecular Imaging” (Loccus Biotecnologia).

As análises dos géis e a confecção dos dendogramas foram realizadas com auxílio do “software” Bionumerics versão 6.6. Os agrupamentos foram realizados utilizando o coeficiente de *Dice*, e os valores de otimização e tolerância de 1,5%. O percentual de similaridade usado foi acima de 80% para que as amostras fossem consideradas do mesmo grupo clonal.

3.9. Análise do polimorfismo genético das amostras de *E. coli* por MLST

Para a tipagem molecular de *E. coli* através de “Multilocus sequence typing” (MLST) foram realizadas duas metodologias. A metodologia proposta pelo Instituto Pasteur (IP) (103) e a metodologia proposta pela Universidade de Warwick (UoW) (104).

3.9.1. MLST segundo o Instituto Pasteur (IP)

A metodologia foi realizada conforme as instruções do Instituto Pasteur para *E. coli* (103). O esquema do Instituto Pasteur analisa os seguintes genes conservados: *dinB* (DNA polimerase), *icdA* (isocitrato desidrogenase), *pabB* (p-aminobenzoato sintase), *polB* (polimerase PolII), *putP* (prolina permease), *trpA* (triptofano sintase subunidade A), *trpB* (triptofano sintase subunidade B) e *uidA* (beta-glicuronidase). Encontra-se a seguir uma tabela com todos os iniciadores utilizados (Tabela 3.4.).

Tabela 3.4. Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST-IP para as amostras de *E. coli* conforme descrito no site do Instituto Pasteur.

Gene alvo	Iniciadores utilizados	Tamanho do produto (pb)
<i>dinB</i>	<i>dinB F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTATGAGAGGTGAGCAATGCGTA	450
	<i>dinB R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCGTAGCCCCATCGCTTCCAG	
<i>icdA</i>	<i>icdA F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATTCGCTTCCCAGAACATTG	516
	<i>icdA R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCATGATCGCGTCACCAAAYTC	
<i>putP</i>	<i>putP F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTGTTTAACCCGTGGATTGC	456
	<i>putP R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCATCGGCCCTCGGCAAAGCG	
<i>polB</i>	<i>polB F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGGCGGCTATGTGATGGATTC	450
	<i>polB R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGGTTGGCATCAGAAAACGGC	
<i>trpB</i>	<i>trpB F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACTATATGCTGGGCACCGC	594
	<i>trpB R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCTCGTGCTTTCAAATATC	
<i>trpA</i>	<i>trpA F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAGCTACGAATCTCTGTTTGCC	561
	<i>trpA R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGCTTTCATCGGTTGTACAAA	
<i>pabB</i>	<i>pabB F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTAATCCAATATGACCCGCGAG	468
	<i>pabB R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTTCGGTTCAGTTCGTCGATAAT	
<i>uidA</i>	<i>uidA F</i> : GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTACATTACGGCAAAGTGTGGGTCAAT	600
	<i>uidA R</i> : TTGTGAGCGGATAACAATTTCCCATCAGCACGTTATCGAATCCTT	

A reação para detecção de cada gene foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 2 µL de DNA genômico (extraído conforme tópico 3.2.1), 8,5 µL de água ultrapura do tipo 2, 1 µL de cada iniciador a 20 pmoles/µL 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 minutos a 72°C.

As condições da corrida de eletroforese e visualização do gel foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.2.

As condições de sequenciamento foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.3. Para o sequenciamento, foi utilizado um único par de iniciadores para todos os genes amplificados (oF : GTT TTC CCA GTC ACG ACG TTG TA e oR: TTG TGA GCG GAT AAC AAT TTC).

As sequências obtidas foram analisadas através do “software” Bioedit (versão 7.2.0) e posteriormente comparadas com sequências já depositadas no banco de dados do MLST de *E. coli* do Instituto Pasteur, para o fornecimento do número de alelo correspondente a cada sequência de cada gene. De acordo com o número de alelo de cada gene, foi obtido um número de “sequence type” (ST) para cada amostra.

Quando alguma sequência não estava disponível no banco de dados, foi realizado o depósito desta sequência, a fim de ser fornecido um novo número de alelo e consequentemente um novo número de ST para a amostra.

3.9.2. MLST segundo a Universidade de Warwick (UoW)

A metodologia foi realizada conforme as instruções da Universidade de Warwick para *E. coli* (104). O esquema da Universidade de Warwick analisa os seguintes genes conservados: *adk* (adenilato quinase), *fumC* (fumarato hidratase), *gyrB* (DNA girase), *icd* (isocitrato/isopropilmalato desidrogenase), *mdh* (malato desidrogenase), *purA* (adenilsuccinato desidrogenase) e *recA* (motivo ligador de ATP/GTP). Encontra-se a seguir uma tabela com todos os iniciadores utilizados (Tabela 3.5.).

Tabela 3.5. Iniciadores específicos para a detecção dos genes do esquema de MLST-UoW para as amostras de *E. coli* conforme, descrito no site da Universidade de Warwick.

Gene alvo	Iniciadores utilizados	Tamanho do produto (pb)	Temperatura de anelamento
<i>adk</i>	<i>adkF</i> 5'-ATTCTGCTTGGCGCTCCGGG-3' <i>adkR</i> 5'-CCGTCAACTTTCGCGTATTT-3'	583	54°C
<i>fumC</i>	<i>fumCF</i> 5'-TCACAGGTCGCCAGCGCTTC-3' <i>fumCR</i> 5'-GTACGCAGCGAAAAAGATTC-3'	805	54°C
<i>gyrB</i>	<i>gyrBF</i> 5'-TCGGCGACACGGATGACGGC-3' <i>gyrBR</i> 5'-ATCAGGCCTTCACGCGCATC-3'	911	60°C
<i>icd</i>	<i>icdF</i> 5'-ATGGAAAGTAAAGTAGTTGTTCCGGCACA-3' <i>icdR</i> 5'-GGACGCAGCAGGATCTGTT-3'	878	54°C
<i>mdh</i>	<i>mdhF</i> 5'-ATGAAAGTCGCAGTCCTCGGCGCTGCTGGCGG-3' <i>mdhR</i> 5'-TTAACGAACTCCTGCCCCAGAGCGATATCTTTCTT-3'	932	60°C
<i>purA</i>	<i>purAF</i> 5'-CGCGCTGATGAAAGAGATGA-3' <i>purAR</i> 5'-CATACGGTAAGCCACGCAGA-3'	816	54°C
<i>recA</i>	<i>recAF</i> 5'-CGCATTCGCTTTACCCTGACC-3' <i>recAR</i> 5'-TCGTCGAAATCTACGGACCGGA-3'	780	58°C

Para as condições de amplificação foram utilizados 30 ciclos de 1 minuto a 95°C para desnaturação, 1 minuto na temperatura de anelamento (discriminada na tabela 3.6) e 2 minutos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 5 minutos a 72°C.

As condições da corrida de eletroforese e visualização do gel foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.2.

As condições de sequenciamento foram realizadas de acordo com o tópico 3.2.3. A análise das sequências, depósito no banco de dados e fornecimento do número de alelo foram feitos conforme o tópico 3.9.1.

4. Resultados

4.1. Seleção das amostras

Durante o período de estudo, o Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH – IOC/ FIOCRUZ) recebeu de diferentes laboratórios centrais de saúde pública (LACENs) um total de 387 amostras de enterobactérias não-*K. pneumoniae* resistentes ou com resistência intermediária aos carbapenemas. Destas, 83 (21,4%) apresentaram o gene *bla*_{KPC}, correspondendo a nove espécies diferentes: *Enterobacter aerogenes* (45,8%, n=38), complexo *Enterobacter cloacae* (20,5%, n=17), *Escherichia coli* (15,7%, n=13), *Pantoea agglomerans* (4,8%, n=4), *Providencia stuartii* (4,8%, n=4), *Citrobacter freundii* (3,6%, n=3), *Klebsiella oxytoca* (2,4%, n=2), *Morganella morganii* (1,2%, n=1), e *Serratia marcescens* (1,2%, n=1).

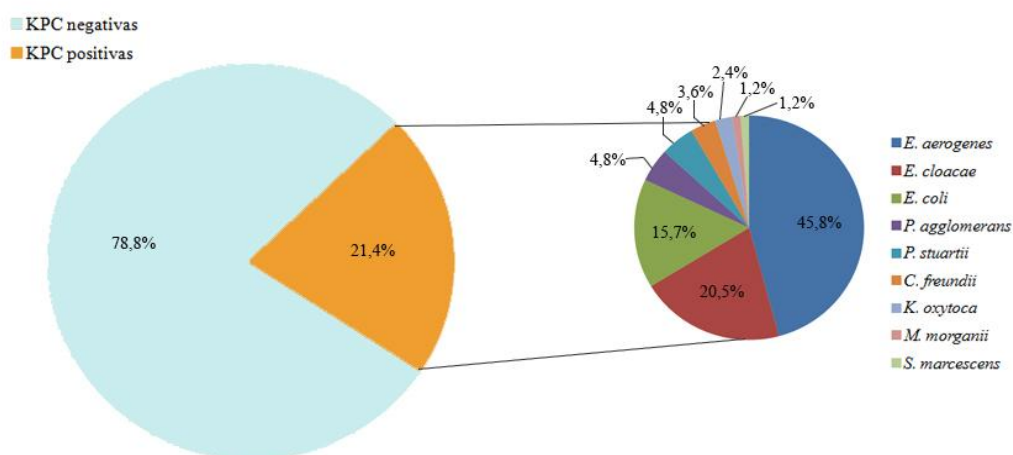


Gráfico 4.1. Frequência de amostras de Enterobacteriaceae (não-*K. pneumoniae*) produtoras de KPC e distribuição por espécies.

As amostras produtoras de KPC foram recuperadas de swabs de vigilância (31,3%, n=26), urina (15,7%, n=13), trato respiratório inferior (14,5%, n=12), pele e tecidos moles (4,8%, n=4), sangue (6%, n=5) e outros sítios (19,3%, n=16), como: ponta de cateter (n= 5), secreções diversas (n= 7), fragmento ósseo (n= 1) e líquido (n= 1). Em 8,4% (n=7) das amostras, o sítio de isolamento não foi informado. Em relação ao sítio de isolamento das diferentes espécies estudadas, foi observado que 52,6% (n=20) das amostras de *E. aerogenes*

foram isoladas de swab de vigilância. Em relação às demais espécies, não houve prevalência de nenhum sítio de isolamento (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Sítios de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.

Espécies	Material Clínico						
	Swabs de vigilância	Urina	Trato respiratório Inferior	Pele e tecidos moles	Sangue	Outros sítios	ND
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	20 (52,6%)	5 (13,2%)	7 (18,3%)	2 (5,3%)	-	2 (5,3%)	2 (5,3%)
<i>E. cloacae</i> (n=17)	4 (23,5%)	3 (17,6%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	1 (5,9%)	5 (29,4%)	2 (11,8%)
<i>E. coli</i> (n=13)	2 (15,4%)	4 (30,8%)	-	-	1 (7,6%)	4 (30,8%)	2 (15,4%)
<i>P. stuartii</i> (n=4)	-	-	3 (75%)	-	-	1 (25%)	-
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	-	-	-	-	2 (50%)	2 (50%)	-
<i>C. freundii</i> (n=3)	-	-	1 (33,3%)	1 (33,3%)	-	1 (33,3%)	-
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	-	1 (50%)	-	-	-	-	1 (50%)
<i>M. morgannii</i> (n=1)	-	-	-	-	-	1 (100%)	-
<i>S. marcescens</i> (n=1)	-	-	-	-	1 (100%)	-	-
Total (n=83)	26 (31,3%)	13 (15,7%)	12 (14,5%)	4 (4,8%)	5 (6,0%)	16 (19,3%)	7 (8,4%)

Legenda: ND= não determinado; Outros sítios= secreções diversas, fragmento ósseo, ponta de cateter e líquido; Pele e tecidos moles= fragmentos de tecidos, escaras; Swabs de vigilância= swab retal, swab nasal e swab de pele.

Em relação ao período de isolamento, foi observado que as amostras produtoras de KPC foram isoladas de julho de 2009 a junho de 2011, havendo um maior isolamento da maioria das espécies no período de novembro de 2010 a fevereiro de 2011 (72,3%, n=60) (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Período de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.

Espécies	2009	2010							2011					Total
	jul	mar	abr	mai	jul	set	nov	dez	jan	fev	mar	mai	jun	
<i>C.freundii</i>							1	1		1				3
<i>E.aerogenes</i>		1			1	3	7	6	9	11				38
<i>E.cloacae</i>		1					5	3	3	3	2			17
<i>E.coli</i>	4		1	3				1	2	1	1			13
<i>K.oxytoca</i>				1				1						2
<i>M.morgannii</i>			1											1
<i>P. Stuartii</i>												2	2	4
<i>P.agglomerans</i>								2		2				4
<i>S.marcescens</i>								1						1
Total	4	2	2	4	1	3	13	15	14	18	3	2	2	83

As amostras utilizadas no estudo foram provenientes de hospitais de oito estados brasileiros (Rio de Janeiro, Goiás, Minas Gerais, Pernambuco, Espírito Santo, Ceará, Alagoas e Bahia) e Distrito Federal. Os estados que apresentaram maior frequência de isolamento de Enterobacteriaceae produtoras de KPC foi o Distrito Federal (39,8% n=33) e Rio de Janeiro (15,7% n=13) (Tabela 4.3).

A maioria das amostras de *E. aerogenes* (71,1%, 27/38) foi isolada no Distrito Federal, correspondendo a 81,8% (27/33) das amostras isoladas neste local, e essas amostras foram isoladas de oito hospitais diferentes da região. Todas as amostras de *P. stuartii* foram isoladas em Minas Gerais e todas as amostras de *P. agglomerans* foram isoladas no Rio de Janeiro. Os estados que apresentaram maior diversidade de espécies produtoras de KPC foram: Minas Gerais e Rio de Janeiro, onde foram encontradas 4 e 5 espécies, respectivamente (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Origem de isolamento das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC.

Espécies bacterianas	Número de amostras isoladas nos estados - Região Geográfica								
	Nordeste				Sudeste			Centro-Oeste	
	CE	PE	BA	AL	RJ	ES	MG	DF	GO
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	1	8						27	2
<i>E. cloacae</i> (n=17)	3				2	5	1	3	3
<i>E. coli</i> (n=13)		1	2		5		2	3	
<i>P. stuartii</i> (n=4)							4		
<i>P. agglomerans</i> (n=4)					4				
<i>C. freundii</i> (n=3)				1	1				1
<i>K. oxytoca</i> (n=2)					1		1		
<i>M. morgani</i> (n=1)							1		
<i>S. marcescens</i> (n=1)		1							
Total (n=83)	4 (4,8)	10 (12)	2 (2,4)	1 (1,2)	13 (15,7)	5 (6)	9 (10,8)	33 (39,8)	6 (7,3)

Legenda: CE – Ceará; PE – Pernambuco; BA – Bahia; AL – Alagoas; RJ – Rio de Janeiro; ES – Espírito Santo; MG – Minas Gerais; DF – Distrito Federal; GO – Goiás.

4.2. Detecção e identificação da variante alélica do gene *bla*_{KPC} e de suas regiões flanqueadoras

O sequenciamento do produto amplificado do gene *bla*_{KPC} de todas as amostras mostrou 100% de identidade com a variante alélica *bla*_{KPC-2}.

Em relação às regiões flanqueadoras deste gene, na maioria das amostras foi observada a presença de uma estrutura parcial do transposon *Tn4401*. Nenhuma amostra apresentou o *Tn4401* completo. A sequência de inserção *ISKpn6* foi detectada em 98,8% (n= 82) das amostras, a *ISKpn7* em 57,8% (n= 48), a transposase *tnpA* em 48,2% (n= 40), a sequência repetida invertida IRR em apenas uma amostra (1,2%) e nenhuma apresentou a região IRL (Gráfico 4.2).

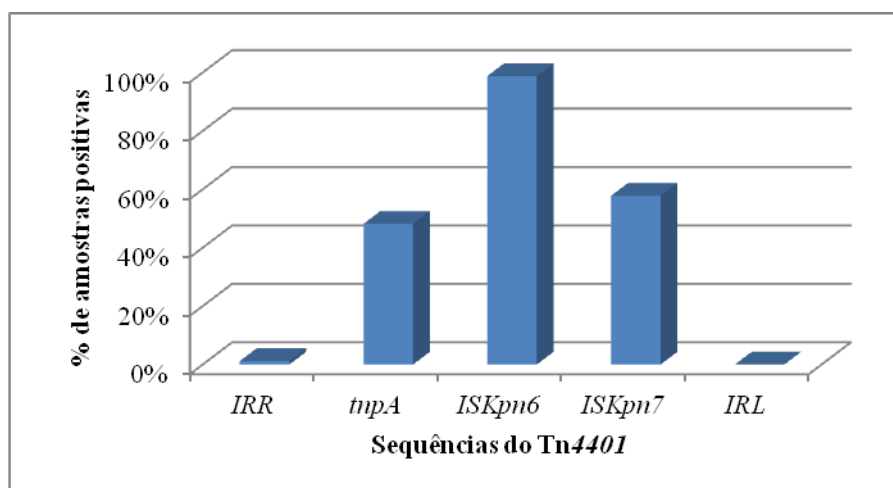


Gráfico 4.2. Frequência de detecção das sequências do *Tn4401* entre as amostras produtoras de KPC-2.

A caracterização da isoforma do transposon *Tn4401* é realizada a partir do sequenciamento da região *ISKpn7*. Através de sequenciamento do *ISKpn7* foi observado que 53% (n= 44) das amostras apresentaram a região sem deleção e 4,8% (n= 4) a região com deleção de 69pb. Como forma de facilitar a interpretação dos resultados obtidos na PCR,

caracterizamos perfis diferentes para diferentes combinações de resultados que obtivemos (Quadro 4.1).

As três sequências principais do transposon (*ISKpn6*, *ISKpn7* e *tnpA*) foram encontradas juntas em 26 amostras (31,3%), sendo que uma apresentou também a sequência IRR (Perfis 1b, 1d e 6). O perfil 1b foi o mais prevalente no complexo *E. cloacae* (n=10, 58,8%) e *E. coli* (n=8, 61,5%). O perfil 1d foi encontrado em uma amostra de *E. aerogenes* e três amostras de *P. agglomerans*, e o Perfil 6 em uma amostra de *C. freundii*. Em metade das amostras de *E. aerogenes* foi encontrado o Perfil 4. Todas as amostras de *P. stuartii*, *M. morgani* e *S. marcescens* eram do perfil 2 (Tabela 4.4).

Quadro 4.1. Perfis de combinações de detecção das regiões do transposon Tn4401.

Perfil 1b	IRR - / <i>tnpA</i> + / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> + sem deleção
Perfil 1d	IRR - / <i>tnpA</i> + / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> + deleção de 69pb
Perfil 2	IRR - / <i>tnpA</i> + / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> -
Perfil 3	IRR - / <i>tnpA</i> - / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> -
Perfil 4	IRR - / <i>tnpA</i> - / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> + sem deleção
Perfil 5	IRR - / <i>tnpA</i> - / <i>ISKpn6</i> - / <i>ISKpn7</i> -
Perfil 6	IRR + / <i>tnpA</i> + / <i>ISKpn6</i> + / <i>ISKpn7</i> + sem deleção

Tabela 4.4. Perfis do transposon Tn4401 encontrados em diferentes espécies de Enterobacteriaceae.

Espécies	Perfis de Perfis de combinações de detecção das regiões do transposon Tn4401						
	Perfil 1b	Perfil 1d	Perfil 2	Perfil 3	Perfil 4	Perfil 5	Perfil 6
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	3	1	5	10	19		
<i>E. cloacae</i> (n=17)	10			6	1		
<i>E. coli</i> (n=13)	8		2	3			
<i>P. stuartii</i> (n=4)			4				
<i>P. agglomerans</i> (n=4)		3			1		
<i>C. freundii</i> (n=3)			1			1	1
<i>K. oxytoca</i> (n=2)				1	1		
<i>M. morgani</i> (n=1)			1				
<i>S. marcescens</i> (n=1)			1				
Total (n=83)	21 (25,3%)	4 (4,8%)	14 (16,8%)	20 (24,1%)	22 (26,5%)	1 (1,2%)	1 (1,2%)

4.3. Detecção de outros genes codificadores de beta-lactamases

Nesse estudo, encontramos outros genes de beta-lactamases em 44 amostras (53%). Todas as amostras de *P. stuartii*, *M. morgani* e *S. marcescens*; 47,4% das amostras de *E. aerogenes*; 11,8% das amostras do complexo *E. cloacae*; 61,5% das amostras de *E. coli*; 66,7% das amostras de *C. freundii* e 50% das amostras de *K. oxytoca* foram negativas para todos os genes de ESBL investigados.

Genes do tipo *bla*_{TEM} foram encontrados em 45,8% (n=38) das amostras. Através do sequenciamento do gene *bla*_{TEM} foi observada a presença de *bla*_{TEM-141} em 36,8% das amostras (n=14). Em 63,2% (n=24) encontramos uma variante alélica que não estava descrita no banco de dados do Lahey (38). Esta variante foi chamada de *bla*_{TEM-141-like} pois difere da *bla*_{TEM-141} em apenas duas posições: na posição 228 houve uma alteração de timina para citosina e na posição 396 de timina para guanina. (Tabela 4.5 e Figura 4.1).

O gene *bla*_{CTX-M} foi encontrado em 22,9% (n=19) correspondendo às espécies *E. aerogenes* e complexo *E. cloacae*. Foram encontradas 5 variantes alélicas (*bla*_{CTX-M-8, 9, 15, 59 e 97}). A variante alélica mais frequente em *E. aerogenes* foi a CTX-M-59 (31,6%, n= 6) e no complexo *E. cloacae* foi a CTX-M-15 (31,6% , n= 6). O gene *bla*_{SHV} foi encontrado em 6% das amostras (n= 5), correspondendo às espécies *E. aerogenes*, *P. agglomerans* e complexo *E. cloacae*. O sequenciamento do gene *bla*_{SHV} mostrou a presença de 4 variantes alélicas (*bla*_{SHV2a, 63, 120, 165}). (Tabela 4.5).

Tabela 4.5. Percentual de amostras produtoras de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} associadas à KPC-2.

Espécies	Variantes (N)	Número de amostras
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	TEM-141 (+), CTX-M-15 (+), SHV (-)	1
	TEM-141 (+), SHV (-), CTX-M (-)	2
	TEM-141-like (+), CTX-M-8 (+), SHV (-)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-59 (+), SHV (-)	1
	TEM-141-like (+), SHV-120 (+)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-59 (+), SHV (-)	7
	CTX-M-59 (+), SHV (-), TEM (-)	5
	CTX-M-97 (+), SHV (-), TEM (-)	1
	Grupo CTX-M-9 (+), SHV (-), TEM (-)	1
<i>E. cloacae</i> (n=17)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	18
	TEM-141 (+), CTX-M-15 (+), SHV (-)	5
	TEM-141 +, Grupo CTX-M-9 (+), SHV (-)	1
	TEM-141 (+), SHV (-), CTX-M (-)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-8 (+), SHV (-)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-9 (+), SHV (-)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-15 (+), SHV (-)	1
	TEM-141-like (+), CTX-M-9 (+), SHV-2a (+)	1
	TEM-141-like (+), SHV (-), CTX-M (-)	4
<i>E. coli</i> (n=13)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	2
	TEM-141 (+), SHV (-), CTX-M (-)	4
	TEM-141-like (+), SHV (-), CTX-M (-)	1
<i>P. stuartii</i> (n=4)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	8
	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	4
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	4
	TEM-141-like (+), SHV (-), CTX-M (-)	1
	TEM-141-like (+), SHV-165 (+), CTX-M (-)	2
<i>C. freundii</i> (n=3)	TEM-141-like (+), SHV-63 (+), CTX-M (-)	1
	Grupo CTX-M-9 (+), TEM (-), SHV (-)	1
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	2
	TEM-141-like (+), SHV (-), CTX-M (-)	1
<i>M. morgani</i> (n=1)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	1
	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	1
<i>S. marcescens</i> (n=1)	CTX-M (-), SHV (-), TEM (-)	1

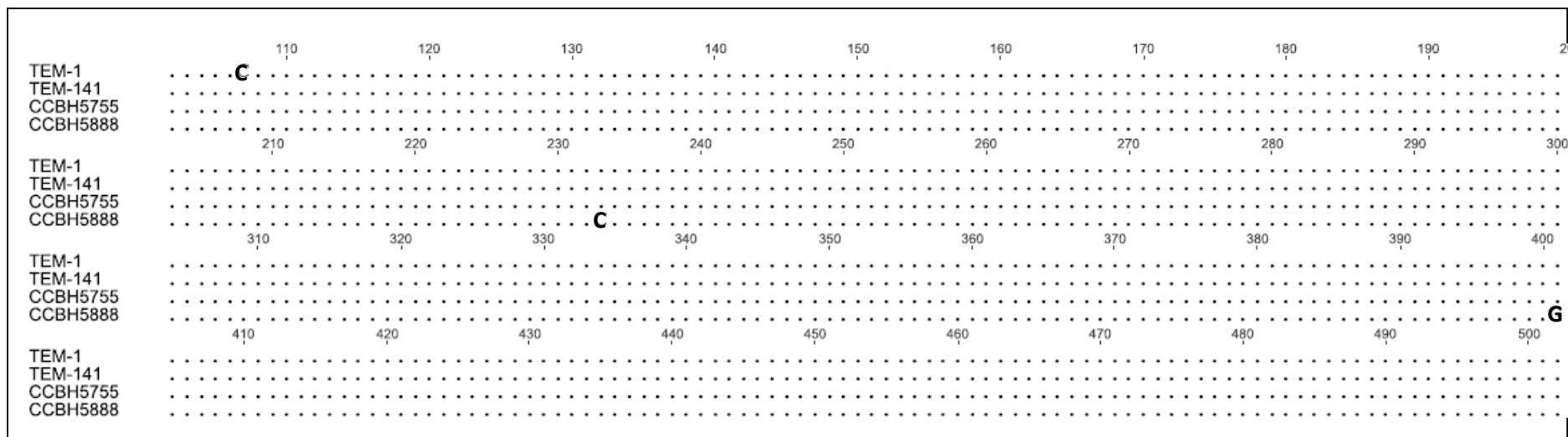


Figura 4.3. Figura representativa do alinhamento das seqüências de nucleotídeos do gene *bla*_{TEM} das amostras positivas com as seqüências dos genes *bla*_{TEM-1} (Genbank JQ423955.1) e *bla*_{TEM-141} (Genbank AY956335.1).

4.4. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

4.4.1. Teste de difusão em ágar

De acordo com os “breakpoints” do CLSI 2013 e da nota técnica da ANVISA 01/2013, foram encontrados altos percentuais de resistência à maioria dos antimicrobianos testados. Considerando os resultados intermediários como resistentes, foi observado um alto percentual de amostras não sensíveis aos carbapenemas: 94% a 100%. Em relação aos outros beta-lactâmicos, 98,8% das amostras apresentaram resistência a cefotaxima (100% não sensíveis), 97,6% ao aztreonam (98,8% não sensíveis), 95,2% a cefepime (97,6% não sensíveis) e 81,9% a ceftazidima, sendo 89,2% não sensíveis. Em relação às outras classes de antimicrobianos, foi observado um percentual de 73,5% de amostras resistentes à ciprofloxacina, sendo 12% com resistência intermediária, e 59% a sulfametoxazol/trimetoprima, sendo 61,4% não sensíveis. Os antimicrobianos com menor percentual de resistência foram os aminoglicosídeos, gentamicina (39,8%, sendo 42,2% não sensíveis) e ampicacina (34,9%, sendo 22,9% com resistência intermediária) (Gráfico 4.3 e tabela 4.6).

Aproximadamente 73% (n= 60) das amostras desse estudo apresentaram fenótipo de resistência a múltiplas classes *in vitro*, ou seja, se mostraram resistentes a três ou mais classes de antimicrobianos testados.

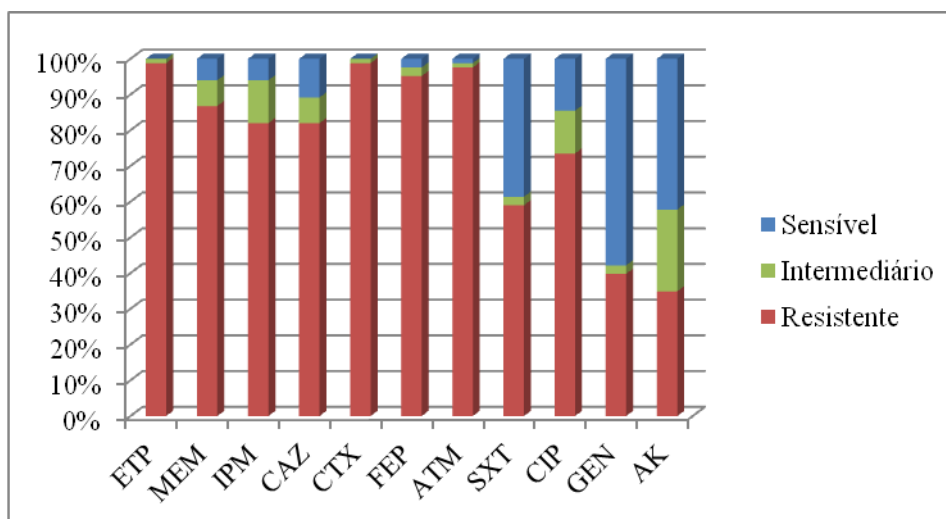


Gráfico 4.3. Susceptibilidade aos antimicrobianos das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC-2 através da técnica de difusão em ágar.

Legenda: ETP= Ertapenem, MEM= Meropenem, IPM= Imipenem, CAZ= Ceftazidima, CTX= Cefotaxima, FEP= Cefepime, ATM= Aztreonam, SXT= Sulfametoxazol/trimetoprima, CIP= Ciprofloxacina, GEN= Gentamicina, AK= Amicacina.

Analisando o perfil de resistência (considerando as amostras intermediárias como resistentes) entre as espécies com maior número de amostras (*E. aerogenes*, complexo *E. cloacae* e *E. coli*), foi observado que *E. coli* apresentou menor percentual de resistência para imipenem (76,9%), meropenem (69,2%), ceftazidima (61,5%), sulfametoxazol/trimetoprima (46,2%) e amicacina (23,1%). Estas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$) para meropenem e amicacina em relação a *E. aerogenes* e ceftazidima em relação a *E. aerogenes* e ao complexo *E. cloacae*. A resistência à ciprofloxacina no complexo *E. cloacae* (64,7%) foi significativamente menor que *E. aerogenes* (97,4%). Já em relação a gentamicina, *E. aerogenes* mostrou-se significativamente menos resistente que o complexo *E. cloacae* (28,9% e 64,7% respectivamente) (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Taxa de resistência aos antimicrobianos (incluindo resistentes e intermediárias) das diferentes espécies de Enterobacteriaceae produtoras de KPC através da técnica de difusão em ágar.

Espécies	ETP N (%)	MEM N (%)	IPM N (%)	CAZ N (%)	CTX N (%)	FEP N (%)	ATM N (%)	SXT N (%)	CIP N (%)	GEN N (%)	AK N (%)
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	38 (100%)	38 (100%)	37 (97,4%)	38 (100%)	38 (100%)	33 (86,8%)	38 (100%)	24 (63,2%)	37 (97,4%)	11 (28,9%)^e	27 (71,0%)
<i>E. cloacae</i> (n=17)	17 (100%)	16 (94,1%)	16 (94,1%)	17 (100%)	17 (100%)	17 (100%)	17 (100%)	12 (70,6%)	11 (64,7%)^d	11 (64,7%)	8 (47,0%)
<i>E. coli</i> (n=13)	13 (100%)	9 (69,2%)^a	10 (76,9%)	8 (61,5%)^b	13 (100%)	11 (84,6%)	12 (92,3%)	6 (46,2%)	10 (76,9%)	5 (38,5%)	3 (23,1%)^c
<i>P. stuartii</i> (n=4)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	–	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	3 (75%)	4 (100%)	3 (75%)	4 (100%)
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	4 (100%)	1 (25%)	4 (100%)	3 (75%)	2 (50%)
<i>C. freundii</i> (n=3)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	3 (100%)	1 (33,3%)	2 (66,6%)	–	1 (33,3%)
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	2 (100%)	–	1 (50%)
<i>M. morgani</i> (n=1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	–	1 (100%)	–	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)
<i>S. marcescens</i> (n=1)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	1 (100%)	–	–	1 (100%)	1 (100%)
Total N (%) R + I	83 (100%)	78 (94,0%)	78 (94,0%)	73 (88%)	83 (100%)	75 (90,4%)	82 (98,8%)	51 (61,4%)	71 (85,5%)	35 (42,2%)	48 (57,8%)

Legenda: ETP= Ertapenem, MEM= Meropenem, IPM= Imipenem, CAZ= Ceftazidima, CTX= Cefotaxima, FEP= Cefepime, ATM= Aztreonam, SXT= Sulfametoxazol/trimetoprima, CIP= Ciprofloxacina, GEN= Gentamicina, AK= Amicacina.

Para nível de significância de 95%:

^a Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0004$)

^b Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E.aerogenes* ($P= 0,0001$) e complexo *E. cloacae* ($P= 0,0090$)

^c Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0024$)

^d Diferença estatisticamente significativa entre o complexo *E. cloacae* e *E. aerogenes* ($P= 0,0008$).

^e Diferença estatisticamente significativa entre *E. aerogenes* e complexo *E. cloacae* ($P= 0,0124$).

4.4.2. Determinação da concentração inibitória mínima

De acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI 2013, encontramos para meropenem $CIM_{50} \geq 32$ mg/L (com CIM variando de 0,047 a ≥ 32 mg/L), para imipenem $CIM_{50} \geq 32$ $\mu\text{g/mL}$ (com CIM variando de 0,25 a ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) e para ertapenem $CIM_{50} \geq 32$ $\mu\text{g/mL}$ (com CIM variando de 0,047 a ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$) (Gráfico 4.4).

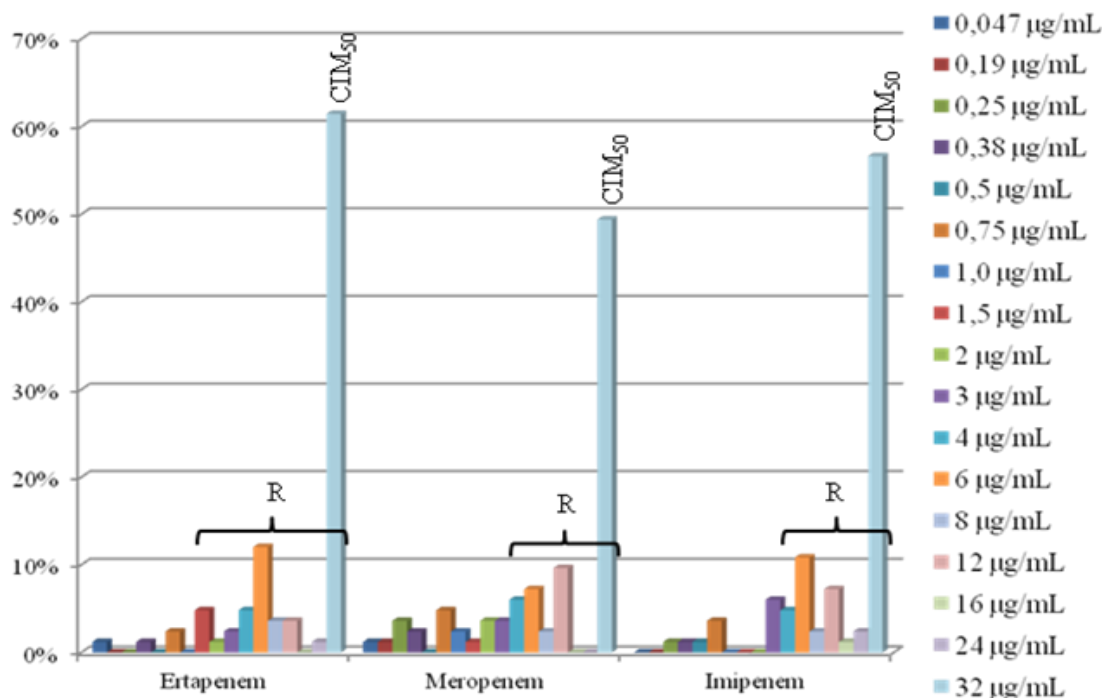


Gráfico 4.4. Concentração inibitória mínima de ertapenem, meropenem e imipenem das 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC-2.

Legenda: breakpoints: ertapenem $R \geq 2 / I = 1 / S \leq 0,5$ $\mu\text{g/mL}$ (NT ANVISA N° 1/2013); meropenem e imipenem $R \geq 4 / I = 2 / S \leq 1$ $\mu\text{g/mL}$ (CLSI, 2013).

De acordo com os critérios estabelecidos pela nota técnica da ANVISA N° 01/2013, foi observado que 36,1% das amostras apresentaram-se não sensíveis à tigeciclina ($CIM_{50} = 1$ $\mu\text{g/mL}$, CIM variando de 0,125 a 16 $\mu\text{g/mL}$), correspondendo às seguintes espécies: complexo *E. cloacae* (29,4%; 5/17), *E. aerogenes* (50%; 19/38), *C. freundii* (33,3%; 1/3), *K. oxytoca* (50%; 1/2), *S. marcescens* (100%; 1/1), *P. agglomerans* (25% 1/4) e *P. stuartii* (50%; 2/4). (Gráfico 4.5 e Tabela 4.7),

Com relação à polimixina B, foi encontrado um percentual de resistência de 16,5%, excluindo espécies intrinsecamente resistentes ($CIM_{50} = 0,75 \mu\text{g/mL}$, CIM variando de 0,19 a $32 \mu\text{g/mL}$) (Gráfico 4.5). Para confirmar a resistência a esta droga, foi utilizado o teste de microdiluição em caldo (padrão-ouro) e todas as amostras mostraram-se igualmente resistentes com o mesmo valor de CIM. As amostras resistentes pertenciam às seguintes espécies: *E. aerogenes* (26,3%; 10/38), *C. freundii* (33,3%; 1/3), e *K. oxytoca* (50% 1/2) (Tabela 4.7).

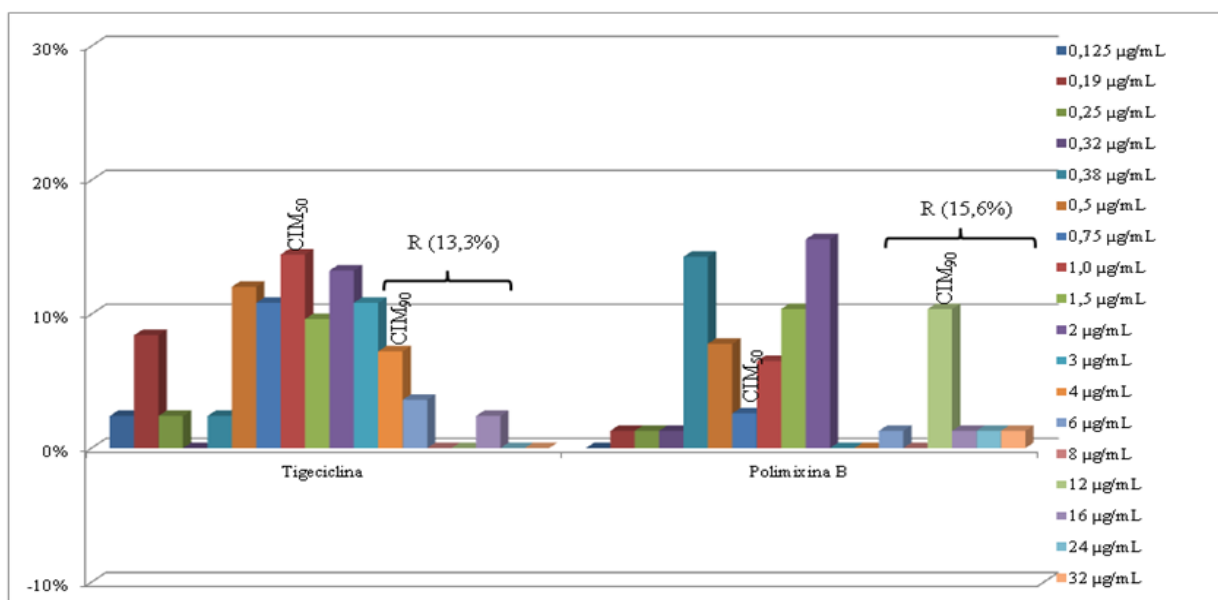


Gráfico 4.5. Concentração inibitória mínima frente à tigeciclina e polimixina B das amostras de Enterobacteriaceae analisadas.

Legenda: breakpoints NT ANVISA N° 1/2013: tigeciclina $R \geq 4 / I = 2 / S \leq 1 \mu\text{g/mL}$; polimixina B $R \geq 4 / S \leq 2 \mu\text{g/mL}$.

Analisando a CIM entre as espécies com maior número de amostras (*E. aerogenes*, complexo *E. cloacae* e *E. coli*), foi observado que *E. aerogenes* apresentou valores de CIM para meropenem e polimixina B significativamente maiores que os valores das outras duas espécies ($P < 0,05$). As amostras de *E. coli* apresentaram valores de CIM significativamente menores que o complexo *E. cloacae* para meropenem e tigeciclina e para todos os antimicrobianos testados em relação a *E. aerogenes* ($P < 0,05$) (Tabela 4.6).

Tabela 4.7. Concentração inibitória mínima das diferentes espécies de Enterobacteriaceae produtoras de KPC para os carbapenemas, tigeciclina e polimixina B através do E-test.

Espécies	IPM		MER		ETP		TGC		PB	
	CIM ₅₀ (VAR)	M±DP	CIM ₅₀ (VAR)	M±DP	CIM ₅₀ (VAR)	M±DP	CIM ₅₀ (VAR)	M±DP	CIM ₅₀ (VAR)	M±DP
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	32 (0,38-32)	23,0±12,8	12 (0,38-32)	24,0±12,2	32 (0,38-32)	27,2±10,3	1,5 (0,125-16)	2,8±3,5	0,75 (0,38-32)	4,7±7,3
<i>E. cloacae</i> (n=17)	32 (0,5-32)	23,3±11,7	6 (0,047-32)	16,3±13,9^a	32 (0,047-32)	20±13,4	1 (0,5-4)	1,6±1,1	0,75 (0,19-2)	1±0,6^b
<i>E. coli</i> (n=13)	6 (3-32)	14,5±12,6^c	3 (0,38-32)	6,4±8,7^d	4 (0,75-32)	11,3±13,3^e	0,19 (0,19-1)	0,3±0,2^f	0,75 (0,5-2)	1±0,5^g
<i>P. stuartii</i> (n=4)	32 (4-32)	25±14	4 (0,75-32)	17,2±17,2	6 (1,5-32)	11,4±13,9	1,5 (1-2)	1,6±0,5	NA	NA
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	32 (24-32)	30±4	32	32±0	32	32±0	1 (0,75-3)	1,4±1	0,32 (0,25-1,5)	0,9±0,7
<i>C. freundii</i> (n=3)	0,75	0,75±0	0,25	0,25±0	6 (4-32)	14±15,6	1 (0,5-6)	2,5±3	1 (0,5-12)	4,5±6,5
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	0,25-32	16,1±22,5	0,19-32	16,1±22,5	(6-32)	19±18,4	0,5-2	1,3±1,1	0,38-12	6,2±8,2
<i>M. morgani</i> (n=1)	32	NA	2	NA	1,5	NA	0,75	NA	NA	NA
<i>S. marcescens</i> (n=1)	32	NA	32	NA	32	NA	2	NA	NA	NA

Legenda: VAR= variação da CIM; M= média; DP= desvio-padrão; NA= não avaliado.

Para nível de significância de 95%:

^a Diferença estatisticamente significativa entre o complexo *E. cloacae* e *E. aerogenes* ($P= 0,0433$).

^b Diferença estatisticamente significativa entre o complexo *E. cloacae* e *E. aerogenes* ($P= 0,0034$).

^c Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0453$).

^d Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P< 0,0001$) e complexo *E. cloacae* ($P= 0,0331$).

^e Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0001$).

^f Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0001$) e complexo *E. cloacae* ($P= 0,0001$).

^g Diferença estatisticamente significativa entre *E. coli* e *E. aerogenes* ($P= 0,0033$).

4.5. Extração plasmidial e Hibridação com sonda para bla_{KPC}

Através da técnica de extração plasmidial por lise alcalina foi observada a presença de mais de um plasmídio para a maioria das amostras. Realizamos a hibridação dos plasmídios com sonda para bla_{KPC-2} nas 83 amostras de Enterobacteriaceae produtoras de KPC estudadas e foi observada marcação em pelo menos uma banda plasmidial em cada amostra. Para a maioria das amostras foi encontrada mais de uma banda marcada (Figura 4.3).

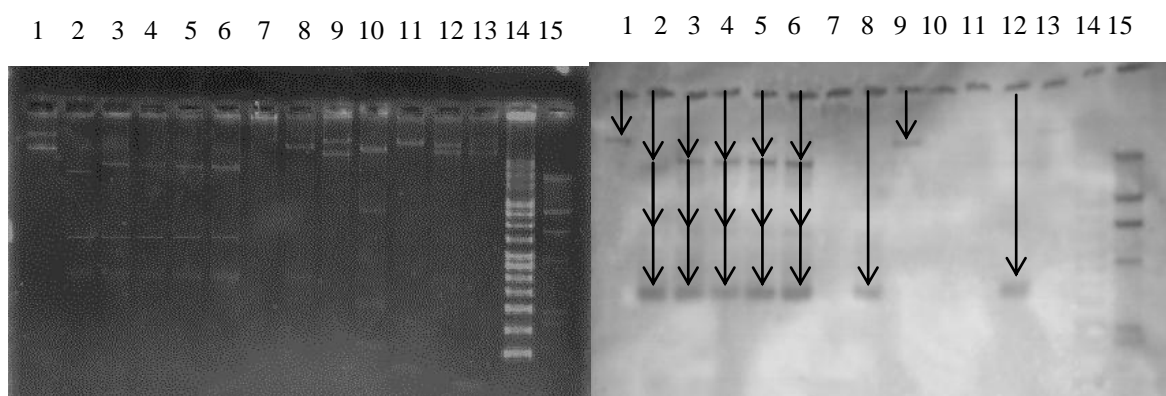


Figura 4.3. Gel representativo de extração plasmidial e posterior hibridação em membrana de nylon com sonda bla_{KPC}

Legenda: 1) *K. pneumoniae* CCBH 1994; 2) *E. aerogenes* CCBH 6458; 3) *E. aerogenes* CCBH 6459; 4) *E. aerogenes* CCBH 6460; 5) *E. aerogenes* CCBH 6461; 6) *E. aerogenes* CCBH 6464; 7) *E. aerogenes* CCBH 6503; 8) *E. aerogenes* CCBH 6529; 9) *E. aerogenes* CCBH 6647; 10) *E. aerogenes* CCBH 6705; 11) *E. aerogenes* CCBH 6709; 12) *E. aerogenes* CCBH 6710; 13) *E. aerogenes* CCBH 6711; 14) Supercoiled: marcador de peso molecular para DNA superenovelado; 15) DIG= Peso molecular marcado com DIG.

A partir da hibridação, realizamos uma estimativa de peso molecular das bandas de plasmídios nos quais foi observada a marcação para KPC. De acordo com a estimativa realizada, pudemos observar que o gene bla_{KPC-2} foi encontrado em plasmídios variando de 3,5 a 60kb, sendo os mais frequentemente encontrados, plasmídios com ~10kb (29/83), ~5kb (20/83) e ~40kb (19/83) (Tabela 4.8).

Em *E. aerogenes*, foram encontrados plasmídios carreadores de KPC variando de 5 a 50 kb, sendo os mais prevalentes, plasmídios de aproximadamente 10 kb (n=22, 57,9%). Em *E. cloacae* e *E. coli*, os plasmídios encontrados variavam de 3,5 kb a 50 kb e 6 kb a 60 kb, respectivamente, não havendo nenhum plasmídio prevalente. Os plasmídios de 40 kb foram os mais frequentemente encontrados nas duas espécies (n=5) (Tabela 4.8).

Tabela 4.8. Variação de tamanho dos plasmídios carreadores de *bla*_{KPC-2} nas diferentes espécies de Enterobacteriaceae

Espécies	Variação do número de plasmídios/ amostra	Variação do tamanho dos plasmídios	Plasmídio mais frequente
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	1 a 5	5- 50 kb	~10 kb (n= 22)
<i>E. cloacae</i> (n=17)	1 a 4	3,5 - 50 kb	~40 kb (n= 5)
<i>E. coli</i> (n=13)	1 a 3	6 - 60 kb	~40 kb (n= 5)
<i>P. stuartii</i> (n=4)	2	6 - 10 kb	~6 kb (n= 4)
			~10 kb (n= 4)
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	1 a 3	5 - 50 kb	~50 (n= 2)
<i>C. freundii</i> (n=3)	1 a 4	5 - 40 kb	~40 (n= 2)
			~5 kb (n= 1)
			~10 kb (n= 1)
			~12 kb (n= 1)
			~20 kb (n= 1)
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	3	5 - 40 kb	~25 kb (n= 1)
			~40 kb (n= 1)
			~6 kb (n= 1)
			~11 kb (n= 1)
<i>M. morgani</i> (n=1)	3	6 - 20 kb	~20 kb (n= 1)
			~5 kb (n= 1)
<i>S. marcescens</i> (n=1)	3	5 - 25 kb	~10 kb (n= 1)
			~10 kb (n= 1)
			~25 kb (n= 1)

4.6. Análise do grupo de incompatibilidade plasmidial

Para elucidar o grupo de incompatibilidade dos plasmídios carreadores de KPC-2, foram realizadas reações de PCR para os principais grupos: IncA/C, IncL/M, IncN e IncFIIA. Foram encontrados plasmídios IncN em 15 amostras (18,1%), IncA/C e IncL/M em 9 amostras (10,8%) e nenhuma das amostras apresentou reação de PCR positiva para IncFIIA. Cinco amostras (6%) apresentaram PCR positiva para IncA/C e IncN concomitantemente.

4.7. Hibridação com sonda para IncN, IncA/C e IncL/M

Na análise dos plasmídios carreadores do gene *bla*_{KPC-2}, conseguimos identificar o grupo de incompatibilidade plasmidial por hibridação em 16 amostras (19,3%), correspondendo às espécies *E. coli*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *P. agglomerans*. *E. coli* foi a espécie na qual conseguimos ter mais plasmídios identificados (n= 7; 53,8%).

Das amostras positivas para o grupo de incompatibilidade IncN, nove amostras (5 de *E. coli*, 3 de *E. cloacae* e 1 de *E. aerogenes*, 9/15, 60%) apresentaram hibridação com sonda para este grupo. Em uma amostra de *E. cloacae* foi observada marcação em uma banda diferente daquela marcada com sonda de *bla*_{KPC-2}. Para as demais, foi observada marcação na mesma altura que a marcação com a sonda de *bla*_{KPC-2} (Tabela 4.9).

Das amostras positivas para o grupo de incompatibilidade IncA/C, quatro amostras (3 de *P. agglomerans* e 1 de *E. aerogenes*) apresentaram hibridação com sonda para este grupo. Em uma amostra de *P. agglomerans* foi observada marcação em uma banda diferente daquela marcada com sonda de *bla*_{KPC-2}. Para as demais, foi observada marcação na mesma altura que a marcação com a sonda de *bla*_{KPC-2} (Tabela 4.9).

Das amostras positivas para o grupo de incompatibilidade IncL/M, sete amostras (2 de *E. coli* e 5 de *E. cloacae*, 7/9, 77,8%) apresentaram hibridação com sonda para este grupo. Em três amostras de *E. cloacae* foi observada marcação em uma banda diferente daquela marcada com sonda de *bla*_{KPC-2}. Para as demais, foi observada marcação na mesma altura que a marcação com a sonda de *bla*_{KPC-2} (Tabela 4.9).

Tabela 4.9. Tamanho dos plasmídios marcados pelas sondas *bla*_{KPC-2}, IncN, IncA/C e IncL/M.

Número CCBH	Espécie	Tamanho aproximado dos plasmídios (kb)			
		Hibridação com sonda <i>bla</i> _{KPC-2}	Hibridação com sonda Inc N	Hibridação com sonda Inc A/C	Hibridação com sonda Inc L/M
6711	<i>E. aerogenes</i>	50	–	50	–
7393	<i>E. aerogenes</i>	40	40	–	–
6307	<i>E. cloacae</i>	50	40	–	–
6357	<i>E. cloacae</i>	16 - 6	–	–	50
6506	<i>E. cloacae</i>	40	–	–	40
6940	<i>E. cloacae</i>	50	–	–	40
7063	<i>E. cloacae</i>	40	40	–	
7298	<i>E. cloacae</i>	50 - 20 - 8 - 3,5	–	–	40
7460	<i>E. cloacae</i>	50	40	–	
7534	<i>E. cloacae</i>	50	–	–	50
5146	<i>E. coli</i>	40	40	–	
5153	<i>E. coli</i>	50	–	–	50
5159	<i>E. coli</i>	60	60	–	
5888	<i>E. coli</i>	50	–	–	50
7056	<i>E. coli</i>	40	40	–	–
7456	<i>E. coli</i>	40	40	–	–
7560	<i>E. coli</i>	40	40	–	–
6542	<i>P. agglomerans</i>	40	–	50	–
7347	<i>P. agglomerans</i>	50	–	50	–
7348	<i>P. agglomerans</i>	50	–	50	–

4.8. Determinação do polimorfismo genético por eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE)

Para a análise da clonalidade das amostras produtoras de KPC-2, foram incluídas apenas as espécies representadas por mais de uma amostra (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. stuartii*, *P. agglomerans*, *K. oxytoca* e *C. freundii*).

Dentre as amostras de *E. aerogenes* foi observado um total de 9 grupos clonais, com prevalência do grupo A (65,8%; n= 25) encontrado em amostras isoladas no DF e GO no período de 11 meses (03/2010 a 02/2011), seguido do grupo F (15,8%; n= 6) encontrado em amostras isoladas em PE. Dentre as amostras de *E. aerogenes* resistentes à polimixina B, 9

pertenciam ao clone A (90%), correspondendo a 36% das amostras deste clone e uma ao clone B (10%), todas isoladas do Distrito Federal. A resistência à tigeciclina foi observada em cinco amostras do clone A (20%) e três amostras do clone F (50%), isoladas do Distrito Federal e Pernambuco, respectivamente. (Figura 4.5).

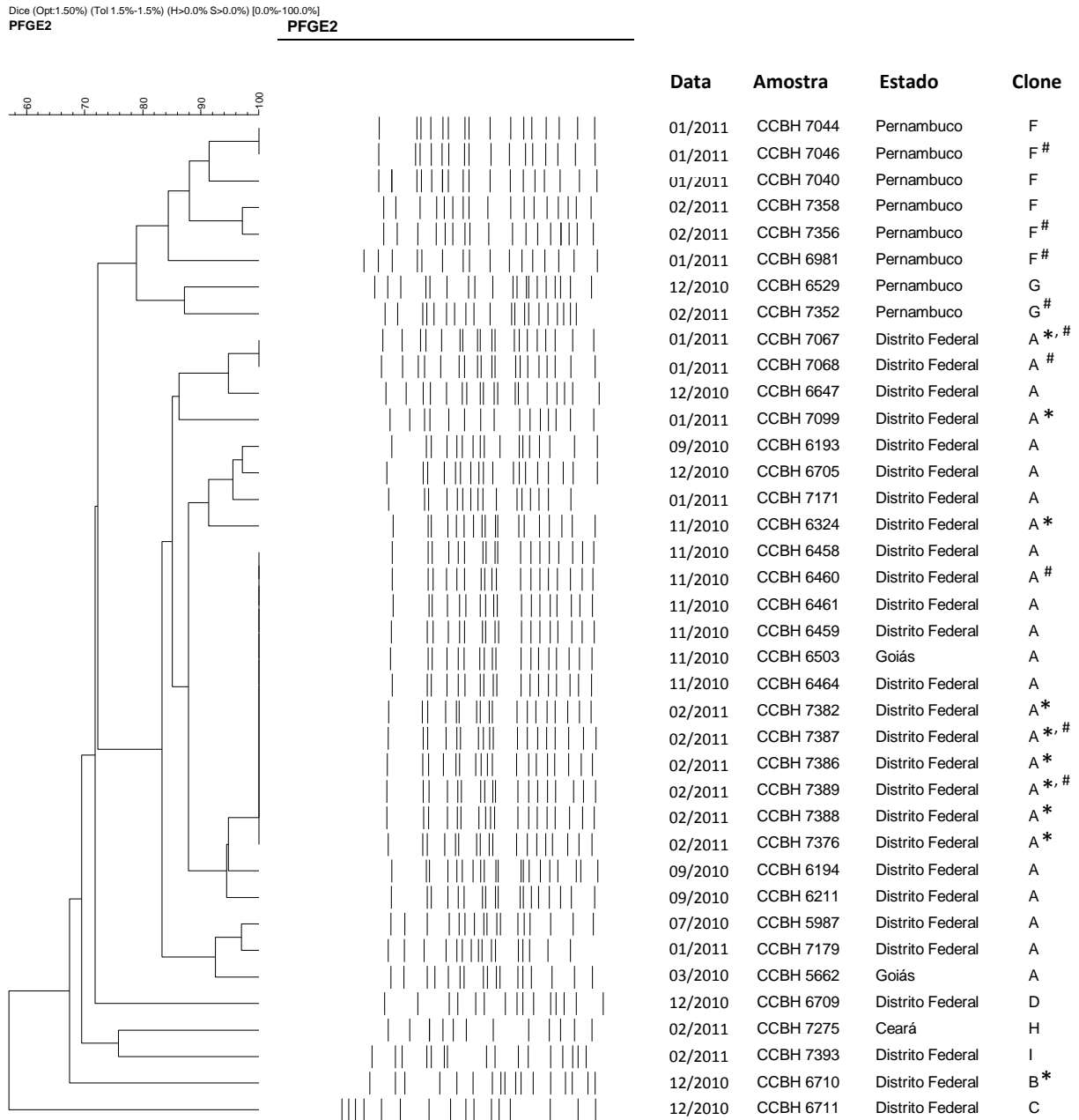


Figura 4.5. Dendrograma representativo dos 9 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 38 amostras de *E. aerogenes* produtoras de KPC-2.

Legenda: * - Amostras resistentes a polimixina B; # – Amostras resistentes a tigeciclina.

Em relação à *E.coli*, foi observado um total de 12 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente. O grupo clonal F foi encontrado em duas amostras isoladas do Distrito Federal (Figura 4.6).

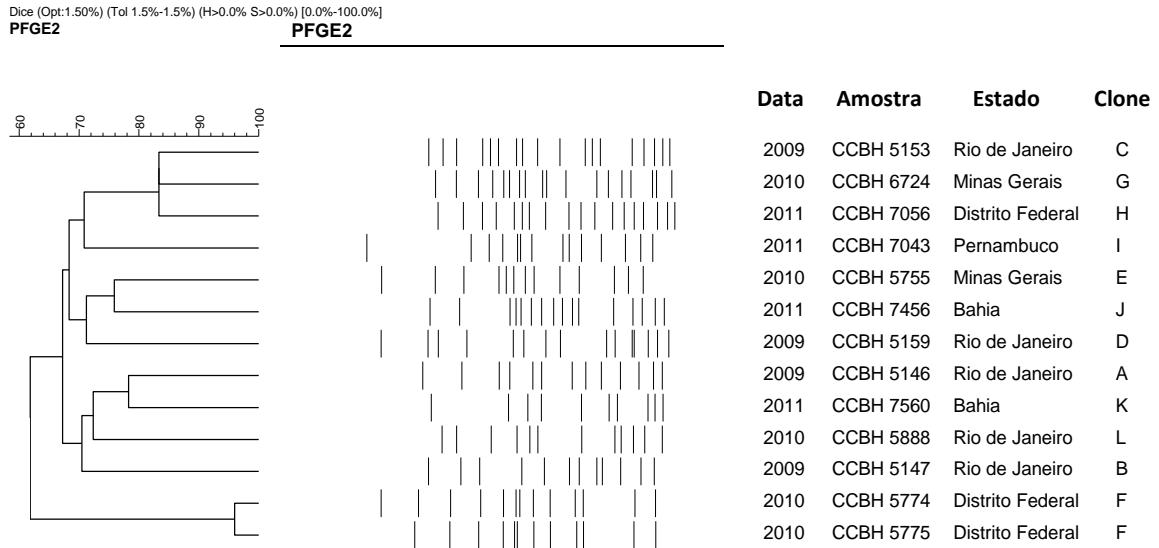


Figura 4.6. Dendrograma representativo dos 12 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 13 amostras de *E. coli* produtoras de KPC-2.

Em *E. cloacae*, foi observado um total de 16 grupos clonais, não havendo nenhum perfil prevalente. O grupo clonal C foi encontrado em duas amostras isoladas do Ceará. Foi encontrada somente uma amostra resistente a tigeciclina (Figura 4.7).

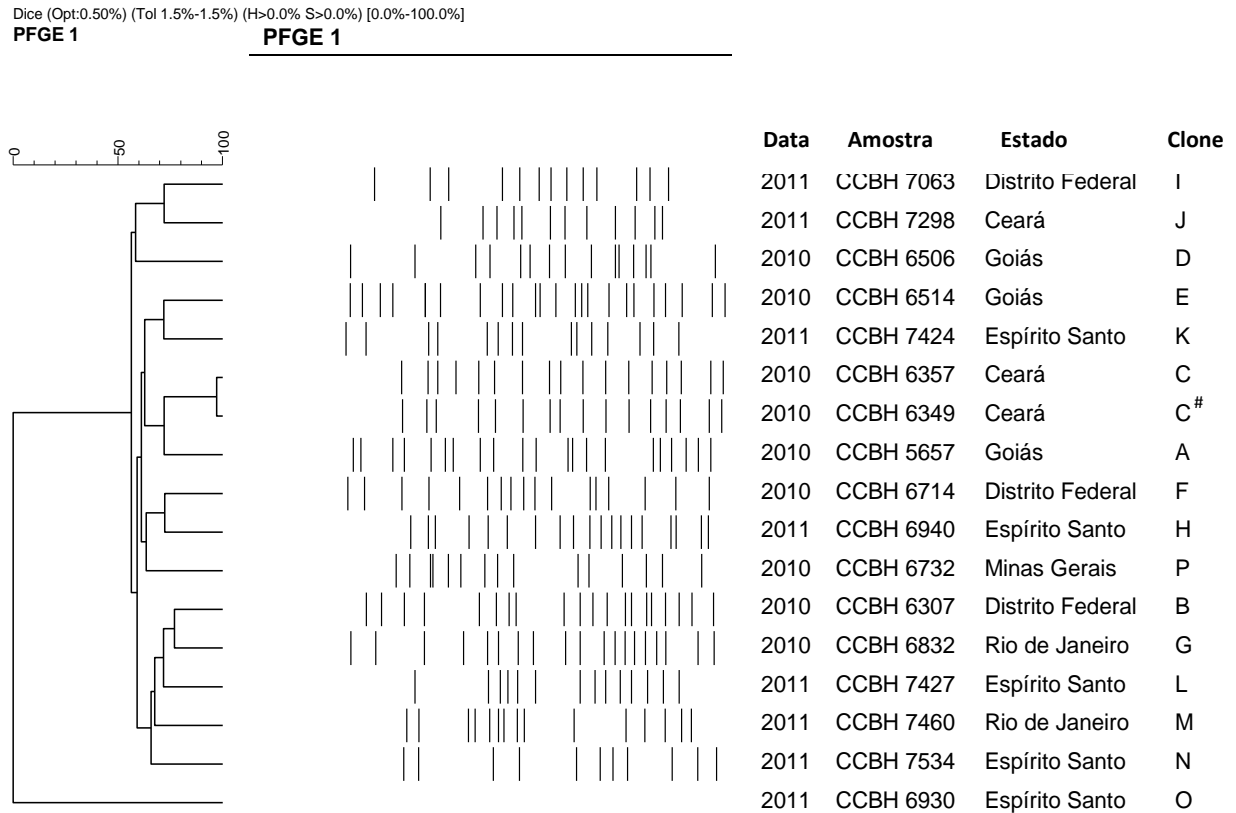


Figura 4.7. Dendrograma representativo dos 16 perfis de fragmentação de DNA cromossomal encontrados nas 17 amostras de *E. cloacae* produtoras de KPC-2.

Legenda: # Amostra resistente a tigeciclina.

As quatro amostras de *P. stuartii* apresentaram perfil de fragmentação do DNA cromossômico com similaridade de acima de 95%. Todas foram isoladas em Minas Gerais (Figura 4.8).

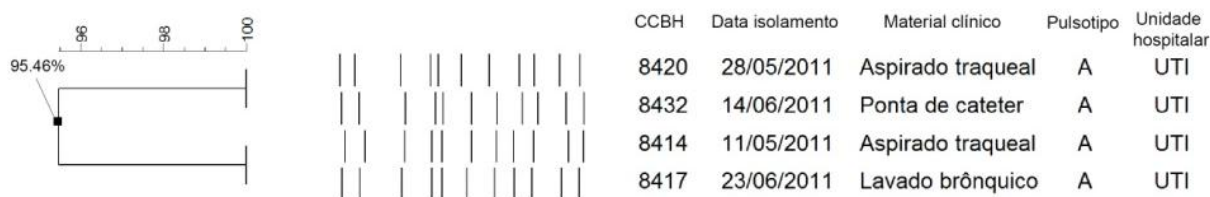


Figura 4.8. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 4 amostras de *P. stuartii* produtoras de KPC.

Em *C. freundii*, as amostras eram pertencentes a clones diferentes e foram isoladas em diferentes estados assim como em *K. oxytoca*. Uma amostra de *C. freundii* e uma de *K. oxytoca* mostraram-se resistentes à polimixina B e foram isoladas de Alagoas e Rio de Janeiro, respectivamente. (Figura 4.9 e 4.10).

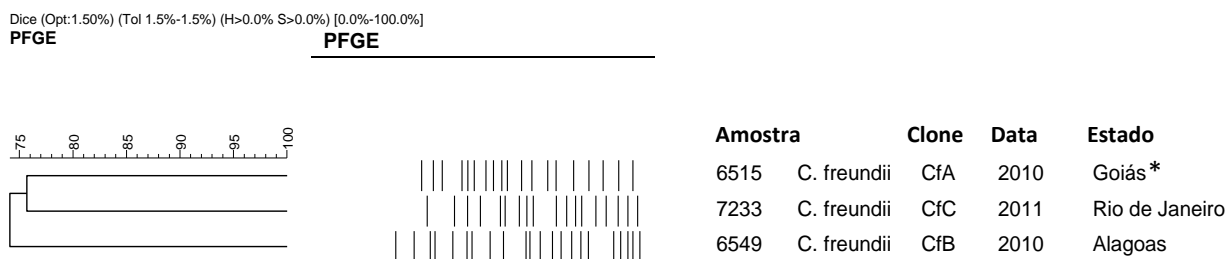


Figura 4.9. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 3 amostras de *C. freundii* produtoras de KPC-2.

Legenda: *Amostra resistente à tigeciclina e polimixina B.

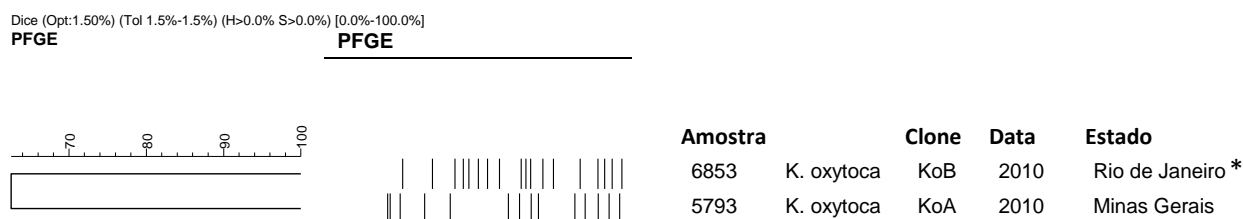


Figura 4.10. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 2 amostras de *K. oxytoca* produtoras de KPC-2.

Legenda: *Amostra resistente à polimixina B.

Em relação a *P. agglomerans*, todas as amostras foram isoladas no Rio de Janeiro e três, das quatro amostras eram idênticas, pertencendo, então, ao mesmo clone (Figura 4.11).

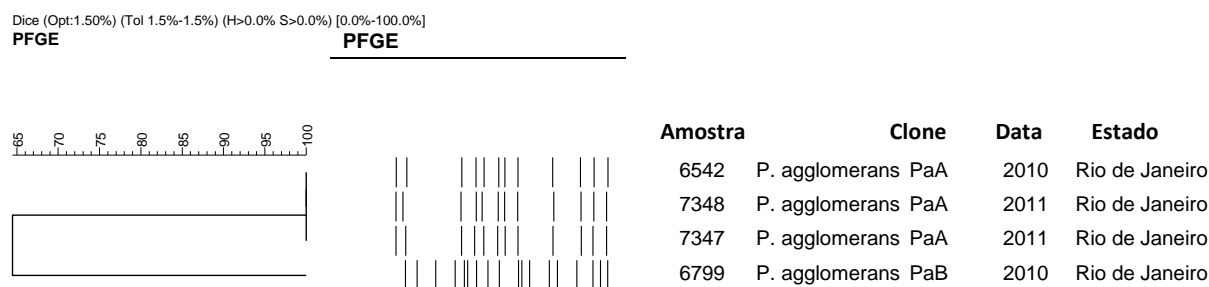


Figura 4.11. Dendrograma representativo do perfil de fragmentação de DNA cromossomal encontrado nas 4 amostras de *P. agglomerans* produtoras de KPC-2.

4.9. Tipagem molecular por “Multilocus Sequence Typing” (MLST) para *E. coli*

Através da tipagem molecular por MLST, pelo esquema do Instituto Pasteur, foram encontrados nove “sequence types” (STs) diferentes. Obtivemos dois novos STs a partir de dois alelos novos para os genes *dinB* e *icdA* (ST629 e ST630) e também dois novos perfis de combinação de alelos gerando dois novos STs (ST631 e ST632) (Tabela 4.10).

As amostras correspondentes ao ST2 pertenciam a três grupos clonais diferentes (EcE, EcK e EcL) por PFGE. As correspondentes ao ST305 pertenciam ao mesmo clone (EcF). As correspondentes ao ST43 pertenciam a dois grupos clonais diferentes (EcG e EcH).

Através da tipagem molecular por MLST pelo esquema da UoW, foram encontrados 10 “sequence types” (STs) diferentes. Obtivemos um novo ST a partir de um alelo novo para o gene *mdh* (ST4353) e três novos perfis de combinação de alelos gerando três novos STs (ST4351, ST4352 e ST4354) (Tabela 4.11). Não foi possível determinar o ST de três amostras.

Comparando os dois esquemas de MLST, foi observado que duas amostras pertencentes ao ST43 pelo esquema do Instituto Pasteur apresentaram STs diferentes no esquema da UoW (ST131 e ST4354). Estes STs diferem em apenas um gene (*fumC*) (Tabela 4.11). Duas amostras pertencentes ao ST2 pelo esquema do Instituto Pasteur apresentaram STs diferentes no esquema da UOW (ST167 e ST4352) (Tabela 4.12).

Tabela 4.10. Tipagem molecular por MLST (esquema Instituto Pasteur e UoW) e PFGE das 13 amostras de *E. coli* produtoras de KPC-2.

Amostra	ST IP	ST UoW	Clone PFGE	Estado
CCBH5755	2	167	EcE	MG
CCBH5888	2	4352	EcL	RJ
CCBH7560	2	ND	EcK	BA
CCBH7043	39	4351	EcI	PE
CCBH6724	43	131	EcG	MG
CCBH7056	43	4354	EcH	DF
CCBH5774	305	57	EcF	DF
CCBH5775	305	ND	EcF	DF
CCBH5159	479	224	EcD	RJ
CCBH5146	629	167	EcA	RJ
CCBH5147	630	4353	EcB	RJ
CCBH5153	631	ND	EcC	RJ
CCBH7456	632	1196	EcJ	BA

Legenda: ND= não determinado.

Tabela 4.11. Alelos dos STs 131 e 4354, mostrando diferença em apenas um alelo do gene *fumC*.

ST	Genes						
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>icd</i>	<i>purA</i>	<i>gyrB</i>	<i>mdh</i>	<i>recA</i>
ST131	53	40	13	28	47	36	29
ST4354	53	88	13	28	47	36	29

Tabela 4.12. Alelos dos STs 167 e 4352, mostrando diferenças em dois alelos dos genes *purA* e *gyrB*.

ST	Genes						
	<i>adk</i>	<i>fumC</i>	<i>icd</i>	<i>purA</i>	<i>gyrB</i>	<i>mdh</i>	<i>recA</i>
ST167	10	11	8	13	4	8	2
ST4352	10	11	8	8	135	8	2

5. Discussão

A resistência a penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos em espécies da família Enterobacteriaceae devido à produção de ESBLs é um fenômeno muito comum, ocorrendo dentro e fora do ambiente hospitalar em diversas partes do mundo (15,17). Os carbapenemas são a escolha terapêutica nesses casos, o que tem contribuído para o surgimento mundial de amostras resistentes aos carbapenemas (ERCs).

A resistência aos carbapenemas em Enterobacteriaceae é principalmente associada à produção de carbapenemases como a KPC, que possuem um alto potencial de disseminação via elementos genéticos móveis. Assim, o aumento da prevalência de ERCs é especialmente importante devido a grande capacidade de disseminação e as altas taxas de mortalidade associadas a essas infecções (105).

A primeira descrição da enzima KPC foi em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada nos Estados Unidos (EUA) em 1996 (47), mas agora já se disseminou não só pelo país, mas pelo mundo todo (54,55, 56). Embora seja descrita predominantemente em *K. pneumoniae*, enzimas do tipo KPC têm sido encontradas em diferentes espécies de Enterobacteriaceae (66), *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (54,68).

No Brasil, a maioria dos estudos também aponta a maior prevalência de KPC em *K. pneumoniae* (106,107). Contudo, também são encontrados relatos em outras espécies de Enterobacteriaceae. No trabalho de Ribeiro e colaboradores (108), das 345 amostras de Enterobacteriaceae isoladas em hospitais do Rio Grande do Sul, 252 (73%) eram pertencentes a outras espécies, que não *K. pneumoniae* (*Enterobacter* spp., *K. oxytoca*, *E. coli*, *S. marcescens* e *Proteus mirabilis*).

Em nosso estudo, encontramos o gene *bla*_{KPC-2} em nove diferentes espécies de Enterobacteriaceae: *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. stuartii*, *P. agglomerans*, *K. oxytoca*, *M. morgannii*, *C. freundii* e *S. marcescens*, sendo que em duas espécies esse gene ainda não havia sido relatado: *P. stuartii* e *P. agglomerans*. A variante alélica KPC-2 é mais disseminada pelo mundo (109) e a única reportada até então no território brasileiro (52,57,61).

Estas 83 amostras produtoras de KPC-2 representam 21,4% de um total de 387 amostras de Enterobacteriaceae (não-*K. pneumoniae*), exibindo susceptibilidade reduzida aos

carbapenemas, recebidas pelo LAPIH/IOC (FIOCRUZ) durante o período de janeiro de 2009 a dezembro de 2011. Este laboratório participa da rede de monitoramento de resistência aos antimicrobianos associada ao Ministério da Saúde e recebe amostras de diferentes estados brasileiros para a confirmação da resistência e identificação do mecanismo de resistência.

A maioria das amostras produtoras de KPC-2 desse estudo foi oriunda do Distrito Federal (39,8% n=33). Em estudo realizado por Pereira e colaboradores em 2012 (110) com 165 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de vários estados brasileiros também foi observado que 34% eram provenientes do DF no período de 2009 a 2011.

Em 2010, foi reportada na imprensa, a ocorrência de um grande surto de enterobactérias, principalmente *K. pneumoniae*, produtoras de KPC no Distrito Federal e a Secretaria de Saúde do Distrito Federal registrou 108 casos de infecção e 18 mortes em outubro de 2010 (111). O órgão anunciou reforço nas medidas de controle de infecção hospitalar, confeccionando um protocolo para manejo de surto de enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo KPC. A ANVISA também confeccionou uma nota técnica (NT 01/2010) com o objetivo de propor medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes (60), e também uma resolução da diretoria colegiada (RDC 20/2011) com o objetivo de regulamentar a dispensação de antimicrobianos, evitando assim, o mau uso e o uso excessivo, que contribuem para a seleção de amostras resistentes (112).

A produção de KPC faz com que a bactéria adquira resistência a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos utilizados na prática clínica (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas) e associações com inibidores de beta-lactamases (6). No entanto, em algumas amostras, pode-se ter sensibilidade *in vitro* a alguns destes antimicrobianos (113).

Segundo os critérios estabelecidos pelo CLSI 2013 (97) e pela nota técnica da ANVISA de 2013 (NT01/2013) (16) , encontramos, conforme esperado, um alto percentual de amostras não sensíveis aos três carbapenemas (ertapenem: 100%; meropenem e imipenem: 94%) com CIM₅₀ de 32 µg/mL. Comparando as três espécies mais frequentes (*E. aerogenes*, *E. cloacae* e *E. aerogenes*), pudemos observar que *E. coli* apresentou menores taxas de resistência e concentrações inibitórias mínimas para os três carbapenemas.

Além da resistência aos beta-lactâmicos gerada pela presença do gene *bla*_{KPC}, altas taxas de resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como quinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos têm sido relatadas em amostras produtoras dessa carbapenemase, principalmente em *K. pneumoniae* (114). Conforme evidenciado por Bratu e colaboradores (115) em trabalho no qual as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC apresentaram altas taxas de resistência à ciprofloxacina (100%) e amicacina (88%), mas com relação à gentamicina, encontraram taxas mais baixas (32%).

Em outras enterobactérias existem poucos relatos evidenciando o percentual de susceptibilidade das amostras em relação aos beta-lactâmicos e outras classes de antimicrobianos. Em relação aos outros antimicrobianos testados, também encontramos um alto percentual de resistência a cefalosporinas (acima de 80% plenamente resistentes e acima de 89% de amostras não sensíveis), monobactâmicos (97,6%), sulfonamidas (59% plenamente resistentes e 61,4 não sensíveis), quinolonas (73,5% plenamente resistentes e 85,5% não sensíveis) e em relação aos aminoglicosídeos, encontramos um percentual de resistência mais baixo: 39,8% resistentes à gentamicina (41,2% não sensíveis) e 34,9% resistentes à amicacina (57,8% não sensíveis).

Devido à alta resistência geralmente encontrada às variadas classes de antimicrobianos entre bactérias produtoras de KPC, poucas são as opções de tratamento para indivíduos infectados por esses micro-organismos. Desde junho de 2010 o CLSI alterou os pontos de corte dos carbapenemas e orienta aos clínicos que podem utilizar os carbapenemas para tratar infecções por bactérias com valores de CIM que se encaixam na faixa de resistência ou resistência intermediária, devido às poucas opções de tratamento (CLSI, 2011) (116). O mesmo também é preconizado pelo EUCAST (“European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”) (117). Ambos os órgãos aconselham que os resultados do teste de susceptibilidade devam guiar o tratamento, e não a detecção molecular de beta-lactamases.

Contudo, de acordo com a nota técnica da ANVISA (01/2013) (16), a orientação terapêutica em caso de suspeita de infecção por enterobactérias produtoras de carbapenemases deve ser a combinação de drogas para infecções graves. Como forma de terapia empírica, é preconizado o uso de polimixina B ou colistina associado com aminoglicosídeos (gentamicina ou amicacina), carbapenemas (meropenem ou doripenem) ou

tigeciclina. Após a determinação do perfil de susceptibilidade bacteriano, devem ser utilizadas duas drogas com sensibilidade *in vitro* comprovada. Não havendo comprovação da sensibilidade *in vitro* a uma segunda droga, a polimixina B ou colistina devem ser utilizadas combinadas com carbapenemas (meropenem ou doripenem) ou tigeciclina. No caso de amostras resistentes à polimixina B, recomenda-se a associação de dois ou três dos antimicrobianos sugeridos para os outros casos (i. e. carbapenemas + aminoglicosídeos + tigeciclina) (16). A terapia combinada deve ser utilizada para prevenir o risco de desenvolvimento de resistência, maximizar a morte bacteriana e prevenir a ocorrência de reinfecções (118).

Esse fato foi comprovado por Tumbarello e colaboradores (119), em um estudo de coorte no qual foi analisada a antibioticoterapia em que foram submetidos os pacientes hospitalizados no mês anterior ao estudo. Foram analisadas diferentes combinações de drogas utilizadas no tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC e o tratamento no qual houve um melhor resultado foi a combinação de colistina, tigeciclina e meropenem. Apesar da ação hidrolítica da KPC ao meropenem, de alguma forma, a combinação dessas três drogas gerou um sinergismo melhor, aumentando a taxa de sobrevivência dos pacientes de forma estatisticamente significativa.

Darko e Markogiannakis (120) também avaliaram o sucesso do tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases e observaram que em amostras nas quais a CIM para os carbapenemas era $\leq 4\mu\text{g/mL}$, o percentual de sucesso ao tratamento (69%) aproximou-se do sucesso no tratamento de amostras que não produziam carbapenemases (73%) quando ambas eram tratadas com carbapenemas associados a outras drogas (tigeciclina e colistina).

Dessa forma, as polimixinas (colistina e polimixina B) e tigeciclina têm sido consideradas as opções centrais para o tratamento das infecções por bactérias resistentes aos carbapenemas (114). As polimixinas apresentam alta toxicidade e a tigeciclina ainda não possui padronização no CLSI e não é recomendada para infecções de corrente sanguínea. Contudo, vários estudos mostram o aumento da resistência a estas drogas.

Zhang e colaboradores (121) avaliaram a susceptibilidade de 89 amostras de diferentes espécies de Enterobacteriaceae (sendo 82 produtoras de KPC) isoladas em sete hospitais chineses e observaram resistência à tigeciclina em 60% das amostras. Livermore e

colaboradores (122) avaliaram a sensibilidade de diferentes espécies de Enterobacteriaceae isoladas no Reino Unido, a diferentes drogas, incluindo tigeciclina. Das 11 amostras produtoras de KPC avaliadas no estudo, nove eram não sensíveis à tigeciclina (sendo 3 plenamente resistentes, três com CIM= 4 mg/L e duas com CIM= 8 mg/L).

De acordo com os critérios estabelecidos pela nota técnica da ANVISA 01/2013 (16), em nosso estudo, foi encontrado um percentual de 36,1% de amostras não sensíveis (resistentes ou com resistência intermediária) à tigeciclina, correspondendo às espécies: *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *C. freundii*, *K. oxytoca*, *S. marcescens* e *P. agglomerans*.

A tigeciclina é um antimicrobiano que não pode ser utilizado em todos os tipos de infecção, por ser uma droga com atividade bacteriostática. Seu uso limita-se a infecções intra-abdominais complicadas e de pele e tecidos moles. Além disso, seu uso não é indicado para tratar infecções no trato urinário, pois sua excreção é essencialmente pela via biliar, fazendo com que sua concentração não seja muito elevada no trato urinário (122). Além de todas essas limitações, podemos observar percentuais de resistência crescentes a essa droga (121,122), fazendo com que ela deixe de ser a principal escolha para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases.

Em relação à polimixina B, em nosso estudo foram encontradas 16,6% das amostras resistentes à polimixina B. As amostras resistentes à polimixina pertenciam às espécies: *E. aerogenes*, *C. freundii* e *K. oxytoca*. Para a confirmação da resistência à polimixina B encontrada através de E-test, utilizamos a microdiluição em caldo, visto que a difusão da polimixina B no ágar é ruim, portanto a qualidade dos resultados poderia ser prejudicada (123). Entretanto, obtivemos a mesma CIM para todas as amostras testadas, nas duas metodologias. Em geral, os valores da CIM determinados a partir de E-test são maiores do que os determinados pela diluição em microplaca (124).

Vários estudos têm mostrado resistência às polimixinas em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Nos EUA em 2005, Bratu e colaboradores (125) encontraram um percentual de resistência à polimixina B de 9% (n= 96) entre as amostras de *K. pneumoniae*. Quatro anos depois, Lee e colaboradores (79) reportaram um percentual de resistência à polimixina B de 25% (n= 12) em amostras de *K. pneumoniae* após tratamento dos pacientes com essa droga. No Brasil, Pereira e colaboradores (110) observaram taxa de

13,9% (23/165) de resistência à polimixina B em amostras isoladas em três estados brasileiros no período de 2008 a 2010.

Em relação a outras espécies de Enterobacteriaceae, Zhang e colaboradores (121), mostraram resistência à polimixina B em 10,8% das 40 amostras produtoras de KPC isoladas em sete hospitais chineses. Outro estudo realizado por Gales e colaboradores (126), associado ao SENTRY, avaliou a susceptibilidade à polimixina B entre bactérias Gram-negativas coletadas em diversos países. Entre as espécies de Enterobacteriaceae (n= 40.923), foi encontrado um percentual de apenas 2% de amostras resistentes a esse antimicrobiano (*C. freundii* – 0,9%, *Klebsiella* spp. – 1,8%, *E. coli* – 0,5%). No entanto, em amostras de *Enterobacter* spp., o percentual foi mais alto (16,7%, n= 4.693).

Todas as amostras de *E. aerogenes* resistentes à polimixina B foram isoladas no DF. Esse fato pode ter relação com a provável grande utilização da polimixina B nos hospitais da região. Como já foi mencionado, em 2010 houve um surto de enterobactérias produtoras de KPC nessa região, atentando para a realização de medidas de contenção da disseminação destas bactérias. É interessante notar que no trabalho realizado por Pereira e colaboradores (110), neste período, foram encontradas 12,8% de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no DF resistentes à polimixina B.

Assim, a detecção de resistência à tigeciclina e polimixina B, drogas utilizadas como opções de tratamento para infecções por bactérias produtoras de carbapenemases do tipo KPC, chama a atenção para a necessidade de uso mais criterioso dessas drogas.

A associação de ESBLs com carbapenemases do tipo KPC tem sido usualmente observada em *K. pneumoniae* (127,128), mas também tem sido reportada entre outras enterobactérias. Li e colaboradores (129) encontraram amostras de *E. coli* e *C. freundii*, na China, que apresentavam o gene *bla*_{KPC-3}, e também possuíam *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{SHV-7} associados.

No nosso trabalho, 53% (n= 44) das amostras apresentaram beta-lactamases associadas. Foram pesquisados os seguintes genes codificadores de beta-lactamases: *bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{CTX-M-like} e especificamente a variante alélica *bla*_{CTX-M-15}. As beta-lactamases mais frequentes foram as do tipo TEM. Através do sequenciamento do gene *bla*_{TEM} foi observada a presença de duas variantes alélicas, *bla*_{TEM-141} e uma variante da TEM-

141, com duas mutações ainda não descritas, e foi chamada de *bla*_{TEM-141-like}. A enzima CTX-M foi a segunda mais encontrada. Foram encontradas 5 variantes alélicas (*bla*_{CTX-M-8, 9, 15, 59 e 97}). A variante alélica mais frequente em *E. aerogenes* foi CTX-M-59 e em *E. cloacae* foi CTX-M-15. A beta-lactamase menos frequente foi SHV, e o sequenciamento do gene *bla*_{SHV} mostrou a presença de 4 variantes alélicas (*bla*_{SHV2a, 63, 120, 165}).

De acordo com o banco de dados “Lahey Studies” (38), a variante SHV-2a é uma ESBL, mas o perfil hidrolítico das outras variantes encontradas em nosso estudo (SHV-63, SHV-120 e SHV-165) não é conhecido. A variante TEM-141 é uma beta-lactamase de espectro restrito, pertencente à classe A de Ambler e grupo funcional 2b de Bush-Jacoby-Medeiros. Já todas as variantes alélicas de CTX-M são ESBLs. Portanto, podemos afirmar que 19 amostras (22,9%) são produtoras de ESBLs associadas à KPC, pois uma das amostras é produtora de CTX-M-9 e SHV-2a.

Hoje, a ESBL mais frequentemente descrita no mundo é a CTX-M, enquanto nas décadas de 1980 e 1990, as enzimas prevalentes eram do tipo SHV e TEM (130). Isto foi constatado por Anastay e colaboradores (131) que realizaram um estudo na França entre 1999 e 2007 e mostraram a mudança do perfil de ESBLs, quando em 1999 a enzima TEM era a mais prevalente, e em 2007 a CTX-M tornou-se a mais prevalente, sendo a CTX-M-15 o subtipo mais encontrado (131). Apesar de enzimas do tipo CTX-M serem as ESBLs mais frequentes em amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* (132), nenhuma das amostras de *E. coli* do nosso trabalho apresentou este tipo de enzima.

Acredita-se que a associação frequente de ESBLs com KPC seja devido a aquisição de plasmídios transferíveis carregando o gene *bla*_{KPC-2} através de amostras endêmicas locais, ou por plasmídios carreadores de genes de ESBL por clones epidêmicos de amostras produtoras de KPC (52). De uma forma ou de outra, sabemos que através dessas estruturas genéticas, os genes de resistência podem se acumular em plasmídios, que quando mobilizados, serão transferidos a outra bactéria levando todos esses determinantes de resistência juntos.

O transposon Tn4401 tem sido descrito como o responsável pela aquisição e disseminação do gene *bla*_{KPC}. Ele consiste em uma transposase (*tnpA*), uma resolvase (*tnpR*), o gene *bla*_{KPC}, dois elementos de inserção (IS), *ISKpn6* e *ISKpn7* e duas sequências repetidas invertidas de 39pb que flanqueiam o transposon (IRR e IRL) (Naas et al., 2008). Até o

momento, já foram descritas seis isoformas do transposon Tn4401 (“a”, “b”, “c”, “d”, “e” e “f”), devido a deleções de diferentes tamanhos na sequência de inserção ISKpn7 (133,134) sendo as isoformas “a”, “b” e “c” as mais comuns (66). A sequência de inserção ISKpn7 sem deleções (Isoforma “b”) tem 703pb; a isoforma “a” tem uma deleção de 99pb nessa região; a isoforma “c” tem uma deleção de 215pb; a isoforma “d” tem uma deleção de 69pb; e a isoforma “e” tem uma deleção de 255pb (133,135).

Kitchel e colaboradores (135) fizeram uma análise *in silico* das isoformas “a” e “d” do transposon, chegando à conclusão que essas deleções representam diferenças no promotor do gene *bla*_{KPC}. Já no caso das isoformas “c” e “e”, a região do promotor foi totalmente deletada, incluindo o sítio de iniciação da transcrição do gene *bla*_{KPC}. Acredita-se que exista outro promotor à frente desta região, que seja responsável pela transcrição do gene *bla*_{KPC} (133). Entretanto, essas duas isoformas estão associadas a fenótipos menos resistentes aos carbapenemas (136).

Um trabalho realizado nos EUA avaliou a isoforma do transposon Tn4401 em amostras de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* produtoras de KPC-2 e KPC-3 provenientes de um hospital em Nova Iorque. A maior parte das amostras tinha a isoforma “a” do transposon, seguida da isoforma “b” (137). Marquez e colaboradores (138) também encontraram predominância da isoforma “a” em amostras de *K. pneumoniae* isoladas no Uruguai. Cuzon e colaboradores (56) encontraram as três isoformas mais comuns do Tn4401 (“a”, “b” e “c”) em amostras de *K. pneumoniae* isoladas em cinco países diferentes (Brasil, Grécia, EUA, Colômbia, Israel e Suécia), sendo que a isoforma “b” foi a mais frequente entre as amostras.

Em nosso estudo, encontramos uma estrutura parcial do transposon Tn4401 em todas as amostras. As três sequências principais do transposon (ISKpn6, ISKpn7 e *tnpA*) só foram encontradas juntas em 31,3% (n= 26) das amostras. A partir do sequenciamento da região ISKpn7 foram encontradas duas isoformas: “b” (sem deleção) e “d” (deleção de 69pb) entre as amostras.

No Brasil, Pereira e colaboradores (61) mostraram que em amostras de *K. pneumoniae* isoladas de diferentes estados brasileiros, o gene *bla*_{KPC-2} encontrava-se associado à isoforma “b” do transposon Tn4401. Assim como Andrade e colaboradores (52), que encontraram predominância da isoforma “b” em amostras de Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *C. freundii*) isoladas no Rio de Janeiro e São Paulo.

A isoforma “d” do transposon Tn4401 foi encontrada nos EUA em amostras de diferentes espécies de Enterobacteriaceae (*K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *E. coli* e *Citrobacter* spp.) produtoras de KPC-3 (139).

Apesar de termos encontrado 53,% das amostras sem deleção no ISKpn7, (sugestivo de isoforma “b”), 26,5% das amostras do presente estudo mostraram-se positivas apenas para as sequências de inserção ISKpn6 e ISKpn7 – sem deleção (Perfil 4). Bryant e colaboradores (134), descreveram a isoforma “f” associada ao gene *bla*_{KPC-4} em *E. cloacae* e *S.marcescens*. Esta isoforma tem sido descrita como não-funcional pois apresenta a região *tnpA* truncada, não tem a região *tnpR* e nem a sequência repetida invertida esquerda do ISKpn7. Entretanto, não apresenta deleções na mesma região do ISKpn7, conforme descrito nas outras isoformas (134). Assim, é possível que as amostras que apresentaram o perfil 4 estejam carregando a isoforma “f” do Tn4401. Entretanto, é necessário sequenciar todo o transposon para a confirmação desta hipótese.

Além destes perfis, também, encontramos amostras positivas apenas para *tnpA* e sequência ISKpn6 (Perfil 2), positivas apenas para a ISKpn6 (Perfil 3) e negativas para todas as regiões do transposon Tn4401 (Perfil 5). Shen e colaboradores (140) encontraram, em Enterobacteriaceae isoladas na China, uma estrutura parcial do transposon Tn4401 associada com um elemento Tn3, que consiste em uma nova sequência de inserção, ISKpn8 e uma região ISKpn6-like, uma transposase e uma resolvase, além de estruturas que caracterizam uma estrutura do tipo Tn3. Essa estrutura genética é caracterizada como uma quimera. Lee e colaboradores (79) descreveram outra isoforma do transposon Tn4401 truncada, na qual há uma deleção de 5,3kb ocasionando a excisão da região ISKpn7 e parte de *tnpA* e do gene *bla*_{KPC}. Assim, é possível que as amostras do nosso estudo que foram negativas para o ISKpn7 (perfis 2, 3 e 5) sejam de outros tipos de Tn4401. Contudo, novamente, é necessário o sequenciamento de todo o transposon para a confirmação desta hipótese.

Dessa forma, diferente do que tem sido descrito na literatura, nossos resultados sugerem uma diversidade do ambiente genético no qual está inserido o gene *bla*_{KPC-2} em amostras de Enterobacteriaceae no Brasil. Essas observações evidenciam a evolução e recombinação contínua de elementos do transposon Tn4401. Contudo, a relevância biológica dessas novas isoformas requer outros estudos para ser elucidada.

Geralmente, transposons e sequências de inserção estão inseridas em plasmídios. De acordo com a estimativa realizada em nosso estudo, pudemos observar o gene *bla*_{KPC-2} em plasmídios em todas as amostras (variando de 3,5 a 60kb). Existem descritas mais de 580 sequências completas de plasmídios identificados em amostras da família Enterobacteriaceae, pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade plasmidial, como IncF, IncR, IncX3, IncHI3, somando mais de 20 grupos diferentes (83,141). Entretanto, alguns grupos são mais frequentemente associados ao gene *bla*_{KPC} (IncFII, IncL/M, IncN, IncA/C) (52,61,83).

Em nosso estudo investigamos a presença dos grupos mais frequentes (IncFII, IncL/M, IncN, IncA/C) e conseguimos identificar o grupo de incompatibilidade plasmidial dos plasmídios carreadores de *bla*_{KPC-2} em 16,9% das amostras (n=14). Encontramos o gene *bla*_{KPC} associado a plasmídios de ~50Kb do grupo IncA/C em 3 amostras (duas de *P. agglomerans* e uma de *E. aerogenes*). Em 4 amostras o gene *bla*_{KPC} foi encontrado em plasmídios de 40 a 50kb do grupo de incompatibilidade IncL/M (2 amostras de *E. coli* e 3 de *E. cloacae*). Entretanto, os plasmídios mais frequentemente encontrados foram de 40kb pertencente ao IncN, em 7 amostras, pertencentes às espécies: *E. coli* (n= 5), *E. cloacae* (n= 1) e *E. aerogenes* (n= 1).

Plasmídios de 40kb pertencentes ao grupo de incompatibilidade IncN também tem sido encontrados em outros estudos com amostras brasileiras. Pereira e colaboradores (61), em um estudo com 113 amostras de *K. pneumoniae* isoladas em diferentes estados brasileiros a presença de plasmídios de 40kb do IncN carreando o gene *bla*_{KPC-2} em 14 amostras. Andrade e colaboradores (52) também mostraram a presença de plasmídios deste tipo em três amostras de Enterobacteriaceae (uma *E. cloacae* e duas *K. pneumoniae*). Isso evidencia uma possível participação deste plasmídio na disseminação de KPC-2 no Brasil. É possível que o plasmídio encontrado em nossas amostras seja igual ao plasmídio encontrado nesses dois estudos, no entanto, são necessários outros estudos para confirmar esta hipótese.

Não foi possível determinar o grupo de incompatibilidade plasmidial da maioria das amostras, pois somente investigamos os grupos de incompatibilidade plasmidial descritos mais frequentemente em enterobactérias: IncN, IncA/C, IncFIIA e IncL/M (52, 56, 142). No entanto, há relatos de amostras nas quais o gene *bla*_{KPC} foi encontrado em plasmídios de outros grupos de incompatibilidade. Chen e colaboradores (143) encontraram plasmídios do IncX carreando KPC-5 em *K. pneumoniae* isoladas nos EUA. Almeida e colaboradores (72)

encontraram plasmídios do IncW carreando KPC-2 em *K. oxytoca* isoladas no Brasil. Também no Brasil, foram descritas amostras de *S. marcescens* nas quais o gene *bla*_{KPC-2} estava inserido em plasmídios do IncK (144).

Dessa forma, pudemos evidenciar a presença de plasmídios de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade plasmidial em nossas amostras, de forma condizente com a literatura (56). Por conta destes mecanismos de disseminação, a produção de carbapenemase do tipo KPC tornou-se um problema de saúde pública não só no Brasil, como também no mundo.

No entanto, além da participação do transposon Tn4401 na disseminação de KPC associado a diferentes plasmídios, tem sido descrita a participação de clones epidêmicos associados ao gene. Por isso, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras produtoras de KPC, através de métodos de tipagem molecular com alto poder discriminatório, como o PFGE e o MLST fazem-se necessários (145).

Em relação à *K. pneumoniae*, existe um clone epidêmico mundialmente descrito, identificado como pertencente ao ST258 através da técnica de MLST. Um estudo publicado por Kitchel e colaboradores (66) mostrou que 70% das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC oriundas de 16 estados americanos no período de 1996 a 2008 pertenciam ao ST258. Esse mesmo clone já foi reportado em Israel (87), Noruega, Suécia (88), Polônia (89), Finlândia (90) e Itália (91). No Brasil também foi descrita a disseminação de dois clones de *K. pneumoniae* (ST437 e ST11) relacionadas ao ST258 (61).

Em relação às outras espécies de enterobactérias, ainda não existem estudos mostrando a presença de clones prevalentes associados à produção de KPC. Contudo, são poucos os relatos nestas outras espécies (69,70,71,72,144).

No presente estudo, através de PFGE das espécies que apresentaram mais de uma amostra, foi encontrada uma grande diversidade clonal, sem prevalência de nenhum clone em *E. coli*, *E. cloacae*, *C. freundii* e *K. oxytoca*. Estes achados corroboram com o descrito por Castanheira (113), onde foi observada grande diversidade clonal entre as amostras de *E. coli* e *E. cloacae* KPC-positivas isoladas dos EUA, Turquia, Espanha e Itália. Carvalho-Assef e colaboradores (70), também observaram que as quatro amostras de *E. coli* KPC-positivas isoladas de um mesmo hospital no Rio de Janeiro, não eram relacionadas geneticamente.

No entanto, em relação à *P. stuartii*, *P. agglomerans* e *E. aerogenes*, foram encontrados grupos clonais prevalentes. Todas as amostras de *P. stuartii* foram isoladas em Minas Gerais e apresentaram o mesmo perfil de fragmentação do DNA. As amostras de *P. agglomerans* foram isoladas no Rio de Janeiro e pertenciam a dois grupos clonais diferentes, sendo o grupo clonal PaA encontrado em 75% das amostras. Para *E. aerogenes*, foi encontrado um grupo clonal mais frequente em Pernambuco e outro no Distrito Federal e Goiás. Cabe ressaltar que a maioria das amostras de *E. aerogenes* do Distrito Federal pertencia ao grupo clonal A e foram isoladas entre 2010 e 2011, demonstrando a persistência do clone por 11 meses. Além disso, a maioria das amostras resistentes à polimixina B do estudo pertencia a esse grupo clonal. Este é um fato preocupante, pois pode indicar a adaptação deste clone e possível disseminação para outras regiões.

Assim, os resultados obtidos para estas espécies sugerem a presença de possíveis surtos com a disseminação clonal nas regiões de isolamento. Contudo, não podemos afirmar a ocorrência destes surtos, pois as amostras do nosso estudo foram enviadas pelos LACENs de diferentes estados, e muitas vezes não temos acesso a todas as informações relacionadas a essas amostras, como o hospital de origem e a ala do hospital onde as amostras foram isoladas.

Assim, através da tipagem molecular por PFGE, pudemos observar que apesar de haver certa dispersão clonal de algumas espécies em alguns estados, por enquanto ainda não é observado um clone prevalente responsável pela disseminação da KPC em outras espécies de Enterobacteriaceae não-*K. pneumoniae* no Brasil.

A tipagem molecular por “Multilocus sequence typing” (MLST), baseada na análise de sequências de genes conservados, gera resultados que podem ser comparados em nível mundial, pois não depende de critérios interpretativos, como na técnica de “fingerprinting” por PFGE, na qual são observados padrões de banda no gel gerados após o tratamento do DNA com enzimas de restrição. Assim, a metodologia de MLST se apresenta mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de amostras distantes geograficamente. Além disso, o MLST é bastante utilizado para estudos evolutivos e comparativos, devido à amplificação de genes conservados (145). No entanto, esta metodologia não está disponível para todas as espécies. Por essa razão, somente realizamos a tipagem por MLST das amostras de *E. coli*.

Existem dois principais esquemas de MLST para *E. coli*: um é o do Instituto Pasteur (IP) (103) e o outro é o da Universidade de Warwick (UoW) (104). Ambos baseiam-se na análise de genes conservados, no entanto, os esquemas analisam genes diferentes. Com isso, a classificação dos STs utilizando ambos os esquemas gera resultados não equivalentes.

Em nosso estudo realizamos os dois esquemas de MLST com o objetivo de avaliar a concordância entre os dois esquemas. No esquema do Instituto Pasteur, foi visto que as amostras pertenciam a nove STs diferentes, sendo quatro STs novos, pois duas amostras apresentaram alelos novos dos genes *dinB* e *icdA*, respectivamente (ST629 e ST630), e duas amostras apresentaram dois perfis de alelos diferentes (ST631 e ST632). Estes STs novos foram depositados no banco de dados do Instituto Pasteur (103).

Correlacionando com os resultados obtidos com o PFGE, foi observada, em nosso estudo, a presença de diferentes grupos clonais através de PFGE com o mesmo ST, como por exemplo, os clones EcE, EcK e EcL que pertenciam ao ST2 e os clones EcG e EcH que pertenciam ao ST43.

Pelo esquema da UoW, foram encontrados 10 STs diferentes. Obtivemos um novo ST a partir de um alelo novo para o gene *mdh* (ST4353) e três novos perfis de combinação de alelos gerando três novos STs (ST4351, ST4352 e ST4354). Em três amostras, não foi possível determinar o ST. Os alelos novos foram depositados no banco de dados da UoW (104).

Através do esquema da UoW, correlacionando os resultados obtidos com o PFGE, foi observado que quase todas as amostras que obtivemos resultado pertenciam a pulsotipos diferentes e STs diferentes, exceto duas amostras pertencentes ao ST167 por MLST, que pertenciam a dois pulsotipos diferentes por PFGE.

Ma e colaboradores (146) encontraram uma grande diversidade clonal através de PFGE para amostras de *E. coli* produtoras de KPC-2 e NDM-1 isoladas em Taiwan. Através do esquema da UoW, o ST131 foi encontrado em 23 amostras, correspondendo a pulsotipos completamente diferentes entre si. O mesmo foi observado por Yano e colaboradores (147) em amostras de *E. coli* produtoras de ESBL. Também foram encontradas amostras pertencentes a clones diferentes por PFGE pertencentes ao mesmo ST através da técnica de MLST.

Matsumura e colaboradores (148) realizaram MLST através dos dois esquemas em 581 amostras de *E. coli* isoladas no Japão e observaram que algumas amostras pertencentes ao ST131 pelo esquema da UoW pertenciam ao ST43 pelo esquema do Instituto Pasteur. Outras amostras do ST131 eram pertencentes a novos STs do Instituto Pasteur geneticamente relacionados ao ST43. Em nosso trabalho também encontramos uma amostra pertencente ao ST43 do Pasteur e ST131 da UoW, no entanto, outra amostra encontrada pertencente ao ST43 pelo esquema do Pasteur diferiu em um alelo do gene *fumC*, gerando um novo ST pelo esquema UoW (ST4354). Portanto, nossos resultados estão condizentes com a literatura.

Este ST131 de *E. coli* tem sido descrito na literatura como uma linhagem virulenta devido ao fato de ser derivada do grupo filogenético B2 (grupo no qual foi descrita a presença de determinantes de virulência, como: adesinas e fímbria, capa de polissacarídeos, toxinas, sideróforos e invasinas) e associada à disseminação mundial da ESBL CTX-M-15 (149,150). Além disso, o gene *bla*_{CTX-M-15} está associado a elementos de transposição e plasmídios que contém outros genes de resistência, fazendo assim com que esse ST tenha altos níveis de resistência a diferentes classes de antimicrobianos: beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfonamidas (150).

Karasic e colaboradores (150) descrevem a ausência de enzimas do tipo CTX-M em amostras de *E. coli* pertencentes ao grupo filogenético B2 isoladas no Reino Unido, mas não deixa claro que elas sejam pertencentes ao ST131 (150). Apesar de termos encontrado uma amostra pertencente ao ST131, ela não apresentou nenhum gene codificador de cefotaximases. No entanto, isso mostra que esse ST está em circulação no Brasil e que pode vir a adquirir a CTX-M-15.

Um fator que contribui significativamente para a dispersão de micro-organismos multirresistentes a nível mundial é a globalização. As pessoas têm se movimentado mais, seja pela ocorrência de guerras e conflitos em seus países (refugiados), a trabalho, turismo ou qualquer outra razão. As viagens (e hospitalizações) internacionais são fatores importantes para a aquisição e dispersão de Enterobacteriaceae multirresistentes, especialmente quando as pessoas visitam locais endêmicos para essas infecções (46). Portanto, é necessário implementar medidas de controle e entender melhor de que forma está ocorrendo a dispersão de genes de resistência, para assim, poder evitá-la.

Através deste estudo, pudemos evidenciar as diversas ferramentas moleculares que o gene *bla*_{KPC-2} se beneficia para se disseminar de forma muito eficiente entre espécies de Enterobacteriaceae, como sua presença em plasmídios e transposons, além de estar, muitas vezes, sendo carregado com outros determinantes de resistência e levando à ocorrência de amostras multirresistentes no ambiente hospitalar. Portanto, a adoção de medidas para a contenção desses patógenos (o que inclui o controle dos antimicrobianos utilizados nos hospitais) faz-se extremamente necessária.

6. Conclusões

Observamos a presença do gene *bla*_{KPC-2} em nove diferentes espécies de Enterobacteriaceae (*E. aerogenes*, *E. cloacae*, *E. coli*, *P. agglomerans*, *P. stuartii*, *K. oxytoca*, *M. morgannii*, *S. marcescens* e *C. freundii*) em oito estados brasileiros (CE, PE, AL, BA, RJ, ES, MG, GO) e Distrito Federal, fato que ainda não havia sido documentado. Cabe ressaltar que em duas espécies esse gene ainda não havia sido relatado: *P. stuartii* e *P. agglomerans*.

Doze amostras (16,5%) se apresentaram resistentes à polimixina B (*E. aerogenes*, *K. oxytoca* e *C. freundii*), uma das últimas opções de tratamento para infecções bacterianas resistentes aos carbapenema. A maioria das amostras resistentes pertencia a um mesmo clone de *E. aerogenes* isolado no DF.

Encontramos associação do gene *bla*_{KPC-2} com outros genes de beta-lactamases em 45,8% das amostras. ESBLs do tipo CTX-M foram encontradas em 26,5% das amostras e a variante alélica CTX-M-15 em 36,4% das produtoras de CTX-M.

Encontramos o gene *bla*_{KPC-2} associado ao transposon Tn4401 inserido em plasmídios de diferentes tamanhos e grupos de incompatibilidade plasmidial. A isoforma do Tn4401 mais frequente foi “b”, mas também encontramos amostras com a isoforma “d” (a qual ainda não há descrições no Brasil) e outras possíveis isoformas do Tn4401.

Observamos grande diversidade genética entre todas as espécies estudadas, através de PFGE, mas encontramos a presença de alguns grupos clonais mais prevalentes em alguns estados para algumas espécies, sugerindo a presença de surtos nestes locais.

Através de análise por MLST para as amostras de *E. coli*, encontramos 2 novos STs através do esquema realizado pelo IP e 4 novos STs através do esquema da UoW. Além disso, detectamos uma amostra pertencente ao ST131 (clone muito virulento, responsável pela disseminação de CTX-M-15 a nível mundial). Apesar desta amostra não ter apresentado nenhum gene codificador de cefotaximases, este achado alerta que este ST está em circulação no Brasil e que pode vir a adquirir a CTX-M-15.

Devido ao nosso estudo ter incluído amostras de diferentes espécies isoladas de diferentes estados brasileiros, acreditamos que o gene *bla*_{KPC-2} esteja se disseminando através do transposon Tn4401, mas não evidenciamos nenhum clone prevalente entre as espécies e

nem um plasmídio específico, demonstrando o enorme poder de dispersão desse gene entre espécies através de diferentes artifícios moleculares.

7. Referências

1. Chroma M, Kolar M. Genetic methods for detection of antibiotic resistance: focus on extended-spectrum β -lactamases. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2010 Dec;154(4):289-96.
2. Hawkey PM, Jones AM. The changing epidemiology of resistance. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Sep;64 Suppl 1:i3-10.
3. Livermore DM. Bacterial resistance: origins, epidemiology, and impact. *Clin Infect Dis.* 2003 Jan 15;36(Suppl 1):S11-23.
4. Sader HS, Gales AC, Pfaller MA, Mendes RE, Zoccoli C, Barth A, Jones RN. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz J Infect Dis.* 2001 Aug;5(4):200-14. Epub 2003 Mar 7.
5. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Oct;18(4):657-86.
6. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Jul;20(3):440-58,
7. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico microbiológico.* 5ed. Rio de Janeiro: Medisi; 2001.
8. Euzéby, JP. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: family Enterobacteriaceae. [Internet]. [Acesso em: 2014 abr 08]. Disponível em: <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterobacteriaceae.html>
9. Brooks GF, Carroll KC, Butel JS, Morse SA, Mietzner TA. *Microbiologia Médica.* 25. ed., São Paulo: Artmed, 2012.
10. Tille PM. *Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology.* 13ed. Missouri: Elsevier; 2014.
11. JJ Farmer III, KD Boatwright e J Michael Janda. Enterobacteriaceae: Introduction and Identification. Murray, PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Manual of Clinical*

Microbiology. 9 ed, Washington (USA); Ed.American Society for Microbiology (ASM); 2007.

12. Cantón R, Loza E, Aznar J, Calvo J, Cercenado E, Cisterna R, Romo FG, Hontangas JL, Calvo CR, Barrenechea AI, Tubau F, Weber I, Yuste P, Cavanillas R; SMART-Spain Working Group. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms from intraabdominal infections and evolution of isolates with extended spectrum β -lactamases in the SMART study in Spain (2002-2010). *Rev Esp Quimioter*. 2011 Dec;24(4):223-32.
13. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1413-8.
14. Zhanel GG, DeCorby M, Adam H, Mulvey MR, McCracken M, Lagacé-Wiens P, Nichol KA, Wierzbowski A, Baudry PJ, Tabor F, Karlowsky JA, Walkty A, Schweizer F, Johnson J; Canadian Antimicrobial Resistance Alliance, Hoban DJ. Prevalence of antimicrobial-resistant pathogens in Canadian hospitals: results of the Canadian Ward Surveillance Study (CANWARD 2008). *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Nov;54(11):4684-93.
15. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2012 Aug;73(4):354-60.
16. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. Nota técnica No 01/2013 [Internet]. Brasília, DF; [Acesso em 25 mai 2014]. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word++NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013%281%29.pdf?MOD=AJPERES>

17. Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S; National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2013 Jan;34(1):1-14.
18. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano IV Edição nº 7 de 10 de março de 2014. [Internet]. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/f36b2d004380ce7fba2afadb8dfacc6d/Seguran%C3%A7a+e+qualidade+em+servi%C3%A7os+e+sa%C3%BAde+n7.pdf?MOD=AJPERES>.
19. A. Stewardson, A. Allignol, S. Harbarth¹, On behalf of the TIMBER study group, Infection Control Program, University of Geneva Hospitals, Geneva, Switzerland ; Institute of Statistics, University of Ulm, Ulm, Germany 24th “European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases”, 2014; Barcelona [Internet]. The burden of bloodstream infections caused by multiresistant bacteria in european hospitals: a multicentre retrospective cohort study. Disponível em:

https://www.escmid.org/escmid_library/online_lecture_library/material/?mid=12106.
20. OMS - Organização Mundial da Saúde. Antimicrobial resistance: Global Report on Surveillance. 2014. [Internet]. Disponível em:
<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>.
21. 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.
22. Kollef MH, Sherman G, Ward S, Fraser VJ. Inadequate Antimicrobial Treatment of Infections: A Risk Factor for Hospital Mortality Among Critically Ill Patients. *Chest* 1999 Feb;115(2):462-74.

23. Cooksey, RC. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. Principles of Medical Biology, Volume 9 A Microbiology, pages 199-214. 1997.
24. Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. Am J Infect Control. 2006 Jun;34(5 Suppl 1):S3-10;
25. Džidić S, Šušković J, Kos B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. Food Technol Biotechnol. 2008;46(1):11–21.
26. Drawz SM, Bonomo RA. Three decades of beta-lactamase inhibitors. Clin Microbiol Rev. 2010 Jan;23(1):160-201.
27. Nordmann P, Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. J Antimicrob Chemother. 2013 Mar;68(3):487-9.
28. Livermore DM, Brown DF. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. J Antimicrob Chemother. 2001 Jul;48 Suppl 1:59-64.
29. Nikaido H, Pagès JM. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. FEMS Microbiol Rev. 2012 Mar;36(2):340-63.
30. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 1980 May 16;289(1036):321-31.
31. Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev. 2001 Oct;14(4):933-51
32. Cooksey, RC. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. Principles of Medical Biology, Volume 9 A Microbiology, pages 199-214. 1997.
33. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. Clin Microbiol Rev. 2009 Jan;22(1):161-82
34. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Mar;54(3):969-76.

35. Bush K, Fisher JF. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:455-78.
36. Bonnet R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Jan;48(1):1-14.
37. Livermore DM¹, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from bacteraemias in the UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov;62 Suppl 2:ii41-54.
38. Jacoby GA. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes [Internet]. Massachusetts: Lahey Clinic, 2014 [Data da última atualização: 4 jun 2014; acesso em 15 mai 2014]. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies/>
39. Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct;9(5):466-75.
40. Peirano G, van der Bij AK, Freeman JL, Poirel L, Nordmann P, Costello M, Tchesnokova VL, Pitout JD. The characteristics of *Escherichia coli* ST131 that produce extended-spectrum β -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Apr 21. [Epub ahead of print]
41. Pittalis S, Ferarro F, Puro V. NDM-1: Il superbug? *Infez Med.* 2011 Dec;19(4):224-34.
42. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TP, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2956-7
43. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Tavares CP, Chagas TP, Marques EA, Timm LN, Da Silva RC, Falci DR, Asensi MD. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and *qnrB4-producing Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014 Apr;58(4):2475-6.

44. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22.
45. Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, Verbruggen AM, Deplano A, Denis O, Bogaerts P. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents*. 2012 Feb;39(2):168-72.
46. van der Bij AK, Pitout JD. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Sep;67(9):2090-100.
47. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr;45(4):1151-61.
48. Yigit H, Queenan AM, Rasheed JK, Biddle JW, Domenech-Sanchez A, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003 Dec;47(12):3881-9.
49. Erratum in *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):809.
50. 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.
51. 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.

52. 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.
53. 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.
54. Villegas MV1, 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.
55. Wei ZQ1, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Feb;51(2):763-5.
56. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase bla_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis.* 2010 Sep;16(9):1349-56.
57. 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.
58. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb;63(2):265-8.
59. 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.

60. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 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
61. Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). J Antimicrob Chemother. 2013 Feb;68(2):312-6.
62. Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari AC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the *bla(kpc)* gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 Jan-Feb;46(1):114-5.
63. Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. Braz J Infect Dis. 2012 Nov-Dec;16(6):577-80.
64. Cabral AB, Melo Rde C, Maciel MA, Lopes AC. Multidrug resistance genes, including *bla(KPC)* and *bla(CTX)-M-2*, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2012 Oct;45(5):572-8.
65. 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.
66. 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.
67. Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP; Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa*

- isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Apr;51(4):1553-5.
68. 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.
69. 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.
70. 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.
71. Del Peloso PF, Barros MFL, Santos FA. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. *J Bras Patol Med Lab.* 2010; 46: 365-367.
72. Almeida AC, Cavalcanti FL, Martins WM, Vilela MA, Gales AC, Morais Junior MA, Morais MM. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Aug;57(8):4077-8.
73. Almeida AC, Vilela MA, Cavalcanti FL, Martins WM, Morais MA Jr, Morais MM. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Apr;56(4):2205-6.
74. Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4990.
75. Chagas TP, 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.
76. Picão RC, Cardoso JP, Campana EH, Nicoletti AG, Petrolini FV, Assis DM, Juliano L, Gales AC. The route of antimicrobial resistance from the hospital effluent to the

environment: focus on the occurrence of KPC-producing *Aeromonas* spp. and Enterobacteriaceae in sewage. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 May;76(1):80-5.

77. Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, Matté MH, Mamizuka EM, Sato MI, Pestana de Castro AF, Lincopan N. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban rivers. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Mar;69(3):849-52.
78. Antoniadou A, Kontopidou F, Poulakou G, Koratzanis E, Galani I, Papadomichelakis E, Kopterides P, Souli M, Armaganidis A, Giamarellou H. *J Antimicrob Chemother*. 2007 Apr;59(4):786-90.
79. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol*. 2009 May;47(5):1611-2.
80. 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.
81. Cole JM, Schuetz AN, Hill CE, Nolte FS. Development and evaluation of a real-time PCR assay for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47(2):322-6.
82. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Apr;52(4):1257-63.
83. Carattoli A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Jun;53(6):2227-38.
84. Carattoli A. Plasmids in Gram negatives: molecular typing of resistance plasmids. *Int J Med Microbiol*. 2011 Dec;301(8):654-8.

85. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov;55(11):5370-3.
86. Dworkin M, Falkow S, Rosenberg E, Schleifer KH, Stackebrandt E. *The prokaryotes: Ecophysiology and biochemistry.* 3ed. New York, USA: Springer; 2006.
87. 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.
88. 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.
89. 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.
90. 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).
91. 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.
92. Caetano-Anolles G, Gresshoff PM. *DNA markers: protocols, applications and overviews.* New York, NY: J. Wiley and Sons. p.151-171, 1997.
93. 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.

94. Mendonça N, Leitão J, Manageiro V, Ferreira E, Caniça M. Spread of extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-producing *Escherichia coli* clinical isolates in community and nosocomial environments in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007 Jun;51(6):1946-55.
95. 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.
96. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol.* 1966 Apr;45(4):493-6.
97. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S23 CLSI, Wayne, PA, 2013.
98. Kado CI, Liu ST. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol.* 1981 Mar;145(3):1365-73.
99. 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.
100. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual.* 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001
101. 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.
102. Seki LM. Caracterização de genes de resistência aos beta-lactâmicos e polimorfismo genético em cepas da família Enterobacteriaceae isoladas de hemocultura em hospitais do Rio de Janeiro [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2012.

103. Brisse S, Erick Denamur's team. [Internet]. Paris: Institute Pasteur; 2014 [acesso em 03 abr 2014].
- Disponível em: <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>
104. Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L.H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H., and Achtman M. 2006. Sex and virulence in *Escherichia coli*: an evolutionary perspective. *Mol.Microbiol.* 60(5), 1136-1151.
105. Gupta N1, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis.* 2011 Jul 1;53(1):60-7.
106. Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Miriagou V, Naas T, Rossolini GM, Samuelsen Ø, Seifert H, Woodford N, Nordmann P; European Network on Carbapenemases. Rapid evolution and spread of carbapenemases among Enterobacteriaceae in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2012 May;18(5):413-31.
107. Andrade LN, Vitali L, Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Martinez R, Costa Darini AL. Expansion and Evolution of a Virulent, Extensively Drug-Resistant (Polymyxin B-Resistant), QnrS1-, CTX-M-2- and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 International High-risk Clone. *J Clin Microbiol.* 2014 May 7. [Epub ahead of print].
108. Ribeiro VB1, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, Barth AL. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2013 Nov;62(Pt 11):1721-7.
109. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents.* 2010 Nov;36 Suppl 3:S8-14.
110. Polyana PS. Caracterização molecular de *Klebsiella pneumoniae* multirresistentes produtoras de carbapenemase do tipo KPC isoladas em diferentes regiões do Brasil [tese]. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz; 2012.

111. Portal G1. Bactéria super-resistente já matou 18 pessoas no Distrito Federal. O globo. 2010 out 7. [acesso em 15 abr 2014]. Disponível em:
<http://g1.globo.com/brasil/noticia/2010/10/bacteria-super-resistente-ja-matou-18-pessoas-no-distrito-federal.html>
112. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC Nº 20, de 5 de maio de 2011 Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. [Internet] 2011. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/Documentos2012/RDC%2020%202011.pdf?jornal=1&pagina=174&data=01/07/2010>
113. 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.
114. 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.
115. 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.
116. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S20 CLSI, Wayne, PA, 2011.
117. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 1.3 2011-01-05, Enterobacteriaceae; 2011.

118. Zavascki AP, Bulitta JB, Landersdorfer CB. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2013 Dec;11(12):1333-53.
119. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, Spanu T, Ambretti S, Ginocchio F, Cristini F, Losito AR, Tedeschi S, Cauda R, Bassetti M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012 Oct;55(7):943-50.
120. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? *Clin Microbiol Infect*. 2011 Aug;17(8):1135-41.
121. Zhang R, Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Lv HX, Hu QF, Chen GX. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. *J Med Microbiol*. 2011 Jul;60(Pt 7):977-82.
122. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents*. 2011 May;37(5):415-9.
123. Jones RN, Anderegg TR, Swenson JM; Quality Control Working Group. Quality control guidelines for testing gram-negative control strains with polymyxin B and colistin (polymyxin E) by standardized methods. *J Clin Microbiol*. 2005 Feb;43(2):925-7.
124. Girardello R, Bispo PJ, Yamanaka TM, Gales AC. Cation concentration variability of four distinct Mueller-Hinton agar brands influences polymyxin B susceptibility results. *J Clin Microbiol*. 2012 Jul;50(7):2414-8.
125. 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.

126. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 2006 Apr;12(4):315-21.
127. 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.
128. Kassis-Chikhani N, Decré D, Ichai P, Sengelin C, Geneste D, Mihaila L, Dussaix E, Arlet G. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Jul;65(7):1539-40.
129. Li G, Wei Q, Wang Y, Du X, Zhao Y, Jiang X. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2011 Apr;30(4):575-80.
130. Carrère A, Nordmann P. CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*: a change in the epidemiology of ESBL. *Pathol Biol (Paris).* 2011 Dec;59(6):e133-5.
131. Anastay M1, Lagier E, Blanc V, Chardon H. [Epidemiology of extended spectrum beta-lactamases (ESBL) Enterobacteriaceae in a General Hospital, South of France, 1999-2007]. *Pathol Biol (Paris).* 2013 Apr;61(2):38-43.
132. Livermore DM, Canton R, Gniadkowski M, Nordmann P, Rossolini GM, Arlet G, Ayala J, Coque TM, Kern-Zdanowicz I, Luzzaro F, Poirel L, Woodford N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J Antimicrob Chemother.* 2007 Feb;59(2):165-74.
133. Naas T, Cuzon G, Truong HV, Nordmann P. Role of *ISKpn7* and deletions in *bla_{KPC}* gene expression. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep;56(9):4753-9.
134. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, Hinrichs SH, Rupp ME, Fey PD. KPC-4 Is encoded within a truncated *Tn4401* in

- an IncL/M plasmid, pNE1280, isolated from *Enterobacter cloacae* and *Serratia marcescens*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013 Jan;57(1):37-41.
135. 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.
136. Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial excision of *bla*_{KPC} from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Mar;56(3):1635-8.
137. Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*_{KPC} carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 May;53(5):1998-2004.
138. Marquez C, Ingold A, Echeverría N, Acevedo A, Vignoli R, García-Fulgueiras V, Viroga J, Gonzalez O, Odizzio V, Etulain K, Nuñez E, Albornoz H, Borthagaray G, Galiana A. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Uruguay: infection control and molecular characterization. *NMNI*. 2014 May; DOI: 10.1002/nmi2.40
139. Chen L, Chavda KD, Melano RG, Hong T, Rojzman AD, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Molecular survey of the dissemination of two *bla*_{KPC}-harboring IncFIA plasmids in New Jersey and New York hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014 Apr;58(4):2289-94.
140. 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.
141. Carattoli A. Plasmids and the spread of resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013 Aug;303(6-7):298-304.

142. Tzouveleakis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* 2012 Oct;25(4):682-707.
143. Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Complete nucleotide sequences of *bla*_{KPC-4} and *bla*_{KPC-5}-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013 Jan;57(1):269-76.
144. da Costa Guimarães AC, Almeida AC, Nicoletti AG, Vilela MA, Gales AC, de Moraes MM. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing blaKPC-2. *Int J Antimicrob Agents.* 2013 Oct;42(4):369-70.
145. 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.
146. Ma L, Siu LK, Lin JC, Wu TL, Fung CP, Wang JT, Lu PL1, Chuang YC. Updated molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Escherichia coli* in Taiwan: first identification of KPC-2 or NDM-1-producing *E. coli* in Taiwan. *BMC Infect Dis.* 2013 Dec 20;13:599.
147. Yano H, Uemura M, Endo S, Kanamori H, Inomata S, Kakuta R, Ichimura S, Ogawa M, Shimojima M, Ishibashi N, Aoyagi T, Hatta M, Gu Y, Yamada M, Tokuda K, Kunishima H, Kitagawa M, Hirakata Y, Kaku M. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates from *Escherichia coli* at a Japanese tertiary hospital. *PLoS One.* 2013 May 15;8(5):e64359.
148. Matsumura Y, Yamamoto M, Nagao M, Hotta G, Matsushima A, Ito Y, Takakura S, Ichiyama S; Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study Group. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Japan. *J Antimicrob Chemother.* 2012 Nov;67(11):2612-20.

149. Clermont O, Lavollay M, Vimont S, Deschamps C, Forestier C, Branger C, Denamur E, Arlet G. The CTX-M-15-producing *Escherichia coli* diffusing clone belongs to a highly virulent B2 phylogenetic subgroup. *J Antimicrob Chemother.* 2008 May;61(5):1024-8.
150. Karisik E, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Virulence factors in *Escherichia coli* with CTX-M-15 and other extended-spectrum beta-lactamases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jan;61(1):54-8.

8. Informações complementares

Para auxiliar na compreensão dos resultados, disponibilizamos tabelas divididas por espécies de Enterobacteriaceae com todas as informações encontradas para cada amostra incluída no estudo.

<i>E. aerogenes</i>																					
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão										E-test						Perfil transposon	Plasmídeo	PFGE
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH5663	Urina	GO	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 3	28 kb, 25 kb, 16 kb, 13 kb	EaA
CCBH5987	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 3	30 kb, 15 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH6193	Secreção traqueal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	R	R	R	Perfil 3	40 kb, 30 kb, 15 kb, 10 kb	EaA
CCBH6194	Secreção traqueal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 3	30 kb, 15 kb, 10 kb	EaA
CCBH6211	Lavado brônquico	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 1b	40 kb	EaA
CCBH6324	Secreção traqueal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	R	R	R	Perfil 3	30 kb, 15 kb, 10 kb	EaA
CCBH6458	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	I	R	R	R	Perfil 4	30 kb, 15 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH6459	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 4	30 kb, 10 kb, 6 kb	EaA
CCBH6460	Escara	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	R	R	R	R	Perfil 4	30 kb, 10 kb, 6 kb	EaA
CCBH6461	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	I	S	I	R	R	R	Perfil 4	30 kb, 10 kb, 6 kb	EaA
CCBH6464	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 4	30 kb, 10 kb, 6 kb	EaA
CCBH6503	Swab de pele	GO	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 4	50 kb	EaA
CCBH6529	Urina	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	Perfil 3	45 kb, 35 kb, 20 kb, 10 kb	EaG

CCBH6647	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	Perfil 1b	40 kb	EaA
CCBH6705	Escara	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	I	Perfil 4	50 kb, 15 kb	EaA
CCBH6709	Secreção traqueal	DF	R	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	Perfil 3	15 kb, 10 kb	EaD
CCBH6710	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	S	R	I	R	Perfil 4	20 kb, 11 kb, 6 kb	EaB
CCBH6711	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	R	Perfil 1d	45 kb	EaC
CCBH6981	Urina	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	Perfil 2	45 kb, 25 kb, 15 kb, 9 kb, 5 kb	EaF
CCBH7040	Swab retal	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	I	R	Perfil 5	25 kb, 10 kb	EaF
CCBH7044	Urina	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	R	R	Perfil 2	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaF
CCBH7046	Secreção traqueal	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	R	R	R	R	Perfil 3	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaF
CCBH7067	Líquido abdominal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb	EaA
CCBH7068	Escarro	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	S	R	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH7099	Ponta de cateter	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	I	R	S	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH7171	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH7179	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	I	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaA
CCBH7275	ND	CE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 2	40 kb	EaH
CCBH7352	Urina	PE	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	Perfil 3	30 kb, 15 kb, 10 kb	EaG
CCBH7356	ND	PE	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	I	I	Perfil 2	25 kb, 10 kb, 5 kb	EaF
CCBH7358	Swab retal	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	S	S	R	R	R	Perfil 2	30 kb, 15 kb, 10 kb	EaF
CCBH7376	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	S	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA

CCBH7382	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA
CCBH7386	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	I	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA
CCBH7387	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA
CCBH7388	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA
CCBH7389	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R	R	Perfil 4	5 kb	EaA
CCBH7393	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	40 kb	EaI

<i>E. cloacae</i>																						
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	PFGE	
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM				
CCBH5657	Ponta de cateter	GO	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 3	36 kb	EclA
CCBH6307	Swab retal	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	50 kb	EclB
CCBH6349	Urina	CE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	R	R	Perfil 3	50 kb, 8 kb	EclC
CCBH6357	Urina	CE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	Perfil 3	16 kb, 6 kb	EclC
CCBH6506	Sangue	GO	R	R	R	I	R	R	R	R	S	I	R	R	S	S	R	R	R	Perfil 3	40 kb	EclD
CCBH6514	Urina	GO	R	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	I	S	I	R	R	R	Perfil 3	40 kb	EclE
CCBH6714	Líquor	DF	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 4	25 kb	EclF
CCBH6732	Secreção ferida	MG	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	R	S	S	R	I	R	Perfil 1b	40 kb	EcM
CCBH6832	ND	RJ	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	R	Perfil 1b	40 kb	EclG
CCBH6930	Swab nasal	ES	I	R	I	R	R	R	R	R	R	I	R	S	S	S	S	S	S	Perfil 1b	40 kb	EclO
CCBH6940	Fragmento ósseo	ES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	50 kb	EclH
CCBH7063	Swab retal	DF	R	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	46 kb	EclI
CCBH7298	ND	CE	R	R	I	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	Perfil 3	50 kb, 20 kb, 8 kb, 3,5 kb	EclJ
CCBH7424	Secreção óssea	ES	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 1b	46 kb	EclK

CCBH7427	Swab de queimadura	ES	R	R	I	R	R	R	R	R	S	I	I	S	S	R	I	R	Perfil 1b	40 kb	EclL
CCBH7460	Aspirado traqueal	RJ	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	I	S	S	R	R	R	Perfil 1b	46 kb	EclM
CCBH7534	Swab retal	ES	R	R	R	R	R	R	R	R	I	R	R	S	S	R	R	R	Perfil 1b	46 kb	EclN

<i>E. coli</i>																								
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão										E-test					Perfil transposon	Plasmí-dio	PFGE	MLST-IP	MLST-UoW		
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM						IPM	
CCBH 5146	Secreção ferida	RJ	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	40 kb	EcA	629	167
CCBH 5147	Urina	RJ	R	I	R	R	R	R	R	R	I	S	R	S	S	R	R	I	Perfil 1b	40 kb	EcB	630	4353	
CCBH 5153	Sangue	RJ	R	S	I	S	R	R	R	R	I	R	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	50 kb	EcC	631	ND	
CCBH 5159	ND	RJ	R	I	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	S	R	R	Perfil 1b	60 kb	EcD	479	224	
CCBH 5755	Secreção ferida	MG	R	S	I	S	R	I	R	R	R	R	I	S	S	S	S	R	Perfil 2	6 kb, 11 kb	EcE	2	167	
CCBH 5774	Urina	DF	R	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	Perfil 1b	36 kb	EcF	305	57	
CCBH 5775	Ponta de cateter	DF	R	S	S	S	I	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S	R	Perfil 1b	36 kb	EcF	305	ND	
CCBH 5888	Swab retal	RJ	R	I	I	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	S	I	Perfil 1b	50 kb	EcL	2	4352	
CCBH 6724	Swab retal	MG	R	R	I	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	S	I	Perfil 2	20 kb, 11 kb, 6 kb	EcG	43	131	
CCBH 7043	Urina	PE	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	R	R	R	Perfil 3	34 kb, 17 kb, 11 kb	EcI	39	4351	
CCBH 7056	ND	DF	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 1b	40 kb	EcH	43	4354	
CCBH 7456	Secreção ferida	BA	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 3	40 kb	EcJ	632	1196	

CCBH 7560	Urina	BA	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	S	S	R	R	R	Perfil 3	40 kb	EcK	2	ND
--------------	-------	----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	-------------	-------	-----	---	----

P. stuartii

CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	PFGE
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH8414	Aspirado tranqueal	MG	R	R	R	S	R	R	R	S	R	S	I	NA	S	R	R	R	Perfil 2	10 kb, 6 kb	PsA
CCBH8417	Lavado brônquico	MG	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	I	NA	S	R	R	R	Perfil 2	10 kb, 6 kb	PsA
CCBH8420	Aspirado tranqueal	MG	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	NA	I	S	R	R	Perfil 2	10 kb, 6 kb	PsA
CCBH8432	Ponta de cateter	MG	R	R	R	S	R	R	R	R	R	I	I	NA	I	R	S	R	Perfil 2	10 kb, 6 kb	PsA

P. agglomerans

CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	PFGE
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH6542	Ponta de cateter	RJ	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	S	S	R	R	R	Perfil 1d	40 kb	PaA
CCBH6799	Secreção de ferida	RJ	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	S	R	R	R	Perfil 4	25 kb, 10 kb, 5 kb	PaB
CCBH7347	Sangue	RJ	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	Perfil 1d	50 kb	PaA
CCBH7348	Sangue	RJ	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S	S	S	R	R	R	Perfil 1d	50 kb	PaA

<i>C. freundii</i>																					
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	PFGE
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH6515	Frag. de tecido	GO	R	I	R	I	R	R	R	S	I	S	S	S	S	R	S	S	Perfil 2	40 kb	CfB
CCBH6549	Secreção traqueal	AL	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	I	R	R	R	S	S	Perfil 6	40 kb, 25 kb, 10 kb, 5 kb	CfA
CCBH7233	Ponta de cateter	RJ	R	R	I	R	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R	S	S	Perfil 5	19 kb, 8 kb, 3,5 kb	CfC

<i>K. oxytoca</i>																					
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	PFGE
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH5793	Urina	MG	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	S	S	Perfil 3	25 kb, 10 kb, 5 kb	KoB
CCBH6853	ND	RJ	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	I	R	R	R	Perfil 4	40 kb, 20 kb, 11 kb	KoA

<i>M. morgani</i>																					
CCBH	Material clínico	Origem	Disco-difusão											E-test					Perfil transposon	Plasmídio	
			ERT	MEM	IMP	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	GEN	AMI	PB	TGC	ETP	MEM	IPM			
CCBH5754	Secreção Ferida	MG	R	R	R	I	R	I	R	R	R	R	R	R	R	S	S	I	R	Perfil 2	20 kb, 11 kb, 6 kb

9. Anexos

Parte dos resultados obtidos nessa dissertação foi submetida na revista *Microbial Drug Resistance* sob o título “Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil”, com a autoria de Carolina P. Tavares, Polyana S. Pereira, Elizabeth A. Marques, Célio F. Junior, Maria da Penha A.H. de Souza, Robmary Almeida, Carlene de F.M. Alves, Marise D. Asensi e Ana Paula D.A. Carvalho Assef.

Microbial Drug Resistance: <http://mc.manuscriptcentral.com/mdr>

Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil

Journal:	<i>Microbial Drug Resistance</i>
Manuscript ID:	MDR-2014-0066.R2
Manuscript Type:	Epidemiology
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Tavares, Carolina; Oswaldo Cruz Foundation, LAPIH Pereira, Polyana; Oswaldo Cruz Foundation, LAPIH Marques, Elizabeth; Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Microbiology and Immunology Junior, Celio; LACEN-DF, Souza, Maria da Penha; LACEN-ES, Almeida, Robmary; LACEN-GO, Alves, Carlene; LACEN-MG, Asensi, Marise; Oswaldo Cruz Foundation, LAPIH; Carvalho-Assef, Ana Paula; Oswaldo Cruz Foundation, LAPIH
Keyword:	Carbapenemases, Enterobacteriaceae, Antimicrobial, Epidemiology, Molecular Characterization
Abstract:	In Brazil, since 2009, there has been an ever increasing wide spread of KPC-producing <i>K. pneumoniae</i> as well as its presence in other <i>Enterobacteriaceae</i> species. Thus, this study aims to assess the molecular epidemiology and genetic background of the <i>bla</i> _{KPC} gene in nine different species of <i>Enterobacteriaceae</i> (non- <i>K. pneumoniae</i>) from nine Brazilian states between 2009 and 2011, by disk diffusion and E-test to evaluate the resistance profile, PFGE and MLST (only for <i>E. coli</i>) were carried out for molecular typing, and multiplex PCR was conducted for both the transposon Tn4401 and plasmid analysis in order to determine the genetic environment of the <i>bla</i> _{KPC} gene. Three hundred eighty seven isolates were analyzed exhibiting reduced susceptibility or resistance to carbapenems, in which the <i>bla</i> _{KPC-2} gene was detected in 21.4%. These isolates exhibited high rates of resistance to most of the antimicrobials tested, including tigecycline (45.6% non-susceptible) and polymyxin B (16.5%), the most resistant species being <i>E. aerogenes</i> , <i>E. cloacae</i> , <i>C. freundii</i> and <i>K. oxytoca</i> . We found great clonal diversity and a variety of <i>bla</i> _{KPC-2} -carrying plasmids, all of them exhibiting a partial Tn4401 structure. Therefore, this study demonstrates the dissemination of KPC-2 in many Brazilian isolates of <i>Enterobacteriaceae</i> including species that were not previously described such as <i>P. agglomerans</i> and <i>P. stuartii</i> .

SCHOLARONE™
Manuscripts

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

For Peer Review Only/Not for Distribution

Table 1: Clonal Groups distribution of the 83 *Enterobacteriaceae* isolates corresponding to 9 different geographic regions from Brazil

Species	Pulsotypes and MLST ^a of <i>Enterobacteriaceae</i> (Number of isolates per Brazilian state ^b)									Total (%)
	Northeast				Southeast			Midwest		
	CE	PE	BA	AL	RJ	ES	MG	DF	GO	
<i>E. aerogenes</i>	EaH (1)	EaF (6) EaG (2)						EaA (23) ^c EaB (1) EaC (1) EaD (1) EaI (1)	EaA (2) ^c	38 (45.8)
<i>E. cloacae</i>	EclC (2) EclJ (1)				EclG (1) EclM (1)	EclH (1) EclK (1) EclL (1) EclN (1) EclO (1)	EclM (1)	EclB (1) EclF (1) EclI (1)	EclA (1) EclD (1) EclE (1)	17 (20.5)
<i>E. coli</i>		Ecl/ST39 (1)	EcJ/ST632 (1) EcK/ST2 (1)		EcA/ST629 (1) EcB/ST630 (1) EcC/ST631 (1) EcD/ST479 (1) EcL/ST2 (1)		EcE/ST2 (1) EcG/ST43 (1)	EcF/ST305 (2) EcH/ST43 (1)		13 (15.7)
<i>P. stuartii</i>							PsA (4)			4 (4.8)
<i>P. agglomerans</i>					PaA (3) PaB (1)					4 (4.8)
<i>C. freundii</i>				CfA (1)	CfB (1)				CfC (1)	3 (3.6)
<i>K. oxytoca</i>					KoA (1)		KoB (1)			2 (2.4)
<i>M. morgannii</i>							1			1 (1.2)
<i>S. marcescens</i>		1								1 (1.2)
Total (%)	4 (4.8)	10 (12)	2 (2.4)	1 (1.2)	13 (15.7)	5 (6)	9 (10.8)	33 (39.8)	6 (7.3)	83 (100)

^a MLST was performed only for *E. coli* isolates

^b CE= Ceará; PE= Pernambuco; BA= Bahia; AL= Alagoas; RJ= Rio de Janeiro; ES= Espírito Santo; MG= Minas Gerais; DF= Distrito Federal; GO= Goiás.

^c The isolates were retrieved from 8 hospitals from Federal District and 3 hospitals from Goiás between March/2010 and February/2011 .

Table 3: Tn4401 and KPC-harboring plasmid sizes of all KPC-2-producing isolates.

Species	Number of plasmids/ isolate	Size of KPC-plasmid	Most frequent KPC-plasmid (N)	Hybridization with IncN, IncA/C and IncL/M probes (N)	Tn4401 (% isolates positive)		
					<i>tnpA</i>	<i>ISKpn6</i>	<i>ISKpn7</i> isoform
<i>E. aerogenes</i> (n= 38)	1 - 5	5- 50 kb	~10 kb (22)	~40 kb-IncN (1) ~50 kb-IncA/C (1)	28.9	97.4	“b” – 57.9 “d” – 2.6 NEG – 39.5
<i>E. cloacae</i> (n= 17)	1 - 4	3,5 - 50 kb	~40 kb (5)	~40 kb-IncN (3) ~40 kb-IncL/M (3) ~50 kb-IncL/M (2)	56.3	100	“b” – 64.7 NEG – 35.3
<i>E. coli</i> (n= 13)	1 - 3	6 - 60 kb	~40 kb (5)	~40 kb-IncN (4) ~50 kb-IncL/M (2) ~60 kb-IncN (1)	78.6	100	“b” – 61.5 NEG – 38.5
<i>P. stuartii</i> (n= 4)	2	6 - 10 kb	~6 kb (4) ~10 kb (4)	–	100	100	NEG – 100
<i>P. agglomerans</i> (n= 4)	1 - 3	5 - 50 kb	~50 kb (2)	~50 kb-IncA/C (3)	75	100	“b” – 25 “d” – 75
<i>C. freundii</i> (n= 3)	1 - 4	5 - 40 kb	~40 kb (2)	-	66.7	66.7	“b” – 33.3 NEG – 66.7
<i>K. oxytoca</i> (n= 2)	3	5 - 40 kb	-	-	0	100	“b” – 50 NEG – 50
<i>M. morgani</i> (n= 1)	3	6 - 20 kb	-	-	100	100	NEG – 100
<i>S. marcescens</i> (n= 1)	3	5 - 25 kb	-	-	100	100	NEG – 100
Total (n= 83)	1 - 5	5 – 60 kb	~10kb (29) ~5kb (20) ~40kb (9)	-	48.2	97.8	“b” – 53 “d” – 4.8 NEG – 42.2

Table 2: Susceptibility profile, MIC₅₀ and allelic variants of CTX-M, TEM and SHV beta-lactamases of all KPC-2-producing isolates studied.

Species	Antimicrobials ^a									Allelic variants of ESBL genes								
	Number of isolates resistant or non-susceptible (disk diffusion)									MIC ₅₀ (range)					<i>bla</i> _{SHV} (N)	<i>bla</i> _{TEM} (N)	<i>bla</i> _{CTX-M} (N)	Neg
	CAZ	CTX	FEP	ATM	SXT	CIP	AMI	GEN	IPM	MER	ERT	TGC	PB					
<i>E. aerogenes</i> (n=38)	38	38	38	38	24	37	27	11	32 (0.38-32)	12 (0.38-32)	32 (0.38-32)	1.5 (0.125-16)	0.75 (0.38-32)	SHV-120 (1)	TEM-141 (3) TEM-141-like (10)	CTX-M-59 (6) CTX-M-8 (1) CTX-M-97 (1) CTX-M-15 (1)	18	
<i>E. cloacae</i> (n=17)	16	17	17	17	12	11	8	11	32 (0.5-32)	6 (0.047-32)	12 (0.047-32)	1 (0.5-4)	0.75 (0.19-2)	SHV-2a (1)	TEM-141 (7) TEM-141-like (8)	CTX-M-8 (1) CTX-M-9 (2) CTX-M-15 (6) CTX-M-9 (1)	2	
<i>E. coli</i> (n=13)	8	12	11	12	6	10	3	5	6 (3-32)	3 (0.38-32)	4 (0.75-32)	0.19 (0.19-1)	0.75 (0.5-2)	-	TEM-141 (4) TEM-141-like (1)	-	8	
<i>P. stuartii</i> (n=4)	0	4	4	4	3	4	4	3	32 (4-32)	4 (0.75-32)	6 (1.5-32)	1.5 (1-2)	NE ^b	-	-	-	4	
<i>P. agglomerans</i> (n=4)	4	4	4	4	1	4	2	3	32 (24-32)	32 (32)	32 (32)	1 (0.75-3)	0.32 (0.25-1.5)	SHV-63 (1) SHV-165 (2)	TEM-141-like (4)	-		
<i>C. freundii</i> (n=3)	3	3	3	3	1	2	0	0	0.75 (0.75)	0.25 (0.25)	6 (4-32)	1 (0.5-6)	1 (0.5-12)	-	-	-	3	
<i>K. oxytoca</i> (n=2)	2	2	2	2	2	2	1	0	0.25-32	0.19-32	6-32	0.5-2	0.38-12	-	TEM-141-like (1)	-	1	
<i>M. morgannii</i> (n=1)	0	1	1	1	1	1	1	1	32	2	1.5	0.75	NE ^b	-	-	-	1	
<i>S. marcescens</i> (n=1)	1	1	1	1	1	0	1	1	32	32	32	2	NE ^b	-	-	-	1	
All species (%)	86.7	100	83.1	97.6	61.4	85.5	57.8	42.2	32 (0.25-32)	32 (0.047-32)	32 (0.047-32)	1 (0.125-16)	0.75 (0.19-32)	5 (6,0%)	38 (45,8%)	19 (22,9%)	37 (44,6%)	

^a CAZ= Ceftazidime; CTX= Cefotaxime; FEP= Cefepime; ATM= Aztreonam; SXT= Trimethoprim / sulfamethoxazole; CIP= Ciprofloxacin; AMI= Amikacin; GEN= Gentamycin; IPM= Imipenem; MER= Meropenem; ERT= Ertapenem; TGC= Tigecycline; PB= Polymyxin B;

^b NE= Not evaluated

Article Title

Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil

Author names

Carolina Padilha Tavares^a, Polyana Silva Pereira^a, Elizabeth de Andrade Marques^b, Celio Faria Junior^c, Maria da Penha Araújo Herkenhoff de Souza^d, Robmary de Almeida^e, Carlene de Fátima Morais Alves^f, Marise Dutra Asensi^a, and Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef^a.

Affiliations

^a Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - LAPIH - IOC (Oswaldo Cruz Institute) – FIOCRUZ, Brazil.

^b Departamento de Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Brazil.

^c Laboratório Central de Saúde Pública do Distrito Federal - LACEN- DF, Brazil.

^d Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo - LACEN- ES, Brazil.

^e Laboratório Central de Saúde Pública de Goiás - LACEN- GO, Brazil.

^f Laboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais - LACEN- MG, Brazil.

Corresponding author: Ana Paula D'Alincourt Carvalho-Assef, Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar - LAPIH - IOC (Oswaldo Cruz Institute) – FIOCRUZ- Brazil (e-mail: anapdca@ioc.fiocruz.br – phone number: +552125621636 – Postal address: Av. Brasil, 4365 - Manguinhos, Rio de Janeiro – RJ/ zip code: 21040-900).

Introduction

The emergence of Gram-negative pathogens resistant to many antimicrobial classes has become a serious threat in the last decades.²² KPC-type carbapenemases have been a major determinant of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*²² as well as in many other *Enterobacteriaceae*.³¹ This enzyme was initially described during a surveillance study in the United States in 2001, quickly spreading throughout the world.³³

KPC affords resistance to all beta-lactam antibiotics available and its gene has been described in mobile elements, such as plasmids and a Tn3-based transposon (Tn4401) associated with IS structures.²¹ This transposon consists of a transposase (*tnpA*), a resolvase (*tnpR*), the *bla*_{KPC} gene, and two insertion sequences (ISK_{p_n6} and ISK_{p_n7}). It is flanked by two 39bp inverted repeat sequences. There are 3 more frequently described isoforms of this transposon (isoforms “a”, “b” and “c”).⁸ This structure, associated to the *bla*_{KPC} gene, has also been described inserted within plasmids of different sizes and incompatibility groups.^{2,7,25}

KPC-producing *K. pneumoniae* was first described in Brazil in 2006,²⁰ and its incidence has increased significantly. In 2010, a great dispersion of this gene was observed in several hospitals in different Brazilian cities and states.²⁵ Pereira *et al.*, observed that the spread of the *bla*_{KPC-2} gene in *K. pneumoniae* is both due to the dispersion of Tn4401 in different clones and the dissemination of a Clonal Complex (CC11), in which the ST437 and ST11 sequence types have played an important role.²⁵

Regarding other *Enterobacteriaceae* species, there are few reports in Brazil, such as *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella* spp., *Serratia marcescens* and *Klebsiella oxytoca*.^{1,9,10,19,34} However, the dissemination mechanisms of the *bla*_{KPC}

gene in these species are still unclear. Therefore, the aim of this study is to assess the molecular epidemiology and genetic background of the *bla*_{KPC} gene in isolates belonging to nine different species of *Enterobacteriaceae*, from nine Brazilian states between 2009 and 2011.

Materials and methods

Clinical Strains

From January 2009 to December 2011, the Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH) in Instituto Oswaldo Cruz - Fiocruz (Rio de Janeiro), which contributes to the Nosocomial Infections Monitoring Network associated to the Health Ministry of Brazil, received a total of 387 clinical *Enterobacteriaceae* (non-*K. pneumoniae*) isolates exhibiting reduced susceptibility or resistance to carbapenems, from nine Brazilian states: Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ), the Federal District (DF), Goiás (GO), Pernambuco (PE), Alagoas (AL), Ceará (CE) and Bahia (BA). The isolates were identified by conventional techniques. The *bla*_{KPC} gene and its allelic variant were detected and identified by PCR and sequencing, respectively.²⁴

Antimicrobial Susceptibility Testing

Antimicrobial susceptibility testing of all KPC-producing isolates was performed and interpreted based on CLSI recommendations⁵ by the disk diffusion method with the following antimicrobials (OXOID Hampshire, UK): ceftazidime (30 µg), cefotaxime (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), sulfamethoxazole/trimethoprim (25 µg), ciprofloxacin (5 µg), gentamicin (10 µg) and amikacin (30 µg). The minimal inhibitory concentration values were determined by

TAVARES, ET AL.

1
2
3 Etest® (AB Biodisk, Solna, Sweden) for imipenem, meropenem, ertapenem, tigecycline
4 and polymyxin B according to the manufacturer's instructions. Broth microdilution was
5 performed to confirm resistance to polymyxin B.⁵ The tests were interpreted based on
6
7
8
9
10 CLSI 2014 breakpoints,⁵ except for tigecycline and polymyxin B for which EUCAST
11
12 2014 breakpoints were adopted.¹¹

13 14 15 16 **Analysis of genetic diversity**

17
18 For molecular typing, pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) and Multilocus
19 Sequence Typing (in the case of *E.coli*) were employed. On PFGE, *XbaI* or *SmaI* (for
20
21
22 *Providencia stuartii*) digestion were used to analyze multiple isolates harboring *bla*_{KPC}
23 belonging to the same species.²⁸ Banding patterns were visually inspected and
24 subsequently analyzed with BioNumerics 6.6 software (Applied Maths, Sint-Martens-
25 Latem, Belgium) with Dice's coefficient analysis and bandwidth tolerance set at 1.5%.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Isolates with at least 80% of similarity were considered as the same clonal group.
Multilocus Sequence Typing (MLST) of *E. coli* isolates was performed according to
MLST database from Pasteur Institute
(<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/EColi.html>).

43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 **Flanking regions of *bla*_{KPC}**

The genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene was analyzed by multiplex PCR according to the primers described by Naas et. al,²¹ except for the amplification of the *ISKpn7* region, in which the primers described by Kitchel et. al were adopted.¹⁴ The positive and negative controls for KPC-2 were *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 and ATCC BAA 1706, respectively.

ESBL gene detection

PCR and sequencing were performed to amplify and identify other beta-lactamase-coding genes (CTX-M, SHV and TEM).^{7,18}

Genetic environment of the *bla*_{KPC} gene

The multiplex PCR plasmid replicon typing was carried out according to Carattoli *et al.*⁴ Then the plasmids were extracted by alkaline lysis,¹² transferred to a nylon membrane and hybridized with digoxigenin-labelled *bla*_{KPC-2}, IncN, IncA/C and IncL/M probes generated by the PCR DIG detection system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)²⁹.

Results

Of all *Enterobacteriaceae* non-*K. pneumoniae* isolates studied, *bla*_{KPC} was detected in 21.4% (83/387) of the isolates, representing nine different *Enterobacteriaceae* species. All of the isolates had the KPC-2 variant.

The distribution of *bla*_{KPC-2} among species was: *Enterobacter aerogenes* (38 from 121 isolates with reduced susceptibility or resistance to carbapenems), *Enterobacter cloacae* (17 from 100 isolates), *Escherichia coli* (13 from 104 isolates), *Pantoea agglomerans* (4 from 10 isolates), *Providencia stuartii* (4 from 11 isolates), *Citrobacter freundii* (3 from 8 isolates), *Klebsiella oxytoca* (2 from 9 isolates), *Serratia marcescens* (1 from 19 isolates) and *Morganella morgannii* (1 from 5 isolates). They were recovered from surveillance swabs (n=26, 31.3%), urine (n=13, 15.7%), respiratory tract samples (n=12, 14.5%), skin and soft tissue (n=10, 12%), blood (n=5, 6%) and other sites (n=10, 12%). In 8.4% (n=7) of the isolates, the anatomical site of

TAVARES, ET AL.

isolation was not reported. Most of the KPC-producing isolates were recovered from the Federal District (39.8% n=33) and Rio de Janeiro state (15.7% n=13) (Table 1).

Through PFGE analysis, there was a great clonal diversity among *E. coli* and *E. cloacae* isolates, 12 and 16 clonal groups, respectively. In *E. aerogenes*, 9 clonal groups were evident, with a predominant group (A- 65.8%) detected in eight different hospitals from the Federal District and three different hospitals from Goiás, over an 11 month period. All *P. stuartii* isolates belonged to the same clonal group, detected in the same hospital in Minas Gerais. The *C. freundii* isolates were pertinent to three different clonal groups. Regarding *P. agglomerans* and *K. oxytoca*, the isolates were designated to two clonal groups (Table 1).

Through *E. coli* MLST analysis, the isolates belonged to nine STs, four new STs that presented two new alleles of *dinB* and *icdA* genes (ST629 and ST630) and two new profiles (ST631 and ST632). Three different clonal groups by PFGE (EcE, EcK and EcL) belonged to ST2 and two others (EcG and EcH) were identified as ST43.

According to CLSI 2014⁵ breakpoints, there were high rates of resistance to most of the antimicrobials tested. Gentamicin and amikacin were the antimicrobials with the lowest resistance rates (39.8% and 34.9%, respectively). Through E-test, most of the isolates were resistant to carbapenems, as was expected, with MIC₅₀ ≥32 mg/L for all carbapenems tested. Individually, several species displayed lower rates of MIC₅₀, *E. coli* and *C. freundii* exhibiting the lowest MIC₅₀ (Table 2).

Approximately 47% of the isolates were non-susceptible to tigecycline (MIC₅₀= 1 mg/L and MIC range 0.125 to 16 mg/L) (Table 2). These isolates were species of: *E. aerogenes* (60.5%; 23/38), *E. cloacae* (52.9%; 9/17), *P. stuartii* (75%; 3/4), *P. agglomerans* (25% 1/4), *C. freundii* (33.3%; 1/3), *K. oxytoca* (50%; 1/2) and *S. marcescens* (100%; 1/1). Regarding polymyxin B, 16.5% of resistance was apparent,

1
2
3 excluding species intrinsically resistant (MIC_{50} = 0.75 mg/L and MIC range 0.19 to 32
4 mg/L) (Table 2). To confirm the polymyxin B resistance, broth microdilution (the gold
5 standard method) was used to test these isolates, and all of the isolates were still
6 considered resistant with the same MIC values. These isolates were species of *E.*
7 *aerogenes* (26.3%; 10/38), *C. freundii* (33.3%; 1/3) and *K. oxytoca* (50% 1/2). Of the 10
8 *E. aerogenes* isolates resistant to polymyxin B, 9 belonged to clonal group A,
9 representing 90% of the polymyxin-resistant *E. aerogenes* strains (Table 2).

10
11
12 In our study, the association of KPC-2 with other beta-lactamases was evident in
13 44 isolates (53%). The *bla*_{TEM} gene was detected in 45.8% of the isolates. Through
14 sequencing, two different allelic variants were defined, *bla*_{TEM-141} (36.8%) and *bla*_{TEM-}
15 *141-like* (63.2%), a novel allelic variant differing from the *bla*_{TEM-141} in two nucleotides.
16 The frequency of *bla*_{SHV} detection was 6% and through sequencing, four different allelic
17 variants were found: *bla*_{SHV-2a} (16.7%), *bla*_{SHV-63} (16.7%), *bla*_{SHV-120} (16.7%) and *bla*_{SHV-}
18 *165* (33.3%). The *bla*_{CTX-M} genes were detected in 22.9% of the isolates, and the allelic
19 variants were *bla*_{CTX-M-8} (10.5%), *bla*_{CTX-M-9} (15.8%), *bla*_{CTX-M-15} (36.8%), *bla*_{CTX-M-59}
20 (31.6%) and *bla*_{CTX-M-97} (5.3%) (Table 2).

21
22
23 By multiplex PCR, a partial *Tn4401* structure was present in all isolates. The
24 inverted repeats (IRs) and their transposition-generated target site duplications (TSDs)
25 were absent in all isolates. The *tnpA* region was detected in 48.2% of the isolates,
26 *ISKpn6* in 97.8% and *ISKpn7* in 57.8%. The three regions together (*tnpA*, *ISKpn6* and
27 *ISKpn7*) were detected in 31.3% of the isolates (n= 26). In 91.7% (44/48), there were no
28 deletions in the *ISKpn7* region, suggesting isoform “b”, and in 8.3% (4/44) a deletion of
29 69 bp was found, suggesting isoform “d” (Table 3).

TAVARES, ET AL.

Hybridization analysis revealed positive staining in more than one plasmid band for 51.8% (43/83) of the isolates. The KPC-carrying plasmids varied from 3.5 to 60 kb (Table 3), the most prevalent plasmids presenting ~10kb (29/83), ~5kb (20/83) and ~40kb (9/83). By multiplex PCR, most of the plasmid incompatibility groups were not determined. Plasmid incompatibility groups were found only in 19.3% of the isolates. IncN prevailed in nine isolates, IncA/C in four and IncL/M in seven. By hybridization, the incompatibility group of 14 KPC-carrying plasmids was identified. Three of these were IncA/C plasmids with ~50kb in both *E. aerogenes* (n=1) and *P. agglomerans* (n=2), and four were IncL/M with ~50kb in *E. aerogenes* (n=1), *E. cloacae* (n=1) and *E. coli* (n=2). IncN plasmids were encountered in seven KPC-carrying plasmids. One 60kb plasmid in an *E. coli* isolate and six 40kb plasmids in *E. aerogenes* (n=1), *E. cloacae* (n=1) and *E. coli* (n=4) were evidenced (Table 3).

Discussion

This study describes the resistance profiles, genetic diversity and genetic environment of the *bla*_{KPC-2} gene among nine different *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil, during a 2-year study. Since 2009, there has been an ever wide spread of KPC-producing *K. pneumoniae* in several Brazilian states.^{25, 30} Beyond the dissemination of *K. pneumoniae*, KPC in other *Enterobacteriaceae* species has also been recorded.²⁶ In our study, there was a KPC-production rate of 21.4% in resistant isolates. All of the isolates produced KPC-2, the most reported variant in Brazil and throughout the world.³²

All of the isolates were non-susceptible to at least one of the carbapenems and two isolates resistant to all of the antimicrobials tested except to tigecycline (one of the

isolates was non-susceptible) and polymyxin B. A high rate of resistance to tigecycline (45.6%) among *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. agglomerans*, *C. freundii*, *K. oxytoca* and *S. marcescens* isolates was observed. *E. aerogenes*, *K. oxytoca* and *C. freundii* isolates resistant to polymyxin B (16.5%) were also found. Resistance to tigecycline and mainly to polymyxin is very worrisome, because these drugs are one of the few options left to treat infections caused by multiresistant KPC-producing bacteria. Polymyxin resistance has been witnessed in KPC-producing *K. pneumoniae* isolates,¹⁵ including those from Brazil.²⁵ To our knowledge, this is the first report of *E. aerogenes* strains resistant to polymyxin B in Brazil. These results warrant a more judicious application of this antimicrobial agent.

The transposon Tn4401 is described to be the origin of *bla*_{KPC} gene acquisition and dissemination. It consists of a transposase (*tnpA*), a resolvase (*tnpR*), the *bla*_{KPC} gene, and two putative insertion sequence (IS) elements, IS*Kpn6* and IS*Kpn7*.²¹ In Brazil, the *bla*_{KPC} gene has been associated with Tn4401 variant “b” in both *K. pneumoniae* as well as other *Enterobacteriaceae* species.^{2,25} Although isoform “b” was also the most prevalent in this study, the complete transposon (*tnpA*, IS*Kpn6* and IS*Kpn7*) was only amplified in 31.3% of the isolates (n= 26). Thus, these findings suggest the diversity of the genetic environment surrounding *bla*_{KPC} in the *Enterobacteriaceae* isolates from Brazil.

Besides the dissemination of *bla*_{KPC-2} through Tn4401, the participation of epidemic clones is being described in the dispersion of this gene. There is an epidemic clone of *K. pneumoniae* delineated worldwide, identified as ST258 by MLST. In Brazil, the dissemination of two major clones in *K. pneumoniae* (ST437 and ST11) related to ST258 was also identified.²⁵

TAVARES, ET AL.

1
2
3 In this study, through PFGE analysis, although there has been clonal spread of
4
5 some species in some states, for now a prevalent clone responsible for the spread of
6
7 KPC in other *Enterobacteriaceae* species in Brazil has still not yet been
8 observed.

9
10 Regarding *E. coli* isolate MLST analysis, two isolates that belonged to ST43
11 were found, which is equivalent to ST131 on the MLST scheme by UCC.¹⁷ This ST has
12 been described as highly virulent and is associated with the global dissemination of the
13
14 CTX-M-15 enzyme.⁶ However, none of these ST43 isolates produced CTX-M-type
15
16 enzymes, but they both produced KPC-2 and TEM. The association of ESBLs with
17
18 KPC has usually been described in *K. pneumoniae*.^{3,13} Nevertheless, it has also been
19
20 reported among other *Enterobacteriaceae*.¹⁴

21
22
23
24
25
26 A wide range of *bla*_{KPC-2}- carrying plasmids was found in this study. With the
27
28 scheme proposed by Caratolli et al.⁴ we could not determine the incompatibility type of
29
30 most of the KPC-carrying plasmids. Among the typed plasmids, IncA/C, L/M and N
31
32 incompatibility groups appeared, which are the incompatibility groups more frequently
33
34 described among *Enterobacteriaceae* isolates.^{2,20,25} The non-typeable plasmids
35
36 probably belong to other Inc groups not included in this scheme.²³ Thus, these results
37
38 disclose the variety of *bla*_{KPC-2}-carrying plasmids among *Enterobacteriaceae* isolates.
39
40 The same has been exposed for *K. pneumoniae* in Brazil.²⁵

41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
Pereira et al. reported an important participation of a 40 kb plasmid belonging to
incompatibility group IncN in the dissemination of KPC-2 among *K. pneumoniae*
isolates from Brazil.²⁵ Andrade et al.² also found 40kb IncN plasmids in
Enterobacteriaceae isolated from São Paulo and Rio de Janeiro (Brazil).² However,
other studies are peremptory to confirm whether or not the 40kb IncN plasmid in this
study is the same.

1
2
3 This study clearly demonstrates the dissemination of KPC-2 to other
4
5 *Enterobacteriaceae* non-*K. pneumoniae* species in many Brazilian states, including
6
7 species that were not previously described as harboring *bla*_{KPC}, such as *P. agglomerans*
8
9 and *P. stuartii*. Therefore, the importance of prompt recognition of these isolates and the
10
11 establishment of proper therapeutic and infection control measures to reduce their
12
13 spread among patients and within hospitals is clearly emphasized.
14
15

16 A part of this study was presented at the 51st Annual Interscience Conference on
17
18 Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Chicago, IL, USA, 2011, and at the XXVI
19
20 Latin American Microbiology Conference, Santos, SP, Brazil, 2012.
21
22
23
24
25
26

27 Acknowledgments

28
29 We thank microbiologists who provided some of the strains: Ivoneide Barroso,
30
31 Maria Iracema Patricio, Valdelúcia Cavalcanti, Letiano da Silva and Maria Pia from the
32
33 Public Health Laboratories (LACENs) of Alagoas, Ceará, Pernambuco, Piauí and Rio
34
35 de Janeiro, respectively. We also thank the Genomic Platform for DNA Sequencing
36
37 PDTIS (Instituto Oswaldo Cruz), and the Institute Pasteur MLST database curators for
38
39 coding the MLST alleles and profiles for *Escherichia coli*.
40
41
42
43
44

45 Author Disclosure Statement

46
47 All authors report no conflicts of interest relevant to this article.
48
49
50

51 Funding

52
53
54
55
56
57
58
59
60

TAVARES, ET AL.

This work was funded by research grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, Fundação Carlos Chagas de Amparo à Pesquisa – FAPERJ and Instituto Oswaldo Cruz – IOC – FIOCRUZ.

Ethical approval

The study was approved by Fiocruz Ethical Committee and Brazilian National Committee for Research Ethics – CONEP under the reference number CAAE-000012/011-02.

References:

1. Almeida, A.C, F.L. Cavalcanti, W.M. Martins, M.A. Vilela, A.C. Gales, M.A. Morais Junior, and M.M.C. Morais. 2013. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **57**:4077-4078.
2. Andrade, L.N., T. Curiao, J.C. Ferreira, J.M. Longo, E.C. Clímaco, R. Martinez, F. Bellissimo-Rodrigues, A. Basile-Filho, M.A. Evaristo, P.F. Del Peloso, V.B. Ribeiro, A.L. Barth, M.C. Paula, F. Baquero, R. Cantón, A.L.C. Darini, and T.M. Coque. 2011. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**:3579-3583.
3. Bradford, P.A., S. Bratu, C. Urban, M. Visalli, N. Mariano, D. Landman, J.J. Rahal, S. Brooks, S. Cebular, and J. Quale. 2004. Emergence of Carbapenem-Resistant *Klebsiella* Species Possessing the Class A Carbapenem- Hydrolyzing KPC-2 and Inhibitor Resistant TEM-30 β -Lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **39**:55-60.
4. 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.
5. Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S24 CLSI, Wayne, PA, 2014.
6. Coque, T.M., A. Novais, A. Carattoli, L. Poirel, J. Pitout, L. Peixe, F. Baquero, R. Cantón, and P. Nordmann. 2008. Dissemination of clonally

TAVARES, ET AL.

- 1
2
3 related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase
4 CTX-M-15. *Emerg. Infect. Dis.* **14**:195-200.
- 5
6
7
8 7. Cuzon, G., T. Naas, H. Truong, M.V. Villegas, K.T. Wisell, Y. Carmeli,
9 A.C. Gales, S.N. Venezia, J.P. Quinn, and P. Nordmann. 2010. Worldwide
10 diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2}
11 gene. *Emerg. Infect. Dis.* **16**:1349-1356.
- 12
13
14
15
16 8. Cuzon G1, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a
17 Tn3-based transposon involved in *bla*_{KPC} gene mobilization. *Antimicrob*
18 *Agents Chemother.* 2011 Nov;**55**(11):5370-3.
- 19
20
21
22
23 9. D'Alincourt Carvalho-Assef, A.P., R.S. Leão, R.V. da Silva, A.G. Ferreira,
24 L.M. Seki, M.D. Asensi, and E.A. Marques. 2010. *Escherichia coli*
25 producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn. Microbiol.*
26 *Infect. Dis.* **68**:337-338.
- 27
28
29
30
31
32 10. Del Peloso, P.F., M.F.L. Barros, and F.A. Santos. 2010. Sepsis por *Serratia*
33 *marcescens* KPC. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* **46**: 365-367.
- 34
35
36 11. EUCAST. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters,
37
38 version 4.0, January, 2014.
39
40 http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint
41 [tables/Breakpoint_table_v_4.0.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint) (July 28th 2014, date last accessed).
42
43
44
- 45 12. Kado, C.I., and S.T. Liu. 1981. Rapid procedure for detection and isolation
46 of large and small plasmids. *J. Bacteriol.* **145**: 1365–1373.
- 47
48
49 13. Kassis-Chikhani, N., D. Decre, P. Ichai, C. Sengelin, D. Geneste, L. Mihaila,
50 E. Dussaix, and G. Arlet. 2010. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae*
51 producing KPC-2 and SHV-12 in a French hospital. *J. Antimicrob.*
52 *Chemother.* **65**:1539-1540.
- 53
54
55
56
57
58
59
60

- 1
2
3 14. Kitchel, B., J.K. Rasheed, J.B. Patel, A. Srinivasan, S. Navon-Venezia, Y.
4 Carmeli, A. Brolund, and C.G. Giske. 2009. Molecular epidemiology of
5 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal
6 expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob. Agents Chemother.*
7 **53**:3365–3370.
8
9
10
11
12
13 15. Lee, J., G. Patel, S. Huprikar, D.P. Calfee, and S.G. Jenkins. 2009.
14 Decreased susceptibility of polymyxin B during treatment for carbapenem
15 resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J. Clin. Microbiol.* **47**:1611-1612.
16
17
18
19
20
21 16. Li, G., Q. Wei, Y. Wang, X. Du, Y. Zhao, and X. Jiang. 2011. Novel genetic
22 environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia*
23 *coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. *Eur. J. Clin. Microbiol.*
24 *Infect. Dis.* **30**:575–580.
25
26
27
28
29
30 17. Matsumura, Y., M. Yamamoto, M. Nagao, G. Hotta, A. Matsushima, Y. Ito,
31 S. Takakura, S. Ichiyama, and Kyoto-Shiga Clinical Microbiology Study
32 Group. 2012. Emergence and spread of B2-ST131-O25b, B2-ST131-O16
33 and D-ST405 clonal groups among extended-spectrum- β -lactamase-
34 producing *Escherichia coli* in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* **67**:2612-
35 2620.
36
37
38
39
40
41
42
43 18. Mendonça, N., J. Leitão, V. Manageiro, E. Ferreira, and M. Caniça. 2007.
44 Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia*
45 *coli* Clinical Isolates in Community and Nosocomial Environments in
46 Portugal. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1946-1955.
47
48
49
50
51
52 19. Miriagou, V., L.S. Tzouveleakis, S. Rossiter, E. Tzelepi, F.J. Angulo, and
53 J.M. Whichard. 2003. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain
54
55
56
57
58
59
60

TAVARES, ET AL.

- 1
2
3 due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. Antimicrob. Agents
4 Chemother. **47**:1297–1300.
5
6
7 20. Monteiro, J., A.F. Santos, M.D. Asensi, G. Peirano, and A.C. Gales. 2009.
8 First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil.
9 Antimicrob Agents Chemother. **53**:333-334.
10
11
12 21. Naas, T., G. Cuzon, M.V. Villegas, M.F. Lartigue, J.P. Quinn, and P.
13 Nordmann. 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-
14 lactamase *bla*_{KPC} gene. Antimicrob. Agents Chemother. **52**:1257-1263.
15
16
17 22. Nordmann, P., T. Naas, and L. Poirel. 2011. Global spread of
18 Carbapenemase- producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis. **17**:1791-
19 1798.
20
21
22 23. Papagiannitsis CC, Miriagou V, Giakkoupi P, Tzouveleki LS, Vatopoulos
23 AC. 2013. Characterization of pKP1433, a novel KPC-2-encoding plasmid
24 from *Klebsiella pneumoniae* sequence type 340. Antimicrob Agents
25 Chemother. 2013 Jul;**57**:3427-9.
26
27
28 24. Peirano, G., L.M. Seki, V.L.V. Passos, M. Pinto, L.R. Guerra, and M.D.
29 Asensi. 2009. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella*
30 *pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J. Antimicrob.
31 Chemother. **63**:265-268.
32
33
34 25. Pereira, P.S., C.F.M. Araujo, L.M. Seki, V. Zahner, A.P. Carvalho-Assef,
35 and M.D. Asensi. 2013. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-
36 producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex
37 11(ST11, ST437 and ST340). J. Antimicrob. Chemother. **68**:312-316.
38
39
40 26. Petrella, S., N. Ziental-Gelus, C. Mayer, M. Renard, V. Jarlier, and W.
41 Sougakoff. 2008. Genetic and Structural Insights into the Dissemination
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

- Potential of the Extremely Broad-Spectrum Class A beta-Lactamase KPC-2 Identified in an *Escherichia coli* Strain and an *Enterobacter cloacae* Strain Isolated from the Same Patient in France. *Antimicrob Agents Chemother.* **52**:3725-3736.
27. Ribeiro, V.B., L.N. Andrade, A.R. Linhares, J. Barin, A.L. Darini, A.P. Zavascki, and A.L. Barth. 2013. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* **62**:1721-1727.
28. Ribot, E.M., M.A. Fair, R. Gautom, D.N. Cameron, S.B. Hunter, B. Swaminathan, and T.J. Barrett. 2006. Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne Pathog. Dis.* **3**:59-67.
29. Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. 3ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001
30. Seki, L.M., P.S. Pereira, M.P. de Souza, M.S. Conceição, E.A. Marques, C.O. Porto, E.M. Colnago, C. de F. Alves, D. Gomes, A.P. Assef, Ø. Samuelsen, and M.D. Asensi. 2011. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **70**:274-277.
31. Tzouvelekis, L.S., A. Markogiannakis, M. Psychogiou, P.T. Tassios, and G.L. Daikos. 2012. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev.* **25**:682-707.
32. Walsh, TR. 2010. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int. J. Antimicrob. Agents* **36**:S8-S14.

TAVARES, ET AL.

- 1
2
3 33. Yigit, H., A.M. Queenan, G.J. Anderson, A. Domenech-Sanchez, J.W.
4
5 Biddle, C.D. Steward, S. Alberti, K. Bush, and F. C. Tenover. 2001. Novel
6
7 Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-
8
9 Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*
10
11 **45**:1151-1161.
12
13
14 34. Zavaski, A.P., A.B. Machado, K.R. de Oliveira S.V. Superti, D.A. Pilger, W.
15
16 Cantarelli, P.R. Pereira, A.C. Lieberkmecht, and A.L. Barth. 2009. KPC-2-
17
18 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int. J.*
19
20 *Antimicrob. Agents.* **34**:286-288.
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60