

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias  
produtoras de KPC no Brasil**

Leonardo Neves de Andrade

**Ribeirão Preto**

**2011**

## RESUMO

ANDRADE, L. N. **Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil**. 2011. 68f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases) são  $\beta$ -lactamases da classe A de Ambler globalmente disseminadas, com 10 variantes, sendo predominantes KPC-2 e KPC-3. O objetivo deste trabalho foi estudar a genética e epidemiologia molecular de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas no Brasil. Sessenta e quatro enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram analisadas: 57 *Klebsiella pneumoniae* (Kp), 5 *Enterobacter cloacae* (Ecl), 1 *Serratia marcescens* (Sm) e 1 *Citrobacter freundii* (Cf), de diferentes pacientes, em seis hospitais e em duas distintas regiões do Brasil. Identificação e testes de sensibilidade antimicrobiana foram realizados por sistemas semi-automáticos e métodos padronizados. A relação clonal foi estabelecido por *Pulsed-field gel electrophoresis* (PFGE) e também por tipagem por sequenciamento de *multilocus* no caso de *K. pneumoniae*. A presença de genes que codificam carbapenemases e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido foi pesquisada. A caracterização de *bla*<sub>KPC-2</sub>, do ambiente genético e de plasmídeos incluiu PCR e sequenciamento, análises de RFLP, S1-PFGE e hibridação. Os isolados Kp corresponderam a 5 pulsotipos, por PFGE, ligados a 6 tipos de sequência (ST): KPA-ST258 (n = 51 com 6 subtipos), KpA6-ST11 (n = 1), KPB-ST327 (n = 1), KPC-ST44 (n = 2), KPD-ST437 (n = 1) e KPE-ST48 (n = 1). Ecl foram agrupados em clones  $\alpha$  e  $\beta$  e, Sm e Cf representam um clone cada. Todos os isolados foram resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos, sensíveis à colistina e tigeciclina e mostraram fenótipos variáveis contra aminoglicosídeos, quinolonas, nitrofurantoína e sulfametoxazol-trimetoprim. Heterorresistência a carbapenêmicos foi observada para isolados de Kp e Cf, conforme relatado anteriormente com produtores de KPC-2 e VIM. Esse estudo relata a disseminação do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro facilitada por clones de *K. pneumoniae* pertencentes ao globalmente disseminado Complexo Clonal CC258 (ST258, ST437 e ST11) e uma diversidade de plasmídeos (IncFII-KpA, IncN-Kp e Ecl $\beta$ , IncL/M-Sm e Cf e, dois plasmídeos não-tipáveis carreando Tn4401a ou Tn4401b) disseminados com sucesso entre as enterobactérias. Constitui também a primeira descrição do ST258 no Brasil associada a um surto em um hospital universitário da cidade de Ribeirão Preto. Este trabalho apontou a alta diversidade de elementos genéticos disponíveis abrigando *bla*<sub>KPC-2</sub>. Isso poderia ampliar enormemente a disseminação desse gene no Brasil como também no continente.

Palavras-chave: KPC, plasmídeo, *K. pneumoniae*, ST258, Tn4401, IncFII, IncN, IncL/M

# ***1. Introdução***

---

A resistência bacteriana aos antibióticos é problema de saúde pública mundial, destacado em 2011 pela Organização Mundial da Saúde (OMS) a qual dedicou o Dia Mundial da Saúde, 7 de abril, ao combate à resistência aos antimicrobianos "...uma ameaça para a atenção aos pacientes e ao controle das doenças em todo o mundo..." (<http://eventos.opasbrasil.org/?tema=DMS> 2011). Segundo a OMS, a resistência aos antibióticos é um grave problema que limita a antibioticoterapia e facilita o aparecimento de "Super Bactérias", resistentes aos principais antibióticos, levando a necessidade de tratamentos novos, mais caros e mais complexos.

Bactérias resistentes a antibióticos estão "se movimentando" entre diferentes ecossistemas, em reservatórios naturais e em meio ambientes modificados, encontrando rotas de transmissão para o homem. Essas bactérias já foram descritas: no trato gastrointestinal (como comensais/opportunistas), no meio ambiente (água e solo), em animais domésticos (cães e gatos), em animais para consumo humano (gado, aves e peixes) e em outros alimentos (vegetais, ovos, leite e derivados). A presença dessas bactérias em diversos ambientes contribui para selecionar, introduzir e manter bactérias envolvidas em infecções humanas. No entanto, o hospital é o principal ambiente onde são isoladas bactérias resistentes a antibióticos. Devido à necessidade de instituição de antibioticoterapia em muitas situações há uma pressão que seleciona bactérias resistentes. Bactérias que anteriormente eram encontradas somente em pacientes hospitalizados, atualmente colonizam e causam infecções em pacientes da comunidade (BAQUERO 1998; BOERLIN; REID-SMITH, 2008; HAWKEY, 2008).

Infecções por bactérias resistentes a antibióticos demonstram aumento significativo na falha de tratamento, morbidade e mortalidade em comparação com infecções por bactérias sensíveis. Esse é um fator crítico para o gerenciamento da terapêutica em pacientes com infecções por essas bactérias (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; QUEENAN; BUSH, 2007).

### **1.1. Mobilização de genes de resistência**

A dinâmica do surgimento e disseminação da resistência bacteriana aos antibióticos envolve diversos fatores que interagem e contribuem para a seleção de bactérias. No entanto, como chave para a evolução bacteriana, talvez, o principal fator seja a impressionante capacidade das bactérias em mobilizar genes de resistência (FROST et al., 2005).

A mobilização de genes de resistência pode ocorrer de uma célula bacteriana para outra (transmissão horizontal), por plasmídeos e transposons mobilizáveis/conjugativos, como também num mesmo genoma (recombinação), por transposons, cassetes gênicos em integrons e sequências de inserção. Esses últimos elementos podem estar inseridos em plasmídeos ou transposons, sendo assim, transferíveis para outras bactérias (BOERLIN; REID-SMITH, 2008).

A resistência aos antibióticos pode ser devida a eventos genéticos, como mutação em genes que passam a conferir resistência e transmissão horizontal de genes de resistência. Embora a mutação tenha papel importante e muitas vezes primordial, a disseminação de genes de resistência por transmissão horizontal é determinante, pois contribui marcadamente para selecionar bactérias com múltiplas resistências (HAWKEY, 2008; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

Elementos genéticos móveis possibilitam a mobilização de múltiplos genes permitindo a sobrevivência de bactérias sob pressão seletiva de antibióticos de diferentes classes (SNYDER; CHAMPNESS, 2007; THOMAS; NIELSEN, 2005).

## **1.2. Plasmídeos**

Como elementos genéticos móveis mais importantes, os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas que possuem capacidade de replicação independente, possuindo como função evolutiva principal a transmissão horizontal de genes entre bactérias, não se limitando à transferência intraespécie (FROST et al., 2005).

Plasmídeos constituem-se de uma região constante que contém os genes responsáveis por funções essenciais como replicação, manutenção e transferência. Em adição, possuem uma região variável onde se localizam os genes responsáveis por funções adaptativas e que conferem vantagens às bactérias, como por exemplo, produção de bacteriocinas, fatores de virulência, e resistência aos antibióticos (CARATTOLI, 2009).

A classificação dos plasmídeos pode ser realizada baseando-se em diferentes critérios: (i) número de cópias na célula, (ii) tamanho do plasmídeo, (iii) faixa de bactérias hospedeiras, (iv) grupo de incompatibilidade e (v) capacidade de transferências entre as células.

Esta última característica permite diferenciar os plasmídeos em conjugativos, mobilizáveis e não-conjugativos. Os conjugativos são assim denominados porque possuem a capacidade intrínseca de se transferir de uma célula para outra, o que foi chamado de “fator F”. Os mobilizáveis não possuem o “fator F”, porém existe a capacidade de transferirem-se à

outra célula na dependência de um plasmídeo conjugativo. Já os não-conjugativos são carentes das características de conjugação e mobilização (FROST et al., 2005).

A classificação mais utilizada é baseada na propriedade universal dos plasmídeos, que é a replicação. Esta classificação utiliza o princípio que plasmídeos com mesmo controle de replicação não podem estar presentes em uma mesma célula, o que foi chamado de "incompatibilidade de plasmídeos" (DATTA; HEDGES, 1971). Com base nessa informação, plasmídeos pertencentes ao mesmo grupo de incompatibilidade (Inc) não podem ser propagados em uma mesma linhagem celular (DATTA; HUGHES, 1983).

Couturier et al. (1988) desenvolveram a identificação dos principais *replicons* de plasmídeos presentes em bactérias da família *Enterobacteriaceae* baseado em experimentos de hibridação com sondas de DNA que reconhecem diferentes *replicons* (*rep*) (CARATTOLI et al., 2005).

Carattoli et al. (2005) propuseram a detecção de plasmídeos baseada em amplificação de segmentos específicos do DNA plasmideal (pDNA), para pesquisa de *rep* responsáveis pelos principais grupos Inc de plasmídeos que circulam entre enterobactérias. Essa proposta tem sido ferramenta importante para investigar plasmídeos carreando genes de resistência e também para seguir a evolução e disseminação de plasmídeos emergentes (CARATTOLI, 2009).

Plasmídeos que conferem resistência a antibióticos foram inicialmente descritos em 1960 por Watanabe e Fukasawa (1960) e foram detectados em *Shigella flexneri* multirresistentes isoladas no Japão no início da década de 1950, sendo demonstrado pouco depois sua transmissibilidade entre bactérias. Posteriormente crescentes relatos relacionaram a disseminação de genes de resistência por plasmídeos, de diferentes tamanhos e origens, em bactérias gram-negativas e gram-positivas, no hospital, na comunidade e em outros ambientes, por todo o mundo.

### 1.3. $\beta$ -lactamases

Como artifício de escape da atividade dos antibióticos, as bactérias possuem mecanismos de resistência diversos, como: (i) alteração na permeabilidade da membrana externa que dificulta ou impede a entrada do antibiótico na célula, (ii) hiperexpressão de bombas de efluxo que excretam o antibiótico da célula, (iii) alteração do sítio alvo que dificulta ou impede a ligação do antibiótico e (iv) produção de enzimas que degradam ou inativam o antibiótico (TENOVER, 2006).

A resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas, denominadas  $\beta$ -lactamases, de grande interesse em enterobactérias. Essas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, inativando, assim, a ação de vários antibióticos pertencentes a esse grupo (BUSH; FISHER, 2010).

As  $\beta$ -lactamases são classificadas utilizando diferentes critérios. As classificações mais difundidas são baseadas essencialmente na estrutura molecular, proposta por Ambler (1980) e, nas características enzimáticas, propostas por Bush, Jacob e Medeiros (1995).

Ambler (1980) dividiu as  $\beta$ -lactamases nas classes moleculares (A, B, C e D), de acordo com a estrutura molecular da proteína (enzima), sendo assim, conhecida como classe molecular de Ambler. As enzimas pertencentes às classes A, C e D, são seria- $\beta$ -lactamases, as quais possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima. As enzimas da classe B são metalo- $\beta$ -lactamases (MBL), as quais são dependentes de zinco ( $Zn^{+2}$ ), como cofator para a atividade enzimática.

Bush, Jacob e Medeiros (1995) estabeleceram diferentes grupos de  $\beta$ -lactamases (grupos de 1 a 4, com subdivisões), segundo o substrato da enzima e o perfil de inibição por inibidores de  $\beta$ -lactamases, conhecidos como grupos de Bush.

O esquema de classificação baseado na associação da classe molecular de Ambler e grupos de Bush foi recentemente revisado e atualizado por Bush e Jacob (2010), resumidamente apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1** - Classificação das principais  $\beta$ -lactamases produzidas por enterobactérias

Grupo Bush-Jacob <sup>i</sup>	Classe Molecular <sup>ii</sup>	Enzimas representativas	Característica <sup>iii</sup>	Substratos <sup>iv</sup>	Inibição por:	
					Ácido clavulânico	EDTA <sup>v</sup>
1; 1e	C	CMY-2; CMY-37	AmpC	Cfs	Não	Não
2be	A	TEM-3, SHV-2, CTX-M-2, 14, 15	ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactams	Sim	Não
2bre	A	TEM-50	IRT-ESBL	Oxiamino-Cfs e monobactams	Não	Não
2de; 2df	D	OXA-11, 15; OXA-23, 48	ESBL; Carbapenemase	Oxiamino-Cfs e carbapenêmicos	Variável	Não
2f	A	GES-2, KPC-2, 3	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas, monobactams e carbapenêmicos	Variável	Não
3a	B (MBL)	SPM-1, IMP-1, VIM-1, NDM-1	Carbapenemases	Oxiamino-Cfs, cefamicinas e carbapenêmicos, mas não monobactams	Não	Sim

<sup>i</sup>Bush e Jacob (2010); <sup>ii</sup>Ambler (1980); <sup>iii</sup>ESBL (do inglês, Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase):  $\beta$ -lactamase de espectro estendido; IRT: TEM resistente a inibidor; MBL (Metallo- $\beta$ -lactamases); <sup>iv</sup>Cfs: Cefalosporinas; Oxiamino-Cfs: Cefalosporinas de amplo espectro; <sup>v</sup>EDTA (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*): ácido etilenodiamino tetra-acético.

Giske et al. (2009) propuseram um esquema alternativo de classificação de  $\beta$ -lactamases baseado na atividade hidrolítica das enzimas frente às cefalosporinas de amplo espectro e aos carbapenêmicos. Os autores dividiram as  $\beta$ -lactamases em três grupos: ESBL<sub>A</sub>, ESBL<sub>M</sub> e ESBL<sub>CARBA</sub>, com diferentes subclasses, de acordo com as características fenotípicas (potencial de: hidrólise e inibição das enzimas), genotípicas (localização: cromossomo ou plasmídeo) e epidemiológicas (prevalência e incidência). Essa classificação foi proposta, principalmente, para resumir o fenótipo de resistência demonstrado, melhorar o entendimento clínico e facilitar o controle epidemiológico.

Nos últimos 60 anos, o uso sucessivo de novas gerações de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos tem selecionado sucessivas gerações de  $\beta$ -lactamases, cada qual com espectro de hidrólise mais potente que a anterior (LIVERMORE; WOODFORD, 2006), somando, atualmente, mais de 920 enzimas conhecidas (JACOB, 2006; <http://www.lahey.org/studies/>).

#### 1.4. Carbapenemases

A partir do final da década de 1980, os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, como imipenem (1987), meropenem (1996) e ertapenem (2001), foram



instituídos como alternativas terapêuticas de última escolha para tratamento de infecções graves provocadas, principalmente, por bactérias gram-negativas multirresistentes produtoras ESBL, como também pelas hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamases AmpC (SHAH, 2008).

Estáveis à hidrólise por essas enzimas, os carbapenêmicos ainda apresentavam o mais potente e excepcional espectro de atividade antibacteriana, agindo contra a maioria das bactérias gram-negativas e gram-positivas, aeróbias e anaeróbias (ZHANEL et al., 2007).

A dependência da utilização de carbapenêmicos está crescendo pelo fato de muitas bactérias gram-negativas produtoras de ESBL, como também as hiperprodutoras de AmpC, serem resistentes a antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos, como aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprima, tetraciclina, quinolonas e fluoroquinolonas (PATERSON; BONOMO, 2005).

Com o uso e abuso de carbapenêmicos, não surpreendentemente, a seleção e disseminação de bactérias resistentes a esses antibióticos ocorreu. Entre outros mecanismos, a resistência é devida à produção de enzimas, denominadas "carbapenemases" (GUPTA et al., 2011; WALSH, 2010).

As carbapenemases constituem o grupo mais versátil de  $\beta$ -lactamases, com espectro de atividade mais amplo que as ESBL. Embora conhecidas como "carbapenemases", esse grupo de enzimas hidrolisa praticamente todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, com destaque para a classe dos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Inicialmente, as carbapenemases foram descritas como  $\beta$ -lactamases codificadas somente por genes cromossômicos em algumas espécies bacterianas, como L1 em *Stenotrophomonas maltophilia* e BcII em *Bacillus cereus* (GARAU; GUILMI; HALL, 2005). No entanto, na década de 90, foram relatados genes codificadores de carbapenemases em plasmídeos. Atualmente, as carbapenemases adquiridas, codificadas por genes plasmídeos, têm sido frequentemente reportadas em bactérias gram-negativas, possuindo importante papel na disseminação da resistência aos carbapenêmicos (QUEENAN; BUSH, 2007).

Bactérias produtoras de outras enzimas (não carbapenemases) como ESBL CTX-M, TEM, SHV (PATERSON; BONONO, 2005) e hiperprodutoras de  $\beta$ -lactamases AmpC CMY, ACT, FOX (JACOB, 2009), entre outras, podem apresentar diminuição de sensibilidade ou resistência aos carbapenêmicos quando ocorrer associação com outros mecanismos, como hiperexpressão de sistemas de efluxo ou alteração na permeabilidade da membrana externa (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

### 1.4.1. Metallo-carbapenemases

Bactérias produtoras de metallo-carbapenemases, MBL, são resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção do aztreonam (CORNAGLIA et al., 2007; WALSH, 2005). São conhecidas nove famílias de MBL adquiridas: IMP (Imipenemase) (OSANO et al., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metallo- $\beta$ -lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004), SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005), AIM (Austrália Imipenemase) (YONG et al., 2007), KHM (Kyorin University Hospital Metallo- $\beta$ -lactamase) (SEKIGUCHI et al., 2008), DIM-1 (Dutch Imipenemase) (POIREL et al., 2009) e NDM-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase) (YONG et al., 2009).

As MBL mais relatadas são IMP e VIM, disseminadas mundialmente. SPM é de destaque no Brasil, uma vez que, por motivos ainda não muito bem conhecidos, essa enzima é quase restrita (endêmica) ao território brasileiro, detectada frequentemente em *P. aeruginosa*. Relato dessa enzima ocorreu na Europa, por turista suíço que regressou do Brasil, não ocorrendo disseminação (QUEENAN; BUSH, 2007). NDM, a mais recente MBL relatada, se disseminou rapidamente da Índia para a Inglaterra, outros países da Europa e para os Estados Unidos. Existe uma relação muito estreita do chamado "turismo médico" na Índia, infecção/colonização dos pacientes com bactérias produtoras de NDM e disseminação dessas nos países de origem (PITOUT, 2010).

Os genes  $bla_{IMP}$  e  $bla_{VIM}$  são encontrados, em sua maioria, como cassetes gênicos em integrons;  $bla_{SPM}$  não está associado com integron e sim com uma sequência de inserção (*ISCR4*);  $bla_{NDM}$  foi localizado em ambientes genéticos que também carregavam genes de fatores de virulência presentes em plasmídeos de diferentes tamanhos (WALSH et al., 2005).

### 1.4.2. Serina-carbapenemases

As serina-carbapenemases mais disseminadas são: OXA, carbapenemases da classe D de Ambler (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006), GES (Guiana-extended spectrum) (POIREL et al., 2001) e KPC (*K. pneumoniae* carbapenemase) (YIGIT et al., 2001). GES e KPC são carbapenemases da classe A de Ambler (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

As carbapenemases OXA e GES são derivadas de genes codificadores de ESBL. Os genes  $bla_{OXA}$  e  $bla_{GES}$  têm sido encontrados como cassetes gênicos em integrons, transposons

ou associados com sequências de inserção, abrigados em plasmídeos, conjugativos ou não (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2006).

Outras serina-carbapenemases são menos relatadas e, geralmente, são mediadas por genes localizados no cromossomo, as quais são: SME (*Serratia marcescens* enzyme) (NAAS et al., 1994), IMI/NMC-A (Imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase/Not metalloenzyme carbapenemase-A) (RASMUSSEN et al., 1996; NAAS; NORDMANN, 1994), SHV-38 (Sulfhydryl reagent variable-38) (POIREL et al., 2003) e SFC-1 (*Serratia fonticola* resistant to carbapenem) (HENRIQUES et al., 2004). SHV-38 e SFC-1 constituem, cada uma, um grupo de enzimas (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

Em geral, o fenótipo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode variar de acordo com a serina-carbapenemase produzida (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007).

#### 1.4.2.1. KPC

Em 2001, Yigit e colaboradores relataram na Carolina do Norte, Estados Unidos, um isolado de *K. pneumoniae* com moderado a alto nível de resistência ao imipenem e meropenem. Após estudos fenotípicos e moleculares, concluíram que a resistência era dividida à produção de uma nova  $\beta$ -lactamase, com atividade de carbapenemase, não inibida por EDTA, fracamente inibida por ácido clavulânico e, desse modo, que essa pertenceria ao grupo 2f de Bush e à classe molecular A de Ambler (YIGIT et al., 2001).

Como a primeira detecção da enzima foi em *K. pneumoniae* e o potencial de hidrólise era de carbapenemase, a  $\beta$ -lactamase foi nomeada como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Embora alterações na expressão de porinas pudessem contribuir com o fenótipo encontrado, a produção de KPC foi determinante para a resistência aos carbapenêmicos (YIGIT et al., 2001).

Atualmente existem 10 variantes de KPC descritas (<http://www.lahey.org/studies/>), sendo KPC-2 e KPC-3 as mais predominantes (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009), Tabela 2.

**Tabela 2** - Comparações das sequências de nucleotídeos entre os genes *bla*<sub>KPC</sub>

Enzima	Nucleotídeo <sup>i</sup>	pb	Mutações comparando com <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub>	Posição (pb <i>contig</i> *)	Mutações entre os genes <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Posição (pb <i>contig</i> *)
KPC-1 <sup>ii</sup>	AF297554	882	G→ <sup>iii</sup> A	520	C; G→A;	814, 520
KPC-2	AY034847	882	na <sup>iv</sup>	na	C	814
KPC-3	AF395881	882	C→T	814	T	814
KPC-4	AY700571	881	C→G; T→G	308; 716	C; T→G; C→G	814; 716, 308
KPC-5	EU400222	882	C→G	308	C; C→G	814; 308
KPC-6	EU555534	882	T→G	716	C; T→G	814; 716
KPC-7	EU729727	882	G→A; C→T	147; 814	T; G→A	814; 147
KPC-8	FJ234412	882	T→G; C→T	716; 814	T; T→G	814; 716
KPC-9	FJ624872	854	T→C; C→T	716; 814	T; T→C	814; 716
KPC-10	GQ140348	882	C→G; C→T	308; 814	T; C→G	814; 308
KPC-11	HM066995	882	C→T	308	T;	308

\*Posição baseada no *contig* de alinhamento dos genes KPC descritos, utilizando o *software* ChromasPro versão 1.33 (Technelysium Pty LTDA); <sup>i</sup>Sequência de nucleotídeos no banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>); <sup>ii</sup>A sequência revisada de "KPC-1" é idêntica à de KPC-2, conseqüentemente KPC-1 não é mais uma designação válida, assim, ao total, são 10 variantes de KPC conhecidas atualmente (<http://www.lahey.org/studies/>); <sup>iii</sup>→: significa alteração na sequência de nucleotídeos, do anterior para o posterior, por exemplo, G para A; <sup>iv</sup>na: não aplicável.

KPC são relatadas principalmente em *K. pneumoniae*, embora existem crescentes relatos em outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas* e *Acinetobacter* também têm sido relatadas como produtoras de KPC (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; WALSH, 2010).

Atualmente, apesar da crescente ocorrência em hospitais brasileiros, divulgada pela mídia, poucos relatos de bactérias produtoras de KPC no Brasil foram publicados em revistas científicas, envolvendo alguns diferentes espécies: *K. pneumoniae* (CARVALHO-ASSEF et al., 2010; CHAGAS et al., 2011; LEÃO et al., 2011; MONTEIRO et al., 2009; PEIRANO et al., 2009; SEKI et al., 2011) *Enterobacter cloacae* (ZAVASCKI et al., 2009), *Serratia marcescens* (DEL PELOSO et al., 2010) e *Escherichia coli* (CARVALHO-ASSEF et al., 2010; LEÃO et al., 2010).

Genes *bla*<sub>KPC</sub> têm sido, em sua maioria, localizados no transposon Tn4401 o qual é frequentemente associado ao Tn1331, um transposon contendo *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1</sub> (NAAS et al., 2008; RICE et al., 2008).

No Tn4401, *bla*<sub>KPC</sub> é flanqueado pelas sequências de inserção ISKpn7 (*upstream*) e ISKpn6 (*downstream*). Entre ISKpn7 e *bla*<sub>KPC</sub> pode existir uma deleção de 100 a 200 pares de

bases (pb), o que determina as variantes do Tn4401: Tn4401 variante "a" foi o primeiro transposon caracterizado, a partir de duas *K. pneumoniae* isoladas de pacientes admitidos em hospitais parisienses, de origem de hospitais da Grécia e da cidade de Nova York, Estados Unidos. Tn4401 variante "b", inicialmente caracterizado a partir de duas *K. pneumoniae* e uma *Pseudomonas aeruginosa* isoladas na Colômbia, é a variante mais frequente nos Estados Unidos. Tn4401a difere de Tn4401b por uma deleção de 100 pb. Tn4401 variante "c", identificado em *E. coli* e isolada de paciente de hospital parisiense, difere de Tn4401b por uma deleção de 200 pb (NAAS et al., 2008, NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; RICE et al., 2008).

Enzimas KPC demonstram variável atividade de hidrólise dos carbapenêmicos, sendo o fenótipo de resistência a esses antibióticos, detectável *in vitro* e observado *in vivo*, dependente de genes de regulação da expressão da enzima e do ambiente genético no qual o gene *bla<sub>KPC</sub>* está localizado, assim como também de alterações na permeabilidade da membrana externa. Essas características são responsáveis pela variação nas concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de carbapenêmicos frente a bactérias produtoras de KPC (KITCHEL et al., 2010; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

Existe certa dificuldade para detectar laboratorialmente bactérias produtoras de KPC, pois, essas podem não expressar resistência aos carbapenêmicos *in vitro*, pelos testes convencionais e, se carbapenêmico for a opção de antibióticoterapia, pode ocorrer falha terapêutica e seleção de bactérias produtoras dessa enzima (CLSI, 2009; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

Dois características podem auxiliar na detecção de KPC. Em primeiro lugar, a heterorresistência (FALAGAS et al., 2008) aos carbapenêmicos, que pode ser definida como a resistência de sub-populações da bactéria estudada aos carbapenêmicos. Em segundo lugar, a diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos, que pode ser definida como a resistência às cefalosporinas de amplo espectro associada a elevados valores de CIM ou halo de inibição reduzido (por disco difusão) de carbapenêmicos.

O *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) em 2009 estabeleceu valores para a triagem da diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos em enterobactérias suspeitas de produzir carbapenemase (halo de inibição; CIM): ertapenem (19-21 mm; 2 µg/mL), meropenem (16-21 mm; 2 a 4 µg/mL) e para imipenem somente valores de CIM, 2 a 4 µg/mL. Também foi proposto utilizar o teste de Hodge modificado para a detecção da produção de carbapenemase, principalmente para próprositos epidemiológicos de controle de infecção (CLSI, 2009).

Posteriormente, em 2011, essa triagem não foi mais utilizada, pois, os pontos de corte para detectar a resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias foram modificados, aumentando a sensibilidade de detecção laboratorial. Essa modificação considerou dados genéticos, epidemiológicos e de avaliação da farmacocinética e farmacodinâmica de carbapenêmicos. No entanto, a sugestão da realização do teste de Hodge continuou (CLSI, 2011).

Bactérias produtoras de KPC são resistentes a todos os  $\beta$ -lactâmicos. O tratamento de infecções por essas bactérias é cada vez mais restrito, pois as opções terapêuticas são limitadas. Em adição, produtores de KPC são frequentemente resistentes a muitos antibióticos não  $\beta$ -lactâmicos. Por vezes as opções de antibióticoterapia são polimixinas, tigeciclina e aminoglicosídeos. Ainda assim, foi observado que a monoterapia para combater essas infecções geralmente não possui boa resposta clínica, sendo necessária a associação de antibióticos e ajustes nos protocolos (FALAGAS; NORDMANN, 2011).

### 1.5. Grupos e fenótipos de bactérias resistentes

O chamado grupo de patógenos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter* spp.) tem grande importância microbiológica e clínica devido à prevalência em infecções graves e, principalmente, à resistência a antibióticos, como as enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE, do inglês *carbapenem-resistant enterobacteriaceae*) (BUSH, 2010; GUPTA et al., 2011).

Também, enterobactérias pertencentes ao informalmente chamado grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*), assim como outras muitas bactérias gram-negativas, possuem genes *ampC* e são potencialmente hiperprodutoras dessa enzima. Quando ocorre indução ou alterações na regulação da expressão dessa enzima, pode ocorrer resistência a muitos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro. Quando essas bactérias adquirem  $\beta$ -lactamases de amplo espectro de atividade, a somatória dessas enzimas pode facilitar a seleção dessas bactérias frente a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e não  $\beta$ -lactâmicos (JACOB, 2009).

Diante de bactérias apresentando resistência crescente à maioria dos antibióticos disponíveis atualmente, faz-se necessária a distinção dessas bactérias em relação ao fenótipo que apresentam. Na avaliação mais ampla do fenótipo de resistência expresso pelas bactérias, geralmente, são utilizados termos que tentam classificá-los em "graus", utilizando prefixos quantitativos, como, por exemplo, "multi" resistente.

Diversos trabalhos utilizam diferentes termos e grafias para classificar o fenótipo de resistência apresentado por uma bactéria. De maneira contemporânea com a maioria dos relatos, Cantón e Ruiz-Garbajosa (2011) classificaram-nas em: bactérias "Multidroga-resistentes (MDR)", as quais podem ser definidas como não sensíveis a pelo menos um antibiótico em três ou mais classes, "Extremamente resistentes às drogas (XDR)", como aquelas que apresentam sensibilidade a todos os antibióticos representantes de somente uma ou duas classes e "Pan-droga resistentes (PDR)", definidas como não sensíveis a todos os antibióticos de todas as classes. Os autores ainda discutem alguns processos de seleção, co-seleção e pleiotropismo envolvidos nos fenótipos de resistência, assim como elementos genéticos que contribuem para esses processos e para a evolução bacteriana.

Em geral, bactérias possuem grande plasticidade genética que permite a aquisição de genes de resistência e sua seleção em ambientes nos quais existe pressão de antibióticos, apresentando-se também como microrganismos problema em infecções com tratamento prolongado ou de difícil penetração de antibióticos, pois muitas bactérias possuem a habilidade de formar biofilme.

Enterobactérias produtoras de ESBLs e carbapenemases possuem fenótipo de MDR e geralmente são hospedeiras de elementos genéticos móveis (genes, integrons, transposons e plasmídeos) sendo fonte de disseminação de resistência por duas razões: primeiro, todos os elementos mencionados são transmitidos verticalmente (por exemplo, da célula mãe para a célula filha) e, segundo, essas bactérias também possuem múltiplas oportunidades para transferir horizontalmente elementos de resistência para outras bactérias (por exemplo, por plasmídeos), não se limitando à transferência intraespécie e intra-gênero (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2010).

## 1.6. Clones bacterianos

O estudo da epidemiologia de bactérias sofreu grande revolução quando métodos de tipagem molecular foram empregados e ofereceram a possibilidade de determinar e comparar bactérias em todo o mundo (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

A tipagem por sequenciamento de *multilocus* (MLST, do inglês *Multilocus Sequence Typing*) é atualmente a ferramenta molecular mais eficiente no estudo e caracterização epidemiológica de bactérias. Esta técnica é baseada na amplificação e sequenciamento de fragmentos internos de 7 genes *housekeeping*, a qual usa a variação na sequência dos genes para definir um tipo de sequência (ST, do inglês *Sequence Type*). O ST pode ser considerado

uma "impressão digital" bacteriana que pode ser reconhecida e comparada, sendo excelente ferramenta para estudos epidemiológicos e filogenéticos. Uma vez determinado o ST de uma bactéria, é possível avaliar grupos representativos de complexos clonais (CC) e tentar estabelecer relação epidemiológica entre as bactérias (WOODFORD; TURTON; LIVERMORE, 2011).

A utilização do termo "clone" foi recentemente discutida por Woodford, Turton e Livermore (2011) segundo a observação de alguns autores e a utilização das técnicas de tipagem bacteriana, como eletroforese em campo pulsado (PFGE, do inglês *pulsed-field gel electrophoresis*) e MLST. Para alguns pesquisadores, o termo clone poderia ser mais amplamente empregado e deixaria de estar relacionado somente com as células bacterianas descendentes de uma célula original (por divisão binária, em um mesmo espaço e tempo). Clone poderia ser usado para definir bactérias com o mesmo ST que podem ter sido cultivadas independentemente de diferentes fontes, locais e em períodos de tempo diferentes.

A disseminação mundial de clones bacterianos abrigando genes de resistência é uma ameaça real para o controle de infecções bacterianas e para a antibioticoterapia (CARATTOLI, 2009; GOOTZ, 2010). Alguns poucos relatos apontam alguns clones como responsáveis pela disseminação de importantes determinantes de resistência, por exemplo: disseminação mundial de *Klebsiella pneumoniae* ST258 produtora de KPC-2 ou KPC-3 (KITCHEL et al., 2009; LEAVITT et al., 2010) e disseminação intercontinental de *Escherichia coli* ST131 produtora de ESBL CTX-M-15 (Nicolas-Chanoine et al., 2008).

Também, crescentes relatos da enzima emergente NDM, detectada pela primeira vez em 2009 em *K. pneumoniae*, já é preocupação mundial, podendo se disseminar globalmente por clones específicos e plasmídeos epidêmicos (BONOMO, 2011). Em adição, *E. coli* ST131 produtora de NDM foi recentemente relatada (Peirano et al., 2011).

A realidade brasileira sobre a epidemiologia molecular da resistência ainda é nebulosa. A maioria dos relatos de enterobactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases não contempla informações sobre plasmídeos e clones responsáveis pela disseminação de genes de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos.

Diante disso, trabalhos que forneçam informações que contribuam para a melhor compreensão da resistência mediada por  $\beta$ -lactamases são de grande interesse.

Este conhecimento torna-se fundamental para que, em futuro próximo, novas estratégias possam ser formuladas a fim de controlar a resistência aos antibióticos, de modo mais contundente e eficaz, diretamente na cadeia de disseminação de genes de resistência.



## ***5. Conclusões***

---

- Houve disseminação clonal de *K. pneumoniae* (KpA-ST258) produtora de KPC-2 no HCFMRP-USP, caracterizando surto. O gene *bla*<sub>KPC-2</sub> estava localizado no *Tn4401a* e abrigado em plasmídeo tipo IncFII. O ST258 foi pela primeira vez relatado no Brasil.
- Foram encontradas *K. pneumoniae* (KpA-ST258 e subtipos desse clone) produtoras de KPC-2 colonizando pacientes no CTI do HCFMRP-USP. Plasmídeos IncFII abrigavam cópia do *Tn4401a* e do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em Ribeirão Preto-SP por dois anos.
- Foi detectada fenotipicamente a produção de serina-carbapenemase em todas as CRE do estudo.
- Em todas as CRE do estudo foi identificado o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>. Genes *bla*<sub>CTX-M-2</sub> foram identificados nos clones KpB-ST327, KpC-ST44, KpD-ST437 (Rio de Janeiro-RJ) e KpE-ST48 (Ribeirão Preto-SP).
- Foram determinados clones de *K. pneumoniae*: KpA-ST258 (6 subtipos), KpA6-ST11, KpB-ST327, KpC-ST44, KpD-ST437 e KpE-ST48. O CC258 (ST258, ST437 e ST11) disseminado globalmente foi encontrado nesse estudo. Ecl $\alpha$  e Ecl $\beta$  foram os clones de *E. cloacae* determinados.
- Todos os genes *bla*<sub>KPC-2</sub> estavam localizados no transposon *Tn4401*, variantes "a" ou "b", exceto o clone Ecl $\beta$ , no qual não foi possível identificar o ambiente genético. *Tn4401c* não foi encontrado.
- Foram encontrados plasmídeos tipo IncFII, IncN e IncL/M. Os plasmídeos IncFII foram transferidos por experimento de conjugação.

## ***6. Referências***

---

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamase. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 289, p. 321-331, 1980.

ANDERSON, K.F.; LONSWAY, D.R.; RASHEED, L.K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L.M.; CAREY, R.B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J.B. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723–2725, 2007.

ANDRADE, L.N., MINARINI, L.A., PITONDO-SILVA A., CLÍMACO, E.C., PALAZZO, I.C., MEDEIROS, M.I., DARINI, A.L.C. Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Canadian Journal of Microbiology**, v: 56, n. 5, p. 399-407, 2010.

ANDRADE, L.N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J.C.; LONGO, J.M.; CLÍMACO, E.C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M.A.; DEL PELOSO, P.F.; RIBEIRO, V.B.; BARTH, A.L.; PAULA, M.C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R.; DARINI, A.L.C.; COQUE, T.M. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.

BAQUERO, F.; NEGRI, M-C.; MOROSINI, M-I.; BLÁZQUEZ, J. Antibiotic-Selective Environments. **Clinical Infectious Diseases**, v. 27, s. 1, p. 5–11, 1998.

BARANIAK, A.; IZDEBSKI, R.; HERDA, M.; FIETT, J.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; FILCZAK, K.; ŁOPACIUK, U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 4565-4567, 2009.

BARTON, B.M.; HARDING, G.P.; ZUCCARELLI. A general method for detecting and sizing large plasmids. **Analytical Biochemistry**, n. 226, p. 235-240, 1995.

BOERLIN, P.; REID-SMITH, R.J. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 2, p.115–126, 2008.

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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, p. 361-362, 2010.

BONOMO, R.A. New Delhi Metallo-b-Lactamase and Multidrug Resistance: A Global SOS? **Clinical Infectious Diseases**, v. 52, n. 4, p. 485–487, 2011.

BUSH, K. Alarming  $\beta$ -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, p. 558–564, 2010a.

BUSH, K. Bench-to-bedside review: The role of  $\beta$ -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, n. 224, p. 1-8, 2010.

BUSH, K.; JACOB, G.A. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–976, 2010.

BUSH, K.; JACOB, G.A.; MEDEIROS, A.A. A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, p.1211-1233, 1995.

CANTÓN, R.; COQUE, T.M.; The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p. 466-475, 2006.

CANTÓN, R.; RUIZ-GARBAJOSA, P. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 11, p. 1-9, 2011.

CARATTOLI, A.; ASCHBACHER, R.; MARCH, A.; LARCHER, C.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid pKOX105 encoding VIM-1, QnrS1 and SHV-12 proteins in *Enterobacteriaceae* from Bolzano, Italy compared with IncN plasmids encoding KPC enzymes in the USA. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 2070-2075, 2010.

CARATTOLI, A.; BERTINI, A.; VILLA, L.; FALBO, F.; HOPKINS, K.L.; THRELFALL, E.J. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. **Journal of Microbiological Methods**, v. 63, p. 219-228, 2005.

CARATTOLI, C. Resistance Plasmid Families in *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–2238, 2009.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D'A.; LEÃO, R. S.; SILVA, R. V.; FERREIRA, A. G.; SEKI, L. M.; ASENSI, M. D.; MARQUES, E. A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic Microbiology Infection Disease**, v. 68, p. 337–338, 2010.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.A.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 4654–4661, 2004.

CHAGAS, T.P.G.; SEKI, L.M.; DA SILVA, D.M.; ASENSI, M.D. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **Journal of Hospital and Infection**, v. 77, n. 3, p. 281, 2011.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI M100-S21. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2011.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S19, v. 30, n. 1, 2009.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S18, v. 30, n. 1, 2008.

**Clinical and Laboratory Standards Institute.** Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Doc M100-S17, v. 30, n. 1, 2007.

CORNAGLIA, G.; AKOVA, M.; AMICOSANTE, G.; CANTÓN, R.; CAUDA, R.; DOCQUIER, J-D.; EDELSTEIN, M.; FRÈRE, J-M.; FUZI, M.; GALLEN, M.; GIAMARELLOU, H.; GNIADKOWSKI, M.; KONCAN, R.; LIBISCH, B.; LUZZARO, F.; MIRIAGOUM, V.; NAVARRO, F.; NORDMANN, P.; PAGANI, L.; PEIXE, L.; POIREL,

- L.; SOULI, M.; TACCONELLI, E.; VATOPOULOS, A.; ROSSOLINI, G.M.; on behalf of the ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- $\beta$ -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 380–388, 2007.
- COUTURIER, M.; BEX, F.; BERGQUIST, P.L. MAAS, W.K. Identification and classification of bacterial plasmids. **Microbiology Reviews**, v. 52, p. 375-395, 1988.
- CURIAO T., MOROSINI M.I., RUIZ-GARBAJOSA P., ROBUSTILLO A., BAQUERO F., COQUE T.M., CANTÓN R. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p.1608-1614, 2010.
- CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M-V.; WISELL, K. T.; CARMELI, Y.; GALES, A. C.; NAVON-VENEZIA, S.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces  $\beta$ -Lactamase bla<sub>KPC-2</sub> gene. **Emerging Infectious Disease**, v. 16, p. 1349-1356, 2010.
- DATTA, N.; HEDGES, R.W. Compatibility groups among fi-R factors. **Nature**, v. 52, p. 222-223, 1971.
- DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro Patologia Med Lab.**, v. 46, p. 365-367, 2010.
- DIANCOURT L.; PASSET, V.; VERHOEF, J.; GRIMONT, P.A.; BRISSE, S. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 4178-4182. 2005.
- DONSKEY, C.J. Antibiotic Regimens and Intestinal Colonization with Antibiotic-Resistant Gram-Negative Bacilli. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, s. 2, p. 62–9, 2006.
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing**. 2011. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 1.3 2011-01-05. Version 1.3, January 5. [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Disk\\_test\\_documents/EUCAST\\_breakpoints\\_v1.3\\_pdf.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf).
- FALAGAS, E.; MAKRIS, G.C.; DIMOPOULOS, G.; MATTHAIYOU, D.K. Heteroresistance: a concern of increasing clinical significance? **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, p. 101–104, 2008.
- FALAGAS, M.E; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiology**, v. 6, p. 653-666, 2011.
- FILIUS, P.M.G.; GYSSENS, I.C.; KERSHOF, I.M.; ROOVERS, P.J.E.; OTT, A.; VULTO, A.G.; VERBRUGH, H.A.; ENDTZ, H.P. Colonization and Resistance Dynamics of Gram-Negative Bacteria in Patients during and after Hospitalization. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2879–2886, 2005.

- FROST, L.S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A.O.; TOUSSAINT, A. Mobile Genetic Elements: The Agents of Open Source Evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.
- GALANI, I.; REKATSINA, P.D.; HATZAKI, D.; PLACHOURAS, D.; SOULI, M.; GIAMARELLOU, H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- $\beta$ -lactamase production in Enterobacteriaceae. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1-6, 2008.
- GARAU, G.; GUILMI, A.M.D.; HALL, B.G. Structure-Based Phylogeny of the Metallo- $\beta$ -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 2778-2784, 2005.
- GAUTON, R.K. Rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for typing of *Escherichia coli* O157:H7 and other Gram-negative organisms in 1 day. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2977-2980, 1997.
- GIANI, T.; D'ANDREA, M. M.; PECILE, P.; BORGIANNI, L.; NICOLETTI, P.; TONELLI, F.; BARTOLONI, A.; ROSSOLINI, G. M. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 carbapenemase. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 3793-3794, 2009.
- GISKE, C.G.; SUNDSFJORD, A.S.; KAHLMETER, G.; WOODFORD N.; NORDMANN, P.; PATERSON, D.L.; CANTÓN, R.; WALSH, T.R. Redefining extended-spectrum beta-lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 63, p. 1-4, 2009.
- GOOTZ, T. D.; LESCOE, M. K.; DIB-HAJJ, F.; DOUGHERTY, B. A.; HE, W.; DELLALATTA, P.; HUARD, R. C. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* Strains isolated in a New York city hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 1998-2004, 2009.
- GOOTZ, T.D. The Global Problem of Antibiotic Resistance. **Critical Reviews in Immunology**, v. 30, n. 1, p. 79-93, 2010.
- GUPTA, N.; LIMBAGO, B.M; PATEL, J.B; KALLEN, A.J. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 1, p. 60-67, 2011.
- HAWKEY, P.M. Molecular epidemiology of clinically significant antibiotic resistance genes. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, p. S406-S413, 2008.
- HENRIQUES, I.; MOURA, A.; ALVES, A.; SAAVEDRA, M.J; CORREIA, A. Molecular characterization of a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, SFC-1, from *Serratia fonticola* UTAD54. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 2321-2324, 2004.
- JACOB, G.A.  $\beta$ -Lactamase Nomenclature. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123-1129, 2006.
- JACOB, G.A. AmpC  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p. 161-182, 2009.

KITCHEL, J.; RASHEED, K.; PATEL, J.B.; SRINIVASAN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CARMELI, Y.; BROLUND, A.; GISKE, C.G. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: Clonal expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 3365–3370, 2009.

KO, K. S.; LEE, J. Y.; BAEK, J. Y.; SUH, J. Y.; LEE, M. Y.; CHOI, J. Y.; YEOM, J. S.; KIM, Y. S.; JUNG, S. I.; SHIN, S. Y.; HEO, S. T.; KWON, K. T.; SON, J. S.; KIM, S. W.; CHANG, H. H.; KI, H. K.; CHUNG, D. R.; PECK, K. R.; SONG, J. H. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p. 822-828, 2010.

KRISTÓF, K.; TÓTH, A.; DAMJANOVA, I.; JÁNVÁRI, L.; KONKOLY-THEGE, M.; KOCSIS, B.; KONCAN, R.; CORNAGLIA, G.; SZEGO, E.; NAGY, K.; SZABÓ, D. Identification of a *bla*<sub>VIM-4</sub> gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1303-1305, 2010.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of *bla*<sub>VIM</sub>, a new integron-borne metallo-β-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, p. 1584–1590, 1999.

LEÃO, R. S.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D'A.; CORREAL, J. C.; SILVA, R. V.; GOLDEMBERG, D. C.; ASENSI, M. D.; MARQUES, E. A. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter related infection. **Clinical Microbiology Infection**, v. 17, p. 380-382, 2010.

LEÃO, R.S.; PEREIRA, R.H.; FOLESCU, T.W.; ALBANO, R.M.; SANTOS E.A.; JUNIOR, L.G.; MARQUES, E.A. KPC-2 Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with Cystic Fibrosis. **Journal Cystic Fibrosis**, v. 10, n. 2, 40-42, 2011.

LEAVITT, A.; CARMELI, Y.; CHMELNITSKY, I.; GOREN, M.G.; OFEK, I.; NAVON-VENEZIA, S. Molecular Epidemiology, Sequence Types, and Plasmid Analyses of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 3002–3006, 2010.

LEAVITT, A.; CHMELNITSKY, I.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S. Complete nucleotide sequence of KPC-3-encoding plasmid pKpQIL in the epidemic *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p.4493–4496, 2010.

LEE, K.; YUM, J.H.; YONG, D.; LEE, H.M.; KIM, H.D.; DOCQUIER, J.D.; ROSSOLINI, G.M.; CHONG, Y. Novel acquired metallo-β-lactamase gene, *bla*<sub>SIM-1</sub>, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 4485–4491, 2005.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v. 14, n. 9, 413-420, 2006.



- MIRIAGOU, V.; PAPAGIANNITSIS, C. C.; KOTSAKIS, S. D.; LOLI, A.; TZELEPI, E.; LEGAKIS, N. J.; TZOUVELEKIS, L. S. Sequence of pNL194, a 79.3-kilobase IncN plasmid carrying the *bla*<sub>VM-1</sub> metallo- $\beta$ -Lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 4497–4502, 2010.
- MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing-*Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 333–334, 2009.
- NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M-V.; LARTIGUE, M-F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase *bla*KPC Gene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257–1263, 2008.
- NAAS, T.; VANDEL, L.; SOUGAKOFF, W.; LIVERMORE, D.M; NORDMANN, P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A  $\beta$ -lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 1262–1270, 1994.
- NAVON-VENEZIA, S., LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; RASHEED, J. K.; SRINIVASAN, A.; PATEL, J.B.; CARMELI, Y. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, p. 818-820, 2009.
- NICOLAS-CHANOINE, M.H.; BLANCO, J.; LEFLON-GUIBOUT, V.; DEMARTY R.; ALONSO, M.P.; CANIÇA, M.M.; PARK, Y.J.; LAVIGNE, J.P.; PITOUT, J.; JOHNSON, J.R. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.61, p. 273-281, 2008.
- NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infection Disease**, v. 9, p. 228–236, 2009.
- OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- $\beta$ -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 38, p. 71–78, 1994.
- OTEO, J.; CUEVAS, O.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, I.; BANDERAS-FLORIDO, A.; VINDEL, A.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; BAUTISTA, V.; ARROYO, M.; GARCÍA-CABALLERO, J.; MARÍN-CASANOVA, P.; GONZÁLEZ-SANZ, R.; FUENTES-GÓMEZ, V.; OÑA-COMPÁN, S.; GARCÍA-COBOS, S.; CAMPOS, J. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 524-528, 2009.
- PATERSON, D.L; BONOMO, R.A. Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.
- PEIRANO, G.; ASENSI, M.D. PITONDO-SILVA, A.; PITOUT, J.D.D. Molecular characteristics of extendedspectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p. 1032–1052, 2011.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L. V.; PINTO, M. C. F. G.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem hydrolysing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 265–568, 2009.

PÉREZ-PÉREZ, F.J.; HANSON, N.D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC  $\beta$ -Lactamase Genes in Clinical Isolates by Using Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 6, p. 2153–2162, 2002.

PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gramnegative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 371–379, 2010.

PITOUT, J.D.D. The latest threat in the war on antimicrobial resistance. **The Lancet**, v. 10, p. 578-579, 2010.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; PODGLAJEN, I.; SOUGAKOFF, W. Gutmann, L.; Nordmann, P. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* of a chromosome-Encoded SHV  $\beta$ -Lactamase That Compromises the Efficacy of Imipenem. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 2, p. 755–758, 2003.

POIREL, L.; RODRIGUES-MARTINEZ, J.; AL NAIEMI, N.; DEBETS-OSSENKOPP, Y.; NORDMANN, P. Characterization of *bla*<sub>DIM-1</sub>, a novel integron-located metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **In: Anais do 19<sup>th</sup> European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID)**. Helsinki, Finlândia, Maio 16-19, 2009.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G.F.; NAAS, T.; CHAMPS, C.; DOVE, M.G.; NORDMANN, P. GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598–2603, 2001.

QI, Y.; WEI, Z.; JI, S.; DU, X.; SHEN, P.; YU, Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, p. 307-312, 2011.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; ANDERSON, K. F.; WASHER, L.; CHENOWETH, C.; PERRIN, J.; NEWTON, D. W.; PATEL, J. B. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *Klebsiella oxytoca* carrying a common plasmid. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, p. 2066-2069, 2008.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, B.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; GARA, C.O.; MEDEIROS, A.A. Characterization of IMI-1  $\beta$ -lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40: p. 2080–2086, 1996.

RHEE, J. Y.; PARK, Y. K.; SHIN, J. Y.; CHOI, J. Y.; LEE, M. Y.; PECK, K. R.; SONG, J. H.; KO, K. S. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a

patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 2278-2279, 2010.

RICE, L. B.; CARIAS, L. L.; HUTTON, R. A.; RUDIN, S. D.; ENDIMIANI, A.; BONOMO, R. A. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 3427-3429, 2008.

SALADIN, M.; CAO, V.T.B.; LAMBERT, T.; DONAY, J.L.; HERRMANN, J.L.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELISLE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M  $\beta$ -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v. 209, p.161-168, 2002.

SAMBROOK, J.; FRISCHT, E.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2<sup>nd</sup> edition. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

SAMUELSEN, Ø; NASEER, U.; TOFTELAND, S.; SKUTLABERG, D. H.; ONKEN, A.; HJETLAND, R.; SUNDSFJORD, A.; GISKE, C. G. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p. 654-658, 2009.

SCALETISKY, I.C.A.; SOUZA, T.B.; RANDA, C.R.S.; OKEKE, I.N. Genetic elements associated with antimicrobial resistance in enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) from Brazil. **BMC Microbiology**, n. 10, v. 25, p.1-5, 2010.

SEKI, L. M., PEREIRA, P.S.; SOUZA, M.PAH.; CONCEIÇÃO, M.S.; MARQUES, E.A.; PORTO, C.O.; COLNAGO, E.M.L.; ALVES, C.F.M.; GOMES, D.; CARVALHO-ASSEF, A.P.D.A.; SAMUELSEN, Ø.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274-277, 2011.

SEKIGUCHI, J-I.; MORITA, K.; KITAO, T.; WATANABE, N.; OKAZAKI, M.; AKIYAMA-M, T.; KANAMORI, M.; KIRIKAE, T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- $\beta$ -lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52. , n. 11, p. 4194-4197. 2008.

SHAH, P.M. Parenteral carbapenems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, S. 1, p. 175-180, 2008.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria**, 3<sup>th</sup> ed. American Society for Microbiology: Washington, D.C., 2007.

TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **The American Journal of Medicine**, v. 119, n. 6A, p. S3-S10, 2006.

TENOVER, F.C.; ARBEIT, R.D.; DOERING, R.V.; MICKELSEN, P.A.; MURRAY, B.E.; PERSING, D.H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233-2239, 1995.

THOMAS, C.M.; NIELSEN, K.M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene Transfer Between Bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 711-721, 2005.

- TOLEMAN, M. A.; SIMM, A.M.; MURPHY, T.A.; GALES, A.C.; BIEDENBACH, D.J.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, p. 673–679, 2002.
- TÓTH, A.; DAMJANOVA, I.; PUSKÁS, E.; JÁNVÁRI, L.; FARKAS, M.; DOBÁK, A.; BÖRÖCZ, K.; PÁSZTI, J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. **European Journal Clinical Microbiology Infection Disease.**, v. 29, p. 765-769, 2010.
- TSAKRIS, A., VOULGARI, E.; POULOU, A.; KIMOULI, M.; POURNARAS, S.; RANELLOU, K.; KOSMOPOULOU, O; PETROPOULOU, D. In vivo acquisition of a plasmid-mediated bla(KPC-2) gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p 2546-2549, 2010.
- WALSH, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. S3, p. S8–S14, 2010.
- WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; POIREL, L.P.; NORDMANN, P. Metallo- $\beta$ -Lactamases: the Quiet before the Storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–325, 2005.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p. 470–482, 2007.
- WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, p. 373–383, 2006.
- WATANABE, M.; IYOBE, S; INOUE, M; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147-151. 1991.
- WOODFORD, N; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Review**, Feb 9, 2011, [Epub ahead of print].
- YIGIT, H., QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W; STEWARD, D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1151– 1161, 2001.
- YONG, D.; BELL, J.M.; RITCHIE, B.; PRATT, R.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R. A novel sub-group metallo- $\beta$ -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Austrália. **In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 47. 2007, Chicago. Annals ... Washington: American Society for Microbiology, 2007.
- YONG, D.; TOLEMAN, M.A.; GISKE, C.G.; CHO, H.S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T.R. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase Gene, blaNDM-1, and a Novel Erythromycin Esterase Gene Carried on a Unique Genetic Structure in *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 14 from India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; MACHADO, A. B. M. P.; OLIVEIRA, K. R. P.; SUPERTI, S. V.; PILGER, D. A.; CANTARELLI, V. V.; PEREIRA, P. R.; LIEBERKMECHT, A. C.; BARTH, A. L. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, p.281–291, 2009.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, A.M.; KARLOWSKY, J.A. Comparative Review of the Carbapenems. **Drugs**, v. 67, n. 7, p. 1027-1052, 2007.

