

GABRIELA RODRIGUES FRANCISCO

Diversidade genética de *Klebsiella pneumoniae* produtora
de KPC isolada de diversos hospitais do Estado de São
Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências da
Coordenadoria de Controle de Doenças
da Secretaria De Estado de Saúde de São
Paulo, para obtenção do Título de Mestre
em Ciências.

Área de concentração: Pesquisas
Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Prof.^a Dra. Doroti de
Oliveira Garcia

São Paulo
2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Francisco, Gabriela Rodrigues.

Diversidade genética de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC isolada de diversos hospitais do Estado de São Paulo/ Gabriela Rodrigues Francisco. - São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública
Orientadora: Doroti de Oliveira Garcia

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. Diversidade genética. 3. Epidemiologia molecular. 4. Beta-lactamases. I. Título

SES/CCD/CD-300/14

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Claudio e Dica, pelo apoio incondicional durante todo o processo, me ajudando e aconselhando em todos os momentos, sem eles nada disso seria possível.

À toda a minha família que também me apoiaram e me ajudaram.

À minha orientadora Prof.^a Doroti de Oliveira Garcia pela oportunidade e dedicação durante esses anos e por todo o conhecimento por ela compartilhado.

Ao Dr. Yohei Doi por ter me recebido de maneira tão receptiva em seu laboratório e ter ensinado tanto durante o período que estive lá.

Aos colegas do Centro de Doenças Entéricas e Infecções por Patógenos Especiais do Centro de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz, especialmente Sueli, Fábio e Sônia pelo apoio e amizade conquistada nesse período.

Aos amigos e colegas do Centro de Bacteriologia pelos momentos de descontração e apoio.

Às amigas de mestrado e da vida a partir de agora, Ana Paula, Juliana Failde, Juliana Pinhata e Nathália pelas conversas, risadas e convivência durante esses anos.

Às minhas amigas Georgia, Priscila, Mariana, Juliana e Luiza pelo apoio e conselhos.

Às amigas de colégio, que sempre estiveram presentes mesmo de longe e também participaram desta conquista.

À Maria Fernanda, minha companheira de todas as horas, literalmente, que passou por tudo junto comigo, desde as coisas boas quanto as ruins. O dia-a-dia no laboratório, as conversas, conselhos e brigas. Uma amiga que nasceu no trabalho mas que levarei para a vida toda.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Este trabalho teve o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo 2012/21709-5 (Projeto Regular) e processo 2012/06828-8 (bolsa de mestrado). O treinamento no laboratório de Doenças Infecciosas da Universidade de Pittsburgh, sob orientação do Dr. Yohei Doi, teve apoio financeiro do Forgy International Center Global Infectious Disease Research Program grant, National Institute of Health (D43TW006592; principal investigador, Lee H. Harrison).

RESUMO

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma enzima que confere resistência a todos os beta-lactâmicos incluindo os carbapenêmicos. Surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC foram primeiramente descritos em Nova York (2004) e se disseminaram, relatos indicam que estas bactérias produtoras de KPC são prevalentes no mundo. Em 2005, foi isolada pela primeira vez no Brasil uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC, e a partir de 2009 se disseminou para vários hospitais no Estado de São Paulo, assim como para outros Estados. O objetivo deste estudo foi analisar a diversidade genética de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de vários hospitais do Estado de São Paulo através das técnicas de MLST e PFGE. Um total de 100 cepas de *K. pneumoniae*, provenientes de vários hospitais do Estado de São Paulo, encaminhadas ao Instituto Adolfo Lutz e previamente confirmadas em nosso laboratório como *K. pneumoniae* produtora de KPC foram selecionadas e submetidas às técnicas de PFGE e MLST. Foram detectados 13 perfis de PFGE, sendo o perfil A o mais dominante, encontrado em 61% dos isolados. O MLST apresentou 8 sequence type diferentes sendo o ST437 o mais predominante encontrado em 73% dos isolados, seguido pelo ST11 (11%), ST340 (7%), ST258 (3%), ST442 (2%) e ST101 (1%), também foram descritos 2 novos STs, o ST1044 e ST1046. Os dados de PFGE e MLST mostraram como as cepas se disseminaram tanto entre hospitais como entre cidades, aumentando a disseminação dos mecanismos de resistência presentes nesses isolados, como produção de ESBL, carbapenemase e metilases 16S rRNA. Os ST437, ST11, ST340 e ST258, pertencem ao mesmo complexo clonal denominado CC258 disseminado mundialmente e associado com a produção de KPC e CTX-M. Foi observada a predominância de um tipo de clone pertencendo ao ST437 e ao perfil A de PFGE em 59% dos isolados, o que pode sugerir uma certa correlação entre os dados de PFGE e MLST, no entanto houve casos em que dentro do mesmo ST foram observados perfis de PFGE diferentes e dentro do mesmo perfil de PFGE, ST diferentes.

ABSTRACT

KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) is an enzyme that confers resistance to all beta-lactams, including carbapenems. *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC causing nosocomial outbreaks were first reported in New York (2004) and nowadays this KPC-producing microorganism is disseminated worldwide. KPC-producing *K. pneumoniae* isolated in 2005 was first described in Brazil and from 2009 has spread through several hospitals in Sao Paulo State, as well as other states. The aim of this study was to evaluate the genetic diversity of KPC-producing *K. pneumoniae* isolates from several hospitals in Sao Paulo State performing MLST and PFGE to detect clonal spread within and among hospitals. A total of 100 isolates of *K. pneumoniae* from several hospitals in Sao Paulo State sent to Adolfo Lutz Institute and previously confirmed in our laboratory as KPC producers were selected and subjected to Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) and Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Eleven PFGE profiles were detected and the profile A was the prevalent, found in 61% of the strains. MLST showed 8 different sequence types (ST) and the ST437 was predominant in 73% of the isolates, followed by ST11 (11%), ST340 (7%), ST258 (3%), ST442 (2%) E ST101 (1%) and two new STs were described, ST1044 and ST1046. PFGE and MLST data showed how strains are disseminated among hospitals and among cities increasing the dissemination of resistance mechanisms such as ESBL-producing, carbapenemases and 16S rRNA methylases. ST437, ST11, ST340 and ST258 belong to the same clonal complex denominated CC258 that are globally disseminated and associated with the production of KPC and CTX-M. The prevalence of the clone belonging to ST437 and to the PFGE A profile was observed in 59% of the isolates. This may suggest a correlation between PFGE and MLST results, although it was observed different PFGE profiles in the same ST and different ST in the same PFGE profile.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β	Beta
μ	Micro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar (10^{-6} molar)
A	Adenina
ACT	"AmpC Type"
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AmpC	Beta lactamase de classe C de Ambler
AMX	Amoxicilina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AT	Aztreonam
ATM	Aztreonam
BGN	Bacilo Gram negativo
BJM	Bush, Jacoby e Medeiros
<i>bla</i>	Beta lactamase
C	Citosina
CARB	Carbenicillin-hydrolyzing beta lactamase
CAU	Metalo beta lactamase de <i>Caulobacter vibrioides</i>
CAZ	Ceftazidima
CC	"Clonal Complex"
CDC	"Center of Disease Control and Prevention"
CepA	Cefalosporinase endógena de <i>Bacteroides fragilis</i>
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
cm	Centímetro
CMY	"Cephamycinase"
CphA	Metalo beta lactamase da subclasse B2 de <i>Aeromonas hydrophila</i>
CT	Cefotaxima
CTM	"Complex Mutant of TEM"
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefoxatimase, Monique
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
ESBL	Extended Spectrum Beta Lactamase" (Beta lactamase de amplo espectro)
ETP	Ertapenem
F	"Foward"
FEZ	Metalo beta lactamase da subclasse B3 de <i>Legionella (Fluoribacter) Gormanii</i>

FOX	Cefoxitinase
g	Gravidade
G	Guanina
gapA	Glyceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GES	“Guiana Extended Spectrum”
GM	Gentamicina
GOB	Metalo beta lactamase da subclasse B3 de <i>Elizabethkingia meningoseptica</i>
h	Horas
I	Intermediário
IMI	Imipenem hydrolising beta lactamase
IMP	Imipenemase
IMP	Imipenem
IND	Metalo beta lactamase de <i>Chryseobacterium indologenes</i>
infB	Fator 2 de início da tradução
IP	Imipenem
kb	Kilo bases
KPC	<i>Klebsiela pneumoniae</i> carbapenemase
L	Litro
L1	Metalo beta lactamase da subclasse B3 de <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
M	Molar
Mb	Mega bases
MBL	Metalo Beta Lactamase
mdh	Malato desidrogenase
MER	Meropenem
mg	Miligramas
min	Minutos
MIR	"Miriam Hospital"
mL	Mililitro
MLST	“Multi Locus Sequence Type”
mm	Milímetro
MP	Meropenem
NDM	New Delhi metalo-betalactamase
NmcA	Not metalloenzyme carbapenemase
NT	Nota técnica
°C	graus Celsius
OXA	Oxacilinas
PBP	Penicilin Binding Protein” (Proteína ligadora de penicilina)
PC1	Beta lactamase de <i>Staphylococcus aureus</i>
PCR	“Polimerase Chain Reaction” (Reação de polimerase em cadeia)
PEG	Polietilenoglicol
PER	“ <i>Pseudomonas</i> Extended Resistance”
PFGE	Pulsed Field Gel Eletrophoresis
Pgi	Fosfoglicose isomerase

phoE	Fosfoporina B
PM	Cefepime
PO	Polimixina B
PSE	" <i>Pseudomonas</i> specific enzymes"
PTc	Piperacilina–tazobactam
R	Resistente
R	"Reverse"
rpm	Rotações por minuto
rpoB	Sub-unidade beta do RNA polimerase B
rRNA	Ácido ribonucleico ribossômico
RTG	Enzyme with RTG (arginine, threonine e glycine)
S	Sensível
s	Segundos
SFC	<i>Serratia fonticola</i> carbapenemase
Sfh	Metalo beta lactamase da subclasse B2 de <i>Serratia fonticola</i>
SHV	"Sulphydryl Variation"
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SPM	São Paulo metalo-beta-lactamase
ST	"Sequence Type"
T	Timina
T	Transmitância
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tris-EDTA
TEM	Temoneira
TGC	Tigeciclina
TM	Tobramicina
tonB	Transdutor de energia periplasmática
TSA	Tryptic Soy Agar
TZ	Ceftazidima
TZP	Piperacilina–tazobactam
U	Unidades
UPGMA	"Unweighted pair group method with arithmetic mean"
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
V	Volts
VEB	"Vietnam Extended Spectrum Beta Lactamase"
VIM	Verona Integron-encoded metallo beta lactamase

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação das beta-lactamases segundo BJM (2010) e Ambler (1989)	20
Tabela 2 – Classificação das carbapenemases segundo Ambler.....	22
Tabela 3 - Primers de PCR e sequenciamento utilizados para realização do MLST em relação a cada gene.....	37
Tabela 4 – Condições de ciclagem no termociclador para cada gene	38
Tabela 5 – Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de KPC.....	43
Tabela 6 – Subtipos de perfis de restrição de PFGE observados nos hospitais com 2 ou mais subtipos	48
Tabela 7 – Subtipos de perfis de restrição de PFGE e hospitais nos quais eles foram detectados.....	49
Tabela 8 – Combinações dos 7 genes “housekeeping” que deram origem aos STs de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC.	54

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Epidemiologia de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no mundo outras cabapenemases incluem VIM, OXA-48 ou NDM..... 24
- Figura 2- Distribuição dos STs de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC no Brasil segundo estudo de Pereira et al (2013). 29
- Figura 3- Número de amostras distribuídas pelas cidades do Estado de São Paulo dos 100 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC 41
- Figura 4 – Mapa do Estado de São Paulo mostrando as cidades das quais foram obtidas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC. 42
- Figura 5 – Fonte de isolamento dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo..... 42
- Figura 6 – Perfis de restrição de PFGE dos 100 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo 44
- Figura 7- Distribuição dos perfis de restrição de PFGE de 100 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC entre as diferentes cidades..... 45
- Figura 8 – Dendrograma mostrando o perfil A de PFGE das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes de diversos hospitais do Estado de São Paulo, digeridas com a enzima de restrição XbaI com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número da amostra, a data do isolamento, o número do hospital, ST, perfil de PFGE, cidade, fonte de isolamento e subtipo de PFGE. 46
- Figura 9 – Dendrograma indicando os outros perfis de PFGE observados nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de pacientes de diversos hospitais do Estado de São Paulo, digeridas com a enzima de restrição XbaI com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número da amostra, a data do isolamento, o número do hospital, ST, perfil de PFGE, cidade, fonte de isolamento e subtipo de PFGE. 47
- Figura 10 – Hospitais que apresentaram mais de um subtipo de perfil de restrição de PFGE entre os 100 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC..... 48
- Figura 11 - Número de hospitais com o mesmo subtipo perfis de restrição de PFGE entre os 100 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC. 49
- Figura 12 – Mapa das cidades que apresentaram o mesmo subtipo de perfis de restrição de PFGE..... 50
- Figura 13 – “Population snapshot” dos STs de *K. pneumoniae* descritos até o momento, em destaque a localização dos STs detectados neste estudo. 51

Figura 14 – Porcentagem dos STs observados nas cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtora de KPC isoladas no Estado de São Paulo.....	52
Figura 15 – Diagrama construído no programa eBURST v3 mostrando a similaridade entre os STs e formação dos complexos clonais. Na figura está representado o grupo 1 que é composto por 575 STs sendo o ST 258 o “predicted founder” e em destaque os STs observados no presente estudo.....	53
Figura 16 - STs observados nas cepas de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC entre as diversas cidades do Estado de São Paulo.	54
Figura 17 – Minimal Spanning Tree dos 100 isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC representando a relação entre os dados de PFGE e MLST, na qual os círculos representam os STs e as cores o perfil de PFGE (software Bionumerics v.7.1).	55
Figura 18 – Distribuição das 65 instituições pelas 18 cidades do Estado de São Paulo mostrando o local de onde os isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtora de KPC foram obtidos. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.	56
Figura 19 - Distribuição dos perfis de restrição de PFGE dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC pelas cidades do Estado de São Paulo participantes do estudo. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.	56
Figura 20 - Distribuição dos STs dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de KPC pelas cidades do Estado de São Paulo participantes do estudo. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.	57

Índice

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
1.2 Antimicrobianos	16
1.2.1 Mecanismos de ação	16
1.2.2 Beta-lactâmicos	17
1.3 Beta-Lactamases.....	18
1.3.1 Classificação das beta-lactamases	18
1.3.2 Carbapenemases	21
1.3.3 KPC	23
1.4 Epidemiologia molecular	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL.....	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 Seleção das cepas para o estudo.....	32
3.2 Extração de DNA.....	32
3.3 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)	33
3.3.1 Preparo das Amostras	33
3.3.2 Digestão das amostras com enzima de restrição	34
3.3.3 Preparo do gel e eletroforese	34
3.3.4 Análise dos dados	35
3.4 MLST	35
3.4.1 Amplificação dos genes de interesse.....	36
3.4.2 Purificação do produto de PCR.....	38
3.4.3 Reação com o Big Dye®	39
3.4.4 Purificação do produto do Big Dye®	39
3.4.5 Sequenciamento.....	40
3.4.6 Análise dos dados	40
4 RESULTADOS	41

4.1	PFGE.....	44
4.2	MLST.....	50
5	DISCUSSÃO	58
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
	ANEXOS.....	91

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo gram-negativo aeróbio facultativo, imóvel, não esporulado, com tamanho variando de 0,3 a 1 μ de diâmetro e 0,6 a 6 μ de comprimento, podem formar cápsula mucóide polissacarídica devido a presença de antígenos K e têm como função proteção contra ação de bactericidas e fagocitose e ajudam na aderência (Martinez et al, 2004). Os micro-organismos deste gênero podem ser encontrados em quase todos os ambientes naturais, no entanto, podem ser isolados de indivíduos como portador assintomático ou causador de doença (Scarpate & Cossatis, 2009).

As principais características bioquímicas da *Klebsiella pneumoniae* são: Voges-Proskauer positivo, produção de indol e H₂S negativos, arginina e ornitina negativos e motilidade negativo, utilização de citrato positivo, produção de urease e descarboxilação de lisina positivos e apresentam colônias mucóides (Murray et al, 2003).

Klebsiella pneumoniae pode ser saprófita em humanos, colonizando a nasofaringe e o trato intestinal, sendo que a taxa de indivíduos portadores varia de estudo para estudo, variando de 5-38% nas fezes e 1-6% na nasofaringe (Podschun & Ullmann, 1998). No ambiente hospitalar esta situação é bem diferente, a taxa de colonização aumenta para 77% nas fezes, 19% na nasofaringe. Esse aumento na taxa de colonização parece estar associado com o uso de antibióticos e ao tempo de internação (Podschun & Ullmann, 1998).

É um patógeno oportunista, o principal alvo são indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos ou que possuam uma doença de base e possui elevada prevalência entre os agentes patogênicos relacionados com

as infecções hospitalares podendo causar doença em qualquer sítio (Scarpate & Cossatis, 2009).

Já foi demonstrado que pelo menos 80% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos tiveram infecções precedidas pela colonização do trato gastrointestinal (Paterson & Bonomo, 2005).

Nas UTIs, *K. pneumoniae* é responsável por 14% das bacteremias primárias, 10% do total de infecções da corrente sanguínea, 29% dos casos de sepse, 45% das infecções de feridas, 6-8% das pneumonias comunitárias e 28% do total de todas as pneumonias (Paterson, et al, 2003). A importância desse patógeno no ambiente hospitalar é devido a capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente beta-lactamases. Livermore et al (2005) destacaram que entre os micro-organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), o gênero *Klebsiella* é o que produz a maior variedade dessas enzimas, o que pode ser explicado pelo fato destes serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae* e também à habilidade das *K. pneumoniae* produtoras de ESBL de escapar da atividade fagocítica dos polimorfonucleares neutrófilos. Já ocorreram diversos surtos causados por *K. pneumoniae* produtora de ESBL, inicialmente na Europa, nos EUA, na Ásia e na América do Sul. Os surtos causados por este micro-organismo produtor de ESBL geralmente decorrem de transferências de pacientes entre unidades de internação e/ou entre hospitais ou podem estar associados ao uso abusivo de β -lactâmicos que poderão exercer pressão seletiva favorecendo o crescimento de cepas produtoras de ESBL (Paterson, et al., 2003).

Antimicrobianos do grupo dos carbapenêmicos são considerados como droga de escolha para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Desta forma a pressão exercida pelo uso excessivo deste tipo de antimicrobiano levou os micro-organismos a desenvolverem mecanismos de resistências aos carbapenêmicos, sendo a produção de carbapenemase o principal deles. A produção de

carbapenemase por esses micro-organismos se tornou preocupação mundial. O isolamento de micro-organismos produtores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), uma das principais carbapenemases, é uma preocupação no ambiente hospitalar, pois limitou ainda mais a escolha de antimicrobianos para o tratamento dessas infecções. A maioria dos produtores de carbapenemase são *K. pneumoniae* ou *E. coli*, e embora elas sejam mundialmente identificadas, existem algumas áreas endêmicas, como KPC nos Estados Unidos, Grécia e Israel (Nordmann et al, 2009), OXA-48 no norte da África Turquia (Nordmann et al, 2011) e NDM na Índia subcontinental e possivelmente os Balcãs (Nordmann et al, 2009).

1.2 Antimicrobianos

Antibióticos ou antimicrobianos são substâncias químicas produzidas por micro-organismos ou de forma sintética, com capacidade de inibir ou matar micro-organismos (Rossi, 2005). São classificados nas seguintes classes: beta-lactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, macrolídeos, lincosamida, tetraciclina, fenicol, quinolonas, sulfas e polimixinas, baseando-se no mecanismo de ação sobre a célula bacteriana e sua estrutura química, (Rossi, 2005). Entre estas classes, as mais utilizadas para o tratamento de infecções por Bacilo Gram-negativo (BGN) estão os beta-lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas e polimixina.

1.2.1 Mecanismos de ação

Os principais mecanismos de ação dos antimicrobianos são: efeito sobre a síntese da parede celular, inibição da síntese protéica, efeito sobre a estrutura e função da membrana celular, interferência na síntese do ácido

nucléico e atividade antimetabólica ou competitividade antagônica (Rossi, 2005).

Os antibióticos que tem efeito na parede celular, como os beta-lactâmicos, se ligam as PBPs (proteínas ligadoras de penicilina). As PBPs são carboxipeptidases localizadas na membrana citoplasmática que atuam na etapa de estruturação do peptidoglicano, constituinte essencial da parede celular bacteriana (Spratt et al, 1988). Elas atuam como sítio alvo para a atividade dos beta-lactâmicos que se ligam as PBPs impedindo a formação da parede celular e causando a lise da célula bacteriana (Spratt et al, 1988).

Os que inibem a síntese protéica interagem com alvos específicos localizados no ribossomo, como os aminoglicosídes que se ligam ao sítio A (aminoacil) do 16S rRNA na subunidade 30S do ribossomo interferindo no processo de translocação inibindo a síntese protéica (Magnet & Blanchard, 2005).

1.2.2 Beta-lactâmicos

O grupo dos beta-lactâmicos reúne alguns dos antimicrobianos mais importantes e mais utilizados na prática clínica para o tratamento de infecções hospitalares e comunitárias, pertencendo a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (Sanders & Sander, 1992). Todos esses antimicrobianos têm em comum a presença de um anel β -lactâmico na sua estrutura e a inibição da síntese da parede celular como principal mecanismo de ação (Rossi, 2005).

Os micro-organismos desenvolveram diversos mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos: perda ou expressão reduzida de porinas (cromossomais), alterações nas PBPs (cromossomais), super expressão de bombas de efluxo (cromossomais) e produção de beta-lactamases (cromossomais e/ou plasmidiais).

As porinas são responsáveis pela difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e da saída de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido, 1994), assim a diminuição ou perda da expressão dos genes que as codificam impede a entrada do antimicrobiano levando a uma diminuição da concentração interna da droga na célula bacteriana que pode conferir resistência aos beta-lactâmicos (Quinn et al, 1988).

As bombas de efluxo são responsáveis pela expulsão de substâncias que poderiam destruir a bactéria era considerado um mecanismo intrínseco (Li et al, 1995; Piddock, 2006). No entanto já foi relatado esse mecanismo mediado por plasmídeo (Rincón et al, 2014).

A produção de beta-lactamases é o mecanismo de resistência mais comum para essa classe de antimicrobianos, principalmente em microorganismos Gram-negativos (Bush & Jacoby, 2010). Essas enzimas degradam o anel beta-lactâmico, inativando a ação do antibiótico sobre a parede celular. Os genes que determinam a produção das beta-lactamases podem estar localizados no cromossomo bacteriano ou em elementos móveis como os plasmídeos e transposons (Chroma et al, 2010). Esses elementos móveis podem facilmente se disseminar para outras bactérias em um hospital, carregando com eles os genes de resistência à maioria das classes de antimicrobianos (Bush et al, 2011)

1.3 Beta-Lactamases

1.3.1 Classificação das beta-lactamases

Primeiramente, as beta-lactamases foram classificadas de acordo com a sequência de aminoácidos, como proposto por Ambler, que as separava em 4 classes denominadas de A a D. Nas classes A, C, e D estão o grupo das enzimas que possuem um aminoácido serina no centro ativo da

enzima e, na classe B, estão as enzimas que necessitam do zinco como cofator para atividade enzimática (Livermore, 1995).

Uma outra classificação proposta por Bush, Jacoby e Medeiros (1995) separa as beta-lactamases em 4 grupos de acordo com o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de beta-lactamases. Revisada por Bush e Jacoby em 2010, a tabela 1 mostra como foram divididas as beta-lactamases de acordo com as duas classificações.

Tabela 1 - Classificação das beta-lactamases segundo BJM (2010) e Ambler (1989)

Classificação Bush, Jacoby, Medeiros (2010)		Classificação Ambler (1989)	Substrato	Características	Representantes
Grupo funcional	Subgrupo	Classe Molecular			
1		C	Cefalosporinas	Resistência a todos os beta-lactâmicos, exceto carbapenêmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico	AmpC (ACT-1, FOX, MIR-1, CMY-2, etc)
2	Inibidas pelo Ácido Clavulânico				
	2 ^a	A	Penicilina	Penicilases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Confere altos níveis de resistência a penicilina	PC1
	2b	A	Penicilinas e cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a geração	Beta-lactamases de espectro limitado de bactérias gram-negativas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
	2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Beta-lactamases de espectro estendido	ESBL (TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB, etc)
	2br	A	Penicilina	Beta-lactamase resistentes aos inibidores de beta-lactamases	TEM-30, SHV-10
	2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos	Beta-lactamase de espectro estendido com relativa resistência a inibição por ácido clavulânico	TEM-50 (CMT-1)
	2c	A	Carbenicilina	Enzimas que hidrolizam a carbenicilina	PSE-1, CARB-3
	2ce	A	Carbenicilina e cefepime	Carbenicilase de amplo espectro com atividade contra cefepime e ceftirome	RTG-4
	2d	D	Oxacilina	Enzimas que hidrolizam a oxacilina, possuem pouco efeito contra carbenicilina e são levemente inibidas pelo ácido clavulânico	OXA-1, OXA-10
	2de	D	Oxacilina e cefalosporinas de amplo espectro	Oxacilinas com espectro estendido que hidrolisam oxamino-beta-lactâmicos mas não carbapenêmicos	OXA-11, OXA-15
	2df	D	Oxacilina e carbapenêmicos	Oxacilinas que hidrolisam carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Cefalosporinas de espectro estendido que possuem pouca afinidade com aztreonam	CepA
	2f	A	Carbapenêmicos	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos	KPC, IMI-1, SME, GES-3, GES-4 GES-5
3	3 ^a	B	Carbapenêmicos	Hidrólise de amplo espectro incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas mas não monobactam	IMP, VIM, SPM, IND, NDM
	3b	B	Carbapenêmicos	Hidrolisa preferencialmente carbapenêmicos a cefalosporinas e penicilinas	L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1, CphA, Sfh-1
4	NI		Desconhecido	Desconhecido	

NI – Não inclui. Em destaque as principais beta-lactamases produzidas por BGN

1.3.2 Carbapenemases

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) são os antimicrobianos de escolha para o tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos antimicrobianos de primeira linha, ou seja, as produtoras de ESBL (Paterson, 2006). O crescente aumento no uso de carbapenêmicos se deve ao fato de BGN produtores de ESBL também apresentarem resistência a outras classes de antimicrobianos, tais como, aminoglicosídeos, quinolonas, sulfametoxazol-trimetoprim e tetraciclina (Walsh, 2010).

Devido a pressão exercida pelo uso abusivo dos carbapenêmicos, os micro-organismos desenvolveram mecanismos de resistência à ação dos carbapenêmicos, como a produção de ESBL ou super expressão de AmpC associada à perda de porina e principalmente produção de carbapenemase (Livermore, 2012).

Carbapenemases são beta-lactamases com a capacidade de hidrolisar a maioria dos beta-lactâmicos incluindo os carbapenêmicos (Cantón et al, 2012). A produção de carbapenemase tem aumentado significativamente no mundo todo, este fato pode ser devido a localização dos genes que codificam essas enzimas, eles se localizam geralmente em plasmídios, que são elementos móveis do DNA bacteriano e se disseminam rapidamente (Krisztina et al, 2011). O mais preocupante com relação aos plasmídios é que eles podem carregar mais de um tipo de mecanismo de resistência a outras classes de antimicrobianos. Desta forma a produção de carbapenemase pode vir acompanhada de outros tipos de mecanismos de resistência restringindo ainda mais as opções de tratamento (Cantón et al, 2012; Nordmann & Poirel, 2012).

De acordo com Ambler, as carbapenemases podem ser divididas em 3 grupos conforme mostra a tabela 2.

Tabela 2 – Classificação das carbapenemases segundo Ambler

Classificação de Ambler (1989)	Características	Representantes
A	Algumas são cromossomais (NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1) outras plasmidiais (KPC, IMI-2, GES). Todas hidrolisam os carbapenêmicos e são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico.	NmcA, Sme, IMI-1, SFC-1, KPC, GES
B	Metallo carbapenemases, hidrolisam todos os beta-lactâmicos exceto aztreonam. Sua atividade é inibida por EDTA e não por ácido clavulânico. Os níveis de resistência aos carbapenêmicos variam muito	VIM, IMP, NDM, SPM
D	Oxacilinasas que hidrolisam carbapenêmicos	OXA-23, OXA-40, OXA-58, OXA-48

O perfil de resistência desses micro-organismos depende de quais outras enzimas estão sendo produzidas juntamente com a carbapenemase, na maioria das vezes eles co-produzem ESBLs.

O primeiro passo para a detecção de micro-organismos produtores de carbapenemases é baseado na análise do teste de sensibilidade. Dentre os carbapenêmicos, o ertapenem é o melhor marcador para produtores de carbapenemase, pois as CIM de ertapenem são geralmente maiores que os de imipenem e meropenem (Vading et al, 2010). A nota técnica da ANVISA recomenda que isolados com valores de CIM $\geq 0,5$ mg/L para ertapenem merecem maiores investigações para a detecção de carbapenemase. Outra observação que deve ser feita nos testes de sensibilidade é a heterorresistência aos carbapenêmicos, característica de isolados produtores de KPC, este fenômeno pode ser detectado pela presença de subpopulações resistentes aos carbapenêmicos dentro do halo de inibição (Falagas et al, 2008).

Existem diversos testes fenotípicos para detecção de produtores de carbapenemases, porém nenhum deles possui 100% de sensibilidade e especificidade. Em 2013, a ANVISA lançou uma nota técnica para orientação das medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes e recomenda o uso de teste fenotípico com inibidores para a detecção de carbapenemase. Neste teste utiliza-se o EDTA para a detecção de metallo-betalactamases, ácido fenilborônico para a detecção de KPC e cloxacilina para as AmpCs plasmidiais.

Técnicas moleculares continuam sendo os métodos padrão para a detecção de carbapenemases, principalmente através de PCR. Para um diagnóstico epidemiológico, pode ser feito sequenciamento do produto de PCR para a caracterização da carbapenemase (Naas et al, 2011).

1.3.3 KPC

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é uma enzima que confere resistência a todos os beta-lactâmicos incluindo os carbapenêmicos. É classificada no grupo 2f de Bush e na Classe A de Ambler (Queenan, Bush, 2007). Foi relatada pela primeira vez em isolados da Carolina do Norte em 1996 (Yigit *et al*, 2001). Embora esta enzima seja encontrada principalmente em *K. pneumoniae*, a KPC já foi identificada em várias outras bactérias Gram-negativas, tais como *Citrobacter freundii* (Deshpande *et al*, 2006; Rasheed *et al*, 2008), *Enterobacter aerogenes* (Bratu *et al*, 2005), *Enterobacter cloacae* (Bratu *et al*, 2005; Deshpande *et al*, 2006), *Enterobacter gergoviae* (Deshpande *et al*, 2006), *Escherichia coli* (Bratu *et al*, 2007; Navon *et al*, 2006), *Klebsiella oxytoca* (Yigit *et al*, 2003), *Salmonella enterica* (Miriagou *et al*, 2003), *Serratia marcescens* (Deshpande *et al*, 2006) e outras *Enterobacteriaceae*, além de *Pseudomonas aeruginosa* (Villegas *et al*, 2007) e *Acinetobacter baumannii* (Robledo *et al*, 2010).

Surtos de *K. pneumoniae* associados a KPC foram primeiramente descritos em Nova York (Bratu *et al*, 2005; Woodford *et al*, 2004), contudo relatos indicam que estas bactérias produtoras de KPC estão disseminadas no mundo. A produção de KPC em *Enterobacteriaceae* foi identificada em pelo menos 39 Estados dos EUA (Center for Disease Control and Prevention 2012), no Canadá (Pillai *et al*, 2009), Colômbia, (Mojica *et al*, 2012), Argentina (Pasteran *et al*, 2008), Reino Unido (Livermore *et al*, 2008), Irlanda (Roche *et al*, 2009), Espanha (Curiao *et al*, 2010), Portugal em água de rio (Poirel *et al*, 2012), França (Naas *et al*, 2005), Itália (Giani *et al*, 2009), Polônia (Baraniak *et al*, 2009), Grécia (Cuzon *et al*, 2008; Tegmark *et al*,

2007), Noruega e Suécia (Samuelsen et al, 2009), Finlândia (Österblad et al, 2012), Israel (Kitchel et al, 2009; Navon-Venezia et al, 2009), Índia (Jones et al, 2009), China (Wei et al, 2007), Japão (Yamane, 2012), Austrália e Nova Zelândia (Price et al, 2013). A figura 1 mostra a situação epidemiológica da *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no mundo. (Price e al, 2013)

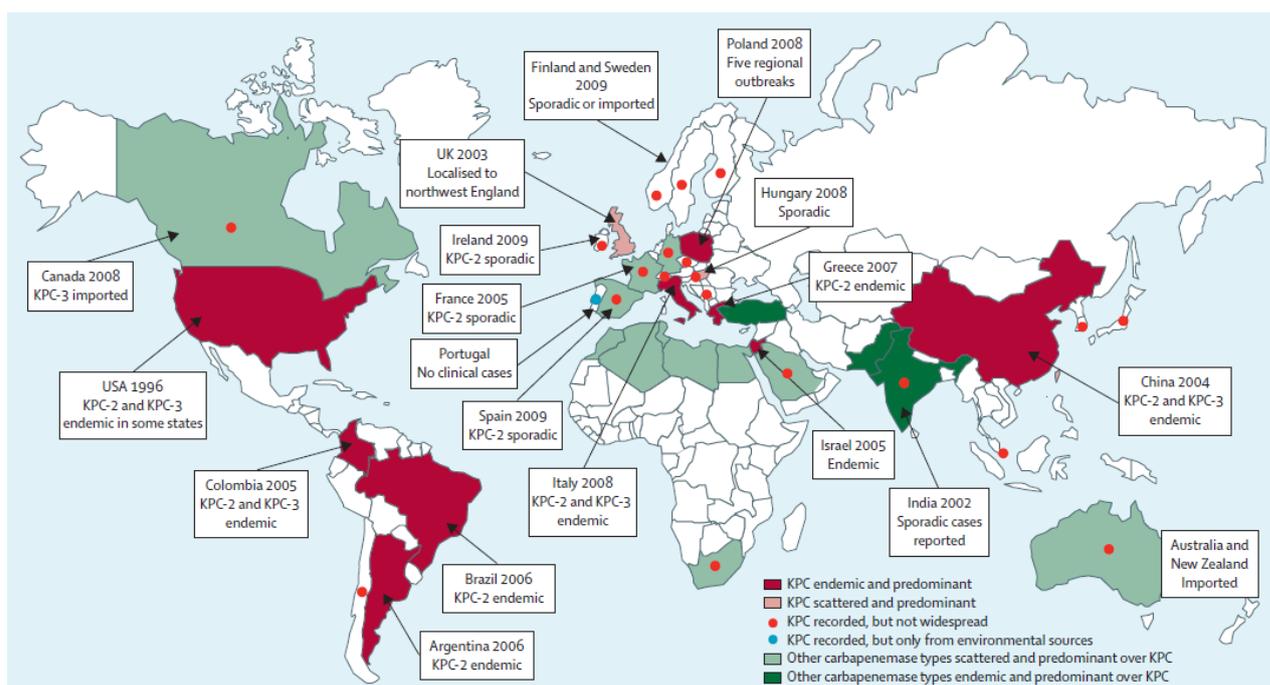


Figura 1 – Epidemiologia de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no mundo outras cabapenemases incluem VIM, OXA-48 ou NDM (Price et al, 2013).

No Brasil, a primeira publicação de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC foi em 2009 em isolados de 2006 em Recife (Monteiro et al, 2009), no entanto publicação posterior mostrou que a KPC já estava no Brasil em 2005, em isolados de São Paulo (Pavez et al, 2009). A produção de KPC já foi detectada no Rio de Janeiro (Peirano et al, 2009), Mato Grosso do Sul (Chang et al, 2013), Paraíba (Fehlberg et al, 2012), Porto Alegre, Brasília (Nicoletti et al, 2012) Espírito Santo, Minas Gerais, Goiás (Seki et al, 2011). Baseado no resultado do SENTRY (Gales et al, 2012) e nos outros achados pelo país, *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 é endêmica no Brasil, com

descrição desses micro-organismos em surtos de infecção hospitalar (Abboud et al, 2011; Garcia DO, 2010; Naves et al, 2011; Pereira et al, 2011), em esgoto de hospital (Chagas et al, 2011) e água de rio (Oliveira et al, 2014).

Já foram descritos 21 tipos de KPC (KPC-1 a KPC-22), sendo que KPC-1 e KPC-2 são considerados o mesmo tipo (<http://www.lahey.org/studies/>, acesso em 01/10/2014). O gene que codifica a KPC é o *bla_{KPC}* mediado por plasmídeo e está localizado num transposon, Tn4401 (Naas et al, 2008), sendo que a facilidade de mobilidade deste mecanismo de resistência é uma grande preocupação, pois facilita a sua disseminação por entre as cepas (Kitchel et al, 2009).

Em 2008 foi identificada na Suécia uma nova metalo-beta-lactamase, de uma paciente hospitalizada na Índia, esta nova enzima foi denominada NDM (New Delhi metalo-beta-lactamase (Yong et al, 2009). É uma carbapenemase de amplo espectro, com poder de hidrolisar todos os beta-lactâmicos exceto o aztreonam, no entanto a maioria dos micro-organismos produtores de NDM também coproduzem outras beta-lactamases que hidrolisam o aztreonam, dessa forma esses micro-organismos são resistentes a todos os beta-lactâmicos (Shakil et al, 2011). Desde então esta enzima tem se tornado de grande importância mundial, pois além do seu alto poder de resistência o gene que a codifica está em um elemento móvel com grande capacidade de disseminação e seu padrão de disseminação é muito mais complexo e imprevisível quando comparado ao gene que codifica a KPC (Bonomo, 2011).

Devido a essa capacidade de rápida disseminação, Patel & Bonomo (2013) acreditam que a NDM está prestes a se tornar a carbapenemase mais isolada no mundo, pois segundo Johnson & Woodford (2013), desde seu primeiro relato, ela já foi relatada em mais de 40 países ao redor do mundo. No Brasil ela foi primeiramente relatada em 2013 em isolados do Rio Grande do Sul de *Providencia rettgeri* (Carvalho-Assef et al, 2013).

Outra carbapenemase que tem aumentado sua importância é a OXA-48, pertencente à classe D de Ambler. As enzimas pertencentes a este

grupo são frequentemente encontradas nas espécies de *Acinetobacter*, no entanto a OXA-48 foi identificada somente em espécies da família *Enterobacteriaceae* (Poirel et al, 2012). Esta enzima hidroliza penicilinas e carbapenêmicos, mas não tem ação sobre cefalosporinas de espectro estendido, porém os isolados produtores de OXA-48 muitas vezes co-produzem ESBLs tornando esses isolados resistentes a todos os beta-lactâmicos (Poirel et al, 2012). Ela foi identificada pela primeira vez em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2004 (Poirel et al, 2004) e a partir daí foi identificada também em outros micro-organismos, como *Citrobacter freundii* (Saïdani et al, 2012) e *E. coli* (Goren et al, 2011). Já foi relatada em diversos países como Bélgica (Glupczynski et al, 2012), França, Alemanha, Espanha, Holanda, Reino Unido e no norte da África (Nordmann et al, 2011). Relatos recentes indicam que *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 são endêmicas na Turquia e em países do norte da África como Marrocos e Tunísia (Nordmann et al, 2011). A OXA-48 é a carbapenemase mais difícil de ser detectada fenotipicamente, desta forma sua verdadeira prevalência pode ser subestimada e sua taxa de mortalidade associada a infecções com produtores de OXA-48 é desconhecida (Nordmann et al, 2012).

1.4 Epidemiologia molecular

Para melhor caracterização das cepas e mapeamento da disseminação deste tipo de resistência é importante realizar a caracterização genotípica dessas cepas e determinar seu perfil e a distribuição dos clones. A tipagem de Multi Locus Sequence Type (MLST) é muito utilizada atualmente, pois permite a comparação dos “Sequence Type” ou sequência tipo (ST) com outras ao redor do mundo (Woodford et al, 2011).

Em 2005, Diancourt et al, padronizaram a técnica de MLST para a tipagem epidemiológica de *K. pneumoniae*, utilizando 7 genes “housekeeping” e a partir da combinação gerada pelo sequenciamento

desses genes foi se dando nome às STs observadas, seguida do número (ST1, ST2, etc). Até o momento foram descritos 1677 STs (http://www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?file=klebs_profiles.xml, acesso em 30/09/2014).

O MLST é indicado para estudos evolucionários e para comparação de isolados, mas pode não ser tão eficiente na análise de surtos (Van Belkum et al., 2007; Diancourt et al., 2010). Como resultado desta tipagem foram definidos os principais “Sequence Type” (ST) e complexos clonais (CCs) de importância em uma série de espécies, como por exemplo, *K. pneumoniae* ST258, associada com a produção de KPC e *K. pneumoniae* comunitária do CC23 associada com doença invasiva (Baraniak et al, 2009; Brisse et al, 2009; Kitchel et al, 2009; Samuelsen et al, 2009). A relação entre os vários STs e CCs pode ser feita e vista através dos diagramas do e-BURST (<http://eburst.mlst.net/>, acesso em 25/02/2014).

O clone predominante no mundo é o ST258 e está associado à produção de KPC, mas não restrita a ela, pois já foi encontrado ST258 em cepas não produtoras de KPC em Israel (Adler et al, 2012). O ST258 foi primeiramente descrito em isolados da Noruega e Suécia, no entanto esses pacientes eram transferidos da Grécia e Israel (Samuelsen et al, 2009), a partir daí o ST258 têm sido descrito em diversos países como Estados Unidos (Kitchel et al, 2009), Canadá (Pillai et al, 2009), Itália (Giani et al, 2009), Irlanda (Roche et al, 2009), Finlândia (Österblad et al, 2009), Polônia (Baraniak et al, 2009), Bélgica (Bogaerts et al, 2010), Dinamarca (Hammerum et al, 2010), Hungria (Tóth et al, 2010), Argentina (Gomez et al, 2011), Colômbia, (Mojica et al, 2012).

Outro ST que têm aumentado sua importância é o ST11, descrito pela primeira vez em 2005 por Diancourt et al. Este ST apresenta apenas um locus diferente do ST258 (gene *tonB*) e já foi associado com a produção de ESBL do tipo CTX-M15 na Hungria (Damjanova et al, 2008), Grécia (Voulgari et al, 2013), Hong Kong, Indonésia, Coreia do Sul, Malásia, Singapura, Tailândia (Lee et al, 2011), Turquia, Argentina, e Índia (Lascols et al, 2013). De acordo com Li et al (2011) o ST11 tem a capacidade de

capturar e acumular vários tipos de resistência, relataram também a co-produção de KPC-2 e metilase 16s rRNA RmtB em isolados de um hospital na China e também houve outros relatos de co-produção como OXA-48 e CTX-M15 na Turquia e Argentina (Lascols et al, 2013), NDM-1 e CTX-M15 na Índia (Lascols et al, 2013). O ST11 associado à produção de KPC também já foi relatado em Singapura (Balm et al, 2012), China (Qi et al, 2011), Taiwan (Lee et al, 2012; Chiu et al, 2013), Argentina (Castanheira et al, 2012) e Polônia (Baraniak et al, 2009).

No Brasil, já foram identificados diversos STs. Andrade et al (2011) identificaram pela primeira vez o ST258, associado a um surto em Ribeirão Preto (SP), além disso, também encontraram os ST11 e ST437 que são um locus variante do ST258 (*tonB*) em isolado de 2007 a 2009. No entanto, Seki et al (2011) descreveram o ST11 em isolados de 2006, o que mostra sua circulação aqui no Brasil antes mesmo do ST258 e mostraram predominância do ST437 em isolados do Rio de Janeiro. Em isolados de 2010 além dos ST11 e ST437, também foi descrito o ST340 que também é um locus variante do ST258 (*tonB*) (Pereira et al, 2013). Os ST340 e ST437 também foram observados em água de rio na cidade de São Paulo (Oliveira et al, 2014) mostrando a disseminação de um mesmo complexo clonal (CC258) composto pelos ST (11, 258, 437, 340) dentro do Brasil. A figura 2 mostra a distribuição dos STs no Brasil segundo estudo de Pereira et al (2013).

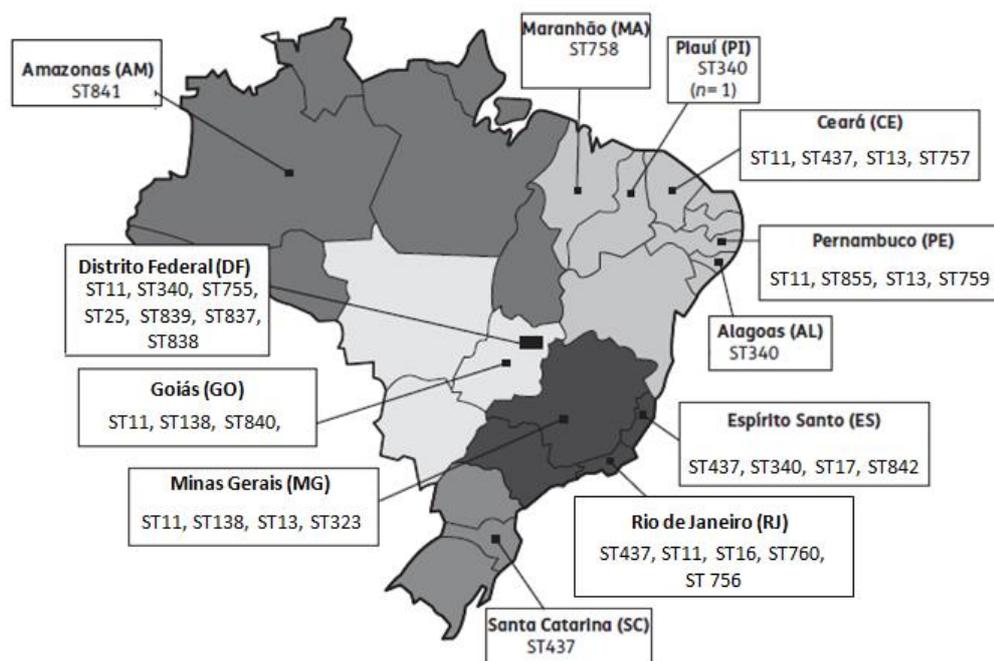


Figura 2- Distribuição dos STs de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC no Brasil segundo estudo de Pereira et al (2013).

A eletroforese em campo pulsado (Pulsed field gel electrophoresis – PFGE) é outro método utilizado para analisar esses clones, pois uma vez que todo o seu genoma será verificado é possível encontrar algumas diferenças entre as cepas pertencentes ao mesmo Sequence Type, no entanto não é um método reprodutivo, dificultando a comparação dos dados interlaboratoriais.

Este método analisa padrões de macro restrição do DNA genômico através de duas etapas: digestão e migração do DNA genômico utilizando enzimas com baixa frequência de corte e a eletroforese. A eletroforese de campo pulsado é baseada na eletroforese convencional, no entanto o pulso elétrico muda periodicamente de direção e/ou intensidade. Este tipo de eletroforese consegue separar moléculas de DNA maiores que 12Mb enquanto que a eletroforese unidirecional consegue separar moléculas de no máximo 50 kb (Dijkshoorn et al, 2001).

A disseminação de um mesmo clone em vários hospitais do Estado de São Paulo observada pelo PFGE já foi descrita (Garcia et al, 2010; Naves

et al, 2011). No entanto, os dados sobre o ST predominante no Estado de São Paulo são escassos. Andrade et al (2011) descreveram o ST258 em duas cidades do Estado (n=53), sendo que em uma delas o ST258 foi relacionado com um surto. Em 2012, Nicoletti et al relacionaram os ST437 e ST11 aos isolados de São Paulo, assim como Castanheira et al (2012) que observaram o ST437 como maioria nos isolados de São Paulo estudados (n=12). Os estudos disponíveis sobre os clones circulantes no Estado de São Paulo apresentam número pequeno de isolados ou de apenas uma cidade do Estado.

Sendo assim poderemos diferenciar os STs e analisar a disseminação dos clones intra e inter hospitalares no Estado de modo a colaborar com a complementação das informações sobre São Paulo, fornecendo subsídios para a contenção e prevenção da disseminação destas cepas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Analisar a diversidade genética de *K. pneumoniae* produtoras de KPC em amostras provenientes de colonização e/ou infecção hospitalar.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a diversidade genética das cepas pelos métodos de: Multilocus Sequence Typing (MLST) e eletroforese de campo pulsado (PFGE);
- Avaliar a associação dos perfis observados nas duas técnicas: MLST e PFGE.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção das cepas para o estudo

O Instituto Adolfo Lutz é um Laboratório de Saúde Pública, que, na área de Infecção Hospitalar, atende rotineiramente diversas instituições de saúde do Estado de São Paulo para confirmação de identificação bacteriana, perfis de sensibilidade aos antimicrobianos, fenótipos de resistência, confirmação da presença de *bla*_{KPC} e tipagem molecular. No período de 2009 a 2011, 704 cepas recebidas de 65 instituições de saúde do Estado de São Paulo foram confirmadas por PCR como *K. pneumoniae* multirresistentes e produtoras de KPC. Desse banco, foram selecionadas uma cepa de cada uma das 65 instituições, e, de 22 instituições, mais de uma cepa foi selecionada, totalizando 100 isolados, sendo que os isolados selecionados foram de pacientes diferentes. Além disso, foi dada preferência para isolados de sangue e urina e apenas nos casos onde não havia cepas isoladas dessas fontes é que foram selecionadas cepas obtidas de secreções, ponta de cateter ou swab de vigilância (anal, axilar ou nasal). Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos foram obtidos pelo método de disco-difusão e a leitura e interpretação foram feitas de acordo com o CLSI, 2013 e Nota Técnica 01/2013 da ANVISA.

3.2 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído conforme protocolo de choque térmico, para utilização no MLST, no qual aproximadamente ¼ de alçada (alça descartável de 10 µL) da massa bacteriana foi colocado em um microtubo

com 500µL de água ultrapura estéril. A suspensão foi então aquecida a 95°C por 15min e posteriormente centrifugada por 15min, 13000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi retirado e armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.3 Eletroforese em Campo Pulsado (PFGE)

A técnica de PFGE foi realizada no Instituto Adolfo Lutz, de acordo com protocolo do CDC, baseado no modificado por Gautom (1997).

3.3.1 Preparo das Amostras

As amostras foram semeadas em meio Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas por 16-18h a 35°C. A partir do crescimento obtido foi feita uma suspensão bacteriana em tampão de suspensão celular (Anexo 1) com turbidez de 15% T medido em espectrofotômetro.

Desta suspensão, foi aliqotado 200µL em um microtubo e acrescentado 10µL de proteinase K (solução estoque de 20mg/mL) e 5µL de lisozima (solução estoque de 40mg/mL) e misturou-se gentilmente invertendo os tubos 5-6 vezes (concentração final de proteinase K e lisozima = 1mg/mL). Em seguida, foi adicionado 200µL de agarose (Anexo 1) em cada um dos tubos e após ser misturada a suspensão foi rapidamente distribuída em moldes para a formação dos blocos. Após a solidificação da agarose, os moldes foram colocados em um tubo Falcon contendo 5mL de tampão de lise celular (Anexo 1) e 25µL de proteinase K e incubados em agitador a 54°C, 120rpm por 2 horas.

Após o período de lise, a solução foi retirada e em cada tubo foi adicionado aproximadamente 15mL de água ultrapura estéril pré aquecida a

50°C e colocada novamente no agitador a 50°C, 120rpm por 15 minutos. Este processo foi repetido por mais uma vez. Posteriormente, foi adicionado aproximadamente 15mL de TE (Anexo 1) pré aquecido a 50°C e recolocados no agitador sob as mesmas condições, repetindo o mesmo processo por mais 3 vezes. No final das lavagens, foi adicionado 10mL de TE a temperatura ambiente e os blocos foram estocados a 4°C até o momento da digestão.

3.3.2 Digestão das amostras com enzima de restrição

Os blocos foram cortados com uma lâmina em pedaços de 2mm de espessura e transferidos para um microtubo contendo o tampão da enzima e incubados em banho Maria a 37°C por 10min. Foi preparada uma solução da enzima XbaI seguindo as instruções do fabricante (concentração final de enzima 50U/bloco) e após a incubação, os blocos foram colocados em microtubos com 100µL da solução da enzima e incubados em banho Maria a 37°C/16-18h. Decorrido o período de incubação a solução com a enzima foi retirada e substituída por 100µL de TBE 0,5x e as amostras foram mantidas a 4°C até o momento da eletroforese.

3.3.3 Preparo do gel e eletroforese

Foi preparado 100mL de gel de agarose (Sigma) a 1% em TBE 0,5x e após sua solidificação, os blocos foram inseridos nos “pocinhos” do gel e posteriormente o gel foi selado com a mesma agarose para impedir a saída dos blocos durante a eletroforese. Foi utilizada a *Salmonella* Braenderup H9812 digerida com a enzima XbaI como marcador. A eletroforese foi

realizada em equipamento CHEF DR III a 6V/vm e temperatura de 14°C, nos seguintes parâmetros:

Tempo Inicial: 2,2s

Tempo Final: 54,2s

Tempo de Corrida: 19h

Após a corrida o gel foi corado em brometo de etídio (0,5mg/mL) por 30min e lavado 2 vezes com água destilada por 15min cada vez e observados no fotodocumentador (DNR – Bio imagins systems – Modelo MiniBis Pro).

3.3.4 Análise dos dados

Os perfis de restrição foram analisados pelo programa Bionumerics, versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). Foram construídos dendrogramas para analisar a proximidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae*, utilizando-se “Unweighted pair group method with arithmetic mean” (UPGMA). Os perfis de PFGE foram determinados com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5% e as cepas que apresentaram similaridade maior ou igual a 80% foram consideradas pertencentes ao mesmo perfil.

3.4MLST

O protocolo utilizado para o MLST foi o descrito por Diancourt et al, 2005, no qual foram utilizadas as sequências de 7 genes "housekeeping" (*tonB*, *rpoB*, *mdh*, *pgi*, *phoE*, *infB*, *gapA*) para a determinação do "Sequence type" (ST).

3.4.1 Amplificação dos genes de interesse

A primeira etapa da técnica consiste em amplificar os genes de interesse por PCR. Para cada gene, utilizou-se uma mistura de 30 μ L contendo 3,3 μ L de mix A (anexo1), 1,5 μ L de cada primer F e R (concentração inicial 10 μ M), 1,5 μ L de Taq polimerase, 20,2 μ L de água e 2 μ L de DNA. Os primers utilizados estão descritos na tabela 3. As condições da reação estão descritas na tabela 4. A amplificação foi visualizada por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x nas seguintes condições: 120V por 45min.

Tabela 3 - Primers de PCR e sequenciamento utilizados para realização do MLST em relação a cada gene.

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

^aOs primers da reação de Big Dye são os mesmo utilizados para o PCR, exceto quando indicados (Diancourt et al, 2005).

Tabela 4 – Condições de ciclagem no termociclador para cada gene

Gene	Denaturação		N.º de ciclos	Extensão		
	Inicial			Denaturação/Anelamento/Extensão	Final	Armazenamento
<i>tonB</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;45°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>rpoB</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;50°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>mdh</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;50°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>pgi</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;50°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>phoE</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;50°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>infB</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;50°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		
<i>gapA</i>	94°C/2min		35	94°C/1min;60°C/1min; 72°C/2min 72°C/2min 4°C		

3.4.2 Purificação do produto de PCR

A purificação do produto amplificado foi realizada por dois métodos: ExoSAP-IT e purificação com PEG (polietilenoglicol). No primeiro método, misturou-se 2µL de ExoSAP-IT com 5µL do produto amplificado e incubou-se nas seguintes condições no termociclador: 37°C por 15min seguido por 80°C por 15min e armazenou-se a 4°C até o momento do uso. No segundo método, adicionou-se 30µL de produto amplificado e 40µL de solução 20%PEG 8000 em 2,5M de Cloreto de Sódio em placa de 96 orifícios, homogeneizou-se em vortex e centrifugou-se por 1min a 4°C 500xg. Incubou-se a temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação, centrifugou-se por 1h a 4°C 2750xg. Retirou-se o sobrenadante e centrifugou-se invertido em papel filtro por 1min a 4°C 500xg. Adicionou-se 150µL de álcool etanol 70% gelado em cada um dos orifícios e centrifugou-se por 10min a 4°C 2750xg. Repetiram-se as etapas de retirada do sobrenadante e centrifugação invertida e adicionou-se mais uma vez 150µL de etanol 70% em cada reação. Repetiram-se novamente as etapas de retirada do sobrenadante e centrifugação invertida e adicionou-se 15µL de água ultra pura estéril, homogeneizou-se por vortex e centrifugou-se rapidamente. Armazenou-se a -20°C até o momento do uso.

3.4.3 Reação com o Big Dye[®]

A partir do produto amplificado purificado foi feita uma nova reação de PCR, utilizando-se o Big Dye[®]. Nesta etapa, foram feitos 2 mix para cada gene, um deles utilizando somente o primer F e o outro somente o primer R. Sendo assim, para cada amostra foram feitas 14 reações, duas para cada gene. Cada mix continha 0,875µL de água ultra pura estéril, 0,875µL do tampão do Big Dye[®], 0,25µL de Big Dye[®] e 2µL de primer F ou R (concentração inicial 0,67µM) e 1µL da amostra purificada. Os primers utilizados nesta etapa estão descritos na tabela 3. As reações foram realizadas em placa de 96 poços e submetidas às seguintes condições do termociclador: denaturação inicial 96°C por 1min seguida de 25 ciclos de 96°C/10s, 50°C/5s e 60°C/4min. A variação de temperatura foi de 1°C por segundo em cada uma das etapas. O produto foi armazenado a 4°C até a purificação.

3.4.4 Purificação do produto do Big Dye[®]

Na placa onde foi realizada a reação com o Big Dye[®], adicionou-se 80µL da solução 1 (anexo1) e incubou-se em temperatura ambiente por 15min. Posteriormente centrifugou-se por 45min a 4°C 2000xg, em seguida retirou-se o excesso de sobrenadante e centrifugou-se invertido em papel filtro por 1min a 4°C 500xg. Adicionou-se em cada poço 150µL de etanol 70% e centrifugou-se por 10min a 4°C 2000xg, repetiu-se a retirada do sobrenadante e centrifugação invertida e deixou-se secar por 5min, cobriu-se com papel alumínio e armazenou-se a placa a -20°C até o momento do sequenciamento.

3.4.5 Sequenciamento

As reações de sequenciamento foram feitas pelo método de Sanger no equipamento Sequenciador Automático Applied 3010 XL segundo as instruções do fabricante.

3.4.6 Análise dos dados

As sequências obtidas foram pré-processadas pelo software “Seqman” e em seguida, a análise foi feita pelo site <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html> e, a combinação dos sete alelos deu origem ao Sequence Type (ST). No caso de novos STs, a nova combinação e/ou sequência foi encaminhada para o mesmo site para ser depositada no banco de dados. Para confirmação dos alelos o alinhamento foi feito pelo ClustalW (disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) e a construção dos grupos de similaridade foi feita pelo eBURSTv3 (disponível em: <http://eburst.mlst.net/>). Os complexos clonais foram definidos pela análise feita no eBURST, na qual foram colocados no mesmo grupo ou complexo clonal, os STs que compartilham 6 ou mais alelos idênticos com pelo menos um membro do grupo e o fundador primário do grupo, que dá nome ao complexo clonal, é o ST que difere em apenas um locus com o maior número de STs presentes no complexo. A Minimal Spanning Tree foi construída utilizando o software Bionumerics v.7.1. (Applied Maths, Kortrig, Bélgica).

4 RESULTADOS

As amostras foram provenientes de 65 locais distribuídos por 18 cidades do Estado de São Paulo conforme mostra a figura 3, a localização de cada cidade no mapa do Estado está mostrada na figura 4. As fontes de isolamento variaram, mas com predominância de urina seguida por sangue representando 75% dos isolados conforme figura 5. Todas as cepas foram produtoras de KPC-2. Os valores da CIM estão mostradas no anexo 3

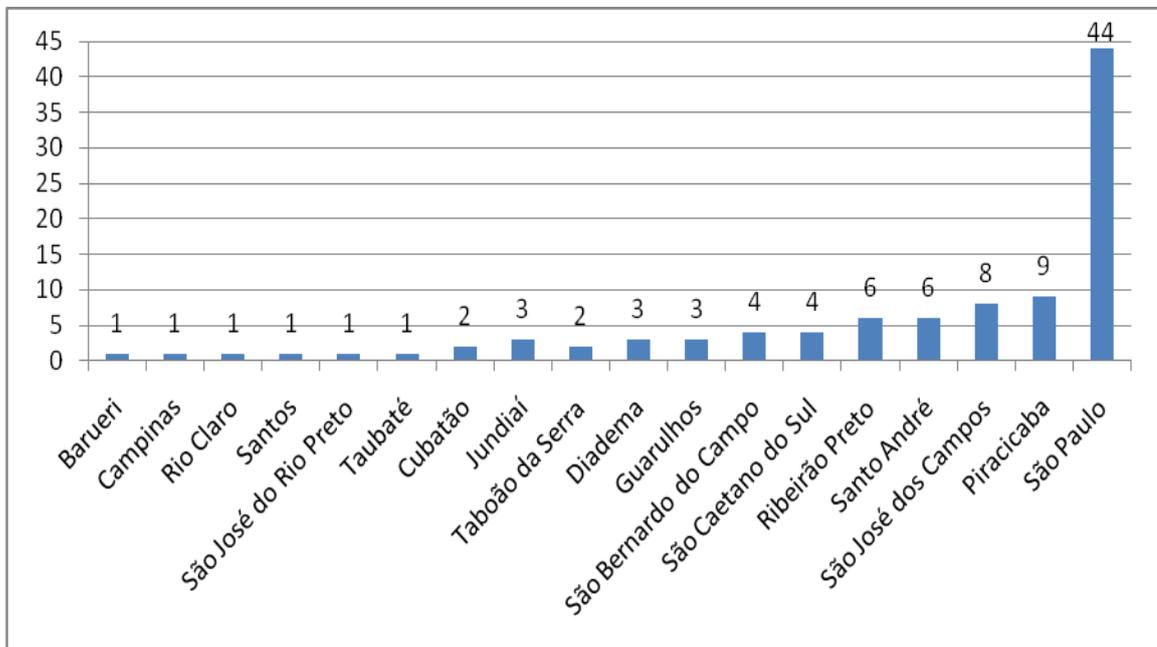


Figura 3- Número de amostras distribuídas pelas cidades do Estado de São Paulo dos 100 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC

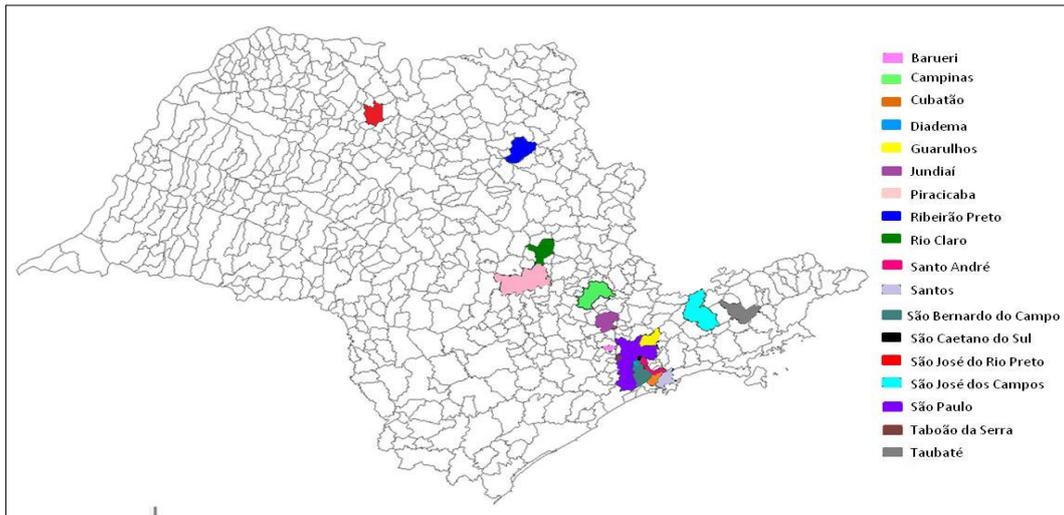


Figura 4 – Mapa do Estado de São Paulo mostrando as cidades das quais foram obtidas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

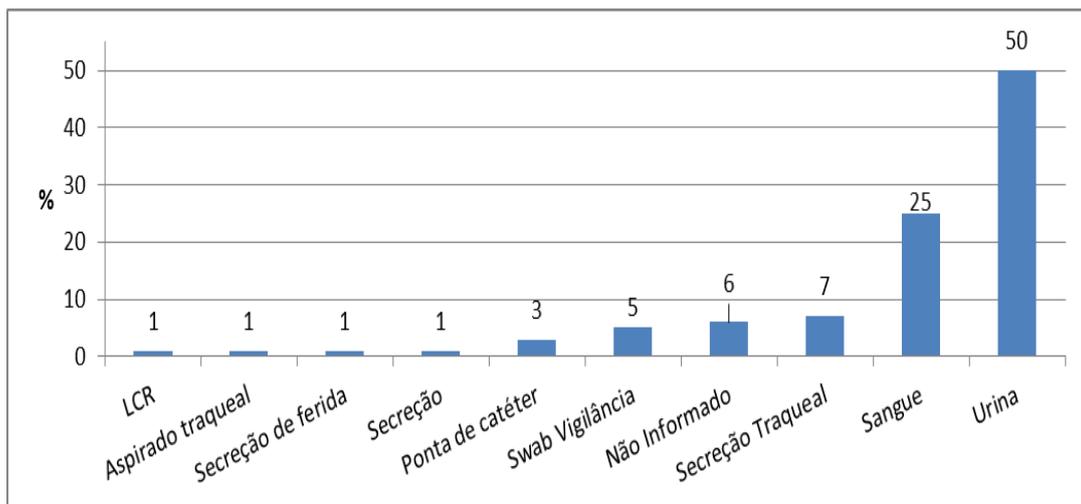


Figura 5 – Fonte de isolamento dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo

Os isolados apresentaram diversos perfis de resistência aos antimicrobianos testados, sendo que aos carbapenêmicos apresentaram os maiores índices de resistência. Todos os isolados foram resistentes ao ertapenem, 98% resistentes ao imipenem e 96% resistentes ao meropenem. Com relação às cefalosporinas, 97% foram resistentes a cefotaxima, 81% foram resistentes à ceftazidima, 71% ao cefepime. Já em relação ao

aztreonam, 99% das cepas apresentaram resistência. O perfil de resistência do isolados está representado na tabela 5.

Tabela 5 – Perfil de resistência aos antimicrobianos dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC

Cepas (n)	Perfil de resistência
19	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc
17	TZ,CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, TM
9	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM, TM
7	TZ,CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, PO, TM
7	TZ,CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, PO, TM
6	CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM, TM
5	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PTc
3	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM
3	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM, TM
3	CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, TM
2	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP
2	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM, PO, TM
2	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, TM
2	AT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, TGC, TM
1	CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc
1	CT, AT, ETP, IP,MP, PTc
1	TZ, CT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, TM
1	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM
1	AT, ETP, IP, MP, PTc, GM
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, ,MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, MP, PTc, GM, TM
1	CT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, GM, TGC
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, PTc
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, MP, PTc, TGC
1	CT, AT, ETP, IP,MP, PTc, GM, TGC, TM
1	TZ, CT, PM, AT, ETP, IP, PTc, TM
1	CT, AT, ETP, PTc
1	CT, AT, ETP, IP, MP, PTc, PO, TM
1	TZ, CT, AT, ETP, IP, MP, TM
1	CT, AT, ETP, IP, MP
1	TZ, CT, AT, ETP, IP, TGC, TM

TZ: ceftazidima; CT: cefotaxima; PM: cefepime; AT: aztreonam; ETP: ertpenem; IP: imipenem; MP: meropenem; PTc: piperaciclina-tazobactam; GM: gentamicina; TGC: tigeciclina; PO: polimixina B; TM: tobramicina

4.1 PFGE

Foram observados 13 perfis, sendo 5 deles únicos. O perfil A foi o predominante, 69% dos isolados, seguido pelo B (9%), C (4%), D (3%), E (3%), F (3%), G (2%) e H (2%) conforme figura 6. Os perfis foram divididos em subtipos, sendo que no mesmo subtipo estão apenas os isolados com 100% de similaridade, sendo assim, o perfil A foi dividido em 41 subtipos (A1 a A41), B em 6 subtipos (B1 a B6), C em 4 subtipos (C1 a C4), D, E e F em 3 subtipos (D1 a D3; E1 a E3; F1 a F3) e G e H em 2 (G1 e G2; H1 e H2). A distribuição dos perfis entre as cidades está demonstrada na figura 7.

A distribuição desses perfis e a similaridade entre os isolados está representada nos dendrogramas da figura 8 e 9. O dendrograma completo está representado no anexo 5.

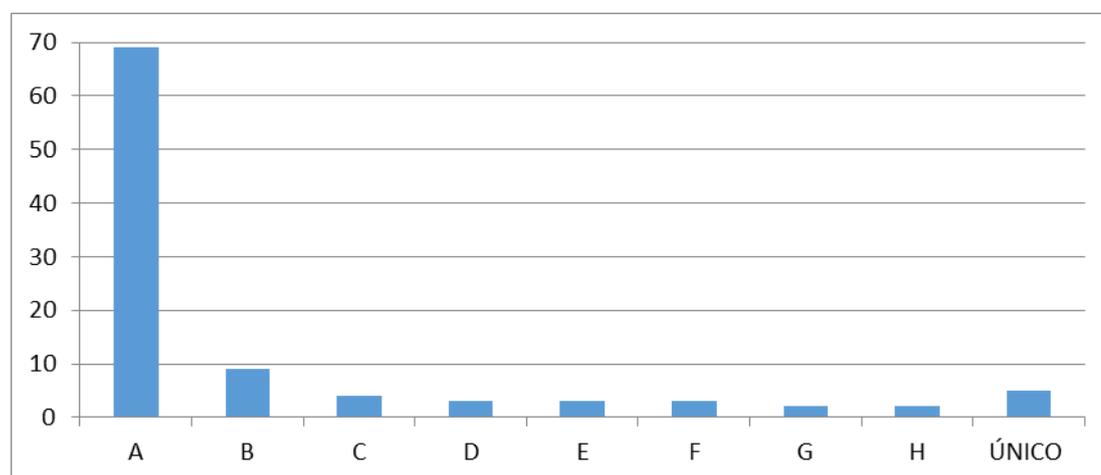


Figura 6 – Perfis de restrição de PFGE dos 100 isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo

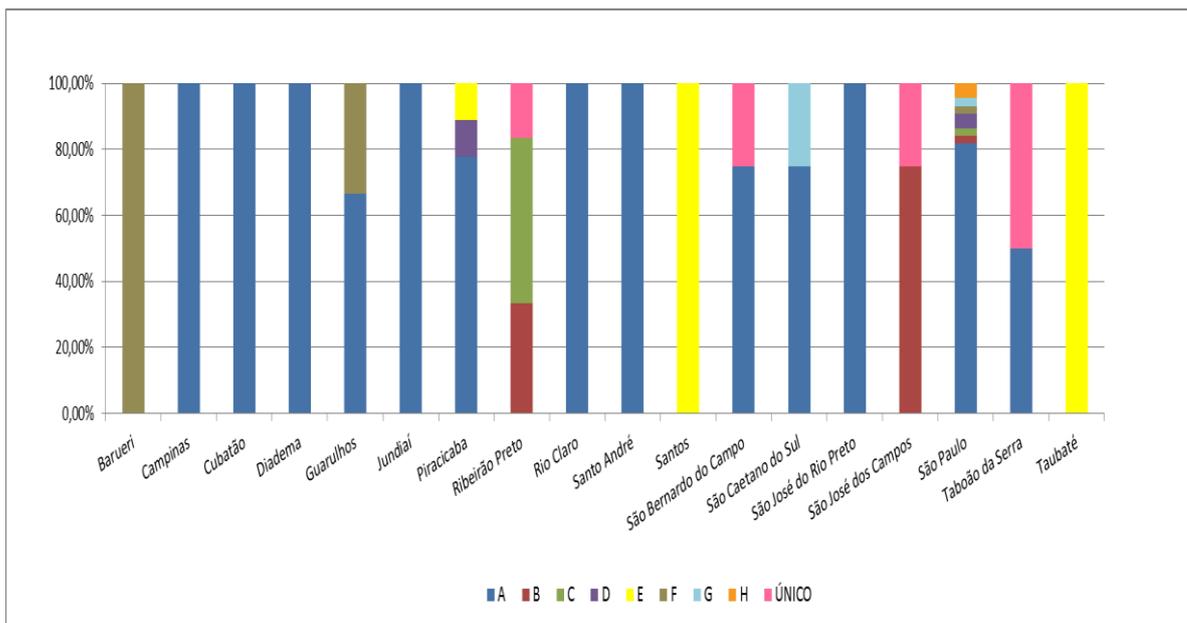


Figura 7- Distribuição dos perfis de restrição de PFGE de 100 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC entre as diferentes cidades

Com relação a distribuição dos clones intra hospitalar, 24 dos 65 locais (36,4%) apresentaram mais de um subtipo de PFGE, conforme mostra a figura 9. A tabela 6 mostra os subtipos presentes nesses hospitais.

Dice (opt.02%) (9 1.5%-1.5%) (H+0.02% S+0.02%) (E20%-100.0%)

XbaI

XbaI

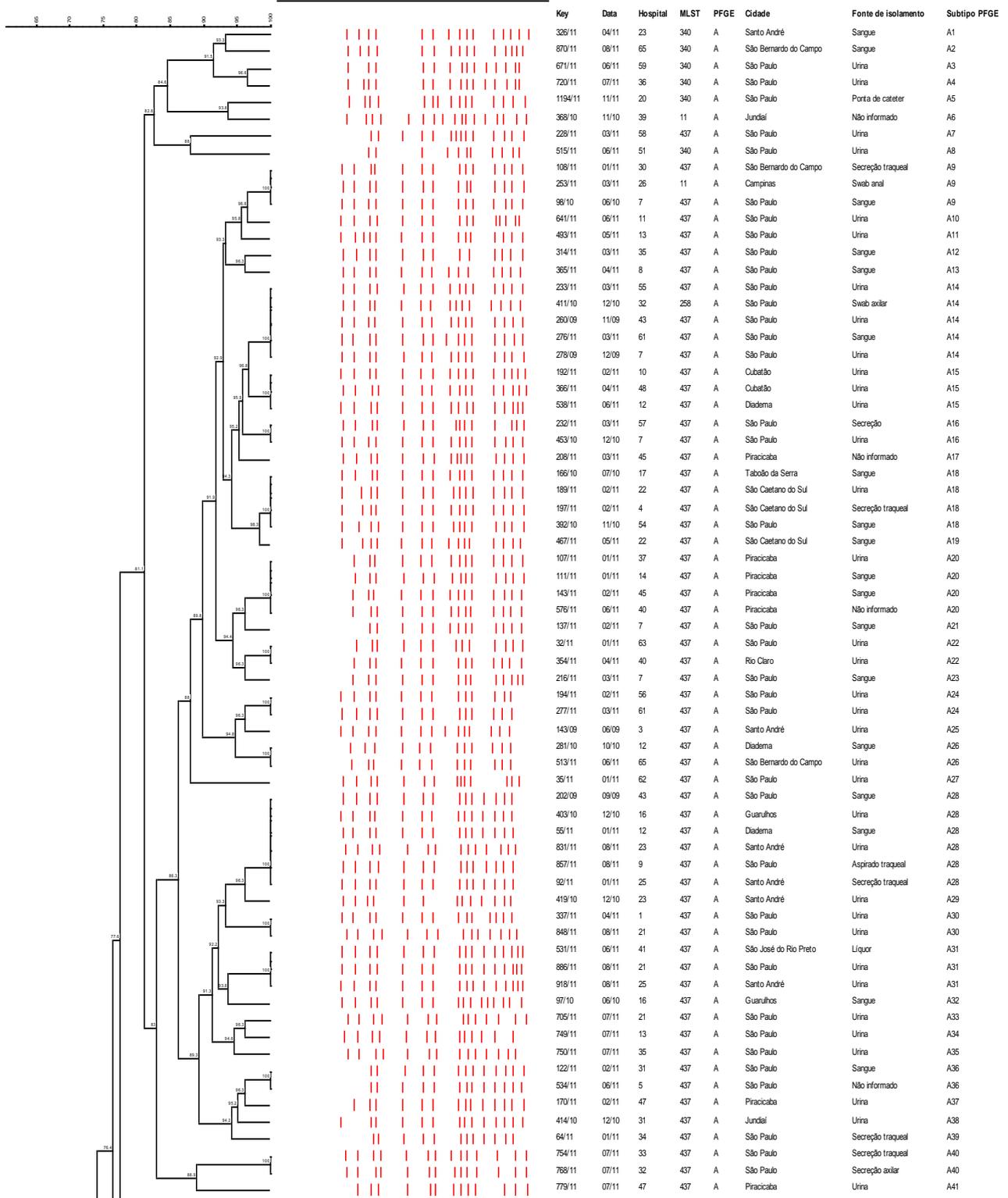


Figura 8 – Dendrograma mostrando o perfil A de PFGE das cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes de diversos hospitais do Estado de São Paulo, digeridas com a enzima de restrição XbaI com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número da amostra, a data do isolamento, o número do hospital, ST, perfil de PFGE, cidade, fonte de isolamento e subtipo de PFGE.

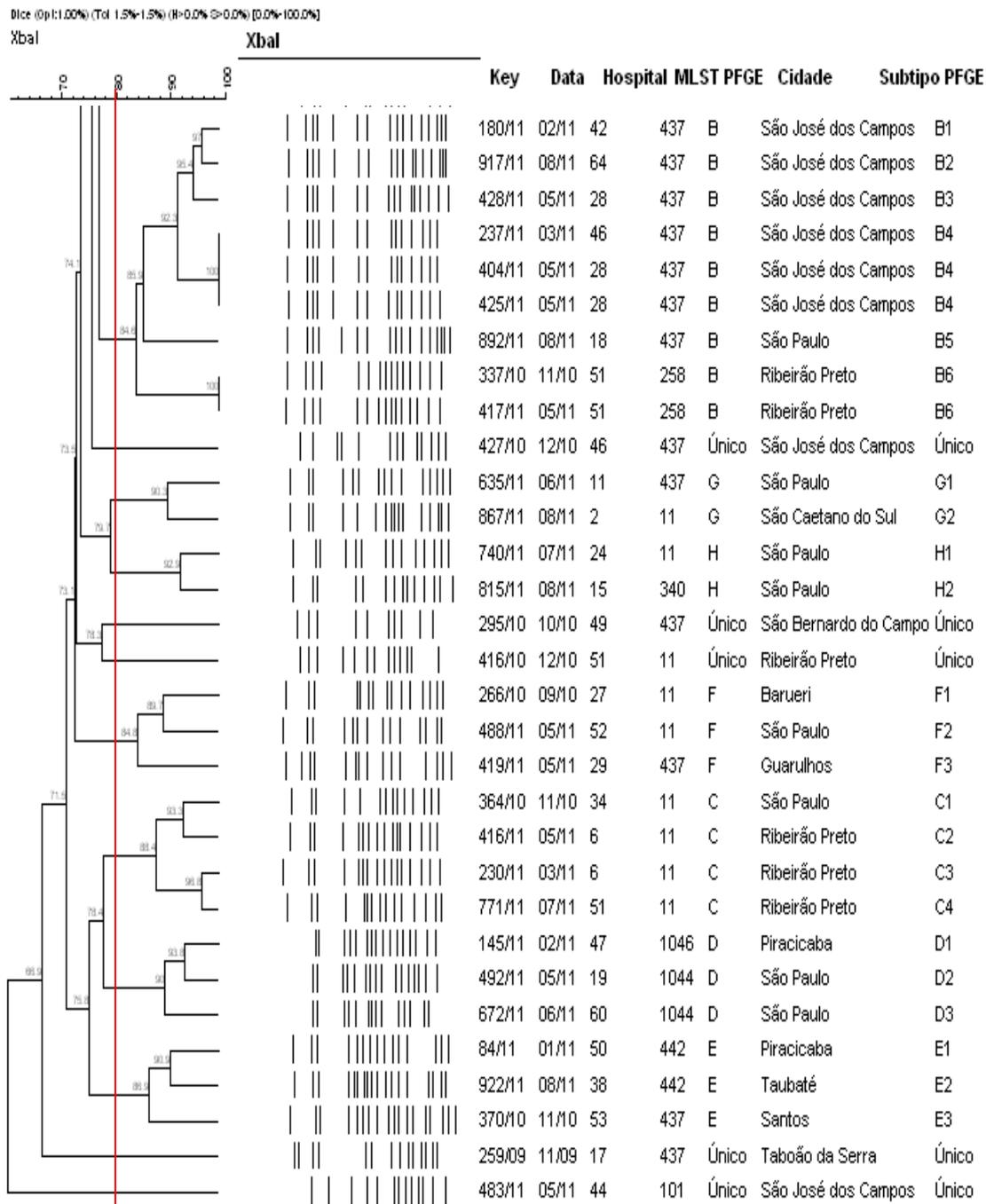


Figura 9 – Dendrograma indicando os outros perfis de PFGE observados nas cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de pacientes de diversos hospitais do Estado de São Paulo, digeridas com a enzima de restrição XbaI com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número da amostra, a data do isolamento, o número do hospital, ST, perfil de PFGE, cidade, fonte de isolamento e subtipo de PFGE.

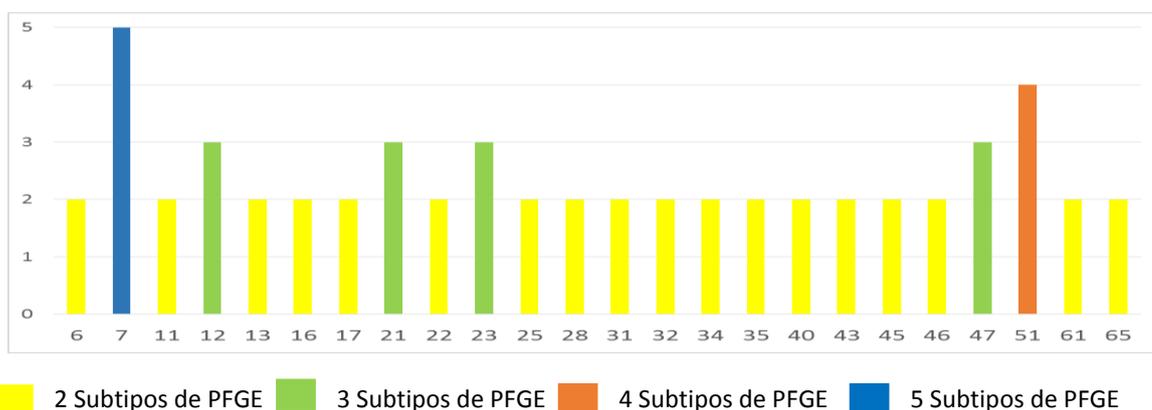


Figura 10 – Hospitais que apresentaram mais de um subtipo de perfil de restrição de PFGE entre os 100 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

Tabela 6 – Subtipos de perfis de restrição de PFGE observados nos hospitais com 2 ou mais subtipos

Hospital	Subtipos					
6	C2	C3				
7	A9	A14	A16	A21	A23	
11	A10	G1				
12	A15	A26	A28			
13	A11	A34				
16	A28	A32				
17	A18	ÚNICO				
21	A30	A31	A33			
22	A18	A19				
23	A3	A28	A29			
25	A28	A31				
28	B3	B4				
31	A36	A38				
32	A14	A40				
34	A39	C1				
35	A12	A35				
40	A20	A22				
43	A14	A28				
45	A17	A20				
46	B4	ÚNICO				
47	A37	A41	D1			
51	A4	B6	C4	ÚNICO		
61	A14	A24				
65	A7	A26				

Com relação a distribuição inter hospitalar, dos 69 subtipos observados, 15 foram observados em mais de um hospital. A figura 10 mostra a distribuição desses perfis por número de hospitais observados. E a tabela 7 em quais hospitais esses subtipos foram observados.

Relacionando-se os subtipos observados com as cidades, dos 69 subtipos, 7 foram observados em mais de uma cidade conforme mostram a figura 11.

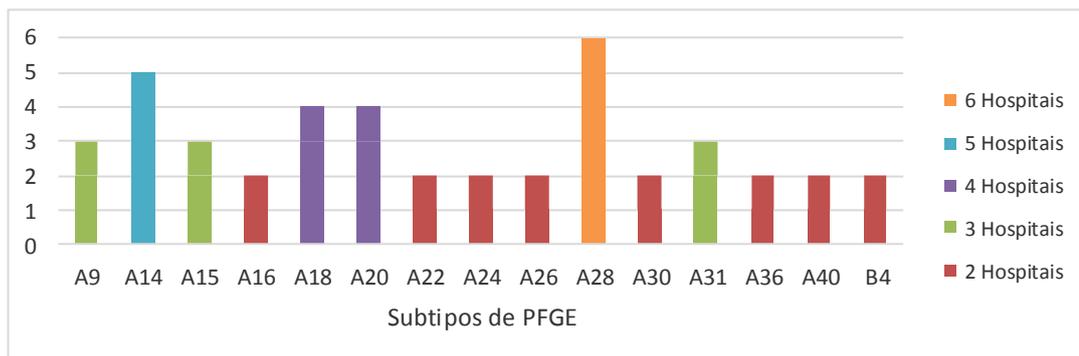


Figura 11 - Número de hospitais com o mesmo subtipo perfis de restrição de PFGE entre os 100 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

Tabela 7 – Subtipos de perfis de restrição de PFGE e hospitais nos quais eles foram detectados

Subtipo	Hospitais					
A9	7	26	30			
A14	7	32	43	55	61	
A15	10	12	48			
A16	7	57				
A18	4	17	22	54		
A20	14	37	40	45		
A22	40	63				
A24	56	61				
A26	12	65				
A28	9	12	16	23	25	43
A30	1	21				
A31	21	25	41			
A36	5	31				
A40	32	33				
B4	28	46				

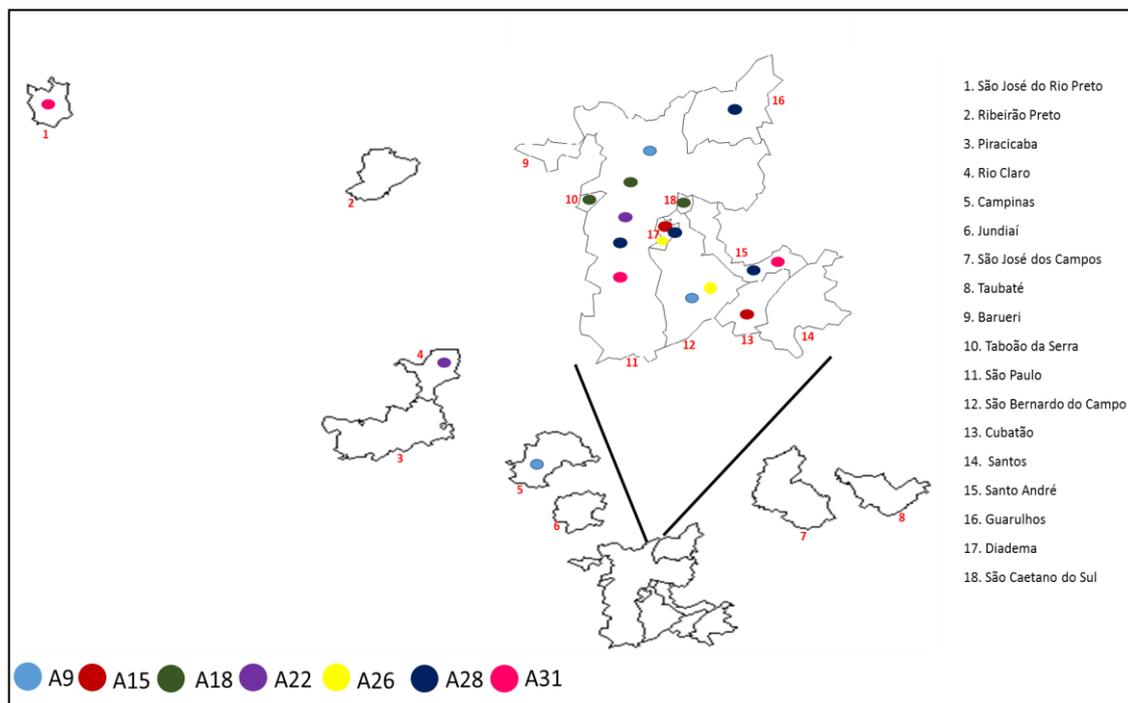


Figura 12 – Mapa das cidades que apresentaram o mesmo subtipo de perfis de restrição de PFGE

4.2 MLST

A figura 13 mostra a “population snapshot” do STs de *K. pneumoniae* até agora descritos, esta figura representa a similaridade entre todos os STs e também é possível observar onde se localizam os STs detectados no estudo.

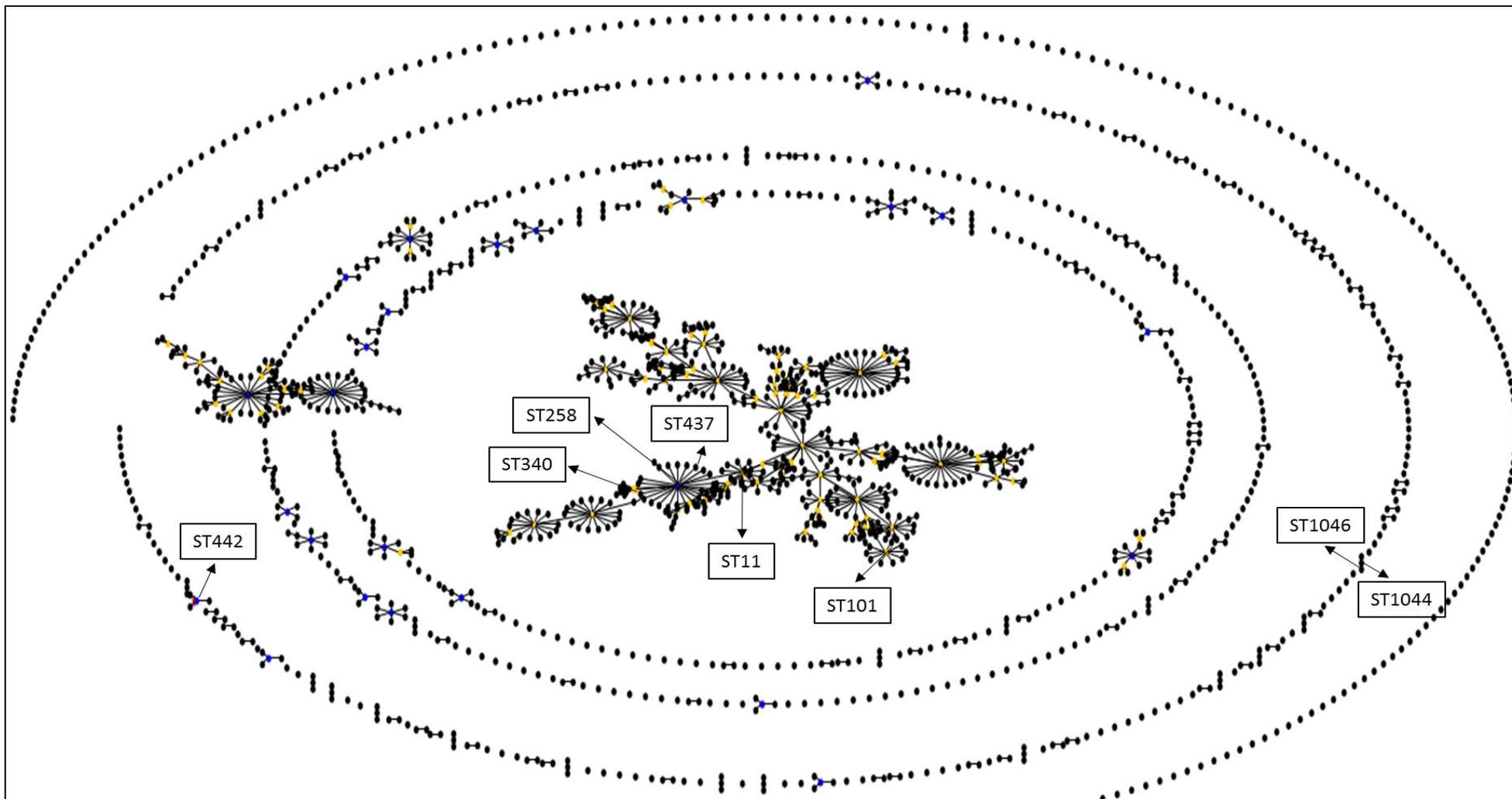


Figura 13 – “Population snapshot” dos STs de *K. pneumoniae* descritos até o momento, em destaque a localização dos STs detectados neste estudo.

Os resultados obtidos (Figura 14) mostraram predominância do ST437 (73%) seguido pelo ST11 (11%), ST340 (7%) e ST258 (3%). Estes STs pertencem ao mesmo complexo clonal 258 (CC258), conforme figura 15 e se diferem apenas por um locus, ou seja, dos sete genes que formam o ST, somente um deles é diferente, no caso o gene *tonB* e. O ST 101 embora pertença ao mesmo complexo clonal, não é muito similar aos STs observados no estudo que pertencem a este CC, pois se diferencia em cinco dos sete locus. Foram observados também o ST442 (2%) e 2 novos STs, ST1044 e ST1046, depositados no banco de dados do site <http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>. A tabela 8 mostra as combinações dos genes que deram origem aos STs. A distribuição dos STs nas cidades estudadas está representada na Figura 16.

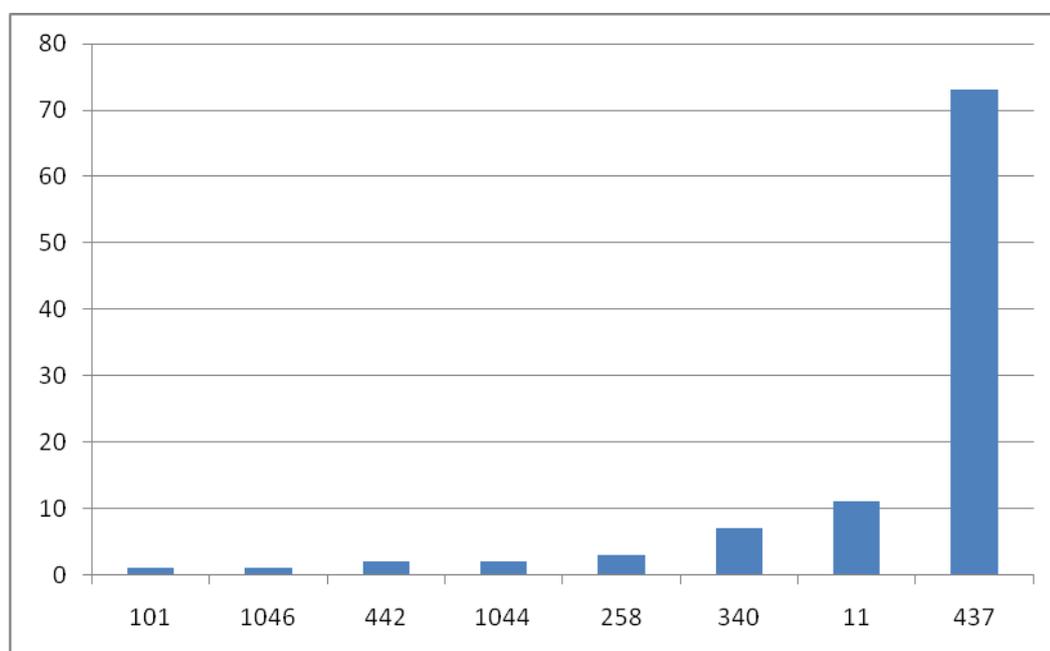


Figura 14 – Porcentagem dos STs observados nas cepas de *K. pneumoniae* produtora de KPC isoladas no Estado de São Paulo.

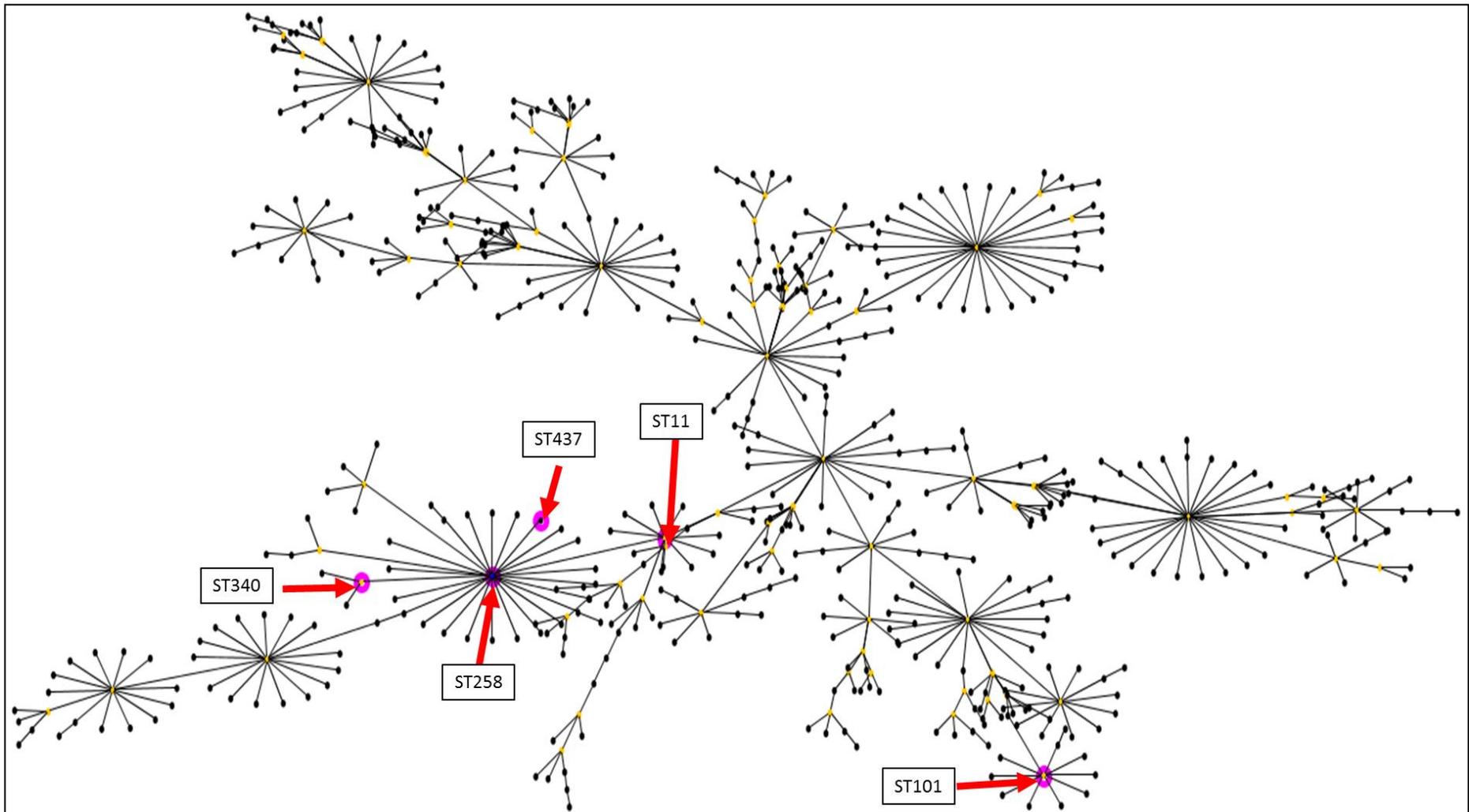


Figura 15 – Diagrama construído no programa eBURST v3 mostrando a similaridade entre os STs e formação dos complexos clonais. Na figura está representado o grupo 1 que é composto por 575 STs sendo o ST 258 o “predicted founder” e em destaque os STs observados no presente estudo.

Tabela 8 – Combinações dos 7 genes “housekeeping” que deram origem aos STs de *K. pneumoniae* produtoras de KPC.

ST	GENES						
	<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>rpoB</i>	<i>tonB</i>
11	3	3	1	1	1	1	4
258	3	3	1	1	1	1	79
340	3	3	1	1	1	1	18
437	3	3	1	1	1	1	31
101	2	6	1	5	4	1	6
442	10	20	2	1	9	11	14
1044	18	22	18	90	142	13	192
1046	18	20	18	90	142	13	192

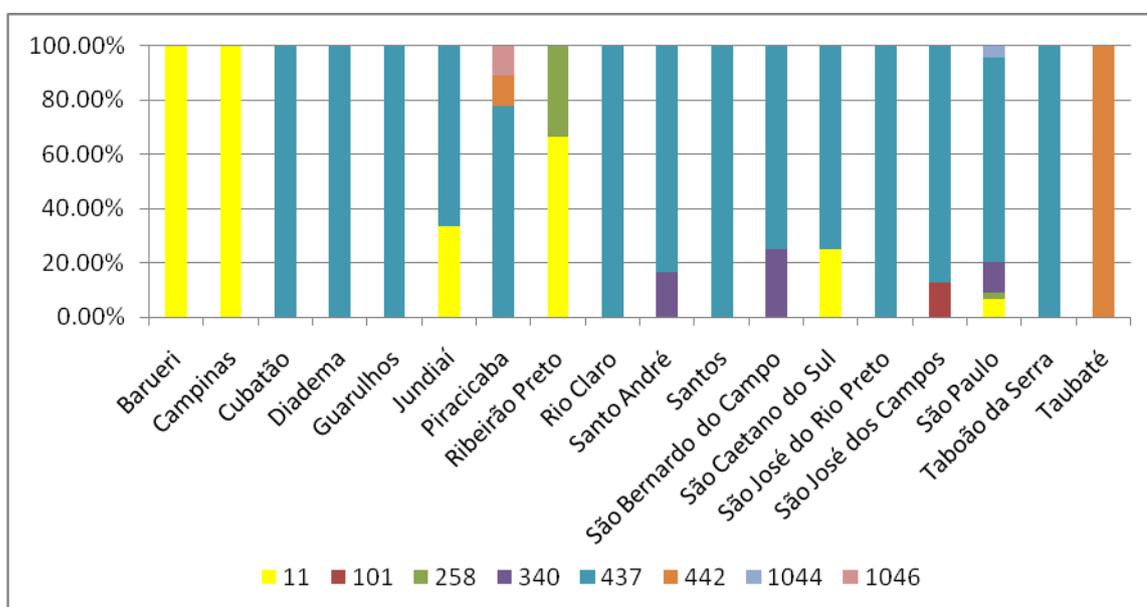


Figura 16 - STs observados nas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC entre as diversas cidades do Estado de São Paulo.

A figura 17 mostra a relação entre os resultados de PFGE e MLST, pode-se observar a predominância do ST437 com perfil de PFGE A, entretanto também é possível visualizar que dentro de um mesmo ST foi encontrado mais de um perfil de PFGE.

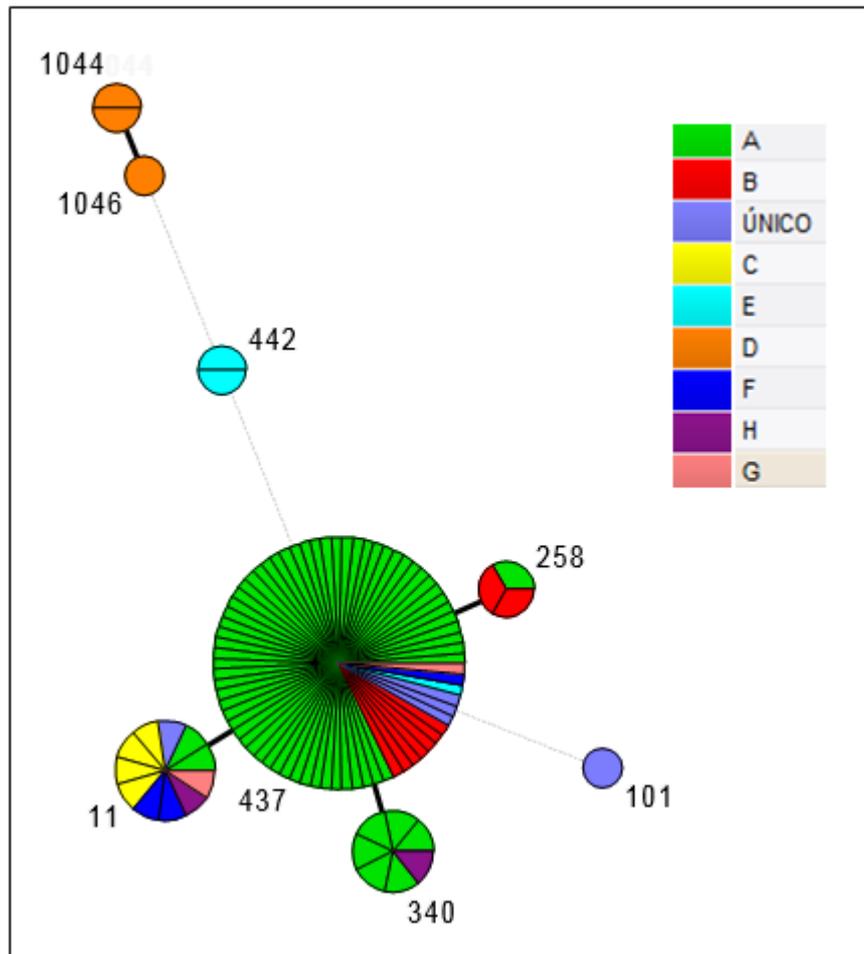


Figura 17 – Minimal Spanning Tree dos 100 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC representando a relação entre os dados de PFGE e MLST, na qual os círculos representam os STs e as cores o perfil de PFGE (software Bionumerics v.7.1).

4.3 Distribuição Geográfica dos isolados

Os isolados foram provenientes de 65 instituições (Figura 18) distribuídas por 18 cidades do Estado de São Paulo. A distribuição dos perfis de PFGE e MLST por cidade está demonstrada nas figuras 19 e 20, respectivamente.

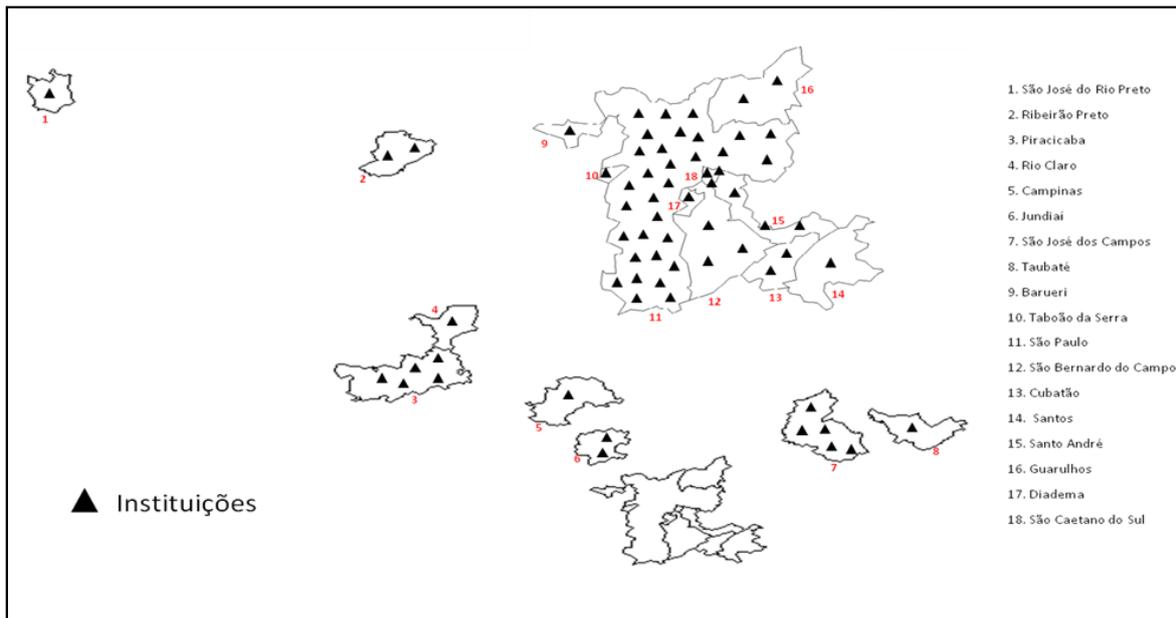


Figura 18 – Distribuição das 65 instituições pelas 18 cidades do Estado de São Paulo mostrando o local de onde os isolados de *K. pneumoniae* produtora de KPC foram obtidos. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.

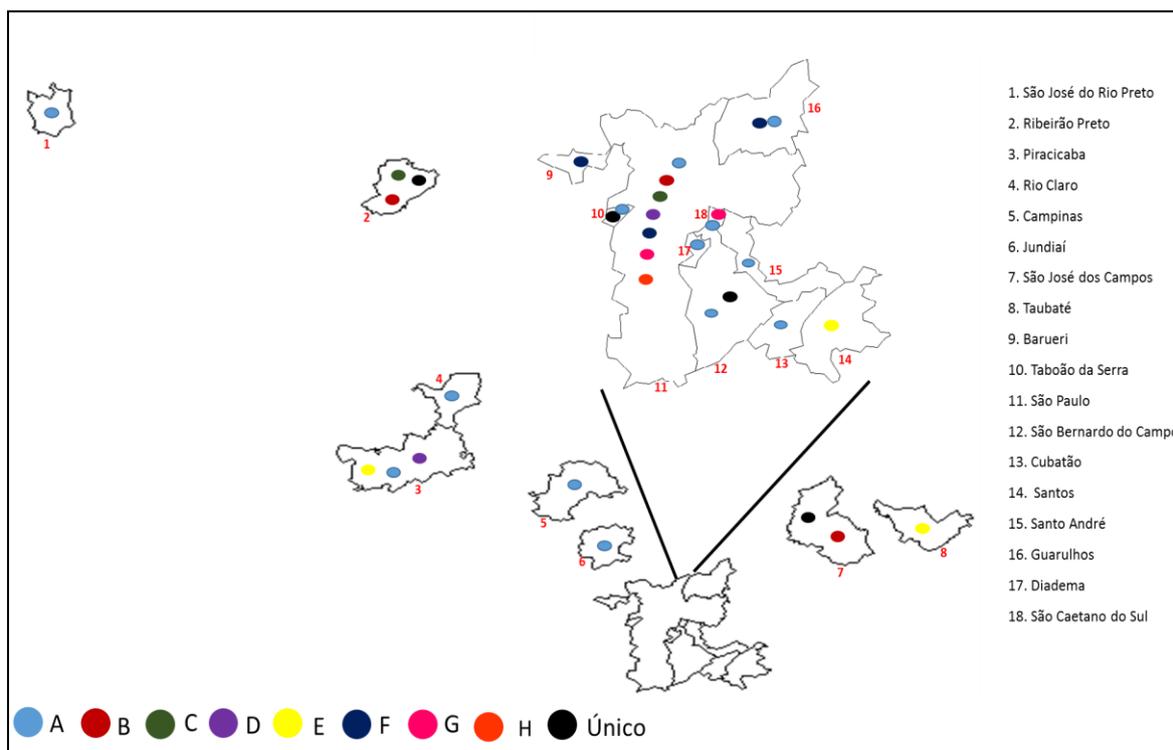


Figura 19 - Distribuição dos perfis de restrição de PFGE dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC pelas cidades do Estado de São Paulo participantes do estudo. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.

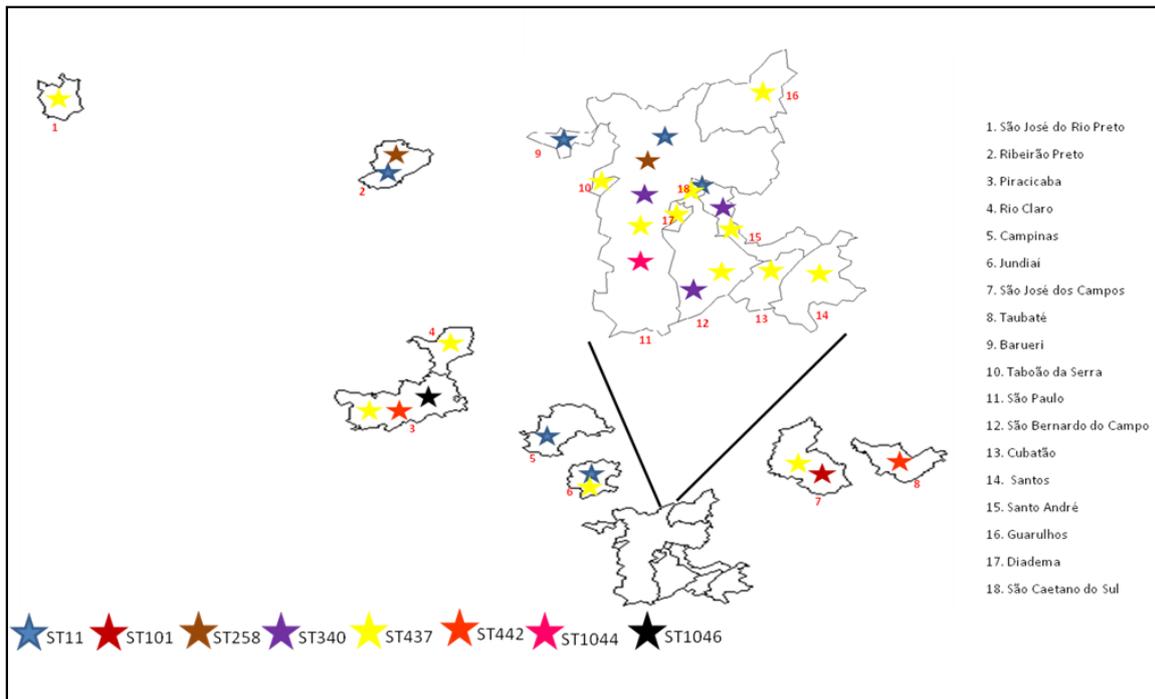


Figura 20 - Distribuição dos STs dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC pelas cidades do Estado de São Paulo participantes do estudo. Destaque para a região metropolitana de São Paulo.

5 DISCUSSÃO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista e seus principais alvos são indivíduos hospitalizados, imunodeprimidos ou que possuam uma doença de base e, são altamente prevalentes entre os agentes patogênicos relacionados com as infecções hospitalares podendo causar doença em qualquer sítio (Scarpate & Cossatis, 2009).

A importância desse patógeno no ambiente hospitalar é devido a grande capacidade de desenvolver mecanismos de resistência aos antimicrobianos, principalmente beta-lactamases. Já foi demonstrado que pelo menos 80% dos pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistentes aos antimicrobianos tiveram infecções precedidas pela colonização do trato gastrointestinal (Paterson & Bonomo, 2005).

Livermore et al (2005) destacaram que entre os micro-organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) o gênero *Klebsiella* é o que produz a maior variedade dessas enzimas, o que pode ser explicado pelo fato destes serem bons vetores para plasmídeos ou por permitirem a evolução de genes que codificam ESBL mais rapidamente que outras *Enterobacteriaceae*.

As técnicas de PFGE e MLST permite a comparação dos isolados, de modo a classificá-los em clones, perfis, subtipos ou “sequence types” e dessa forma verificar qual o clone mais predominante, o que este clone coproduz em termos de mecanismos de resistência aos antimicrobianos para então desenvolver formas de controlar a disseminação desta cepa.

Os resultados obtidos mostraram a predominância do ST437 (73%) seguido pelo ST11 (11%), ST340 (7%), ST258 (3%), ST442 e ST1044 (2%) e ST1046 e ST101 (1%). Os ST437, ST11, ST340 e ST258, pertencem ao mesmo complexo clonal denominado CC258. O ST258 teve sua primeira descrição em 2009 em isolados da Noruega e Suécia, no entanto, estes isolados eram de pacientes previamente hospitalizados na Grécia e Israel (Samuelsen et al, 2009). Estudos seguintes mostraram a disseminação desse ST para outros países da Europa como Itália (Giani et al, 2009), Irlanda (Roche et al, 2009), Finlândia (Österblad et al, 2009), Polônia

(Baranakiak et al, 2009), Bélgica (Bogaerts et al, 2010), Dinamarca (Hammerum et al, 2010) e Hungria (Tóth et al, 2010). A primeira descrição deste ST fora da Europa foi nos EUA, no entanto, entre os isolados americanos havia 1 isolado de Israel, mostrando que a provável origem deste ST seria Israel ou Grécia. O ST 258 é considerado um clone de sucesso, pois, além da Europa e EUA, foi relatado também no México (Rodríguez-Zulueta et al, 2013), Argentina (Gome et al, 2011), Colômbia (Mojica et al, 2012), Brasil (Andrade et al, 2011), Coréia (Yoo et al, 2013), República Tcheca (Hrabák et al, 2013), Hong Kong (Ho et al, 2011).

O ST258 está altamente correlacionado com a produção de KPC e mundialmente disseminado (Kitchel et al, 2009; Hrabák et al, 2013; Samuelsen et al, 2009; Rodríguez-Zulueta et al, 2013; Jain et al, 2013; Yoo et al, 2013), Porém, também já foi relacionado com cepas KPC negativas (Adler et al, 2012). Além da KPC, este ST também foi associado com a produção de CTX-M-2 (Adler et al, 2012).

O sucesso internacional de disseminação deste ST não está totalmente esclarecido. DeLeo et al (2014) tentaram explicar este fato através do sequenciamento do genoma completo deste ST e comparando com outros STs, que resultou na descrição de uma região de divergência que incluía genes envolvidos na síntese de cápsula polissacarídica, esta região parecia estar relacionada com eventos de recombinação de DNA sugerindo que esta região contribuiria para o sucesso da *K. pneumoniae* ST258. Outro estudo feito por Chmelnitsky et al (2013) compararam os genes presentes em *K. pneumoniae* pertencentes ao ST258 e também do CC258 com outros STs. Os autores identificaram um grupo de 17 genes únicos e ubíquos ao CC258 e outro grupo de 19 genes único ao ST258. A maioria das proteínas codificadas por esses genes pertence a dois grupos funcionais: motilidade e secreção celular e reparação e modificação do DNA. Sendo assim, eles sugeriram que estes genes podem estar relacionados com o grande sucesso da disseminação deste ST e dos STs presentes em seu complexo clonal.

No Brasil o ST258 foi considerado o mais frequente por Andrade et al (2011). Estudos publicados posteriormente (Seki et al, 2011; Pereira et al, 2013) mostraram que o clone predominante no Brasil é o ST437, que é um locus diferente do ST258 e pertence ao mesmo complexo clonal. Nosso estudo demonstrou que 3% das cepas pertencia ao ST258, concordando com os estudos mais recentes (Seki et al, 2011; Pereira et al, 2013) que indicam a predominância do ST437. Este ST, assim como o ST258 está associado à produção de KPC-2 (Seki et al, 2011; Andrade et al, 2011; Pereira et al, 2013), sendo esta associação também observada no presente estudo. A predominância do ST437 não foi explicada por nenhum estudo até o momento, mas pode ser devido à adaptação da KPC-2 no Brasil e a coprodução da KPC-2 com outras ESBLs como a CTX-M.

O ST437 foi primeiramente descrito em isolados do Brasil em 2011 por Seki et al em isolados de 2007 a 2009 dos estados do Rio de Janeiro e Espírito Santo. No mesmo ano foi descrito também por Andrade et al (2011) em isolado do Rio de Janeiro do ano de 2009. Em seu estudo, Seki et al (2011) concluíram que o ST437 era o mais frequente entre os isolados brasileiros, o que se comprovou por estudos posteriores, como o de Pereira et al (2013) que descreveram este ST em isolados de Santa Catarina, Espírito Santo, Ceará e Rio de Janeiro e o estudo de Fehlberg et al (2012) em isolados da Paraíba. Os dados sobre os STs do Estado de São Paulo são escassos. Andrade et al (2011) descreveram o ST258 em duas cidades do Estado (n=53), sendo que em uma delas o ST258 foi relacionado com um surto. Em 2012, Nicoletti et al relacionaram os ST437 e ST11 aos isolados do Estado de São Paulo, assim como Castanheira et al (2012) que observaram o ST437 como maioria nos isolados do Estado de São Paulo estudados (n=12). Os estudos disponíveis sobre os clones circulantes no Estado de São Paulo apresentam número pequeno de isolados ou são provenientes de apenas uma cidade do Estado; o nosso estudo avaliou um número maior de amostras e com distribuição em diversas cidades de São Paulo. O ST437 foi encontrado em 73% dos isolados, em 14 das 18 cidades estudadas e em 48 das 65 instituições presentes no estudo.

Este ST também foi relatado na água dos principais rios da cidade de São Paulo, o rio Tietê e o rio Pinheiros (Oliveira et al, 2014). Este estudo de Oliveira et al (2014) detectou além do ST437, o ST340 na água do Rio Tietê. Este estudo demonstra como estes STs podem sair do ambiente hospitalar e chegar ao meio ambiente facilitando sua disseminação. Comparando-se geograficamente os pontos de coleta nos rios utilizados no estudo de Oliveira et al (2014) com a localização dos hospitais do nosso estudo, feitos pelo google maps e plotados no mapa pelo programa “Engine Lite”, verificamos evidências de que possivelmente vários deles podem ter contaminado a água dos rios. Isso nos leva a uma preocupação sobre como é feito o tratamento e o despejo desse tipo de efluente, e se os hospitais têm essa preocupação ou algum tipo de plano para evitar a circulação de micro-organismos multirresistentes no meio ambiente.

Não havia relato do ST437 fora do Brasil, no entanto, Oteo et al (2013), relataram a ocorrência deste ST em um isolado da região de Málaga na Espanha associado com a produção de OXA-245.

O segundo ST mais frequente foi o ST11, descrito pela primeira vez por Diancourt et al (2005), durante a padronização do MLST. Entretanto tem aumentado sua importância mundial nos últimos anos sendo associado a diversos surtos e a coprodução de diversos mecanismos de resistência (Li et al 2011) de disseminação internacional. Já foi relatado na Hungria (Damjanova et al, 2008), Grécia (Voulgari et al 2013), Hong Kong, Indonésia, Coréia do Sul, Malásia, Singapura e Tailândia (Lee et al 2011), Turquia, Argentina e Índia (Lascols et al 2013), China (Qi et al, 2011), Taiwan (Lee et al, 2012; Chiu et al, 2013), Polônia (Baranakiak et al 2009), Espanha (Pena et al, 2014), Austrália (Shomas et al, 2014), Líbia (Lafeuille et al, 2013), Nova Zelândia (Williamson et al, 2012), Suécia, Reino Unido (Giske et al, 2012) e República Tcheca (Chudácková et al, 2010). No Brasil, Andrade et al (2011) foram os primeiros a relatar a presença do ST11 em isolados de 2009 da cidade de Ribeirão Preto em São Paulo e Seki et al (2011) também relataram este ST nos Estados de Pernambuco e Minas Gerais em isolados de 2006, provando sua presença no Brasil antes mesmo do ST258.

O ST11 está associado com a produção de CTX-M-15 (Damjanova et al, 2008; Voulgari et al, 2013; Lee et al, 2011; Lascols et al, 2013), KPC-2 (Li et al 2011; Balm et al, 2012; Qi et al, 2011; Lee et al, 2012; Chiu et al, 2013; Castanheira et al, 2012; Baranakiak et al, 2009), OXA-48 (Lascols et al, 2013), NDM-1 (Lascols et al, 2013) e RmtB (Li et al, 2012). Este ST tem a capacidade de capturar e acumular vários mecanismos de resistência, segundo Li et al (2012) e já foi relatada a coprodução de RmtB e KPC-2 (Li et al, 2011), OXA-48 e CTX-M-15 e NDM-1 e CTX-M-15 (Lascols et al, 2013).

Outro ST descrito em nosso estudo foi o ST340, que foi o terceiro mais predominante, e como já mencionado pertence ao mesmo complexo clonal que os ST258, ST437 e ST11. Foi depositado no banco de dados em 2009 por Naas Thierry (http://www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?file=klebs_profiles.xml&page=profileinfo&st=340, acesso em 04/10/2014), no entanto, não foi relacionado com nenhuma publicação, mas provavelmente sua origem seja europeia. Já foi relatado em isolados de Omã (Poirel et al, 2011), Grécia (Giakkoupi et al, 2011), Canadá (Peirano et al, 2011), Espanha (Sánchez-Romero et al, 2011), Coreia (Kim et al, 2013), Itália (Donati et al, 2014), Filipinas e Tailândia (Lee et al, 2011). No Brasil, sua primeira descrição foi feita por Pereira et al (2013) em isolados do Espírito Santo, Distrito Federal, Alagoas e Piauí. Neste estudo foi relatada sua presença em 3 cidades do Estado de São Paulo (São Paulo, Santo André e São Bernardo do Campo) e em 7 instituições diferentes, estando entre os STs mais predominantes no país, mais importante que o ST258.

O ST340 foi correlacionado com diversos mecanismos de resistência, como KPC-2 (Oliveira et al, 2014; Pereira et al, 2013; Giakkoupi et al, 2011), NDM-1 (Kim et al, 2013; Peirano et al, 2013; Poirel et al, 2011); CTX-M-15 (Peirano et al, 2013; Lee et al, 2011; Oliveira et al, 2014); VIM-1 (Sánchez-Romero et al, 2011), OXA-1 e ArmA (Poirel et al, 2011) e foi o terceiro ST mais frequente em nosso estudo. Também foi descrito por Oliveira et al (2014) na água do Rio Titê.

O ST442 foi relatado somente no Brasil por Seki et al (2011) em um isolado do Estado de Goiás, nenhuma descrição deste ST foi relatada desde então. Contudo, neste estudo foram observados 2 isolados pertencentes a este ST, também correlacionados com a produção de KPC-2 assim como o isolado de Goiás.

O ST101 foi encontrado em apenas um isolado deste estudo, no entanto já foi descrito no Brasil por Seki et al (2011) em isolado do Rio de Janeiro e em outros países como República Tcheca (Hrabák et al, 2009), Espanha (Pitarti et al, 2011; Pena et al, 2014), Itália (Mamma et al, 2012; Frasson et al, 2012; Mezzatesta et al, 2013), Finlândia (Österblad et al, 2011), Coreia (Lee et al, 2012), Taiwan (Ma et al, 2013), França (Marcade et al, 2013; Potron et al 2013), Grécia (Poulou et al, 2013), Tailândia (Lee et al, 2011) Tunísia, Suíça, África do Sul, Marrocos (Potron et al, 2013) e no Japão em paciente que havia viajado para o Egito e Turquia (Hashimoto et al, 2014).

Este ST foi correlacionado com a produção de diversos mecanismos de resistência, principalmente KPC-2 (Seki et al, 2011; Frasson et al, 2012; Mezzatesta et al, 2013; Pena et al, 2014), CTX-M-15 (Lee et al, 2011, Pitarti et al, 2011, Potron et al, 2013) e a família OXA (OXA-48, OXA-1 e OXA181) (Hashimoto et al, 2014; Pitarti et al 2011; Potron et al, 2013; Österblad et al, 2011), mas também com outras beta-lactamases como CTX-M-14 (Hashimoto et al, 2014; Lee et al, 2012) e SHV-12 (Hrabák et al 2009) e a metilases 16s rRNA ArmA (Mezzatesta et al, 2013).

Os ST1044 e ST1046 foram descritos pela primeira vez neste estudo e se diferenciam entre si apenas por um locus (*infB*) e foram relacionados com a produção de KPC-2 e não têm relação com o CC258.

Portanto, o estudo observou a predominância do ST437 no Estado de São Paulo, sendo que este foi associado à produção de KPC-2, podendo ser a adaptação da KPC-2 no Brasil, uma possível explicação para a mudança de frequência quando comparado ao cenário mundial, no qual o ST258 é o mais disseminado e o clone de maior sucesso. O ST437, assim como os

ST11 e ST340, está muito relacionado com o ST258 pertencendo ao mesmo complexo clonal 258.

Alguns autores não utilizam mais o termo CC258 e sim CC11 multirresistente (Oliveira et al, 2014; Pereira et al, 2013, D'Andrea et al, 2013, Lee et al, 2011), devido ao aumento da importância deste ST e sua relação com diversos mecanismos de resistência. Entretanto, optamos por continuar com o termo CC258, devido aos resultados da análise do eBURST. Recentemente, uma nova nomenclatura foi sugerida por Bialek-Davenet et al (2014). Neste estudo, os autores utilizam uma nova técnica chamada "Core Genome MLST" (cgMLST), na qual são analisados 634 genes e são definidos grupos clonais (GC), que seriam mais discriminatórios que os complexos clonais. Os autores exemplificaram STs que pertenciam ao mesmo complexo clonal de acordo com o MLST, mas em diferentes grupos clonais quando analisados pelo cgMLST. Foi determinada a definição de GC como sendo o grupo de STs que apresentam menos de 100 incompatibilidades alélicas com pelo menos um ST do grupo, ou seja, que apresentem menos de 14,4% de diferença entre os 694 alelos. Dos STs presentes no nosso estudo, foram analisados por este método, no estudo de Bialek-Davenet et al (2014), os ST258, ST340 e ST11, e estes foram agrupados no GC258. O ST437 não foi analisado por este método, mas devido a similaridade deste com os ST258, ST340 e ST11, é provável que ele também se enquadre no GC258. A não inclusão do ST437 no estudo realizado por Bialek-Davenet et al (2014) deve-se ao fato da presença deste ST ser praticamente restrita ao Brasil. Foi proposta também uma nova ferramenta de bioinformática para análise desta nova técnica, além de relacionar virulência, resistência antimicrobiana e MLST a estes grupos clonais. Esta ferramenta e banco de dados, chamado BIGSdb-Kp substituiu o antigo site de análise do MLST http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/P_F8/mlst/primers_Kpneumoniae.html pelo novo <http://bigsdbs.web.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>.

Outra técnica utilizada para a comparação dos isolados foi o PFGE, que analisa padrões de macro restrição do DNA genômico. Neste estudo,

foram identificados 13 perfis de PFGE sendo 5 deles únicos. O perfil A foi o predominante, encontrado em 69% dos isolados e em 13 das 18 cidades estudadas e em 46 das 65 instituições presentes no estudo, demonstrando similaridade entre as cepas circulantes no Estado. Dentro do perfil A foram identificados 41 subtipos, estes com 100% de similaridade e o subtipo A28 foi o mais frequente (6 isolados), encontrado em 4 cidades (Diadema, Guarulhos, Santo André e São Paulo) e em 6 instituições diferentes. Estes dados mostram como as cepas se disseminam tanto entre hospitais como entre cidades, aumentando a disseminação dos mecanismos de resistência presentes nesses isolados, como produção de ESBL, carbapenemase e outros mecanismos de resistência a outras classes de antimicrobianos como aminoglicosídeos.

Andrade et al (2011) estudaram isolados da cidade de Franca e Ribeirão Preto no Estado de São Paulo do período de 2007 a 2009 e identificaram um perfil de PFGE predominante que também foi denominado de A (KpA) e foi relacionado com os ST258, ST11 e ST340. Nos isolados da cidade de Ribeirão Preto deste estudo foram observados 4 perfis diferentes de PFGE (B, C, D e H), porém relacionados com os ST258, ST11 e ST340, os mesmos STs descritos por Andrade et al (2011). O perfil A descrito por Andrade et al (2011) pode ser o mesmo encontrado neste estudo, no entanto, devido ao uso de diferentes protocolos para a realização do PFGE não é possível dizer se os perfis estão ou não correlacionados pela técnica do PFGE, mas ao compararmos os resultados do MLST podemos dizer que estes isolados podem estar correlacionados, visto que o ST258 foi encontrado somente em duas cidades, Ribeirão Preto e São Paulo. Tóth et al (2010) também correlacionaram os ST258 e ST11 como pertencentes ao mesmo padrão de PFGE em isolados da Hungria.

Com relação aos outros perfis encontrados, o perfil B (9 isolados) foi encontrado em 3 cidades (Ribeirão Preto, São José dos Campos e São Paulo), 6 instituições e relacionado a 2 STs (ST437 e ST258), com predominância do ST437. O perfil C (4 isolados) foi encontrado em 2 cidades (Ribeirão Preto e São Paulo) e em 3 instituições diferentes, porém associado

apenas ao ST11. O perfil D (3 isolados), foi descrito em 2 cidades (São Paulo e Piracicaba) e em 3 instituições, no entanto, foi relacionado com 2 STs novos (ST1044 e ST1046) que foram descritos pela primeira vez neste estudo e depositados no banco de dados do Instituto Pasteur (www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?file=klebs_profiles.xml). O perfil E (3 isolados) foi encontrado em 3 cidades (Santos, Piracicaba e Taubaté), em 3 instituições e foi relacionado com 2 STs (ST437 e ST442). O perfil F foi descrito em 3 cidades (Barueri, São Paulo e Guarulhos) e foi relacionado com ST437 e ST11. O perfil G (2 isolados) foi descrito em 2 cidades (São Paulo e São Caetano do Sul) e relacionado com os ST437 e ST11 e o H foi descrito apenas em São Paulo, em duas instituições diferentes e também relacionado com 2 STs diferentes (ST11 e ST340). Os perfis considerados únicos se relacionaram com os ST437, ST11 e ST101, sendo que o perfil associado ao ST101 foi o mais distante, apresentando menos de 60% de similaridade com todos os outros isolados.

Os resultados de PFGE apresentaram pouca correlação com os resultados de MLST, pois em muitos casos, o mesmo ST foi observado em perfis de PFGE diferentes e dentro do mesmo perfil de PFGE, STs diferentes. Desta forma, não se pode assumir que dentro de um mesmo perfil de PFGE também está representado um único ST. Este fato é devido a diferença das duas técnicas, pois elas têm objetivos e métodos diferentes, o MLST analisa apenas 7 genes, enquanto que o PFGE analisa todo o DNA bacteriano. Desta forma, o PFGE diferenciou mais as cepas (11 perfis) comparado ao MLST (8 STs).

O PFGE é uma técnica utilizada para a comparação de padrões de restrição e consegue mostrar, por exemplo, se no caso de um surto a mesma cepa colonizou todos os pacientes, porém não é uma técnica reproduzível entre os laboratórios e seus resultados não podem ser comparados, pois, não existe um protocolo padrão para *K. pneumoniae* como existe para outros microorganismos (Rede Pulsenet). Desta forma, nem sempre a mesma enzima é utilizada ou o mesmo tipo de extração é feito e até mesmo a diferença entre os equipamentos de eletroforese e os

insumos utilizados podem interferir na análise dos resultados. A vantagem do MLST sobre o PFGE é a questão da reprodutibilidade, pois conseguimos comparar os resultados obtidos neste estudo com todo o cenário mundial de distribuição, predominância e mudanças nos STs circulantes, o que não foi possível com o PFGE, pois só conseguimos comparar os nossos isolados entre si.

6 CONCLUSÃO

- Foi observada grande diversidade de clones nas amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC circulantes no Estado de São Paulo. Embora um clone tenha sido predominante (ST437 e perfil de PFGE A) presente em 60% das amostras, outros clones também foram observados.
- As sequências tipo encontradas foram ST437, ST11, ST340, ST258, ST442, ST101 e foram descritas 2 novas STs, a ST1044 e ST1046, sendo o ST437 o predominante, encontrado em 73% dos isolados. Já o PFGE resultou em 13 perfis, sendo 5 deles únicos. O perfil A foi o mais predominante em 69% dos isolados.
- A predominância do clone ST437-A sugere uma certa correlação entre os dados de PFGE e MLST, no entanto, houve casos em que dentro do mesmo ST foram encontrados perfis de PFGE diferentes e dentro do mesmo perfil de PFGE, STs diferentes. O PFGE e o MLST são técnicas complementares, sendo utilizadas e analisadas dependendo do objetivo proposto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abboud CS, Bergamasco MD, Doi MA, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D et al. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. *J. Infect. Prev.* 2011; 12:150-153

Adler A, Paikin S, Sterlin Y, Glick J, Edgar R, Aronov R. A Swordless Knight: Epidemiology and Molecular Characteristics of the blaKPC-Negative Sequence Type 258 *Klebsiella pneumoniae* Clone *J Clin Microbiol.* 2012; 50(10): 3180–3185.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R et al. 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 and Chemother* 2011; 55(7): 3579–3583.

Balm MND, Ngan G, Jureen R, Lin RTP, Teo J. Molecular Characterization of Newly Emerged blaKPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Singapore. *J of Clin Microbiol* 2012; 50(2): 475–476.

Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fiett J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 4565–67.

Bialek-Davenet S, Criscuolo A, Ailloud F, Passet V, Jones L, Delannoy-Vieillard A et al. Genomic definition of hipervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis* 2014; 20(11):1812-1820.

Bogaerts P, Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates

of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 65:361–362.

Bonomo R. New Delhi Metallo- β -Lactamase and Multidrug Resistance: A Global SOS? *Clin Infect Dis* 2011; 52(4): 485–487.

Bratu S, Brooks S, Burney S, Kochar S, Gupta J, Landman D, et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 44:972–975.

Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49:776–778.

Brisse S, Fevre C, Passet V, Issenhuth-Jeanjean S, Tournebize R, Diancourt L & Grimont P. Virulent clones of *Klebsiella pneumoniae*: identification and evolutionary scenario based on genomic and phenotypic characterization. *PLoS One* 2009; 4: e4982.

Bueno MFC, Francisco GR, O'Hara JA, Garcia DO, Doi Y. Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(5): 2397-2400.

Bush K & Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents and Chemother.* 2010; 54 (3): 969-976.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 36(6): 1211-1233.

Bush K, Courvalin P, Dantas G, Davies J, Eisenstein B, Houvinen P, et al. Tackling antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9: 894-896.

Cantón R, Akóva M, Carmeli Y, Gisk CG, Glupczynski Y, Livermore DM, et al. Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 413-431.

Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TGP, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 2956-2957.

Castanheira M, Costello AJ, Deshpande LM, Jones RN. Expansion of Clonal Complex 258 KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Latin American Hospitals: Report of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents and Chemother* 2012; 56(3): 1668-1669.

Centers for Disease Control and Prevention. Healthcare-associated infections. Tracking CRE. <http://www.cdc.gov/hai/organisms/cre/TrackingCRE.html> (acesso em 01/04/2014).

Chagas TP, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect* 2011; 77: 281.

Chang M, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari ACC. 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; 46(1):114-115.

Chiu S, Wu T, Chuang Y, Lin J, Fung C, Lu P et al. National Surveillance Study on Carbapenem Non-Susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan:

The Emergence and Rapid Dissemination of KPC-2 Carbapenemase. PLoS ONE 2013; 8 (7): e69428.

Chmelnitsky I, Shklyar M, Hermesh O, Navon-Venezia S, Edgar R, Carmeli Y. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. J Antimicrob Chemother. 2013; 68: 74-83.

Chroma M, Kolar M. Genetic methods of detection of antibiotic resistance: focus on Extended-Spectrum β -lactamases. Biomed Pap Med Univ Palacky Olomouc Czech e Repub. 2010; 164 (4): 286-296.

Chudácková E, Bergerová T, Fajfrlík K, Cervená D, Urbásková P, Empel J, et al. Carbapenem-nonsusceptible strains of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 and/or DHA-1 beta-lactamases in a Czech hospital. FEMS Microbiol Lett. 2010; 309(1):62-70.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twenty-three informational supplement, M100-S23. Clinical and Laboratory Institute; Wayne, PA. 2013.

ClustalW. Disponível em: <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (acesso em 29/09/2014).

Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robutilo A, Baquero F, Coque TM, et al. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. J Antimicrob Chemother 2010; 65: 1608–14.

Cuzon G, Naas T, Demachy MC, Nordmann P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 796–97.

Damjanova I, Tóth A, Pásztij, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, et al. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’?. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62, 978–985.

D'Andrea MM1, Arena F, Pallecchi L, Rossolini GM. CTX-M-type β -lactamases: a successful story of antibiotic resistance. *Int J Med Microbiol*. 2013; 303 (6- 7):305-17.

DeLeo FR, Chen L, Porcella SF, Martens CA, Kobayashi SD, Porter AR, et al. Molecular dissection of the evolution of carbapenem-resistant multilocus sequence type 258 *Klebsiella pneumoniae*. *PNAS*. 2014; 111(13): 4988-4993.

Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States medical centers: report from the MYSTIC program (1999–2005). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2006; 56:367–372.

Diancourt L, Passet V, Nemeč A, Dijkshoorn L & Brisse S. The population structure of *Acinetobacter baumannii*: expanding multiresistant clones from an ancestral susceptible genetic pool. *PLoS One* 2010; 5: e10034.

Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PAD, Brisse S. Multilocus Sequence Typing of *Klebsiella pneumoniae* Nosocomial Isolates. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(8):4178-4182.

Dijkshoorn L, Towner KJ, Struelens M. Analysis of Microbial Genomic Macrorestriction Patterns by Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE) Typing. In: New Approaches for the generation and analyses of microbial typing data. Amsterdam: Elsevier; 2011. P 159-176.

Donati V, Feltrin F, Hendriksen RS, Svendsen CA, Cordaro G, García-Fernández A, et al. Extended-Spectrum-Beta-Lactamases, AmpC Beta-Lactamases and Plasmid Mediated Quinolone Resistance in *Klebsiella* spp. From Companion Animals in Italy. PLoS ONE 2014; 9(3): e90564.

eBURST v3. Disponível em: <http://eburst.mlst.net> , acesso em 30/09/2014

Engine Lite. Disponível em: <https://mapsengine.google.com>, acesso em: 27/10/2014.

Falagas E, Makis GC, Dimopoulos G, Matthaiou DK. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? Clin Microbiol and Infec 2008; 14: 101-104.

Fehlberg LCC, Carvalho AMC, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. Braz J Infect Dis. 2012; 16(6):577–580.

Frasson I, Lavezzo E, Franchin E, Toppo S, Barzon L, Cavallaro A, et al. Antimicrobial Treatment and Containment Measures for an Extremely Drug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST101 Isolate Carrying pKPN101-IT, a Novel Fully Sequenced blaKPC-2 Plasmid. J Clin Microbiol 2012; 50(11): 3768-3772

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; 73: 354–60.

Garcia DO, Abboud CS, Doy C, Saraiva CR, Pereira GH. Interhospital dissemination of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* single clone in São Paulo city, Brazil – First report. In: Interscience Conference on Antimicrob Agents Chemother, 50th, 2010, Boston. Abstract.

Gautom RK. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram negative organism in 1 day. J Clin Microbiol. 1997; 35(11): 2977-2980.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, et al. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009–10). J Antimicrob Chemother 2011; 66: 1510–1513.

Giani T, D’Andrea MM, Pecile P, Borgianni L, Nicoletti P, Tonelli F et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. J Clin Microbiol 2009; 47: 3793–94.

Giske CG, Fröding I, Hasan CM, Turlej-Rogacka A, Toleman M, Livermore D, et al. Diverse Sequence Types of *Klebsiella pneumoniae* Contribute to the Dissemination of blaNDM-1 in India, Sweden, and the United Kingdom. Antimicrob Agents Chemother. 2012; 56(5): 2735-2738.

Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates in Belgian hospitals. Int. J. Antimicrob. Agents 2012; 39:168–172.

Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. Clin Microbiol Infect. 2011;17(10):1520-4.

Google maps. Disponível em: <https://maps.google.com.br>, acesso em: 27/10/014.

Goren MG, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. J. Antimicrob. Chemother 2011; 66: 672– 673.

Hammerum AM, Hansen F, Lester CH, et al. Detection of the first two *Klebsiella pneumoniae* isolates with sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Denmark. Int J. Antimicrob. Agents 2010; 35:610-612.

Hashimoto A, Nagamatsu M, Ohmagari N, Hayakawa K, Kato Y, Kirikae T. Isolation of OXA-48 Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* ST101 from an Overseas Traveler Returning to Japan. Jpn. J. Infect. Dis 2014; 67: 120-121.

Ho PL, Tse CW, Lai EL, Lo WU, Chow KH. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Hong Kong. Int J Antimicrob Agents 2011; 37(4):386-7.

Hrabák J, Papagiannitsis CC, Studentová V, Jakubu V, Fridrichová M, Zemlickova H. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Czech Republic in 2011. Surveillance and Outbreaks reports 2013; 18(45):pii:20626

Iraida E, Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. In Puerto Rico. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54 (3): 1354-1357.

Jain R, Walk ST, Aronoff DM, Young VW, Newton DW, Chenoweth CE. Emergence of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of sequence type 258 in Michigan, USA. *Infect Dis Reports* 2013; 5(5): 16-20.

Johnson & Woodford, 2013. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- β -lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *J Med Microbiol.* 2013; 62: 499–513.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum-beta-lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 465–75.

Kim SY, Shin J, Shin SY, Ko KS. Characteristics of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from Korea. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013; 76(4):486-90.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 3365–70.

Klebsiella pneumoniae MLST Database. Disponível em: www.pasteur.fr/cgi-bin/genopole/PF8/mlstdbnet.pl?file=klebs_profiles.xml, acesso em 30/09/2014.

Krisztina MPW, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2011; 55(11): 4943-4960.

Lafeuille E, Decré D, Mahjoub-Messai F, Bidet P, Arlet G, Bingen E. OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from Libyan patients. *Microb Drug Resist.* 2013; 19(6): 491-7.

Lahey Clinical. Disponível em: www.lahey.org/studies/, acesso em 01/10/2014.

Lascols C, Petrano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JDD. Surveillance and Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* Isolates That Produce Carbapenemases: First Report of OXA-48-Like Enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57 (1): 130-136.

Lee C, Liao C, Lee W, Liu Y, Mu J, Lee M et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2-Producing *K. pneumoniae* Sequence Type 11 in Taiwan in 2011. *Antimicrob Agents and Chemother* 2012; 56: 5016–5022.

Lee MY, Ko KS, Kang C, Chung DR, Peck KR, Song JH. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Asian countries: diverse clones and clonal dissemination. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 38: 160– 163.

Lee S, Park Y, Yu JK, Jung S, Kim Y, Jeong SH, Arakawa Y. Prevalence of acquired fosfomicin resistance among extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Korea and IS26-composite transposon surrounding fosA3. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67: 2843–2847.

Li XZ, Nikaido H, Poole K. Role of mexA-mexBoprM in antibiotic efflux in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents and Chemother.* 1995; 39: 1948-1953.

Li J, Sheng Z, Deng M, Bi S, Hu F, Miao H et al. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 Clone Coproducing KPC-2 and 16S rRNA Methylase RmtB in a Chinese University Hospital. *BMC Infect Dis* 2012; 12: 373-381

Livermore DM, Andrews JM, Hawkey PM, Ho PL, Keness Y, Doi Y, et al. Are susceptibility tests enough, or should laboratories still seek ESBLs and carbapenemases directly. *J Antimicrob Chemoter.* 2012; 67: 1569-1577.

Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R. Non-susceptibility trends among *Pseudomonas aeruginosa* and other non-fermentative Gram-negative bacteria from bacteremias in the UK and Ireland, 2001–06. *J Antimicrob Chemoter* 2008; 62 (suppl 2): ii55–63.

Livermore DM. β -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8:557-84.

Magnet S & Blanchard JS. Molecular Insights into Aminoglycoside Action and Resistance. *Chemical Rev.* 2005; 105(2): 477-497.

Ma L, Lu PL, Siu LK, Hsieh MH. Molecular typing and resistance mechanisms of imipenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: results from the Taiwan surveillance of antibiotic resistance (TSAR) study, 2002-2009. *J Med Microbiol.* 2013; 62(1):101-7.

Mamina C, Bonura C, Aleo A, Fasciana T, Brunelli T, Pesavento G, et al. Sequence type 101 (ST101) as the predominant carbapenem-non-susceptible *Klebsiella pneumoniae* clone in an acute general hospital in Italy. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(6):543-5.

Marcade G, Brisse S, Bialek S, Marcon E, Leflon-Guibout V, Passet V, et al. The emergence of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* of international clones ST13, ST16, ST35, ST48 and ST101 in a teaching hospital in the Paris region. *Epidemiol Infect.* 2013; 141(8):1705-12.

Martínez J, Martínez L, Rosenblueth M, Silva J, Martínez R. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *Int Microbiol* 2004; 7: 261-268.

Mezzatesta ML, Gona F, Caio C, Adembri C, Dell'utri P, Santagati M, et al. Emergence of an extensively drug-resistant ArmA- and KPC-2-producing ST101 *Klebsiella pneumoniae* clone in Italy. *J Antimicrob Chemother.* 2013; 68(8):1932-4.

Miriagou V, Pappagianistis CC, Tzelepi E. Detection of VIM-1 production in *Proteus mirabilis* by an imipenem dipicolinic acid double disk synergy test. *J Clin Microbiol* 2010; 4: 667–668.

Miriagou V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo F, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Samonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47(4):1297-300.

Mojica MF, Correa A, Vargas DA, et al. Molecular correlates of the spread of KPC-producing *Enterobacteriaceae* in Colombia. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 40: 277–79.

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; 53(1): 333-334.

Nicoletti AG, Fehlberg LCC, Picão RC, Machado ADO, Gales AC .Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2012; 56:4563–4564.

Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: permeability barrier and active efflux. *Science.* 1994; 264: 382-388.

Nordmann P, Cuzón G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–36.

Nordmann P & Poirel L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 487–489.

Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 432–438.

Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis* 2011; 17: 1791–1798.

NOTA TÉCNICA N.º 01/2013. Medidas e prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária; Brasília, DF. 2013.

Oliveira S, Moura RA, Silva KC, Pavez M, McCulloch JA, Dropa M, et al. Isolation of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains belonging to the high-risk multiresistant clonal complex 11 (ST437 and ST340) in urban Rivers *J Antimicrob Chemother Research letters* 2014.

Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Finland: the first years (2008–11). *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 2860–2864.

Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vázquez M, et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother*. 2009; 64: 524–528.

Patel G & Bonomo RA. “Stormy waters ahead”: Global emergence of carbapenemases. *Frontiers in Microbiol*. 2013; 4: 1-17.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1178–80.

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB et al. Extended-Spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M- type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47: 3554-3560.

Paterson DL. & Bonomo R. Extended-Spectrum β -lactamases: a Clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18 (4): 657-686.

Paterson DL. Resistance in gram negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *Am J Infect Control*. 2006; 34: 20-28.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother*. 2009; 53(6): 2702.

Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother. 2009, 63(2): 265-268.

Peirano G, Pillai DR, Pitondo-Silva A, Richardson D, Pitout JD. The characteristics of NDM-producing *Klebsiella pneumoniae* from Canada. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011; 71(2):106-9.

Pena I, Picazo JJ, Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistin resistance among VIM-1 producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. Int J Antimicrob Agents. 2014; 14: pii: S0924-8579.

Pereira GH, Garcia DO, Mostardeiro M, Ogassavara CT, Levin AS. Spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in São Paulo, Bras J Hosp Infect 2011; 79: 182-183.

Pereira PS, Araújo CFM, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef APD, 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; 68: 312–316

Piddock LJV. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. Clin Microbiol Rev 2006; 19 (2): 382-402.

Pillai D, Melano r, Rawte P, Lo S, Tijet N, Fuksa M, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. Emerg Infect Dis. 2009; 15(5): 827–829.

Pitart C, Solé M, Roca I, Fábrega A, Vila J, Marco F. First Outbreak of a Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing OXA-48 β -Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55(9): 4398–4401.

Podschun R. & Ullman, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology taxonomy, typing, methods and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Ver* 1998; 11 (4): 589-603.

Poirel L, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Bernabeu S, Nordmann P. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in the Sultanate of Oman. *J Antimicrob Chemother*.2011; 66: 304–306.

Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simoes RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56: 1662–63.

Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56(1): 559-562.

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48: 15–22.

Price LS, Poirel L, Bonomo RA, Schwaber MJ, Daikos GL, Cormican M, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis* 2013; 13: 785–96.

Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. *Surveillance and outbreak reports* 2013; 1-14.

Poulou A, Voulgari E, Vrioni G, Koumaki V, Xidopoulos G, Chatzipantazi V, et al. Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant. *J Clin Microbiol* 2013; 51(10): 3176–3182.

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66: 307–312.

Queenan AM & Bush K. Carbapenemases: the versatile beta- lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* 2007; 20: 440–458.

Quinn JP, Studemeister AE, DiVicenzo CA, Lerner SA. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*: clinical experience and biochemical mechanisms. *Rev. Infec Dis* 1988; 10(4): 892-898.

Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, et al. Detection of the KPC-2 carbapenem- hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *Klebsiella oxytoca* carrying a common plasmid. *J. Clin. Microbiol.* 2008; 46:2066–2069.

Rincón G, Radice M, Giovanakis M, Di Cona JA, Gutkind G. First report of plasmid-mediated fluoroquinolone efflux pump QepA in *Escherichia coli* clinical isolate ST68, in South America. *Diag Microbiol & Infect Dis* 2014; 79(1): 70 -72.

Roche C, Cotter M, O Connell N, Crowley B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. Euro Surveill 2009; 14: 19163.

Rossi F, Andreazzi DB. Resistência Bacteriana: Interpretando o antibiograma. São Paulo. 2005. Ed Atheneu: 21-26.

Rodriguez-Zulueta P, Silva-Sánchez J, Barrios H, Reyes-Mar J, Vélez-Peréz F, Arroyo-Escalante S et al. First Outbreak of KPC-3- Producing *Klebsiella pneumoniae* (ST258) Clinical Isolates in a Mexical Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(8): 4086-4088.

Saïdani M, Hammami S, Kammoun A, Slim A, Boutiba-Ben Boubaker I. Emergence of carbapenem-resistant OXA-48 carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Tunisia. J Med Microbiol. 2012; 61(12):1746-9.

Sánchez-Romero I, Asensio A, Oteo J, Muñoz-Algarra M, Isidoro B, Vindel A, et al. Nosocomial Outbreak of VIM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates of Multilocus Sequence Type 15: Molecular Basis, Clinical Risk Factors, and Outcome. Antimicrob Agents Chemother 2011; 56 (1): 420-427.

Samuelsen Ø, Naseer U, Toffeland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. J Antimicrob Chemother 2009; 63: 654–658.

Sanders CC, Sander WE Jr. β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. Clin Infect Dis. 1992; 15: 824-839.

Scarpate ECB, Cossatis JJ. A presença da *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de Epectro Estendido no ambiente hospitalar. Saúde & Amb. Rev. 2009; 4 (1): 1-11.

Shakil S, Azhar EI, Tabrez S, Kamal MA, Jabir NR, Abuzenadah AM, et al. New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1): an update. J Chemother. 2011; 23: 263–265.

Shoma S, Kamruzzaman M, Ginn AN, Iredell JR, Partridge SR. Characterization of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from Australia carrying blaNDM-1. Diagn Microbiol Infect Dis. 2014; 78(1):93-7.

Seki LM, Pereira PS, Souza MP, Conceição MS, Marques EA, Porto CO et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. Diag Microbiol Infect Dis 2011; 70: 274–277.

Spratt BG. Hybrid penicillin-binding proteins in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. Nat. 1988; 332: 173-176.

Tegmark WK, Haeggman S, Gezelius L, Thompson O, Gustafsson I, Ripa T, et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. Euro Surveill 2007; 12: E071220.

Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári L, Farkas M, Dobák A, et al. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2010; 29:765–769.

Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske GC. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. Clin Microbiol Infec. 2010; 17(5): 668-674.

Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin Microbiol Infec* 2007; 13: 1–46.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing- β -lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51:1553–1555.

Voulgari E, Zarkotou O, Ranellou K, Karageorgopoulos DE, Vrioni G, Mamali V, et al. Outbreak of OXA-48 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece involving an ST11 clone. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68: 84–88.

Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International J Antimicrob Agents* 2010; 36(53): 508-514.

Wei ZQ, 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; 51: 763–65.

Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, et al. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- β -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing *Enterobacteriaceae* from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents.* 2012; 39(6):529-33.

Woodford N, Tierno PM, Young Jr. K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrob. Agents Chemother* 2004; 48:4793–4799.

Woodford N, Turlon JF, Livermore DM. Multiresistant Gram-Negative bacteria: the role of high risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. *FEMS Microbiol Rev* 2011; 35(5):736-755.

Yamane K. KPC carbapenemase producing Gram-negative bacteria. *Nihon Rinsho* 2012; 70(2):267-71.

Yigit H, Queenan A, Rasheed J, Biddle J, Domenech-Sanchez A, Alberti S, et al. Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella oxytoca* Harboring Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003; 47(12): 3881–3889.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001;45:1151–1161.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5046-5054.

Yoo JS, Kim HM, Yoo JI, Yang JW, Kim HS, Chung GT et al. Detection of clonal KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 in Korea during nationwide surveillance in 2011. *J Med Microbiol*. 2013; 62(9):1338-42.

ANEXOS

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa - CEPIAL



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ
Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



São Paulo, 17 de fevereiro de 2012.

Protocolo: 008/2012

Registro CEPIAL nº 045/2011 de 05/12/11

1º Parecer – Protocolo nº 094/2011 de 20/12/11

Projeto de Pesquisa: “Caracterização de genes de resistência em *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos hospitais do Estado de São Paulo”.

Pesquisador Responsável: Doroti de Oliveira Garcia

Instituição: Instituto Adolfo Lutz - IAL

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Adolfo Lutz - CEPIAL analisou e deliberou em reunião de 16 de fevereiro de 2012, de acordo com a Resolução CNS nº 196 de 10 de outubro de 1996 e resoluções complementares, o projeto na categoria **APROVADO**.

Em conformidade com o item IX. 2 da Resolução CNS nº 196/1996 - cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar os relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo, sob sua guarda, por 5 anos, os dados da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar, perante o CEP, interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados ao CEPIAL a cada seis meses a partir do início da pesquisa.

Trata-se de estudo com cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas, depositadas e catalogadas no Núcleo de Coleção de Microrganismos do Centro de Procedimentos Interdisciplinares do Instituto Adolfo Lutz, com declaração expressa do responsável técnico pelo repositório, e não envolve dados secundários e/ou material biológico de humanos, dos quais foram obtidas.

Há declaração expressa da pesquisadora responsável, Doroti de Oliveira Garcia, no que se refere ao cumprimento das Normas de Biossegurança Internacionais da IATA para o transporte das cepas, a partir do IAL ao Laboratório na Faculdade de Medicina da Universidade de Pittsburgh, PA, EUA, sob responsabilidade do Professor Assistente Yohei Doi, o qual declarou colaborar nas etapas propostas no projeto.

Há declaração expressa do diretor geral do IAL, Dr. Alberto José da Silva Duarte, de ciência e concordância com o projeto.

fmj



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
COORDENADORIA DE CONTROLE DE DOENÇAS
INSTITUTO ADOLFO LUTZ

Comitê de Ética em Pesquisa - CEPIAL
Av. Dr. Arnaldo, 355 – Sala 83 - Cerqueira César - 01246-902
Fone: 3068-2859 e-mail: cepi@ial.sp.gov.br



A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em projeto similar, declarou não ser concernente a apreciação ética à luz da Resolução CNS 196/1996.

A aplicação da Resolução CNS 196/1996 e resoluções complementares no estudo com cepas de microrganismos, isoladas de material biológico humano, depositadas e catalogadas em repositório institucional, para as quais não há qualquer relação direta ou indireta com seres humanos, é uma questão a se compreender perfeitamente.

O CEPIAL deverá reunir-se com a CONEP para enunciar decisivamente o procedimento de análise de projetos de pesquisa com cepas de microrganismos isoladas, depositadas e catalogadas.

O CEPIAL aprova o projeto de pesquisa e não encaminhará para a CONEP nesse caso específico.

Luz Marina Trujillo
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Instituto Adolfo Lutz – CEPIAL

1ª via - Coordenador
2ª via - Diretor Geral do IAL
3ª via - CEPIAL
LMT/dvmp

Anexo 2 – Tampões e Soluções

Amplificação dos genes de interesse para o MLST

Mix A

- 900µL Denvil Buffer (10x PCR Buffer, 15mM MgCl₂)
- 90µL DNTP New England Biosystems

Purificação do produto do Big Dye®

Solução 1

- 0,3mL 3M NaOAc (pH 5,3)
- 6.25 mL Etanol 95%
- 1,45 mL Água Mili-Q estéril

Reagentes utilizados no PFGE

Tris 1 M, pH 8,0

- | | |
|-------------------------------------|---------|
| • Tris base | 121,1g |
| • H ₂ O dest | 800 mL |
| • HCl | 42 mL |
| • H ₂ O Ultra pura q.s.p | 1000 mL |

Autoclavar

EDTA 0,5M, pH 8,0

- | | |
|--------------------------------------|---------------|
| • EDTA | 93,06g |
| • H ₂ O dest. | 300 mL |
| • Ajustar pH | ±10 g de NaOH |
| • H ₂ O Ultra pura q.s.p. | 500 mL |

Autoclavar

Tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 2 mL
- H₂O Ultra pura estéril q.s.p. 1000 mL

Tampão de Suspensão Celular - Cell Suspension Buffer – CSB (100 mM Tris, 100 mM EDTA, pH 8,0)

- Tris 1 M pH 8,0 10 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 20 mL
- H₂O Ultra pura estéril q.s.p. 100 mL

Tampão de lise celular – Cell Lysis Buffer – CLB (50 mM Tris, 50 mM EDTA, pH 8,0, 10% sarcosil)

- Tris 1 M pH 8,0 25 mL
- EDTA 0,5 M pH 8,0 50 mL
- Sarcosil 10% 50 mL
- H₂O Ultra pura estéril q.s.p. 500 mL
-

Agarose para plug

- 1,2g pulsed field certified agarose - ultra pure DNA grade agarose (Bio-Rad – cat 162-0137)
- 100mL TE

Agarose para eletroforese

- 1,0g agarose pulsed field electrophoresis: running gel (Sigma – A-2929)
- 100mL H₂O ultra pura

Tampão Tris Borato (TBE)

a) TBE 5 x []

Ácido bórico	27,5 g
Tris base	54,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	20 mL
H ₂ O Ultra pura estéril q.s.p.	1000 mL

b) TBE 10 x []

Ácido bórico	55 g
Tris base	108,0 g
EDTA 0,5 M pH 8,0	40 mL
H ₂ O Ultra pura estéril q.s.p.	1000 mL

Proteinase K

Solução estoque 20 mg/mL

Pesar 0,06 g de Proteinase K para 3 mL de água Ultra pura estéril. Estocar no freezer – 20° C da seguinte maneira: 5 microtubos com alíquota de 100 µL e o restante em alíquotas de 400 µL. Descongelar e usar somente o necessário.

Lisozima

Pesar 0,04 g de Lisozima para 1 mL de água Ultra pura estéril. Estocar no freezer – 20° C em microtubo com alíquota de 100 µL.

Anexo 3 – Perfil de resistência através da determinação da CIM pela técnica de E-test®, de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de hospitais do Estado de São Paulo no período de 2009 a 2011.

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	PM	AT	ETP	IP	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
143/09	3	Santo André	Urina	06/09	6 I	2 I	1,5 S	24 R	>32 R	4 R	>32 R	32 I	1 S	1,5 I	2 S	6 I	
202/09	43	São Paulo	Sangue	09/09	128 R	>256 R	64 R	>256 R	>32 R	24 R	4 R	>256 R	0,5 S	2 I	1,5 S	8 I	
259/09	17	Taboão da Serra	Urina	11/09	8 I	64 R	64 R	48 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	8 I	0,125 S	1,5 S	12 I	
260/09	43	São Paulo	Urina	11/09	128 R	>256 R	64 R	>256 R	4 R	4 R	4 R	>256 R	0,5 S	2 I	1,5 S	8 I	
278/09	7	São Paulo	Urina	12/09	>256 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1 S	1 S	1,5 S	8 I	
97/10	16	Guarulhos	Sangue	06/10	12 I	64 R	6 S	64 R	>32 R	6 R	>32 R	>256 R	2 S	3 I	0,5 S	1 S	
98/10	7	São Paulo	Sangue	06/10	128 R	>256 R	64 R	>256 R	>32 R	8 R	8 R	128 R	1 S	2 I	0,5 S	8 I	
166/10	17	Taboão da Serra	Sangue	07/10	96 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	2 S	2 I	0,5 S	24 R	
266/10	27	Barueri	Sangue	09/10	12 I	>256 R	>256 R	128 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	96 R	1 S	0,75 S	24 R	
281/10	12	Diadema	Sangue	10/10	8 I	8 R	12 I	64 R	>32 R	12 R	8 R	128 R	8 I	1 S	1,5 S	24 R	
295/10	49	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	10/10	48 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	4 R	8 R	>256 R	2 S	2 I	1 S	24 R	
337/10	51	Ribeirão Preto	Secreção de ferida	11/10	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	3 S	1 S	0,19 S	24 R	
364/10	34	São Paulo	Urina	11/10	12 I	>256 R	256 R	256 R	>32 R	12 R	>32 R	>256 R	64 R	0,75 S	0,38 S	24 R	
368/10	39	Jundiaí	Não Informado	11/10	12 I	64 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	0,75 S	0,38 S	>256 R	>256 R
370/10	53	Santos	Não Informado	11/10	32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	0,5 S	0,38 S	0,38 S	1 S	
392/10	54	São Paulo	Sangue	11/10	>256 R	>256 R	4 S	6 I	>32 R	>32 R	>32 R	12 S	0,5 S	2 I	0,25 S	12 I	
403/10	16	Guarulhos	Urina	12/10	64 R	>256 R	256 R	256 R	>32 R	16 R	>32 R	256 R	2 S	2 I	0,5 S	16 R	
411/10	32	São Paulo	Swab axilar	12/10	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	2 S	1 S	0,38 S	16 R	
414/10	31	Jundiaí	Urina	12/10	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	16 R	16 R	4 R	>256 R	1,5 S	1,5 I	0,5 S	12 I	
416/10	51	Ribeirão Preto	Urina	12/10	>256 R	256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	3 S	1 S	0,5 S	24 R	
419/10	23	Santo André	Urina	12/10	96 R	>256 R	>256 R	256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1,5 S	1 S	8 R	16 R	
427/10	46	São José dos Campos	Urina	12/10	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1,5 S	1 S	0,5 S	16 R	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	PM	AT	ETP	IP	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
453/10	7	São Paulo	Urina	12/10	128 R	>256 R	48 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	0,75 S	2 I	0,5 S	12 I	
32/11	63	São Paulo	Urina	01/11	16 R	>256 R	16 I	128 R	>32 R	>32 R	>32 R	48 I	1,5 S	0,25 S	0,5 S	6 I	
35/11	62	São Paulo	Urina	01/11	16 R	>256 R	16 I	>256 R	>32 R	>32 R	16 R	>256 R	1 S	2 I	0,5 S	12 I	
55/11	12	Diadema	Sangue	01/11	>32 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	2 S	1 S	2 S	16 R	
64/11	34	São Paulo	Secreção Traqueal	01/11	128 R	>256 R	128 R	>256 R	>32 R	16 R	>32 R	>256 R	>256 R	1 S	0,5 S	>256 R	>256 R
84/11	50	Piracicaba	Secreção Traqueal	01/11	>256 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	16 R	>32 R	>256 R	>256 R	0,125 S	0,5 S	>256 R	>256 R
92/11	25	Santo André	Secreção Traqueal	01/11	192 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1 S	2 I	12 R	24 R	
107/11	37	Piracicaba	Urina	01/11	192 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	>32 R	8 R	96 I	0,75 S	0,5 S	0,25 S	16 R	
108/11	30	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	01/11	>256 R	32 R	3 S	32 R	>32 R	>32 R	>32 R	64 I	0,5 S	2 I	1,5 S	1,5 S	
111/11	14	Piracicaba	Sangue	01/11	128 R	>256 R	32 R	>256 R	12 R	12 R	>32 R	256 R	0,75 S	1 S	1 S	16 R	
122/11	31	Jundiaí	Sangue	02/11	16 R	12 R	6 S	64 R	>32 R	>32 R	>32 R	256 R	1 S	2 I	1 S	16 R	
137/11	7	São Paulo	Sangue	02/11	>256 R	>256 R	48 R	>256 R	>32 R	8 R	>32 R	>256 R	0,5 S	0,75 S	0,25 S	12 I	
143/11	45	Piracicaba	Sangue	02/11	96 R	>256 R	32 R	>256 R	3 R	>32 R	>32 R	>256 R	0,5 S	1 S	0,5 S	12 I	
145/11	47	Piracicaba	Secreção Retal	02/11	32 R	32 R	12 I	256 R	>32 R	>32 R	32 R	>256 R	>256 R	0,125 S	32 R	>256 R	>256 R
170/11	47	Piracicaba	Urina	02/11	16 R	>256 R	12 I	96 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	0,5 S	0,38 S	0,38 S	1 S	
180/11	42	São José dos Campos	Urina	02/11	8 I	2 I	8 S	128 R	8 R	>32 R	>32 R	256 R	192 R	1 S	0,38 S	128 R	
189/11	22	São Caetano do Sul	Urina	02/11	6 I	6 R	6 S	>256 R	>32 R	16 R	4 R	256 R	1 S	0,5 S	0,19 S	24 R	
192/11	10	Cubatão	Urina	02/11	48 R	>256 R	24 I	>256 R	>32 R	>32 R	12 R	>256 R	0,5 S	0,38 S	0,19 S	12 I	
194/11	56	São Paulo	Urina	02/11	16 R	>256 R	6 S	256 R	>32 R	>32 R	12 R	192 R	0,38 S	0,75 S	0,19 S	0,38 S	
197/11	4	São Caetano do Sul	Secreção Traqueal	02/11	48 R	>256 R	48 R	256 R	>32 R	>32 R	4 R	96 I	0,75 S	1 S	0,25 S	16 R	
208/11	45	Piracicaba	Não Informado	03/11	64 R	>256 R	24 I	>256 R	4 R	4 R	4 R	256 R	0,5 S	0,38 S	0,094 S	12 I	
216/11	7	São Paulo	Sangue	03/11	8 I	>256 R	3 S	24 R	>32 R	>32 R	4 R	128 R	0,75 S	1 S	0,25 S	16 R	
228/11	58	São Paulo	Urina	03/11	48 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	>32 R	4 R	64 I	0,75 S	1 S	0,25 S	12 I	
230/11	6	Ribeirão Preto	Urina	03/11	48 R	128 R	48 R	256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	64 R	0,19 S	0,125 S	8 I	
232/11	57	São Paulo	Secreção	03/11	>256 R	>256 R	64 R	>256 R	>32 R	>32 R	32 R	>256 R	1,5 S	1 S	0,19 S	12 I	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	PM	AT	ETP	IP	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
233/11	55	São Paulo	Urina	03/11	>256 R	>256 R	96 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1 S	1,5 I	0,125 S	12 I	
237/11	46	São José dos Campos	Urina	03/11	48 R	256 R	32 R	>256 R	>32 R	24 R	>32 R	>256 R	64 R	0,75 S	0,125 S	16 R	
253/11	26	Campinas	Swab anal	03/11	8 I	256 R	>256 R	256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	0,25 S	0,25 S	>256 R	>256 R
276/11	61	São Paulo	Sangue	03/11	3 S	256 R	6 S	6 I	>32 R	>32 R	4 R	24 I	0,38 S	1,5 I	0,5 S	8 I	
277/11	61	São Paulo	Urina	03/11	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	8 R	4 R	12 R	>256 R	2 S	2 I	32 R	24 R	
314/11	35	São Paulo	Sangue	03/11	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	2 S	2 I	<0,064 S	12 I	
326/11	23	Santo André	Sangue	04/11	64 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	8 R	8 R	>256 R	64 R	8 R	0,19 S	8 I	
337/11	1	São Paulo	Urina	04/11	>256 R	>256 R	48 R	>256 R	24 R	8 R	8 R	>256 R	1,5 S	8 R	0,19 S	16 R	
354/11	40	Rio Claro	Urina	04/11	>256 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	3 I	2 I	192 R	1,5 S	0,5 S	0,25 S	6 I	
365/11	8	São Paulo	Sangue	04/11	128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1,5 S	3 I	2 S	16 R	
366/11	48	Cubatão	Urina	04/11	192 R	>256 R	128 R	>256 R	>32 R	4 R	12 R	192 R	1,5 S	4 R	0,75 S	12 I	
404/11	28	São José dos Campos	Sangue	05/11	48 R	>256 R	16 I	>256 R	>32 R	4 R	6 R	256 R	48 R	2 I	0,75 S	16 R	
416/11	6	Ribeirão Preto	Urina	05/11	24 R	32 R	8 S	>256 R	>32 R	16 R	>32 R	>256 R	>256 R	0,75 S	1 S	32 R	
417/11	51	Ribeirão Preto	Não Informado	05/11	>256 R	256 R	192 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	12 I	2 I	32 R	24 R	
419/11	29	Guarulhos	Sangue	05/11	6 I	32 R	64 R	>256 R	>32 R	6 R	>32 R	>256 R	>256 R	1 S	1 S	96 R	
425/11	28	São José dos Campos	Ponta de catéter	05/11	128 R	>256 R	48 R	>256 R	16 R	3 I	4 R	>256 R	>256 R	3 I	0,38 S	>256 R	>256 R
428/11	28	São José dos Campos	Urina	05/11	128 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	4 R	4 R	>256 R	128 R	3 I	2 S	64 R	
467/11	22	São Caetano do Sul	Sangue	05/11	128 R	>256 R	64 R	>256 R	12 R	>32 R	8 R	>256 R	1 S	2 I	1,5 S	12 I	
483/11	44	São José dos Campos	Urina	05/11	256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	8 R	24 R	>256 R	1,5 S	0,5 S	0,5 S	1,5 S	
488/11	52	São Paulo	Swab Vigilância	05/11	4 S	8 R	4 S	24 R	8 R	6 R	4 R	>256 R	128 R	4 R	1,5 S	32 R	
492/11	19	São Paulo	Sangue	05/11	24 R	128 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	12 I	0,38 S	0,5 S	24 R	
493/11	13	São Paulo	Urina	05/11	96 R	256 R	32 R	>256 R	>32 R	4 R	0,5 S	256 R	1,5 S	2 I	1,5 S	16 R	
513/11	65	São Bernardo do Campo	Urina	06/11	96 R	>256 R	64 R	>256 R	8 R	>32 R	8 R	256 R	2 S	1 S	0,75 S	16 R	
515/11	51	São Paulo	Urina	06/11	32 R	>256 R	16 I	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	1 S	0,75 S	0,5 S	0,5 S	
531/11	41	São José do Rio Preto	LCR	06/11	>256 R	>256 R	64 R	>256 R	32 R	32 R	>32 R	>256 R	2 S	2 I	1,5 S	16 R	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	PM	AT	ETP	IP	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
534/11	5	São Paulo	Não Informado	06/11	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	3 S	1,5 I	1 S	24 R	
538/11	12	Diadema	Urina	06/11	128 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	32 R	>32 R	>256 R	2 S	1,5 I	1 S	8 I	
576/11	40	Piracicaba	Não Informado	06/11	256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256	>256 R	1,5 I	0,5 S	>256 R	>256 R
635/11	11	São Paulo	Sangue	06/11	16 R	128 R	24 I	128 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	64 R	1 S	0,38 S	32 R	
641/11	11	São Paulo	Urina	06/11	12 I	4 R	6 S	192 R	>32 R	2 I	1 S	256 R	1 S	0,5 S	0,5 S	1 S	
671/11	59	São Paulo	Urina	06/11	256 R	>256 R	48 R	>256 R	12 R	>32 R	4 R	>256 R	32 R	0,38 S	0,75 S	4 S	
672/11	60	São Paulo	Urina	06/11	12 I	8 R	8 S	>256 R	32 R	4 R	>32 R	>256 R	6 I	0,38 S	4 R	24 R	
705/11	21	São Paulo	Urina	07/11	256 R	>256 R	48 R	>256 R	24 R	32 R	32 R	>256 R	1 S	1,5 I	1,5 S	12 I	
720/11	36	São Paulo	Urina	07/11	256 R	>256 R	128 R	>256 R	16 R	4 R	4 R	>256 R	64 R	0,38 S	0,75 S	6 I	
740/11	24	São Paulo	Sangue	07/11	24 R	>256 R	32 R	128 R	6 R	32 R	>32 R	>256 R	256 R	2 I	0,38 S	32 R	
749/11	13	São Paulo	Urina	07/11	64 R	>256 R	24 I	>256 R	>32 R	8 R	>32 R	48 I	0,75 S	2 I	0,38 S	16 R	
750/11	35	São Paulo	Urina	07/11	6 I	128 R	3 S	48 R	16 R	16 R	4 R	96 I	1,5 S	2 I	1 S	1 S	
754/11	33	São Paulo	Secreção Traqueal	07/11	128 R	>256 R	32 R	>256 R	8 R	16 R	4 R	>256 R	1,5 S	3 I	1,5 S	12 I	
768/11	32	São Paulo	Secreção axilar	07/11	192 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	3 S	2 I	16 R	32 R	
771/11	51	Ribeirão Preto	Urina	07/11	>256 R	256 R	16 I	>256 R	12 R	32 R	16 R	>256 R	96 R	1,5 I	12 R	32 R	
779/11	47	Piracicaba	Urina	07/11	128 R	>256 R	32 R	>256 R	32 R	16 R	8 R	>256 R	1 S	0,75 S	1 S	12 I	
815/11	15	São Paulo	Ponta de catéter	08/11	16 R	>256 R	192 R	192 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	2 S	1 S	0,75 S	16 R	
831/11	23	Santo André	Urina	08/11	128 R	>256 R	32 R	>256 R	>32 R	8 R	4 R	256 R	2 S	1 S	6 R	24 R	
848/11	21	São Paulo	Urina	08/11	192 R	>256 R	48 R	>256 R	>32 R	4 R	>32 R	>256 R	1,5 S	2 I	1 S	12 I	
857/11	9	São Paulo	Aspirado Traqueal	08/11	128 R	>256 R	48 R	>256 R	2 R	16 R	>32 R	>256 R	1 S	3 I	1 S	16 R	
867/11	2	São Caetano do Sul	Urina	08/11	12 I	>256 R	64 R	96 R	>32 R	>32 R	32 R	>256 R	64 R	0,75 S	0,5 S	16 R	
870/11	65	São Bernardo do Campo	Sangue	08/11	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	1 S	0,5 S	16 R	
886/11	21	São Paulo	Urina	08/11	4 S	2 I	3 S	32 R	16 R	4 R	8 R	48 I	1 S	1,5 I	0,75 S	1,5 S	
892/11	18	São Paulo	Sangue	08/11	96 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	8 R	16 R	128 R	1,5 S	2 I	1 S	24 R	
917/11	64	São José dos Campos	Urina	08/11	24 R	>256 R	24 I	128 R	>32 R	4 R	2 I	48 I	1 S	4 R	0,38 S	16 R	

CONTINUA

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	TZ	CT	PM	AT	ETP	IP	MP	PTc	GM	TGC	PO	TM	AK
918/11	25	Santo André	Urina	08/11	128 R	>256 R	64 R	>256 R	>32 R	4 R	4 R	>256 R	2 S	2 I	24 R	16 R	
922/11	38	Taubaté	Urina	08/11	>256 R	>256 R	>256 R	>256 R	>32 R	>32 R	>32 R	>256 R	>256 R	0,19 S	0,5 S	>256 R	>256 R
1194/11	20	São Paulo	Ponta de catéter	11/11	192 R	>256 R	48 R	>256 R	8 R	8 R	4 R	>256 R	>256 R	0,75 S	0,5 S	>256 R	>256 R

ETP – ertapenem; IP – imipenem; IP/IPI – imipenem/imipenem com EDTA; MP – meropenem; GM – gentamicina; TGC – tigeciclina; PO – polimixina B; TM – tobramicina; AK – ampicacina.

Anexo 4 - Resultados de MLST, perfis e subtipos de PFGE das amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de hospitais do Estado de São Paulo no período de 2009 a 2011.

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	PFGE Subtipo	PFGE Perfil	MLST
143/09	3	Santo André	Urina	06/09	A25	A	437
202/09	43	São Paulo	Sangue	09/09	A28	A	437
259/09	17	Taboão da Serra	Urina	11/09	ÚNICO	ÚNICO	437
260/09	43	São Paulo	Urina	11/09	A14	A	437
278/09	7	São Paulo	Urina	12/09	A14	A	437
97/10	16	Guarulhos	Sangue	06/10	A32	A	437
98/10	7	São Paulo	Sangue	06/10	A9	A	437
166/10	17	Taboão da Serra	Sangue	07/10	A18	A	437
266/10	27	Barueri	Sangue	09/10	F1	F	11
281/10	12	Diadema	Sangue	10/10	A26	A	437
295/10	49	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	10/10	ÚNICO	ÚNICO	437
337/10	51	Ribeirão Preto	Secreção de ferida	11/10	B6	B	258
364/10	34	São Paulo	Urina	11/10	C1	C	11
368/10	39	Jundiaí	Não Informado	11/10	A6	A	11
370/10	53	Santos	Não Informado	11/10	E3	E	437
392/10	54	São Paulo	Sangue	11/10	A18	A	437
403/10	16	Guarulhos	Urina	12/10	A28	A	437
411/10	32	São Paulo	Swab axilar	12/10	A14	A	258
414/10	31	Jundiaí	Urina	12/10	A38	A	437
416/10	51	Ribeirão Preto	Urina	12/10	ÚNICO	ÚNICO	11
419/10	23	Santo André	Urina	12/10	A29	A	437
427/10	46	São José dos Campos	Urina	12/10	ÚNICO	ÚNICO	437
453/10	7	São Paulo	Urina	12/10	A16	A	437
32/11	63	São Paulo	Urina	01/11	A22	A	437
35/11	62	São Paulo	Urina	01/11	A27	A	437
55/11	12	Diadema	Sangue	01/11	A28	A	437
64/11	34	São Paulo	Secreção Traqueal	01/11	A39	A	437
84/11	50	Piracicaba	Secreção Traqueal	01/11	E1	E	442
92/11	25	Santo André	Secreção Traqueal	01/11	A28	A	437
107/11	37	Piracicaba	Urina	01/11	A20	A	437
108/11	30	São Bernardo do Campo	Secreção Traqueal	01/11	A9	A	437
111/11	14	Piracicaba	Sangue	01/11	A20	A	437
122/11	31	Jundiaí	Sangue	02/11	A36	A	437
137/11	7	São Paulo	Sangue	02/11	A21	A	437
143/11	45	Piracicaba	Sangue	02/11	A20	A	437

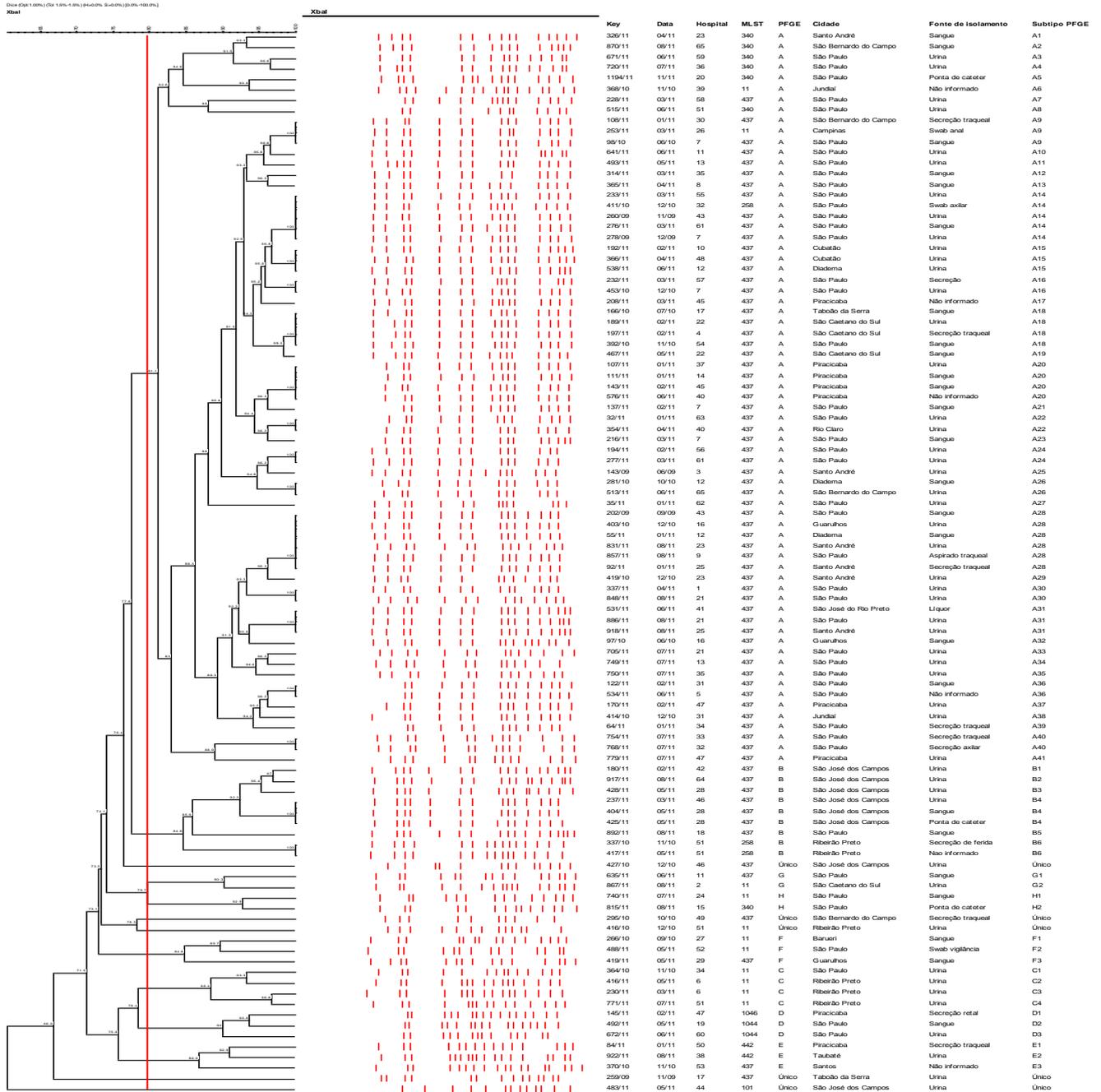
Continua

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	PFGE Subtipo	PFGE Perfil	MLST
145/11	47	Piracicaba	Secreção Retal	02/11	D1	D	1046
170/11	47	Piracicaba	Urina	02/11	A37	A	437
180/11	42	São José dos Campos	Urina	02/11	B1	B	437
189/11	22	São Caetano do Sul	Urina	02/11	A18	A	437
192/11	10	Cubatão	Urina	02/11	A15	A	437
194/11	56	São Paulo	Urina	02/11	A24	A	437
197/11	4	São Caetano do Sul	Secreção Traqueal	02/11	A18	A	437
208/11	45	Piracicaba	Não Informado	03/11	A17	A	437
216/11	7	São Paulo	Sangue	03/11	A23	A	437
228/11	58	São Paulo	Urina	03/11	A7	A	437
230/11	6	Ribeirão Preto	Urina	03/11	C3	C	11
232/11	57	São Paulo	Secreção	03/11	A16	A	437
233/11	55	São Paulo	Urina	03/11	A14	A	437
237/11	46	São José dos Campos	Urina	03/11	B4	B	437
253/11	26	Campinas	Swab anal	03/11	A17	A	11
276/11	61	São Paulo	Sangue	03/11	A14	A	437
277/11	61	São Paulo	Urina	03/11	A24	A	437
314/11	35	São Paulo	Sangue	03/11	A12	A	437
326/11	23	Santo André	Sangue	04/11	A1	A	340
337/11	1	São Paulo	Urina	04/11	A30	A	437
354/11	40	Rio Claro	Urina	04/11	A22	A	437
365/11	8	São Paulo	Sangue	04/11	A13	A	437
366/11	48	Cubatão	Urina	04/11	A15	A	437
404/11	28	São José dos Campos	Sangue	05/11	B4	B	437
416/11	6	Ribeirão Preto	Urina	05/11	C2	C	11
417/11	51	Ribeirão Preto	Não Informado	05/11	B6	B	258
419/11	29	Guarulhos	Sangue	05/11	F3	F	437
425/11	28	São José dos Campos	Ponta de catéter	05/11	B4	B	437
428/11	28	São José dos Campos	Urina	05/11	B3	B	437
467/11	22	São Caetano do Sul	Sangue	05/11	A19	A	437
483/11	44	São José dos Campos	Urina	05/11	ÚNICO	ÚNICO	101
488/11	52	São Paulo	Swab Vigilância	05/11	F2	F	11
492/11	19	São Paulo	Sangue	05/11	D2	D	1044
493/11	13	São Paulo	Urina	05/11	A11	A	437
513/11	65	São Bernardo do Campo	Urina	06/11	A26	A	437
515/11	51	São Paulo	Urina	06/11	A8	A	340
531/11	41	São José do Rio Preto	LCR	06/11	A31	A	437

Continua

Cepas	Hospital	Cidade	Fonte de isolamento	Data	PFGE Subtipo	PFGE Perfil	MLST
534/11	5	São Paulo	Não Informado	06/11	A36	A	437
538/11	12	Diadema	Urina	06/11	A15	A	437
576/11	40	Piracicaba	Não Informado	06/11	A20	A	437
635/11	11	São Paulo	Sangue	06/11	G1	G	437
641/11	11	São Paulo	Urina	06/11	A10	A	437
671/11	59	São Paulo	Urina	06/11	A3	A	340
672/11	60	São Paulo	Urina	06/11	D3	D	1044
705/11	21	São Paulo	Urina	07/11	A33	A	437
720/11	36	São Paulo	Urina	07/11	A4	A	340
740/11	24	São Paulo	Sangue	07/11	H1	H	11
749/11	13	São Paulo	Urina	07/11	A34	A	437
750/11	35	São Paulo	Urina	07/11	A35	A	437
754/11	33	São Paulo	Secreção Traqueal	07/11	A40	A	437
768/11	32	São Paulo	Secreção axilar	07/11	A40	A	437
771/11	51	Ribeirão Preto	Urina	07/11	C4	C	11
779/11	47	Piracicaba	Urina	07/11	A41	A	437
815/11	15	São Paulo	Ponta de catéter	08/11	H2	H	340
831/11	23	Santo André	Urina	08/11	A28	A	437
848/11	21	São Paulo	Urina	08/11	A30	A	437
857/11	9	São Paulo	Aspirado Traqueal	08/11	A28	A	437
867/11	2	São Caetano do Sul	Urina	08/11	G2	G	11
870/11	65	São Bernardo do Campo	Sangue	08/11	A2	A	340
886/11	21	São Paulo	Urina	08/11	A31	A	437
892/11	18	São Paulo	Sangue	08/11	B5	B	437
917/11	64	São José dos Campos	Urina	08/11	B2	B	437
918/11	25	Santo André	Urina	08/11	A31	A	437
922/11	38	Taubaté	Urina	08/11	E2	E	442
1194/11	20	São Paulo	Ponta de catéter	11/11	A5	A	340

Anexo 5 – Dendrograma indicando a diversidade genética entre as cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes de diversos hospitais do Estado de São Paulo, digeridas com a enzima de restrição XbaI com base no coeficiente de similaridade de Dice com tolerância de 1,5%. Ao lado do dendrograma está indicado da esquerda para direita o número da amostra, a data do isolamento, o número do hospital, ST, perfil de PFGE, cidade, fonte de isolamento e subtipo de PFGE.



Anexo 6 – Artigo 1 publicado no periódico Antimicrobial Agents and Chemotherapy

Antimicrobial Agents
and Chemotherapy

**Coproduction of 16S rRNA
Methyltransferase RmtD or RmtG with
KPC-2 and CTX-M Group
Extended-Spectrum β -Lactamases in
*Klebsiella pneumoniae***

Maria Fernanda C. Bueno, Gabriela R. Francisco, Jessica A. O'Hara, Doroti de Oliveira Garcia and Yohei Doi

Antimicrob. Agents Chemother. 2013, 57(5):2397. DOI:
10.1128/AAC.02108-12.

Published Ahead of Print 4 March 2013.

Updated information and services can be found at:
<http://aac.asm.org/content/57/5/2397>

These include:

REFERENCES

This article cites 27 articles, 17 of which can be accessed free at: <http://aac.asm.org/content/57/5/2397#ref-list-1>

CONTENT ALERTS

Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), [more»](#)

Information about commercial reprint orders: <http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml>

To subscribe to to another ASM Journal go to: <http://journals.asm.org/site/subscriptions/>

Journals.ASM.org

Coproduction of 16S rRNA Methyltransferase RmtD or RmtG with KPC-2 and CTX-M Group Extended-Spectrum β -Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*

Maria Fernanda C. Bueno,^{a,b} Gabriela R. Francisco,^{a,b} Jessica A. O'Hara,^b Doroti de Oliveira Garcia,^a Yohei Doi^b

Enteric Diseases and Infections by Special Pathogens Laboratory, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, Brazil^a; Division of Infectious Diseases, University of Pittsburgh School of Medicine, Pittsburgh, Pennsylvania, USA^b

Eight *Klebsiella pneumoniae* clinical strains with high-level aminoglycoside resistance were collected from eight hospitals in São Paulo State, Brazil, in 2010 and 2011. Three of them produced an RmtD group 16S rRNA methyltransferase, RmtD1 or RmtD2. Five strains were found to produce a novel 16S rRNA methyltransferase, designated RmtG, which shared 57 to 58% amino acid identity with RmtD1 and RmtD2. Seven strains coproduced KPC-2 with or without various CTX-M group extended-spectrum beta-lactamases, while the remaining strain coproduced CTX-M-2.

The production of 16S rRNA methyltransferases (16S-RMTases) has emerged as a mechanism of high-level aminoglycoside resistance among Gram-negative pathogens in the last decade (1). Eight groups of such enzymes have been reported to date. Seven of them (ArmA and RmtA through RmtF) confer high-level resistance to 4,6-disubstituted deoxystreptamine (DOS) aminoglycosides, including gentamicin, tobramycin, and amikacin, by post-transcriptional methylation of position N7 at residue G1405 of 16S rRNA (1–3). N7 G1405 16S-RMTases have a global distribution and are often coproduced with carbapenemases or extended-spectrum β -lactamases (ESBLs). The other 16S-RMTase, NpmA, confers high-level resistance to 4,6-disubstituted DOS aminoglycosides, as well as 4,5-disubstituted DOS aminoglycosides, such as neomycin. NpmA has been shown to methylate position N1 at residue A1408 and has only been found in a single *Escherichia coli* strain in Japan (4).

Worldwide, ArmA and RmtB are the most commonly encountered 16S-RMTases, having been identified in *Enterobacteriaceae*, as well as *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* (1). The epidemiology appears to be distinct in South America, however, where RmtD, which includes the two closely related enzymes RmtD1 and RmtD2, predominates. RmtD1 was initially identified in *P. aeruginosa* clinical strains which were collected from hospitals in São Paulo, Brazil, in 2005 (5). The majority of these strains coproduced SPM-1 metallo- β -lactamase (6). RmtD1 was then identified in multiple species of *Enterobacteriaceae* from Brazil, Argentina, and Chile (7). Subsequently, RmtD2 was reported in *Enterobacter* and *Citrobacter* spp. from Argentina as the first variant of RmtD, differing from RmtD1 by nine amino acids (8).

The present study was conducted to investigate the 16S-RMTase contents among aminoglycoside-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical strains collected at Instituto Adolfo Lutz (IAL) from hospitals across the state of São Paulo. IAL serves as a state reference laboratory and receives multidrug-resistant Gram-negative pathogens on an ongoing basis. In 2010 and 2011, eight *K. pneumoniae* strains with high-level resistance to amikacin, gentamicin, and tobramycin (MIC of ≥ 256 μ g/ml) were identified, all collected from different hospitals in São Paulo State. The sources of the strains included tracheal aspi-

rate (2), rectal swab (2), bone (1), catheter tip (1), urine (1), and unknown (1) samples (Table 1).

We first screened for known 16S-RMTase genes as described previously (9). Three strains were positive for *rmtD*. Sequencing of the full structural genes identified them as *rmtD1* (1 strain) or *rmtD2* (2 strains). The other strains were negative for any of the previously reported genes. One of these five strains without a known 16S-RMTase gene, *K. pneumoniae* 350/10, was selected for further investigation. The genomic DNA of *K. pneumoniae* 350/10 was extracted, digested with HindIII (New England Biolabs, Ipswich, MA), and ligated with vector pBC-SK(+) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA). Electrocompetent *Escherichia coli* DH10B was transformed with this genomic library, and transformants were selected on tryptic soy agar (TSA) plates containing chloramphenicol (30 μ g/ml) and gentamicin (50 μ g/ml). This procedure yielded several colonies, all of which grew readily on TSA plates containing 100 μ g/ml of arbekacin, a phenotype suggestive of 16S-RMTase production (9). The recombinant plasmid harbored by one of these transformants (pKp350/10H3) was then fully sequenced. The sequencing revealed the presence of a 1.6-kb insert, which contained two overlapping open reading frames. The first open reading frame was partial and corresponded to a 252-amino-acid sequence showing 76% identity with a putative tRNA ribosyltransferase reported upstream from *rmtD1* and *rmtD2* (8, 10). The second open reading frame overlapped the first one by eight nucleotides and corresponded to a 264-amino-acid sequence, which showed 58% and 57% identity with RmtD1 and RmtD2, respectively, 36% with RmtA, RmtB2, and RmtF, 35% with RmtB1, 29% with RmtE, 23% with RmtC, and 22% with ArmA. This open reading frame encoded a novel 16S-RMTase, which was designated RmtG (Fig. 1 and 2). Given the relative

Received 15 October 2012 Returned for modification 25 November 2012

Accepted 24 February 2013

Published ahead of print 4 March 2013

Address correspondence to Yohei Doi, yod4@pitt.edu.

Copyright © 2013, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/AAC.02108-12

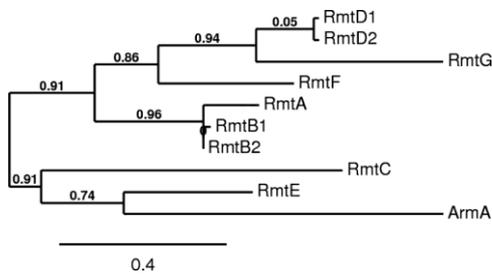


FIG 2 Dendrogram of confirmed and putative acquired N7 G1405 16S-RMTases. The dendrogram was generated using the tools available at <http://www.phylogeny.fr> (27).

GenBank protein sequence accession numbers are as follows: ArmA, AAP50754.1; RmtA, BAD12551.1; RmtB1, BAC81971.1; RmtB2, AFC75738.1; RmtC, BAE48305.1; RmtD1, ABJ53409.1; RmtD2, ADW66527.1; RmtE, ADA63498.1; RmtF, AFJ11385.1. The numbers represent branch support values. The scale bar shows length in proportional difference.

CGATGTGTGCC-3') and *rmtG*-R (5'-ACACGGCATCTGTTT CTCC-3') to screen the four remaining *K. pneumoniae* strains, which were negative for known 16S-RMTase genes. The PCR conditions were the following: initial denaturation at 95°C for 2 min; 30 cycles at 95°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 60 s; and final incubation for 7 min at 72°C. The results showed that they were all positive for the presence of *rmtG*. Sequencing of the entire genes confirmed them as identical to the originally identified *rmtG* from *K. pneumoniae* 350/10. Furthermore, the upstream sequence of *rmtG* was identical for all five strains for the 0.7-kb region captured in pKp350/10H3. Of the five RmtG-producing *K. pneumoniae* strains, transfer of *rmtG* by transformation to *E. coli* DH10B was successful only for *K. pneumoniae* 84/11(pKp84/11), suggesting a plasmidic location of *rmtG* for this strain. *rmtG* was cotransferred with *bla*_{CTX-M-59} but not *bla*_{KPC-2}. Transfer of *rmtG* to *E. coli* J53 by broth mating was not successful for any of the five strains despite repeated attempts. We therefore conducted pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) of S1 nuclease-treated genomic DNA (11). This was followed by DNA hybridization using an *rmtG*-specific probe and methodology described previously (12). As shown in Fig. 3, the size of pKp84/11 was estimated to be approximately 200 kb. While they did not transfer to *E. coli*, the

rmtG genes in the other four *K. pneumoniae* strains also appeared to be carried on plasmids, which ranged in size between 200 and 400 kb. Replicon typing using a previously described method (13) revealed pKp84/11 to be an IncN plasmid (Table 1). However, two of the *rmtG*-harboring *K. pneumoniae* strains were negative for any replicon, including IncN, based on this protocol.

K. pneumoniae strains producing various ESBLs and, more recently, KPCs (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases), are reported from Brazil (14–19). We screened the eight 16S-RMTase-producing strains for KPC, CTX-M, SHV, and TEM group -lactamases by PCR and sequencing as described previously (20). All but one strain were found to harbor *bla*_{KPC-2}. In addition, six strains carried *bla*_{CTX-M} (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-59}, or *bla*_{CTX-M-15}) (Table 1). KPC-producing *K. pneumoniae* strains in Brazil are predominantly clonal complex 258 (CC258), which includes sequence types (STs) such as ST11, ST258, and ST437 (16,21). We determined the STs of the eight clinical strains using the standard protocol (22). The strains producing RmtD1 and RmtD2 belonged to ST11 or ST437 (Table 1). One of the RmtG-producing strains belonged to ST340, which is also part of CC258. The other four strains belonged to ST442 or ST1046. ST442 was reported in a clinical strain which was recovered from blood in the state of Goiás in Brazil in 2009 (21). ST1046 is a double-locus variant of ST961, which was recently registered as an environmental strain from Portugal. Therefore, the *rmtD* alleles were likely acquired by global epidemic strains from other *Enterobacteriaceae* species or *P. aeruginosa*, whereas the strains carrying *rmtG* appeared to be of a more-local origin. Coproduction of KPC and 16S-RMTase has been reported for ArmA and RmtB in *K. pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* (23–25). RmtG is thus the third 16S-RMTase to be described in KPC-producing *Enterobacteriaceae*. The production of 16S-RMTase by KPC-producing *K. pneumoniae* could further limit the treatment options for infection caused by this organism, the majority of which otherwise remain susceptible to one or more aminoglycosides, gentamicin in particular (26).

Nucleotide sequence accession number. The sequence reported in this work has been deposited to the GenBank under accession number JX486113.

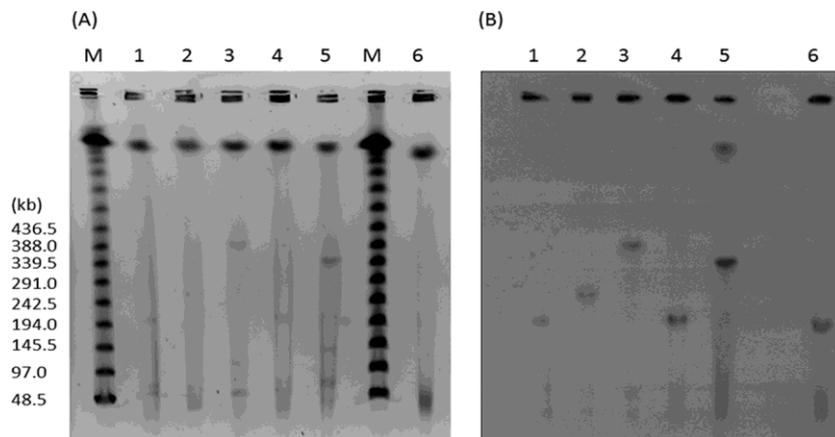


FIG 3 (A) PFGE of S1 nuclease-digested plasmids. (B) DNA hybridization with *rmtG*-specific probe. Lanes M, marker; lanes 1, strain 145/11; lanes 2, strain 1194/11; lanes 3, strain 350/10; lanes 4, strain 84/11; lanes 5, strain 922/11; lanes 6, *E. coli* DH10B transformant of strain 84/11.

ACKNOWLEDGMENTS

M.F.C.B. and G.R.F. were supported through the Global Infectious Disease Research Training Program funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (grant D43TW006592; principal investigator, Lee H. Harrison) and a scholarship from FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; grants 2012/06827-1 and 2012/06828-1). Part of this work was also supported by a research grant from FAPESP (grant 2009/53229-0) to D.D.O.G. Y.D. was supported in part through a Research Scholar Development Award funded by the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (grant K22AI080584).

REFERENCES

1. Wachino J, Arakawa Y. 2012. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug Resist. Updat.* 15:133–148.
2. Davis MA, Baker KN, Orfe LH, Shah DH, Besser TE, Call DR. 2010. Discovery of a gene conferring multiple-aminoglycoside resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 54:2666–2669.
3. Galimand M, Courvalin P, Lambert T. 2012. RmtF, a new member of the aminoglycoside resistance 16S rRNA N7 G1405 methyltransferase family. *Antimicrob. Agents Chemother.* 56:3960–3962.
4. Wachino J, Shibayama K, Kurokawa H, Kimura K, Yamane K, Suzuki S, Shibata N, Ike Y, Arakawa Y. 2007. Novel plasmid-mediated 16S rRNA m1A1408 methyltransferase, NpmA, found in a clinically isolated *Escherichia coli* strain resistant to structurally diverse aminoglycosides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:4401–4409.
5. Doi Y, de Oliveira Garcia D, Adams J, Paterson DL. 2007. Coproduction of novel 16S rRNA methylase RmtD and metallo- β -lactamase SPM-1 in a panresistant *Pseudomonas aeruginosa* isolate from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:852–856.
6. Doi Y, Ghilardi AC, Adams J, de Oliveira Garcia D, Paterson DL. 2007. High prevalence of metallo- β -lactamase and 16S rRNA methylase coproduction among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:3388–3390.
7. Fritsche TR, Castanheira M, Miller GH, Jones RN, Armstrong ES. 2008. Detection of methyltransferases conferring high-level resistance to aminoglycosides in enterobacteriaceae from Europe, North America, and Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1843–1845.
8. Tijet N, Andres P, Chung C, Lucero C, Low DE, Galas M, Corso A, Petroni A, Melano RG. 2011. *rmtD2*, a new allele of a 16S rRNA methylase gene, has been present in *Enterobacteriaceae* isolates from Argentina for more than a decade. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:904–909.
9. Doi Y, Arakawa Y. 2007. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clin. Infect. Dis.* 45:88–94.
10. Doi Y, Adams-Haduch JM, Paterson DL. 2008. Genetic environment of 16S rRNA methylase gene *rmtD*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:2270–2272.
11. Barton BM, Harding GP, Zuccarelli AJ. 1995. A general method for detecting and sizing large plasmids. *Anal. Biochem.* 226:235–240.
12. Sidjabat HE, Paterson DL, Adams-Haduch JM, Ewan L, Pasculle AW, Muto CA, Tian GB, Doi Y. 2009. Molecular epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* isolates at a tertiary medical center in western Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:4733–4739.
13. Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. 2005. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J. Microbiol. Methods* 63:219–228.
14. de Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TM, Leite D, Padoveze MC, Freire MP, Silveira FP, Paterson DL. 2008. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52:1790–1793.
15. Tollentino FM, Polotto M, Nogueira ML, Lincopan N, Neves P, Mizuka EM, Remeli GA, De Almeida MT, Rubio FG, Nogueira MC. 2011. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. *Microb. Drug Resist.* 17:7–16.
16. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Canton R, Darini AL, Coque TM. 2011. Dissemination of *bla*_{KPC-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.* 55:3579–3583.
17. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. 2009. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53:333–334.
18. Abboud CS, Bergamasco MD, Doi AM, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D, Saraiva CR, Doy C, de Oliveira Garcia D. 2011. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. *J. Infect. Prev.* 12:150–153.
19. Pereira GH, Garcia DO, Mostardeiro M, Ogassavara CT, Levin AS. 2011. Spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Sao Paulo, Brazil. *J. Hosp. Infect.* 79:182–183.
20. Kim YA, Qureshi ZA, Adams-Haduch JM, Park YS, Shutt KA, Doi Y. 2012. Features of infections due to *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *Escherichia coli*: emergence of sequence type 131. *Clin. Infect. Dis.* 55:224–231.
21. Seki LM, Pereira PS, de Souza MDP, Conceicao MDS, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves CDF, Gomes D, Assef AP, Samuelsen O, Asensi MD. 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.
22. Diancourt L, Passet V, Verhoef J, Grimont PA, Brisse S. 2005. Multi-locus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. *J. Clin. Microbiol.* 43:4178–4182.
 23. Galani I, Souli M, Panagea T, Poulakou G, Kanellakopoulou K, Giamairellou H. 2012. Prevalence of 16S rRNA methylase genes in *Enterobacteriaceae* isolates from a Greek university hospital. *Clin. Microbiol. Infect.* 18:E52–E54.
 24. Zacharczuk K, Piekarska K, Szych J, Zawidzka E, Sulikowska A, Wardak S, Jagielski M, Gierczynski R. 2011. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. *Antimicrob. Agents Chemother.* 55:443–446.
 25. Wu Q, Liu Q, Han L, Sun J, Ni Y. 2010. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 66:326–328.
 26. Falagas ME, Karageorgopoulos DE, Nordmann P. 2011. Therapeutic options for infections with *Enterobacteriaceae* producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. *Future Microbiol.* 6:653–666.
 27. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie JM, Gascuel O. 2008. Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36:W465–W469