

Suellen Gavronski

**INVESTIGAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS
EM ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS EM UM HOSPITAL DE
BLUMENAU/SC: DETECÇÃO LABORATORIAL E ASPECTOS
EPIDEMIOLÓGICOS**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-graduação em
Farmácia da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de mestre em Farmácia
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís
Cristine Marques Sincero
Co-orientador: Prof. Dr.
Alessandro Conrado de Oliveira
Silveira

Florianópolis
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gavronski, Suellen
Investigação da resistência aos carbapenêmicos em
enterobactérias isoladas em um hospital de
Blumenau/SC : detecção laboratorial e aspectos
epidemiológicos / Suellen Gavronski ; orientadora,
Thais Cristine Marques Sincero, coorientador,
Alessandro Conrado de Oliveira Silveira, 2017.
158 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde,
Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis,
2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. enterobactérias. 3.
carbapenemases. 4. mecanismos de resistência. 5.
epidemiologia. I. Sincero, Thais Cristine Marques.
II. Silveira, Alessandro Conrado de Oliveira. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de
Pós-Graduação em Farmácia. IV. Título.

**“Investigação da resistência aos carbapenêmicos em
enterobactérias isoladas em um hospital de
Blumenau/SC: Detecção laboratorial e aspectos
epidemiológicos”**

POR

Suellen Gavronski

**Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:**

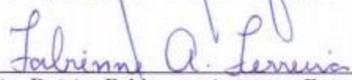
Banca Examinadora:



Prof(a). Dr(a). **Maria Luiza Bazzo** (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). **Marení Rocha Farias** (UFSC – Membro Titular)



Prof(a). Dr(a). **Fabienne Antunes Ferreira** (UFSC - Membro
Titular)



Prof(a). Dr(a). **Thais Marques Sincero** (UFSC – Orientador(a))

Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 30 de março de 2017.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo carinho, estímulo e preocupação. Obrigada pela paciência, pelo colo e pelo abraço. Por me darem força pra continuar apesar dos obstáculos no caminho. O meu trabalho é pra vocês!

À professora Thaís, por ser uma pessoa incrível e um grande exemplo a ser seguido. Sou menina de sorte e com muito orgulho de dizer que você é minha orientadora!

Ao professor Alessandro, pelas idéias e pelo grande conhecimento compartilhado.

Ao professor Caio, pelo estímulo e ajuda, jamais esquecerei!

Às minhas grandes amigas Cristine, Alejandra e Angela. Pelo companheirismo, pela leveza e por me fazerem sentir em casa. Amo vocês, gurias!

Ao Leonel, por ser meu grande e querido companheiro ao longo desses anos.

À Dani e Caetana, pela paciência, ajuda e por compartilharem com alegria as pequenas vitórias ao longo do caminho!

À todas as meninas do Laboratório MIMA, pelo estímulo, ajuda e agradável companhia.

Ao Juliano, pelo interesse e fundamental auxílio em Blumenau.

À toda equipe da CCIH, pelos dias divertidos e pelo belíssimo exemplo de profissionalismo.

Muito obrigada!

“Não haverá borboletas se a vida não passar por longas e silenciosas metamorfoses.”

(Rubem Alves)

RESUMO

A resistência aos carbapenêmicos por meio da produção de enzimas denominadas carbapenemases tem sido amplamente relatada em espécies pertencentes à família Enterobacteriaceae, estando relacionadas a altas taxas de mortalidade. Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo investigar enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC) pelo período de um ano em um hospital de Blumenau (SC), levando em conta os aspectos clínicos, relacionados à internação dos pacientes, e microbiológicos, avaliados por meio de metodologias fenotípicas e genotípicas. Ao término da coleta, foram obtidas 152 amostras isoladas de 147 pacientes, provenientes de *swab* anal de vigilância, urina, aspirado traqueal e sangue, entre outros sítios em menor proporção. A espécie predominantemente isolada foi *Klebsiella pneumoniae* (84,2%), seguida das espécies *Serratia marcescens* (9,9%), *Enterobacter cloacae* (3,9%), *Escherichia coli* (1,3%) e *Enterobacter aerogenes* (0,7%). Os resultados indicam que 55,9% dos isolados caracterizam colonizações, enquanto os demais 43,4% resultaram de processos infecciosos e 0,7% não foram caracterizados quanto à natureza da sua presença. Dos pacientes analisados, 60% apresentaram processos de colonização/infecção com origem na instituição hospitalar analisada, das quais 78% ocorreram quando o paciente se encontrava internado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Os fatores de risco significativamente relevantes para a obtenção de uma cultura positiva para ERC incluem o uso de instrumentos invasivos (cateteres venosos centrais e vesicais, ventilação mecânica), a realização de procedimentos invasivos e a prévia exposição aos antimicrobianos de amplo espectro do grupo das penicilinas/inibidores de betalactamases. Em relação ao desfecho clínico, 31% dos pacientes vieram a óbito, sendo a utilização de instrumentos invasivos, a realização de procedimentos invasivos, a admissão em UTI e prévias internações fatores significativamente associados à mortalidade dos pacientes. Em relação às enterobactérias isoladas em processos infecciosos, destaca-se o considerável índice de sensibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina. Já em relação aos isolados bacterianos provenientes de processos de colonização, índices de sensibilidade elevados foram verificados em relação ao antimicrobiano fosfomicina. A pesquisa genotípica para carbapenemases apresentou resultados positivos para o gene *blaKPC* em 98,6% dos isolados. As metodologias fenotípicas de inibição enzimática e BlueCarba, utilizadas para a pesquisa de carbapenemases, apresentaram, ambas, ótimos resultados de sensibilidade e

especificidade quando comparadas à metodologia genotípica PCR. Já a metodologia de tipagem molecular rep-PCR pôde ser aplicada com sucesso na avaliação da clonalidade dos isolados das espécies *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae* e *E. coli*.

Palavras-Chave: Enterobacteriaceae, carbapenemase, KPC, rep-PCR, fatores de risco

ABSTRACT

Resistance to carbapenems mediated by enzymes called carbapenemases has been widely reported in species belonging to the Enterobacteriaceae family, being related to high mortality rates. The present study aimed to investigate carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) for a one year period in a hospital in Blumenau (SC), taking into account the clinical aspects, related to the patients hospitalization, and microbiological aspects, evaluated by phenotypic and genotypic methodologies. By the end of the study, 152 samples from 147 patients were obtained, isolated from surveillance anal swab, urine, tracheal aspirate and blood, among other sites to a lesser extent. The predominant isolated species was *Klebsiella pneumoniae* (84.2%), followed by *Serratia marcescens* (9.9%), *Enterobacter cloacae* (3.9%), *Escherichia coli* (1.3%) and *Enterobacter aerogenes* (0.7%). The results indicate that 55.9% of the isolates characterize colonizations, while the remaining 43.4% resulted from infectious processes and 0.7% were not characterized about the nature of their presence. About the analyzed patients, 60% had colonization/infection processes originated in the analyzed hospital institution, of which 78% occurred when the patient was admitted in the Intensive Care Unit (ICU). Significant risk factors related to a positive culture for CRE include the use of invasive instruments (central venous and bladder catheters, mechanical ventilation), invasive procedures and prior exposure to broad spectrum antimicrobial agents from the penicillin/betalactamase inhibitors group. Regarding the clinical outcome, 31% of the patients died. The significant risk factors related to the patients mortality were the use of invasive instruments, invasive procedures, admission to ICU and previous hospitalizations. About the susceptibility profile of the enterobacteria isolated in infectious processes, the sensitivity to aminoglycosides, including amikacin and gentamicin stands out. Regarding the bacterial isolates from colonization processes, a high sensitivity index was verified for the antimicrobial fosfomicin. Genotypic research for carbapenemases showed positive results for the *blaKPC* gene in 98.6% of the isolates. The phenotypic methodologies of enzymatic inhibition and BlueCarba, used for the research of carbapenemases, presented, both, excellent results of sensitivity and specificity when compared to the genotypic methodology. The rep-PCR molecular typing methodology could be applied successfully for the clonality evaluation of the isolates of *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. cloacae* and *E. coli*.

Key-words: Enterobacteriaceae, carbapenemase, KPC, rep-PCR, risk factors

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial das carbapenemases KPC, NDM e OXA-48-like.....	42
Figura 2. Esquema para realização de testes fenotípicos para identificação de carbapenemases por meio da utilização de inibidores enzimáticos.....	59
Figura 3. Resultados representativos da metodologia BlueCarba	61
Figura 4. Número total dos isolados bacterianos obtidos de colonizações ou infecções classificados por tipo de amostra.....	69
Figura 5. Quantidade de pacientes em processo de infecção classificados quanto à terapia antimicrobiana utilizada.....	71
Figura 6. Resultados representativos para a pesquisa fenotípica de enzimas do tipo ESBL.....	90
Figura 7. Resultados representativos das Multiplex-PCR realizadas para pesquisa dos genes KPC, IMP, NDM, OXA-48-like, SPM e VIM.....	92
Figura 8. Resultados representativos obtidos por meio da metodologia BlueCarba.....	96
Figura 9. Teste com todos os inibidores enzimáticos testados para espécies não pertencente ao grupo CESP	99
Figura 10. Fotografia representativa dos resultados obtidos pela metodologia de REP-PCR.....	104
Figura 11. Dendrograma dos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	105
Figura 12. Distribuição dos perfis clonais de <i>K. pneumoniae</i> nas alas hospitalares.....	107
Figura 13. Dendrograma dos isolados de <i>E. cloacae</i>	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das enzimas betalactamases.....	35
Tabela 2. Quantidade de isolados bacterianos separados por espécie e por amostra biológica	67
Tabela 3. Fatores de risco significativamente relevantes para a colonização/infecção por ERC	76
Tabela 4. Fatores de risco significativamente relacionados à mortalidade dos pacientes	79
Tabela 5. Fatores de risco analisados em pacientes que receberam alta e pacientes que vieram a óbito	80
Tabela 6. Fenótipos de resistência dos isolados bacterianos envolvidos em infecções	82
Tabela 7. Fenótipos de resistência dos isolados bacterianos envolvidos em colonizações	83
Tabela 8. Quantidade de isolados classificados como “sensíveis” (S) aos antimicrobianos testados separados por espécie e características do isolamento (colonização/infecção)	84
Tabela 9. Resultados para pesquisa de ESBL nos isolados pesquisados	90
Tabela 10. Resultados do teste com inibição enzimática não concordantes com a metodologia genotípica.....	102
Tabela 11. Avaliação das metodologias fenotípicas utilizadas para a pesquisa de carbapenemases	103

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR	63
Quadro 2. Cepas controle para amplificação de genes de resistência ...	65
Quadro 3. Distribuição temporal dos perfis clonais de <i>K. pneumoniae</i>	108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFB - Ácido Fenilborônico
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- BKC - Carbapenemase Brasileira de *Klebsiella* (do inglês, *Brazilian Klebsiella carbapenemase*)
- CC - Centro cirúrgico
- CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
- CDC - Centro de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês, *Centers for Disease Control and Prevention*)
- CESP - grupo de bactérias pertencentes ao gênero *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Providencia sp.*
- CIM- Concentração Inibitória Mínima
- CLSI- Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês, *Clinical and Laboratory Standards Institute*)
- CVC - Catéter Venoso Central
- dNTP - Desoxinucleotídeos Trifosfatados
- ECDC - Centro Europeu de Prevenção e Controle de Doenças (do inglês, *European Center for Disease Prevention and Control*)
- EDTA - Ácido Etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- ERIC - Região Consenso Intergênica Repetitiva de Enterobactérias (do inglês, *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*)
- EPC - Enterobactéria Produtora de Carbapenemase
- ERC - Enterobactéria Resistente a Carbapenêmicos
- ESBL - Betalactamase de Espectro Estendido (do inglês, *Extended Spectrum Betalactamase*)
- GES - Betalactamase de Espectro Estendido da Guiana (do inglês, *Guiana extended spectrum*)
- IMP - Imipenemase
- IPCS - Infecções Primárias de Corrente Sanguínea
- IRAS - Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
- ITU - Infecção de Trato Urinário
- KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase
- MBL - Metallo-Betalactamase (do inglês, *Metallo-Beta-lactamase*)
- MDR - Multidroga Resistente (do inglês, *Multidrug resistant*)
- MIMA - Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada
- MLST - Tipagem por Sequenciamento de Multilocus (do inglês, *Multilocus sequence typing*)
- MRSA - *Staphylococcus aureus* Resistente à Meticilina (do inglês,

Methicilin Resistant S. aureus)

NDM - Metalo-betalactamase de Nova Deli (do inglês, *New Delhi Metallo-Beta-lactamase*)

NMC-A - Carbapenemases não-metaloenzimas (do inglês, *not metalloenzyme carbapenemases*)

OMS - Organização Mundial da Saúde (do inglês, *World Health Organization – WHO*)

OXA - Oxacilinases

PAV - Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica

PBP - Proteína Ligadora de Penicilina (do inglês, *Penicilin Binding Protein*)

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

PFGE - Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (do inglês, *Pulsed-Field Gel Electrophoresis*)

REP-PCR - PCR do Elemento Repetitivo Palindrômico (do inglês, *Repetitive Element Palindromic PCR*)

SIM - Imipenemase de Seul (do inglês, *Seul Imipenemase*)

SME - Enzima de *Serratia marcescens* (do inglês, *S. marcescens enzyme*)

SPM - São Paulo Metalo-betalactamase

ST - Tipo de Sequência (do inglês, *Sequence Type*)

SVD - Sonda Vesical de Demora

TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TSA - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

UFC - Unidades Formadoras de Colônias

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

VIM - Imipenemase de Verona (do inglês, *Verona Imipenemase*)

VM - Ventilação Mecânica

VRE - Enterococcus Resistente à Vancomicina (do inglês, *Vancomycin Resistant Enterococci*)

SUMÁRIO

<u>1</u>	<u>INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA</u>	<u>25</u>
<u>2</u>	<u>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</u>	<u>29</u>
2.1	RESISTÊNCIA BACTERIANA EM BACIOS GRAM-NEGATIVOS	29
2.2	FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE	30
2.3	MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA	31
2.4	BETALACTÂMICOS E BETALACTAMASES	32
2.5	CLASSIFICAÇÃO DAS BETALACTAMASES	34
2.6	BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E ENZIMAS AMPC	36
2.7	CARBAPENEMASES	37
2.7.1	SERINO-CARBAPENEMASES	40
2.7.2	METALO-BETALACTAMASES	44
2.8	DETECÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CARBAPENEMASES	47
<u>3</u>	<u>OBJETIVOS</u>	<u>53</u>
3.1	OBJETIVO GERAL	53
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	53
<u>4</u>	<u>METODOLOGIA</u>	<u>55</u>
4.1	APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA	55
4.2	AMOSTRAS	55
4.3	DADOS CLÍNICOS	56
4.4	TESTES MICROBIOLÓGICOS	57
4.4.1	CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA	57
4.4.2	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)	57
4.5	TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA DE CARBAPENEMASES	58

4.5.1	INIBIÇÃO ENZIMÁTICA	58
4.5.2	TESTE COLORIMÉTRICO – BLUECARBA	60
4.6	TESTES GENOTÍPICOS	61
4.6.1	EXTRAÇÃO DE DNA	61
4.6.2	INICIADORES	62
4.6.3	REAÇÕES DE PCR (<i>POLYMERASE CHAIN REACTION</i>)	64
4.6.4	REP-PCR	65
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	66
5	<u>RESULTADOS E DISCUSSÃO</u>	<u>67</u>
5.1	ASPECTOS CLÍNICOS	67
5.1.1	AMOSTRAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS	67
5.1.2	TERAPIA ANTIMICROBIANA	70
5.1.3	ORIGEM DA COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO	73
5.1.4	DESFECHO CLÍNICO	78
5.2	ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS	80
5.2.1	TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS	80
5.2.2	PESQUISA FENOTÍPICA DE ESBL	89
5.3	PESQUISA GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES – PCR	91
5.4	TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES	95
5.4.1	ENSAIO COLORIMÉTRICO – BLUECARBA	95
5.4.2	INIBIDORES ENZIMÁTICOS	98
5.5	ANÁLISE DE CLONALIDADE	103
6	<u>SUMÁRIO DE RESULTADOS</u>	<u>111</u>
7	<u>CONSIDERAÇÕES FINAIS</u>	<u>115</u>
8	<u>PERSPECTIVAS</u>	<u>117</u>
9	<u>REFERÊNCIAS</u>	<u>119</u>

ANEXO A **153**

ANEXO B **157**

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, com o crescente desenvolvimento científico e tecnológico da medicina, tem-se notado uma considerável melhoria na assistência à saúde da população. Entretanto, apesar de tais avanços e da crescente ênfase na recomendação de boas práticas em ambientes de saúde, os índices relacionados às infecções em ambientes hospitalares continuam preocupantes (SANTOS, 2004; PELEG ET AL, 2010; ANVISA, 2016).

De acordo com a Portaria MS nº 2616 de 12/05/1998, define-se como infecção hospitalar, atualmente denominada Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), “qualquer processo infeccioso adquirido após a admissão do paciente e que se manifeste durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionado com a internação ou procedimentos hospitalares” (BRASIL, 1997). A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece o fenômeno das IRAS como um problema de saúde pública, sendo considerado o evento adverso mais frequente em instituições de saúde (WHO, 2014). Em razão de aumentar a probabilidade de prognósticos desfavoráveis, levando ao acréscimo das taxas de morbidade e mortalidade, seu estabelecimento eleva consideravelmente os custos da terapia medicamentosa e o tempo de internação, bem como do trabalho dos profissionais da saúde, gerando mais demora no atendimento de outros pacientes (MEYER et al, 2011; CDC, 2013; CDDEP, 2016).

Em pesquisa realizada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2014, evidencia-se que a cada 100 pacientes hospitalizados, sete em países desenvolvidos e dez em países em desenvolvimento irão adquirir pelo menos uma IRAS, comprovando que, por ano, milhões de pacientes são afetados por esse efeito adverso (WHO, 2014).

É crescente o interesse em estudar e melhor analisar o problema das IRAS, principalmente pelo aumento da proporção de infecções causadas por microrganismos multidroga-resistentes (MDR). O mais recente Relatório de Riscos Globais, publicado anualmente, cita a grande disseminação de doenças infecciosas, exacerbada pela resistência a antimicrobianos, como uma das grandes ameaças à sociedade (WEF, 2017). O uso indiscriminado de antibacterianos para fins de consumo humano e animal vem sendo destacado como um dos principais fatores relacionados ao aumento das taxas de resistência, uma vez que a pressão seletiva decorrente da própria utilização de antimicrobianos leva à seleção de cepas resistentes que tendem a se disseminar pelo ambiente. Nos ambientes hospitalares a situação torna-se ainda mais crítica uma

vez que o uso de antimicrobianos, sobretudo de amplo-espectro, é mais elevado (NORDMANN, 2011; NORDMANN, 2012).

Quando comparadas com infecções causadas por cepas sensíveis da mesma espécie, infecções por bactérias MDR têm apresentado pior prognóstico, refletindo sobretudo no aumento das taxas de mortalidade (COSGROVE et al, 2003). Além disso, evidencia-se o aumento do tempo de internação, o aumento do risco de infecções em pacientes imunocomprometidos e a redução das opções terapêuticas remanescentes para o tratamento das infecções causadas por estes microrganismos, restritas a opções onerosas e muitas vezes tóxicas, como a polimixina (CARVALHO-ASSEF, 2010).

Em pesquisa realizada pelo CDC em 2013, a cada ano, nos EUA, mais de dois milhões de casos de infecções adquiridas no ambiente hospitalar estão relacionados a microrganismos resistentes, sendo eles fungos ou bactérias, resultando na morte de mais de 23 mil pessoas (CDC, 2013). Isto, aos cofres públicos, representa um gasto anual superior a US\$ 35 bilhões. Na Europa, cerca de 25 mil mortes são atribuídas a infecções causadas por microrganismos resistentes, resultando em gastos anuais que alcançam 1,5 bilhões de euros (EMA; ECDC, 2009). Neste ritmo, estima-se que em 2050, 300 milhões de mortes serão decorrentes da resistência bacteriana aos antimicrobianos, gerando uma despesa que ultrapassará a cifra de US\$ 100 trilhões (ARIAS et al, 2015).

Atualmente, o grande desafio mundial no que se refere à resistência bacteriana aos antimicrobianos é a resistência disseminada encontrada na grande família de bacilos Gram-negativos Enterobacteriaceae aos antimicrobianos carbapenêmicos, consequência sobretudo da produção de enzimas denominadas carbapenemases. O grupo dos carbapenêmicos apresenta o maior espectro de ação dentre a classe dos betalactâmicos, sendo considerada a última linha de defesa não-tóxica contra infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes (NORDMANN, 2014; PASCUAL, 2014).

Em virtude da significativa ameaça representada pela resistência bacteriana à saúde dos pacientes infectados, bem como de toda a comunidade, diversas iniciativas de controle por meio de órgãos nacionais e internacionais de vigilância e controle epidemiológicos têm sido propostas (OLIVEIRA et al, 2008). Dentre elas, conforme proposto pelo CDC, destaca-se a prevenção de infecções e o controle da disseminação de cepas resistentes, o rastreamento dos padrões de

resistência, a otimização no uso de antimicrobianos e o desenvolvimento de novos antimicrobianos e técnicas diagnósticas (CDC, 2013).

Além disso, existe um forte estímulo à adesão de políticas de rastreamento e monitoramento de microrganismos resistentes por parte das instituições de saúde, como é o caso das CCIHs (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) presentes em todos os hospitais, visando contribuir na apresentação de dados fidedignos referentes a este problema, auxiliando em políticas de controle e prevenção de IRAS (ANVISA, 2013). Além disso, desde 2011, a Coordenação Estadual de Controle de Infecção em Serviços de Saúde (CECISS) de Santa Catarina tornou a notificação de bactérias produtoras de carbapenemases obrigatória, permitindo o delineamento do perfil epidemiológico desses microrganismos (ANVISA, 2016).

Em pesquisa realizada pelo CDC, em 2016, evidencia-se uma taxa de redução de até 70% na ocorrência de IRAS quando os profissionais das instituições hospitalares conhecem a realidade das infecções no ambiente em que trabalham, passando a aderir às medidas propostas pelos programas de controle e prevenção de IRAS (CDC, 2016).

Neste sentido, a realização de pesquisas epidemiológicas que permitam à instituição tomar conhecimento acerca da ocorrência das IRAS, investigar os possíveis fatores de risco envolvidos no seu aparecimento, bem como obter informações microbiológicas e moleculares acerca dos determinantes de resistência presentes, em muito contribui no entendimento do problema, sendo essencial para a elaboração de estratégias que controlem e previnam a sua ocorrência, além de impedir a disseminação dos microrganismos envolvidos (CARDO et al, 2010)

Conforme dados locais, os hospitais de Blumenau/SC isolam um número constante de bactérias resistentes aos carbapenêmicos, entretanto desconhecem-se os fatores de risco implicados, bem como as características fenotípicas e genotípicas de tais amostras. Neste sentido, a elucidação do cenário atual referente à resistência aos antimicrobianos bem como a compreensão das características fenotípicas e genotípicas de cepas MDR por meio da associação de métodos microbiológicos e moleculares contribui fortemente para o entendimento destes mecanismos de resistência, possibilitando a formulação de estratégias de controle desses microrganismos e o estabelecimento de uma antibioticoterapia eficaz em tempo hábil, aumentando a sobrevida do paciente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RESISTÊNCIA BACTERIANA EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS

Desde a descoberta da penicilina, na década de 1940, a utilização de agentes antimicrobianos foi largamente empregada no tratamento de infecções, em muito auxiliando na contenção de infecções. Entretanto, desde sua disponibilização no mercado, a pesquisa de novas moléculas com ação antibiótica se fez necessária, em função do rápido desenvolvimento de mecanismos de resistência a essa classe de fármacos (CDC, 2013).

A resistência aos antimicrobianos é uma consequência direta da sua própria utilização, uma vez que a pressão seletiva decorrente do seu uso favorece a seleção e o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacterianos. Dois fatores exercem influência mandatória no desenvolvimento de populações bacterianas resistentes: a larga utilização de antimicrobianos – apropriada ou não – em seres humanos e a intensificação de seu uso na produção de animais para consumo, acarretando o aumento da utilização de antimicrobianos para a contenção e prevenção de doenças, bem como para estimular seu crescimento (CDDEP, 2016).

De acordo com dados de 71 países, notou-se um aumento de 30% no consumo humano de antimicrobianos entre os anos de 2000 e 2010 (VAN BOECKEL et al, 2014). Entre os países com maior utilização, destacam-se a Rússia, China, Índia, África do Sul e o Brasil, que apresentou uma taxa de aumento de 68%. Se não bastasse a sua crescente utilização, estima-se que o uso de 50% de todos os antimicrobianos tenha sido inapropriado e/ou desnecessário (CIZMAN, 2003; CDDEP, 2016).

Na indústria agropecuária (aves, suínos e gado), o consumo de antimicrobianos é exacerbadamente maior do que o consumo humano. Em 2010, mais de 63 toneladas de antimicrobianos foram utilizados para prevenir e curar infecções e/ou promover o crescimento de animais, representando dois terços de todas as 100 toneladas produzidas anualmente (VAN BOECKEL, 2015; CDDEP, 2016). Nesse panorama, o Brasil encontra-se entre os cinco países que mais utilizaram antimicrobianos na produção de bovinos, além de ser o terceiro maior produtor e liderar a exportação de carnes de aves, sendo este, juntamente com a produção de carne suína, os segmentos agropecuários que mais utilizam antimicrobianos no mundo (USITC, 2012; CDDEP, 2016).

Além disso, certa quantidade de antimicrobianos eventualmente acaba sendo descartada no meio ambiente, contaminando o solo e a água de rios e lençóis freáticos, conseqüentemente aumentando o risco de contaminação humana sobretudo em áreas com condições sanitárias inadequadas, como é o caso dos países em desenvolvimento (CDDEP, 2016).

A soma desses fatores torna o impacto relacionado à disseminação dos mecanismos de resistência preocupante, uma vez que a redução do arsenal terapêutico disponível pode comprometer a eficácia e muitas vezes inviabilizar o tratamento dos pacientes infectados com estes microrganismos (WHO, 2014).

Não existe distinção de espécies no que se refere à possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana, embora diferentes mecanismos sejam expressos de acordo com a divisão do grande grupo de bactérias. De toda forma, apesar de ainda existirem perspectivas favoráveis ao desenvolvimento de novos fármacos ativos contra bactérias Gram-positivas, a mesma realidade infelizmente não se repete quando falamos de Gram-negativas (PASCUAL et al, 2014).

Atualmente, os patógenos Gram-negativos predominantemente envolvidos como agentes causadores de IRAS são majoritariamente representados pela família Enterobacteriaceae, embora bactérias não fermentadoras como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* também sejam agentes constantemente responsabilizados pelo aparecimento de surtos em ambientes hospitalares.

2.2 FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE

Os bacilos pertencentes à família Enterobacteriaceae constituem o maior e mais variável grupo de bastonetes Gram-negativos de importância clínica, sendo as bactérias mais frequentemente isoladas em amostras biológicas. Além disso, apresentam ampla distribuição na natureza, sendo encontradas no solo, água, vegetação e no trato intestinal de seres humanos e animais, característica que deu nome à família (WINN et al, 2008). Atualmente, a família Enterobacteriaceae conta com mais de 44 gêneros e 156 espécies e subespécies. Entretanto, curiosamente, cerca de 95% de todas as infecções causadas por este grupo estão relacionadas a menos de 20 espécies (MURRAY et al, 2009, ANVISA, 2013b).

Os membros da família Enterobacteriaceae podem ser responsáveis por qualquer tipo de doença infecciosa e isolados de qualquer amostra recebida no laboratório, sendo responsáveis por 30%

de todas as infecções adquiridas em hospitais e estando envolvidos em 47% das infecções do trato respiratório inferior, 45% das infecções do trato urinário e 70% quando tais infecções são reportadas em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), de acordo com pesquisa realizada no Estados Unidos (PELEG et al, 2010; HIDRON et al, 2008; GAYNES et al, 2005). No Brasil, estão envolvidos em até 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (ANVISA, 2013b). Além disso, estão também associadas a infecções do trato gastrointestinal, peritonite, meningite, sepse e infecções associadas a procedimentos de risco (HRABAK et al, 2014).

A presença de algumas enterobactérias pode estar exclusivamente relacionada ao desenvolvimento de infecções (*Salmonella spp.*, *Shigella spp.*), enquanto outras podem viver como comensais (*Klebsiella spp.*, *E. coli*), podendo vir a causar infecções oportunistas, dependendo de fatores externos e relacionados aos hospedeiros (MURRAY et al, 2009).

Neste sentido, os pacientes imunocomprometidos ou debilitados são altamente suscetíveis às infecções causadas por estes microrganismos, podendo ser colonizados com isolados presentes em diversos ambientes, hospitalares ou não, ou após procedimentos invasivos, como cateterismo, traqueostomia ou biópsias cirúrgicas, por exemplo, em que as mucosas são traumatizadas (WINN et al, 2008).

Especial atenção deve ser dada às infecções causadas por Enterobacteriaceae resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos (MDR), uma vez que a taxa de mortalidade relacionada é alta, oscilando entre 19% e 72% de acordo com alguns estudos clínicos (TUMBARELLO et al, 2012, QUERESHI et al, 2012; ZARKOTOU et al, 2011; DAIKOS et al, 2014; HIRSCH et al, 2010; BORER et al, 2009). Dentro da família, *E. coli* e *K. pneumoniae* destacam-se como as espécies predominantemente relacionadas com a aquisição e/ou desenvolvimento de mecanismos de resistência (CDC, 2013).

2.3 MECANISMOS ENZIMÁTICOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA

Independente se de forma intrínseca ou adaptativa, a resistência aos antimicrobianos ocorre por meio de diversos mecanismos, incluindo desde a alteração na permeabilidade da membrana bacteriana, a hiperexpressão de bombas de efluxo e a modificação do sítio alvo do fármaco por mutações ou modificações pós-traducionais, até a produção de enzimas que inativam ou degradam os antimicrobianos por meio de

hidrólise ou modificação estrutural (TENOVER, 2006; BLAIR et al, 2015).

Sendo considerado o principal mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas desde a descoberta das penicilinas, em 1940, destaca-se a produção de enzimas responsáveis pela inativação ou degradação de antimicrobianos (ABRAHAM et al, 1940; ANVISA, 2016; NORDMANN, 2014). Dentre as principais enzimas relacionadas à resistência aos antimicrobianos em Enterobacteriaceae destacam-se as betalactamases, majoritariamente representadas pelas ESBLs (betalactamases de espectro estendido) e pelas carbapenemases, que serão o foco deste trabalho.

2.4 BETALACTÂMICOS E BETALACTAMASES

Os betalactâmicos constituem a maior e mais importante classe de fármacos antimicrobianos. Suas vendas representam aproximadamente US\$15 bilhões e sua família representa mais de 65% do mercado mundial de antibacterianos (ELANDER, 2013). O interesse nesta classe de fármacos data de 1929, desde o surgimento da penicilina (FLEMING, 1929). Desde então, tanto fármacos de origem natural quanto quimicamente sintetizados foram desenvolvidos para o uso clínico, sendo largamente utilizados até os dias de hoje.

Esta classe é assim chamada em função da presença de um anel betalactâmico presente em sua estrutura molecular, que atua inibindo a síntese do peptidoglicano na parede celular bacteriana. A composição dessa estrutura é reforçada pelo entrelaçamento de suas proteínas componentes, um processo catalisado pela enzima transpeptidase. Os betalactâmicos são análogos estruturais do substrato da enzima transpeptidase, o que resulta na formação de um complexo estável entre o fármaco e a enzima (TIPPER et al, 1965). Como consequência da neutralização desta enzima, ocorre a perda da integridade celular, resultando na lise da célula bacteriana.

Desde a descoberta do primeiro betalactâmico, múltiplas moléculas sintéticas e naturais foram identificadas. Atualmente, os betalactâmicos dividem-se em quatro grupos distintos: as penicilinas, as cefalosporinas, os monobactâmicos e os carbapenêmicos (NOBREGA, 2013).

Os carbapenêmicos possuem em sua estrutura um anel com cinco átomos de carbono ligado ao anel betalactâmico. Sua síntese tem diferenças significativas quando comparada com a síntese de outros representantes dessa classe de fármacos. Apresentam o maior espectro

de ação entre a classe dos betalactâmicos, constituindo um grupo ativo contra uma ampla gama de bactérias Gram-positivas e negativas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Neisseria sp.*, *Haemophilus sp.*, *P. aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Enterobacter sp.*, *Bacteroides sp.* e *Clostridium sp.* (BRADLEY et al, 1999). O primeiro representante do grupo foi a tienamicina, isolado do microrganismo *Streptomyces cattleya* (KAHAN et al, 1979). Atualmente, os antimicrobianos carbapenêmicos possuem quatro representantes principais: meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem.

O desenvolvimento de mecanismos de resistência entre microrganismos clinicamente importantes está diretamente relacionado com a utilização dos próprios antimicrobianos. Em 1944, quando a benzilpenicilina começou a ser utilizada, 95% dos isolados de *S. aureus* eram sensíveis a sua utilização. Em apenas cinco anos após seu primeiro uso, este número foi drasticamente reduzido para 50%, reforçando a necessidade do desenvolvimento de novas opções terapêuticas (LIVERMORE, 1998).

Nas últimas décadas, os antimicrobianos betalactâmicos foram ativamente usados no tratamento de infecções severas causadas por microrganismos Gram-negativos pertencentes à família Enterobacteriaceae. Infelizmente, em razão do crescente aparecimento de cepas resistentes, consequência da pressão seletiva exercida pela sua utilização, a eficiência de alguns representantes desta classe de antimicrobianos tornou-se questionável (POBOLELOVA et al, 2014). Apesar da resistência aos betalactâmicos ocorrer por diversos mecanismos, incluindo a modificação na permeabilidade de membrana e o aumento na regulação das bombas de efluxo (NORDMANN et al, 2009; FIGUEIREDO et al, 2009), no contexto hospitalar, dentro da família Enterobacteriaceae, o principal mecanismo de resistência que se destaca é a produção de betalactamases, enzimas que catalisam a hidrólise do anel betalactâmico, promovendo sua inativação (NÓBREGA, 2013; MEYER et al, 2011; BUSH, 2010).

Diversas enzimas pertencentes ao grupo das betalactamases são clinicamente relevantes. Entretanto, no que se refere à família Enterobacteriaceae, três grupos de enzimas demandam particular atenção: as betalactamases de espectro estendido (ESBLs), as ampCs cromossomais ou mediadas por plasmídeos e as carbapenemases (MARTINEZ-MARTINEZ et al, 2014).

2.5 CLASSIFICAÇÃO DAS BETALACTAMASES

A classificação das betalactamases (Tabela 1) é definida com base em diferentes critérios, como as características físicas e funcionais de cada enzima, critério utilizado por Bush, Jacob e Medeiros em 1989, e a classificação proposta por Ambler, em 1980, baseada na estrutura molecular das betalactamases, sendo essa a mais difundida.

A classificação proposta por Ambler divide as betalactamases em quatro grupos principais: A, B, C e D. As enzimas pertencentes às classes A, C e D possuem um aminoácido serina em seu sítio de ação. Já as betalactamases da classe B, também denominadas metalo-betalactamases, utilizam o zinco como cofator enzimático (BUSH, 2010; PINHEIRO, 2013; DALMARCO et al, 2006).

Embora a classificação estrutural proposta por Ambler obedeça a critérios de classificação mais simples, a classificação funcional de cada betalactamase tornou-se essencial ao trabalho dos clínicos e dos profissionais de microbiologia clínica, uma vez que os critérios de classificação propostos apresentam o perfil de ação de cada enzima, trazendo informações sobre os principais substratos enzimáticos e seus respectivos inibidores, sendo de grande valia para a escolha da terapia antimicrobiana ideal (BUSH, 2010).

Tabela 1. Classificação das enzimas betalactamases

Classe funcional	Classe Molecular	Substratos	Inibidores		Principais representantes
			AC ou TZB ^a	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	ampC, CMY-2, FOX-1
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	GC1, CMY-37,
2a	A	Penicilinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de curto-espectro	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Sim	Não	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15
2br	A	Penicilinas	Não	Não	TEM-30, SHV-10
2ber	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Não	Não	TEM-50
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	RTG-4
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	IMP-1, VIM-1, CcrA
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	CphA, Sfh-1

^aAC, Ácido Clavulânico; TZB, Tazobactam. Fonte: adaptado de Bush; Jacoby; 2010.

2.6 BETALACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E ENZIMAS ampC

As betalactamases do tipo ESBL (do inglês *Extended Spectrum Beta Lactamases*, ou betalactamases de espectro estendido) são enzimas capazes de promover a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e aztreonam. Entretanto, não é ativa contra cefamicinas e carbapenêmicos, além de serem majoritariamente inibidas por inibidores de betalactamases, como o ácido clavulânico e o sulbactam, característica que possibilita sua identificação fenotípica (BRCAST, 2015; BRADFORD, 2001).

Primeiramente descrita em 1983 na Alemanha, as enzimas ESBL são predominantemente representadas pelos tipos CTX-M, TEM e SHV, surgindo a partir de mutações na sequência de aminoácidos das penicilinas de curto espectro (PFEIFER et al, 2010, PITOUT et al, 2005). São majoritariamente encontradas nas espécies *K. pneumoniae* e *E. coli* dentro da família Enterobacteriaceae, embora possam também ser encontradas em bacilos Gram-negativos não fermentadores, incluindo os gêneros *Pseudomonas spp.* e *Acinetobacter spp.* (PITOUT et al, 2005). No Brasil, o primeiro relato de enzimas do tipo ESBL foi verificado em isolados de *K. pneumoniae* coletados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro, no ano de 1997 (GALES et al, 1997)

Quanto à sua classificação, as ESBLs pertencem majoritariamente à classe A de Ambler, embora algumas ESBLs do tipo OXA estejam incluídas no grupo D (LEE et al, 2012, BRADFORD et al, 2001).

Atualmente, a disseminação de enzimas ESBLs é considerada endêmica tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, consequência de serem codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, incluindo plasmídeos e transposons (PFEIFER et al, 2010, PITOUT et al, 2005).

Menos relatadas que as ESBLs, as betalactamases do tipo ampC, também conhecidas como cefalosporinases, diferem daquelas por sua capacidade de hidrolisarem as cefamicinas (incluindo a cefoxitina), sendo este antimicrobiano utilizado como marcador para a verificação da produção de ampC (BRCAST, 2015). Além disso, não são inibidas por inibidores de betalactamases e pertencem à classe C de Ambler, grupo 1 de Bush e Jacoby (BUSH et al, 2010).

Em algumas espécies, incluindo isolados do grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Hafnia*) e isolados de *P. aeruginosa*, a expressão de enzimas ampC é baixa e induzível após

exposição a certos betalactâmicos. Nesse caso, o gene codificador da cefalosporinase é cromossomal (BRCAS, 2015; BUSH et al, 2010). Entretanto, alguns genes codificadores de ampC podem ser mediados por plasmídeos, facilitando sua disseminação. As principais espécies produtoras de ampCs adquiridas são *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e *P. mirabilis* (JACOBY, 2009; BRCAS, 2015).

Tanto as enzimas do tipo ESBL quanto as enzimas do tipo ampC, quando associadas a outros mecanismos de resistência, incluindo a redução da permeabilidade celular bacteriana e/ou a hiperexpressão de bombas de efluxo, podem contribuir na resistência a grupos de fármacos de maior espectro, incluindo os carbapenêmicos.

2.7 CARBAPENEMASES

Atualmente as betalactamases de maior ameaça clínica constituem o grupo das carbapenemases. O aparecimento destas enzimas constitui uma grande ameaça mundial no que se refere ao tratamento de infecções bacterianas devido à sua capacidade de hidrolisar a maioria dos betalactâmicos, incluindo a classe dos carbapenêmicos (QUEENAN et al, 2007).

Desde seu surgimento na década de 80, os carbapenêmicos tem constituído terapia antimicrobiana de escolha para tratamento de infecções hospitalares graves causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (SOOD, 2014; OLIVEIRA et al, 2012), em razão do seu amplo espectro de ação bactericida e estabilidade frente à maioria das betalactamases, inclusive às produtoras de ESBL e hiperprodutoras de ampC (SHAH, 2008; BRATU et al, 2005). Entretanto, apesar de justificável, seu uso tem sido feito de maneira abusiva — mundialmente, a utilização de carbapenêmicos aumentou cerca de 40% (VAN BOECKEL et al, 2014) —, de forma a induzir pressão seletiva e favorecer o aparecimento de bactérias resistentes, limitando drasticamente as opções clinicamente seguras para o tratamento destas infecções (FALAGAS et al, 2014). Dessa forma, com a resistência aos carbapenêmicos, somente opções terapêuticas onerosas e com maior toxicidade, incluindo as polimixinas e a tigeciclina, são utilizadas para o tratamento de infecções causadas por estes microrganismos. Por essa razão, a resistência bacteriana aos carbapenêmicos vem se tornando um problema alarmante dentro de instituições de saúde.

A resistência aos carbapenêmicos geralmente predomina em áreas com alta prevalência de isolados carreadores de genes que

conferem resistência a várias cefalosporinas. Isso ocorre como consequência da pressão seletiva exercida pelo aumento de seu uso clínico, uma vez que a terapia com cefalosporinas passa a ser substituída por carbapenêmicos (ZOWAWI et al, 2015; QUEENAN et al, 2007; TZOUVELEKIS et al, 2012).

Além das carbapenemases, outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos na resistência aos carbapenêmicos. Dentre eles, podemos citar tanto as enzimas ESBLs quanto as ampCs, que apesar de apresentarem baixa atividade hidrolítica contra carbapenêmicos, podem ter sua capacidade de hidrólise aumentada quando associados a perda ou modificação de porinas (MARTINEZ-MARTINEZ et al; 1999). A resistência de enterobactérias a carbapenêmicos, por exemplo, pode ser mediada na ausência de carbapenemases quando mutações resultam na redução da expressão de porinas ou quando a porina é estruturalmente mutada (JOHNSON et al, 2013; GLASNER et al, 2013). Além disso, a pressão seletiva exercida pelos próprios carbapenêmicos favorece mutações nos genes de porinas ou em seus genes reguladores, contribuindo para a resistência a esta classe de antimicrobianos (GLASNER et al, 2013). Outros mecanismos como a alteração das proteínas ligadoras de penicilina (PBP) também estão relacionadas à resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos (YAMACHIKA et al, 2013).

As carbapenemases pertencem majoritariamente às classes moleculares A, B e D de Ambler. As cefalosporinases pertencentes à classe C de Ambler (ampC) possuem pouca atividade hidrolítica contra carbapenêmicos, embora algum nível de resistência seja descrito quando associada a outros mecanismos, incluindo a perda de porinas e bombas de efluxo (NORDMANN et al, 2011; GUTIERREZ et al, 2007; DAHMEN et al, 2012).

Relatos acerca das carbapenemases são descritos desde o surgimento do imipenem, em 1980 (WALSH, 2010). No Brasil, a primeira descrição de resistência aos carbapenêmicos foi feita em 1989, onde 1% de *E. coli*, 6% de *Enterobacter sp.* e alguns isolados de *K. pneumoniae* mostraram-se não-susceptíveis ao imipenem (GODOY et al, 1989). Atualmente, embora os dados referentes à prevalência de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos permaneçam escassos na América Latina, dados divulgados pelo programa SENTRY estimam um índice de 11,1% de resistência no Brasil. Em países como a Argentina, o Chile e o México, a prevalência é estimada em 8,2%, 5,0% e 0,8%, respectivamente (GALES et al, 2012). Na República Dominicana, em

2013, cerca de 28% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentam resistência ao imipenem (PAHO, 2014). Entretanto, em função do baixo número de pesquisas e da consequente subnotificação dos casos, esse panorama pode não refletir a realidade dos casos.

Na Índia, os índices de resistência em *K. pneumoniae* e *E. coli* são de, respectivamente, 57% e 12% (CDDEP, 2016). Nos Estados Unidos, os índices para estas mesmas espécies são relatados em 11% e 2% (CDC 2013). Na Europa a situação é ainda mais crítica. Estima-se que na Itália, a prevalência de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos chegue a 28,8%. Na Grécia a prevalência ultrapassa 60% (HRABAK, 2014).

Até a década de 90, acreditava-se que os genes codificadores de carbapenemases estavam apenas localizados em regiões cromossomais, com pouco potencial de disseminação e que eram espécie-específicos (haviam sido encontrados em *Bacillus cereus* e *Stenotrophomonas maltophilia*). Sendo assim, seus primeiros relatos não ganharam visibilidade (QUEENAN et al, 2007; WALSH et al, 2005). Sua existência só passou a ganhar maiores proporções após ser encontrada em bactérias de maior importância clínica, incluindo a família Enterobacteriaceae, como no isolamento de uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), no estado da Carolina do Norte/EUA, em 1996, e de um pequeno surto causado por bactérias produtoras de IMP, uma metalo-betalactamase, no Japão, em 1993 (YIGIT et al, 2001; ITO et al, 1995). Atualmente, sua presença já foi relatada em Enterobacteriaceae e em bacilos Gram-negativos não fermentadores da glicose, sobretudo nas espécies *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (TZOUVELEKIS et al, 2012).

Atualmente, sabe-se que, além de apresentarem um amplo espectro de ação, estas enzimas possuem uma rápida disseminação em âmbito mundial, consequência de serem majoritariamente codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídeos e transposons (KUMARASAMY et al, 2010; ANVISA, 2013). Tal característica também permite a transferência de genes de resistência não somente para bactérias da mesma espécie, mas de espécies diferentes, facilitando sua disseminação (LEVINSON et al, 2005). Até agora, cerca de 70 subtipos de carbapenemases foram relatadas (DU et al, 2014).

2.7.1 SERINO-CARBAPENEMASES

Pertencentes às classes A e D de Ambler, as serino-carbapenemases são assim denominadas em função de possuírem um aminoácido serina no seu sítio de ação (AMBLER et al, 1991).

2.7.1.1 CARBAPENEMASES DE CLASSE A

As carbapenemases da classe molecular A de Ambler possuem um amplo espectro de ação, muito embora sejam facilmente degradadas por inibidores de betalactamases, como o clavulanato e o tazobactam (QUEENAN et al, 2007). A detecção fenotípica de cepas produtoras de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é majoritariamente realizada por inibidores enzimáticos derivados do ácido borônico, com ênfase para o ácido fenilborônico (AFB). Produtores de ampC, pertencentes à classe C de Ambler também são inibidos por derivados do ácido borônico, mas podem ser diferenciados pelo uso concomitante da cloxacilina, uma vez que seu uso também inibe as cefalosporinas (HRABAK et al, 2014; GISKE et al, 2011).

Existem cinco grandes grupos de enzimas pertencentes a esta classe: SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI (*Imipenem-Hydrolyzing Beta lactamases*), NMC-A (*not Metalloenzyme Carbapenemase*), GES (*Guiana extended spectrum*) e KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Por serem mediadas por genes predominantemente localizados em cromossomos, as enzimas SME, IMI e NMC-A são em geral menos relatadas (MARTINEZ-MARTINEZ et al, 2014). Por outro lado, as enzimas GES e KPC, sendo mediadas por plasmídeos, apresentam maior disseminação.

As enzimas GES foram detectadas mundialmente em várias espécies de bactérias Gram-negativas. No Brasil, foi relatada pela primeira vez em 2008, isolada em um *swab* anal de vigilância em uma espécie de *K. pneumoniae* (PICAIO et al, 2010). Recentemente, em 2014, foi isolada no Rio Grande do Sul a primeira cepa de *S. marcescens* produtora de GES no Brasil, em uma amostra de líquido ascítico. A cepa, intrinsecamente resistente à polimixina, apresentou resistência também aos carbapenêmicos e sensibilidade a fluoroquinolonas e tigeciclina (NODARI et al, 2016). Embora tenham sido inicialmente consideradas ESBLs, algumas variantes dentre os 24 tipos de enzimas reconhecidas são atualmente consideradas carbapenemases (NORDMANN et al, 2012). Os genes *bla*GES estão normalmente presentes em cassetes gênicos dentro de integrons de

classe I, localizados em plasmídeos. Em Enterobacteriaceae, sua presença foi também detectada em região cromossomal (WALTER-RASMUSSEN et al, 2007). Apesar dessa característica, o grupo GES, primeiramente descrito no ano 2000, não é frequentemente encontrado (GIAKKOUI et al, 2000).

Dentre todas as carbapenemases descritas, a KPC representa a maior ameaça, sobretudo no que se refere às taxas de mortalidade: 32.2% versus 9.9%, em relação às cepas de *K. pneumoniae* não produtoras de KPC ($p < 0.001$ [odds ratio: 3.60; 95% CI: 1.87–6.91]) (GASINK et al, 2009).

A primeira descrição de uma KPC foi feita na Carolina do Norte/EUA, em 1996, isolada em uma amostra de *K. pneumoniae* (YIGIT et al, 2001). Atualmente existem 20 variantes de KPC descritas, sendo a KPC-2 e KPC-3 as mais comuns, variando em apenas um aminoácido (LCF, 2017).

A enzima KPC apresenta alta atividade hidrolítica contra penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos e uma menor atividade contra cefamicinas e carbapenêmicos, o que pode dificultar sua detecção. Além disso, bactérias portadoras do gene *blaKPC* frequentemente expressam outros tipos de betalactamases, incluindo as ESBLs dos tipos CTX-M, TEM e SHV (CUZON et al, 2010). Ademais, além da resistência aos betalactâmicos, os plasmídeos que carregam os genes *blaKPC* geralmente apresentam genes que conferem resistência a uma ampla gama de agentes antimicrobianos, incluindo quinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, trimetoprim e sulfonamidas. Dessa maneira, a presença dos genes *blaKPC* tornou grande parte das cepas portadoras multi ou pan-resistentes (CHEN et al, 2014; CARATTOLI, 2013).

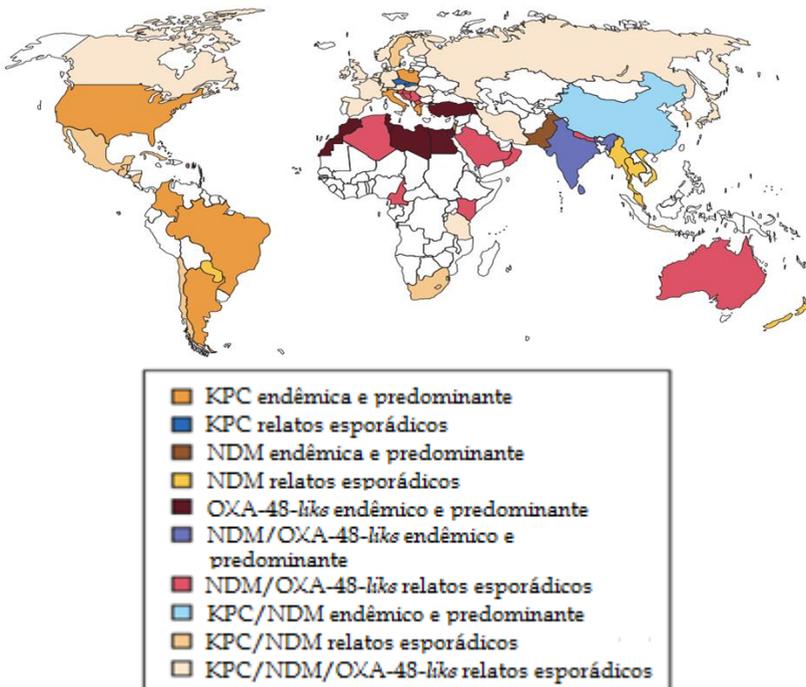
Os genes *blaKPC* estão localizados tipicamente no transposon Tn4401, um transposon do tipo Tn3 com alta frequência de recombinação (CUZON et al, 2011). Este tipo de transposon foi encontrado numa ampla variedade de plasmídeos transferíveis, incluindo os plasmídeos pertencentes aos grupos de incompatibilidade IncFIIK, IncA/C, IncN, IncI2, IncX, IncR e ColE (CHEN et al, 2014; CARATTOLI, 2013; CUZON et al, 2011).

A partir de sua descoberta, em função de estar localizada em elementos genéticos móveis, a disseminação desta carbapenemase foi crescente, sendo relatada em praticamente todas as regiões do mundo, incluindo países das Américas como os EUA, Argentina e Colômbia, países asiáticos como Israel, China, Taiwan e Índia, relatos esparsos na

Austrália, Nova Zelândia e no continente africano e praticamente em todos os países da Europa, com ênfase na Grécia e na Itália (NORDMANN, 2014; MUNOZ-PRICE et al, 2013). Atualmente, a KPC é a carbapenemase mais encontrada em Enterobacteriaceae (RAPP et al, 2012).

No Brasil, o primeiro relato de uma KPC – no caso, a variante KPC-2 – foi feito em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada em maio de 2005 de uma hemocultura em um hospital de São Paulo (PAVEZ et al, 2009). A partir desse relato, houve uma ampla disseminação dessas enzimas em todas as regiões do país, sendo descrita no Recife, em 2006 (MONTEIRO et al, 2009), no Rio de Janeiro, em 2007/2008 (PEIRANO et al, 2009), no Mato Grosso do Sul, em 2010 (CHANG et al, 2013), bem como em outros estados (SAMPAIO et al, 2016). Atualmente, a sua presença no território brasileiro é considerada endêmica (Figura 1).

Figura 1. Distribuição mundial das carbapenemases KPC, NDM e OXA-48-like



Fonte: modificada de VASOO et al, 2015.

Embora as KPCs sejam predominantemente encontradas na espécie *K. pneumoniae*, a enzima já foi encontrada em diferentes espécies de Enterobacteriaceae, como *Enterobacter sp.*, *Salmonella sp.*, *Citrobacter sp.*, *E. coli* e *Serratia sp.* (BRATU et al, 2005; WALTER-RAMUSSEN, 2007; NORDMANN et al, 2012; POIREL et al, 2007). Além da família Enterobacteriaceae, existem relatos da presença da KPC em isolados de *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (VILLEGAS et al, 2007; POIREL et al, 2010; ROBLEDO et al, 2010, SHARAN et al, 2016).

Recentemente, uma nova carbapenemase de classe A denominada BKC (*Brazilian Klebsiella carbapenemase*) foi descrita no Brasil. Entretanto, em função do gene codificador da enzima estar localizado em um plasmídeo não-conjugativo, sua presença tem sido relatada com baixa frequência (NICOLETTI et al, 2015; MARTINS et al, 2016).

2.7.1.2 CARBAPENEMASES DE CLASSE D

As betalactamases de Classe D, também denominadas oxacilinases (“OXA”) em função de hidrolisarem a oxacilina, são enzimas mediadas por plasmídeos conhecidas pelas suas variadas sequências de aminoácidos (BUSH et al, 1995). Dentre sua funcionalidade, algumas OXA são divididas entre betalactamases de curto-espectro, ESBLs e carbapenemases (MARTINEZ-MARTINEZ et al, 2014). Sua presença é geralmente relatada em *Acinetobacter sp.*, embora esteja sendo detectada em Enterobacteriaceae com uma frequência ascendente, sendo representada majoritariamente pelas enzimas OXA-48-like (WALTHER-RASMUSSEN et al, 2006; HIGGINS et al, 2010; POIREL et al, 2010; GIRMENIA, 2016). Dentre as enzimas OXA-48-like, diversas variantes que diferem em poucos aminoácidos foram relatadas, incluindo a OXA-162, OXA-163, OXA-181, OXA-204, OXA-232, OXA-244 e a OXA-245. Todas, com exceção da enzima OXA-163, apresentam propriedades hidrolíticas similares às da OXA-48 (POIREL et al, 2012, OTEO et al, 2013).

O gene *blaOXA-48* está localizado no transposon Tn1999, sendo flanqueado por duas sequências de inserção IS1999. É carregado pelo plasmídeo conjugativo IncL/M, de 62kb, que apresenta alto potencial disseminativo (POIREL et al, 2012). Por não serem inibidas por clavulanato, tazobactam, sulbactam, derivados de ácido borônico e EDTA, nenhum teste fenotípico que permitisse a identificação do gene *blaOXA-48-like* foi desenvolvido. Entretanto, a resistência à temocilina

e a combinação de piperacilina-tazobactam, somados a uma sensibilidade reduzida a carbapenêmicos pode ser indicativa da produção de OXA-48. A confirmação de sua presença, entretanto, só poderá ser feita por meio de técnicas moleculares (HRABAK et al, 2014; GLUPCZYNSKI et al, 2012)

As enzimas OXA-48 foram descobertas em um isolado de *K. pneumoniae* na Turquia em 2003, e apresentam o maior potencial hidrolítico contra carbapenêmicos dentre todas as enzimas OXA (POIREL et al, 2004). Entretanto, apesar disso, a OXA-48 não é uma carbapenemase forte. Seu potencial somente é evidenciado quando em conjunto com outros mecanismos de resistência a carbapenêmicos, como a super expressão de bombas de efluxo, por exemplo (GULMEZ et al, 2008). Apesar disso, o aumento da frequência destas carbapenemases, particularmente em espécies de *K. pneumoniae*, é preocupante. Até o momento, existem relatos de sua presença no Líbano, Turquia, Tunísia, na Bélgica e na América do Norte (GIRMENIA et al, 2016; CARRER et al, 2010; GULMEZ et al, 2008; MATAR et al, 2010; CUZON et al, 2008; CUZON et al, 2010; LASCOLS et al, 2013; POIREL et al, 2012; POIREL et al, 2012), sendo majoritariamente encontrada na Turquia, Oriente Médio e norte da África (POIREL et al, 2012). No Brasil, o primeiro relato de uma variante do grupo OXA-48-like, a enzima OXA-370, foi descrito em maio de 2013, isolado de uma amostra de *swab* retal num hospital de Porto Alegre. A espécie isolada foi identificada como *Enterobacter hormaechei* (SAMPAIO et al, 2014).

2.7.2 METALO-BETALACTAMASES

As metalo-betalactamases (MBL), pertencentes à classe molecular B de Ambler, diferem das demais enzimas em função de utilizarem o zinco como cofator enzimático, sendo portanto inibidas por quelantes de metais, como o EDTA. Tal característica facilita sua identificação em métodos fenotípicos. Seu espectro de ação é amplo, podendo hidrolizar todos os betalactâmicos com exceção dos monobactâmicos (ex: aztreonam) (QUEENAN et al, 2007).

Existem três subclasses de enzimas MBLs (B1, B2 e B3), classificadas de acordo com sua estrutura e com os substratos em que atuam. Dentre elas, a subclasse B1 recebe mais atenção porque abriga todas as enzimas de maior interesse clínico (QUEENAN et al, 2007).

As MBLs são divididas em nove famílias principais: IMP (*active on imipenem*), VIM (*Verona integron-encoded metallo-beta-lactamase*), SPM (*São Paulo metallo-beta-lactamase*), GIM (*German imipenemase*), SIM (*Seoul imipenemase*), AIM (*Austrália imipenemase*), KHM (*Kyorin University Hospital metallo-beta-lactamase*), DIM (*Dutch imipenemase*) e NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) (ANDRADE, 2011).

As metallo-beta-lactamases de maior predominância incluem as enzimas VIM e IMP, com ampla disseminação mundial. A primeira metallo-beta-lactamase relatada foi do tipo IMP-1, descrita em 1990, no Japão, em um isolado de *P. aeruginosa*, seguido por um surto do mesmo subtipo enzimático em meados da mesma década, em uma espécie de *S. marcescens*, da família Enterobacteriaceae (OSANO et al, 1994; ITO et al, 1995).

As enzimas do tipo VIM foram primeiramente isoladas na espécie *P. aeruginosa*, em 1997, e atualmente apresentam 41 variantes relatados (LAURETTI et al, 1999; LCF, 2017). É uma das MBLs mediadas por plasmídeo mais relatadas mundialmente, sendo considerada endêmica na Grécia (VATOPOULOS, 2008). Na América Latina somente casos isolados foram reportados em Enterobacteriaceae. Sua presença foi relatada em espécies de *E. cloacea*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae* e *Providencia rettgeri* na Venezuela, México, Colômbia e Argentina, respectivamente (MARCANO et al, 2008; MORFIN-OTERO et al, 2009; MONTEALEGRE et al, 2011; GOMEZ et al, 2011). Na Colômbia, foi descrita uma espécie de *K. pneumoniae* carregando os genes VIM e KPC (ROJAS et al, 2013). É encontrada em cassetes gênicos dentro de integrons de classe I, geralmente carregado por transposons. Os integrons-*bla*VIM podem estar localizados dentro de plasmídeos de diversos grupos de incompatibilidade, além de poderem estar inseridos também em regiões cromossômicas (CARATTOLI, 2013).

Da mesma forma que os genes *bla*VIM, os genes *bla*IMP também apresentam relatos em espécies de *P. aeruginosa* e diversas espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. cloacae* e *Citrobacter sp.* Atualmente apresentam mais de 40 variantes e também estão localizadas em cassetes gênicos dentro de integrons, vinculados a plasmídeos conjugativos de diferentes grupos de incompatibilidade (CARATTOLI, 2013; WALSH et al, 2005; ZHAO et al, 2011).

A família IMP foi primeiramente descrita no Japão, em um isolado de *P. aeruginosa*, tendo sido posteriormente encontrada na espécie *K. pneumoniae*, no mesmo país (WATANABE et al, 1991). No

Brasil e América Latina, foi a primeira metalo-betalactamase identificada em Enterobacteriaceae – nesse caso, em uma *K. pneumoniae* -, tendo sido isolada em abril de 2003 na cidade de São Paulo (LINCOPAN et al, 2005). Em pesquisa realizada entre setembro de 2011 e fevereiro de 2013, foi relatada a coexistência de IMP e KPC em espécies de *S. marcescens* em um hospital da região Centro-Oeste do Brasil. Todos os pacientes vieram a óbito (SILVA et al, 2015).

A enzima SPM foi relatada pela primeira vez em 2002, no Brasil, em *P. aeruginosa*, tendo sido reportada em poucos casos fora do Brasil (SALABI et al, 2010) e responsável por alguns surtos hospitalares associados a altas taxas de mortalidade (CAMARGO et al, 2011; SCHEFFER et al, 2010). Apresenta alta capacidade hidrolítica contra cefaloporinas, sendo parcialmente inibida por quelantes de metais (MURPHY et al, 2003).

Atualmente, um dos grandes desafios no que se refere às MBLs é a abrangência e rápida disseminação do gene *bla*NDM entre bacilos Gram negativos fermentadores e não-fermentadores por todos os continentes, tendo sido identificada em mais de 70 países desde a sua descoberta na Índia, em 2008 (JOHNSON et al, 2013; POIREL et al, 2010; BUSHNELL et al, 2013). O grande problema relacionado a esta carbapenemase relaciona-se à extrema mobilidade de seu gene e à presença concomitante de outros mecanismos de resistência, incluindo a produção de oxacilinasas, ampC mediada por plasmídeo, ESBLs, outras carbapenemases e genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, macrolídeos e quinolonas, restringindo suas opções de tratamento a fármacos mais tóxicos, como a tigeciclina e a colistina (NORDMANN, 2014; JOHNSON et al, 2013). Além disso, a presença da NDM geralmente resulta em maiores valores de CIM para carbapenêmicos quando comparada à presença de outras carbapenemases (DAIKOS et al, 2011).

Atualmente foram descritas 13 variantes da enzima e, em Enterobacteriaceae, são carregadas em plasmídeos conjugativos pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade, incluindo IncL/M, IncA/C, IncF e IncHI1 (CARATTOLI, 2013; LCF, 2017).

Em 2011, bactérias portadoras desta MBL foram encontrados na Guatemala e no ano seguinte, foram descritos no Uruguai, Colômbia e Paraguai (ANVISA, 2011; PAHO/OMS, 2012). O primeiro relato da NDM no Brasil foi feito em Porto Alegre (RS), em 2013, num isolado de *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al, 2013) e, no mesmo ano, 1134 isolados foram analisados na mesma cidade, sendo a NDM

encontrada em 0,97% das amostras, nove *Enterobacter cloacae* e duas *Morganella morganii* (ROZALES et al, 2014). A enzima também foi encontrada no Paraná, na espécie *A. baumannii* (Comunicado de risco nº 01/2014). A coprodução de NDM-1 e KPC-2 foi recentemente descrita na espécie *P. rettgeri* e *E. cloacae* no Rio de Janeiro (QUILES et al, 2015).

2.8 DETECÇÃO FENOTÍPICA E MOLECULAR DE CARBAPENEMASES

A crescente incidência de enterobactérias produtoras de carbapenemases torna fundamental a otimização de métodos diagnósticos rápidos e eficientes para a detecção destes microrganismos, sendo determinante para a escolha do tratamento adequado e para a tomada de medidas eficazes para o controle dessas infecções (HAMMOUDI et al, 2014).

De maneira geral suspeita-se que uma amostra seja produtora de carbapenemases quando seus resultados apresentam suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos, caracterizada por um aumento na concentração inibitória mínima (CIM) ou diminuição do diâmetro do halo de inibição em testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (MIRIAGOU et al, 2010). Entretanto, mesmo havendo a produção de carbapenemases, muitos isolados apresentam pouca ou nenhuma alteração nos índices de sensibilidade aos carbapenêmicos, uma vez que o alto nível de resistência a essa classe somente se apresenta quando outros mecanismos de resistência coexistem, incluindo a redução da permeabilidade da membrana bacteriana e a produção de betalactamases do tipo ESBL ou ampC (TAMMA et al, 2016; KITCHEL et al, 2010; NORDMANN et al., 2011). Como consequência, a detecção fenotípica dos isolados produtores de carbapenemases pode ser dificultada (NORDMANN et al, 2012).

Com o objetivo de confirmar a produção enzimática de carbapenemases, diversas metodologias com princípios fenotípicos e genotípicos foram desenvolvidas. Apesar de consideradas o padrão-ouro na detecção de carbapenemases, as metodologias genotípicas não costumam ser rotineiramente utilizadas nos laboratórios de microbiologia clínica, uma vez que geralmente são onerosas e limitadas aos alvos pesquisados. Por essa razão, a diferenciação entre Enterobactérias produtoras e não produtoras de carbapenemases costuma ser realizada por meio da implementação de metodologias

fenotípicas (TAMMA et al, 2017). Entre elas, atualmente destacam-se as metodologias de inibição enzimática ou de hidrólise de substratos.

Nos testes de inibição enzimática, a atividade de antimicrobianos com e sem inibidores específicos para um determinado tipo de enzima é avaliada. Com a utilização de um inibidor enzimático, o potencial hidrolítico da carbapenemase avaliada diminui, tornando o isolado mais susceptível à ação do antimicrobiano. Dessa forma, se ocorrer um aumento no halo de inibição (ou um decréscimo no valor da CIM) do carbapenêmico com inibidor em comparação com o disco do carbapenêmico sem o inibidor, é possível confirmar a produção de uma carbapenemase, além de identificar a qual classe a carbapenemase detectada pertence, dependendo do tipo de inibidor enzimático utilizado. Neste teste, são utilizados discos de imipenem e meropenem sem inibidores e acrescidos dos inibidores AFB (ácido fenilborônico), EDTA e Cloxacilina, que degradam, respectivamente betalactamases de classe A, B e C de Ambler. Já para as carbapenemases da Classe D de Ambler, relata-se a utilização de discos de temocilina para sua detecção. Entretanto, as técnicas moleculares permanecem como padrão ouro para a identificação laboratorial de carbapenemases pertencentes a esta classe (MIRIAGOU et al., 2010; POIREL et al., 2010; NORDMANN et al., 2012a). Para enterobactérias pertencentes ao grupo CESP (incluem os gêneros *Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Providencia sp.*), produtores de beta-lactamases do tipo ampC de forma induzível, a utilização dos inibidores enzimáticos AFB e Cloxacilina não é recomendada, uma vez que podem dar resultados falsos positivos para KPC, em função das cafalosporinases ampC serem inibidas pelo AFB (ANVISA, 2013).

Atualmente, no Brasil, a metodologia de inibição enzimática foi compilada e preconizada pela ANVISA, em 2013, devendo ser realizada por todos os laboratórios de microbiologia clínica do país na pesquisa de isolados produtores de carbapenemases (ANVISA, 2013). A metodologia vem sendo avaliada e atualizada pelo Comitê Brasileiro de Testes de Sensibilidade aos Antimicrobianos, na busca de um consenso sensível e específico para a realidade nacional (BRCAST, 2016).

Outras metodologias que podem ser empregadas na detecção de carbapenemases são os ensaios de hidrólise enzimática, incluindo o CarbaNP (DORTET et AL, 2012a) e o BlueCarba (PIRES et al, 2013). Estas metodologias avaliam a hidrólise do carbapenêmico imipenem quando em contato com o extrato bacteriano testado. A hidrólise do antibiótico resulta na mudança do pH do meio e, em função da presença

de um indicador de pH, uma reação positiva pode ser visualizada pela mudança da cor original do meio testado (NORDMANN et al, 2012d). Essa metodologia permite diferenciar amostras produtoras de carbapenemases de amostras resistentes aos carbapenêmicos em função da presença de outros mecanismos de resistência (ESBLs, ampC, perda de porinas, entre outros) (NORDMANN et al, 2012d). Além disso, por não ser um teste aplicado a carbapenemases específicas, o CarbaNP permite a detecção de carbapenemases ainda não conhecidas (NORDMANN et al, 2013). Os resultados podem ser obtidos em até 2h, é um teste barato por não precisar de equipamentos e reagentes especiais e apresenta ótima sensibilidade para a maioria das carbapenemases, com exceção de carbapenemases da classe D e de carbapenemases do tipo GES (classe A), que apresentam atividade hidrolítica relativamente baixa contra carbapenêmicos (TIJET et al, 2013; DORTET et al., 2012).

No que se refere aos métodos genotípicos para detecção de carbapenemases, a PCR vem conquistando cada vez mais espaço nos laboratórios clínicos, uma vez que pode ser mais rápida e menos laboriosa que as metodologias fenotípicas (MIRIAGOU et al., 2010). Diversas variações dessa técnica são realizadas, com destaque para as PCRs simplex e multiplex, onde, respectivamente, um ou vários genes são amplificados concomitantemente, e para as PCRs em tempo real, também simplex ou multiplex. Além disso, em caso de amplificação positiva para o gene da carbapenemase pesquisada, é possível fazer o sequenciamento do gene amplificado, permitindo a identificação do subtipo enzimático presente (POIREL et al., 2011).

Ainda nas metodologias genotípicas, pode-se analisar a clonalidade dos isolados estudados, permitindo a obtenção de dados epidemiológicos importantes referentes aos clones bacterianos circulantes (MIRIAGOU et al, 2010).

Entre as metodologias utilizadas para a avaliação da similaridade genética dos isolados bacterianos, a análise do genoma bacteriano por PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) tem sido, por muitos anos, considerada o padrão-ouro entre os métodos de tipagem molecular, sobretudo em função do grande potencial discriminatório apresentado frente a outras metodologias (HAN et al, 2013; GOERING, 1993; OLIVE et al, 1999). Entretanto, apesar de eficaz, sua realização é laboriosa, cara e demorada, constituindo uma grande desvantagem para a rotina dos laboratórios de microbiologia (OLIVE et AL, 1999). O princípio da metodologia baseia-se na clivagem do genoma do isolado por meio de enzimas de restrição. Seus fragmentos são separados por

pulsos elétricos vindos de direções alternadas, o que permite a sua melhor separação. A análise dos perfis obtidos é interpretada por seus graus de similaridade, baseado em critérios de análise bem estabelecidos (TENOVER et al, 1995).

Nos últimos anos, a utilização de técnicas baseadas em PCR vem ganhando espaço entre as metodologias utilizadas para a avaliação de similaridade genética entre isolados bacterianos. Particularmente, a rep-PCR (*repetitive element* PCR) tem sido considerada uma ferramenta com alto poder discriminatório, contribuindo para uma rápida análise epidemiológica dos isolados avaliados (GEORGHIU et al, 1995; LIGOZZI et al, 2010; FLUIT et AL, 2010, TARTARI, 2016). A tipagem molecular pela rep-PCR utiliza iniciadores complementares a sequências repetitivas distribuídas ao longo do genoma bacteriano, resultando na amplificação das regiões de DNA flanqueadas por estas sequências. Por diferirem quanto a seu tamanho, as regiões conservadas adjacentes às sequências repetitivas geram fragmentos com tamanhos variados, separados e visualizados por meio de eletroforese. Dessa forma, por meio do padrão de bandas geradas, os isolados bacterianos podem ser comparados (GUNAWARDANA et al, 2000; OLIVE et al, 1999, VERSALOVIC et al, 1991). Três principais grupos de elementos repetitivos são utilizados para a tipagem molecular: os elementos REP, do inglês *Repetitive Extragenic Palindromic*, de 38pb, os elementos ERIC, do inglês *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*, de 126 pb e os elementos BOX, com três subunidades, boxA, boxB e boxC, com 59, 45 e 50 pb, respectivamente (OLIVE et al, 1999). Atualmente, a tipagem por meio da rep-PCR pode ser realizada por meio do kit semiautomatizado Diversilab (Biomerieux®), reduzindo problemas relacionados à reprodutibilidade da técnica (HEALY et al, 2005).

Além de ser mais barata, rápida e menos trabalhosa em comparação com o PFGE, a tipagem molecular por rep-PCR pode ser aplicada a uma ampla gama de espécies e realizada em um grande número de isolados (OLIVE et al, 1999, GEORGHIU et al, 1995; FLUIT et AL, 2010; TARTARI, 2016). Ademais, de forma geral, quando comparada ao padrão-ouro PFGE, apesar de poder, esporadicamente, apresentar resultados com poder discriminatório discretamente menor, estudos demonstram uma boa correlação entre os resultados de tipagem molecular obtidos por meio da realização das duas metodologias (OLIVE et al, 1999; LIU et al, 1997; CASTRO-ALARCON et al, 2009; LIGOZZI et al, 2010; STUMPF et al, 2005; HAHM et al, 2003).

Entretanto, apesar do alto poder discriminativo das análises de clonalidade, a metodologia com maior valor epidemiológico interlaboratorial atualmente é o MLST (*Multilocus Sequence Typing*), uma vez que amplifica e posteriormente sequencia sete genes constitutivos de aproximadamente 500 pb. As diferentes sequências são analisadas em bancos de dados próprios para cada espécie analisada, gerando um perfil denominado *Sequence Type* (ST). O valor desta técnica reside justamente na comparação dos padrões de STs, que podem estar presentes em distintas áreas geográficas, permitindo a análise epidemiológica a nível global. Além disso, permite o rastreamento de clones com alto poder de disseminação (MIRIAGOU et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a resistência aos carbapenêmicos em espécies de enterobactérias isoladas em um hospital de Blumenau/SC.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os aspectos clínicos relacionados à resistência aos carbapenêmicos;
- Determinar o perfil de resistência dos isolados de enterobactérias aos carbapenêmicos;
- Pesquisar a presença e a prevalência dos principais genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos;
- Avaliar e comparar o desempenho das técnicas microbiológicas fenotípicas e moleculares em relação à sua contribuição na detecção de isolados produtores de carbapenemases;
- Traçar o perfil epidemiológico das cepas analisadas e avaliar a possível clonalidade dos isolados obtidos.

4 METODOLOGIA

4.1 APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA

O presente projeto de pesquisa faz parte de um projeto maior intitulado “Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar”. Para isso, o projeto foi submetido e aprovado através da Plataforma Brasil pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC (CEP-UFSC) (nº 32930514.0.0000.0121). Assim, quando houve a necessidade de coleta de informações clínicas dos pacientes, os mesmos foram esclarecidos sobre os seus objetivos e participaram voluntariamente através de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1), posteriormente respondendo a um questionário para coleta de dados (Anexo 2).

4.2 AMOSTRAS

A obtenção das amostras para o presente trabalho foi realizada em um hospital de Blumenau/SC entre outubro de 2015 e setembro de 2016. As amostras obtidas foram provenientes de culturas de sítios biológicos diversos dos quais foram isolados enterobactérias com perfil de sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, confirmados por TSA (Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos), de acordo com os padrões estipulados pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (2015) e pela ANVISA (2013).

Coletas invasivas somente foram realizadas em caso de utilização para fins diagnósticos e de acompanhamento, nunca sendo realizadas exclusivamente para o projeto.

Como critério de inclusão temos:

- todos os isolados bacterianos da família Enterobacteriaceae com sensibilidade reduzida a ertapenem, meropenem e/ou imipenem, no caso de espécies não pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Serratia sp.* e *Providencia sp.*), ou a meropenem e/ou imipenem nas espécies pertencentes ao grupo CESP, obtidas entre outubro de 2015 e setembro de 2016;

Como critério de exclusão, temos:

- culturas repetidas de um mesmo paciente com a mesma espécie bacteriana que apresentam o mesmo perfil de sensibilidade.

Após sua obtenção, as amostras foram conservadas em caldo Skim Milk a -20°C até a data de análise.

4.3 DADOS CLÍNICOS

Dados relacionados à internação dos pacientes foram obtidos por meio de entrevista e acesso ao prontuário dos mesmos após esclarecimento da pesquisa e assinatura do TCLE. Quando da não realização da entrevista por motivos diversos (alta hospitalar, óbito, ausência de acompanhante), somente foram coletados e apresentados dados que não possam ser pessoalmente relacionados ao paciente.

As seguintes informações foram obtidas:

- Dos pacientes: desfecho clínico;
- Das amostras: espécie bacteriana isolada, sítio biológico, caracterização quanto ao processo de colonização/infecção;
- Dos pacientes com processo infeccioso ativo por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos: terapia antimicrobiana utilizada, resultado terapêutico;
- Das colonizações e infecções (IRAS) registradas durante a internação: ala em que o paciente estava internado, tempo (em dias) que o paciente estava internado antes da cultura positivar, utilização de instrumentos invasivos (cateter venoso central, sonda vesical de demora, ventilação mecânica), realização de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou não) anterior à obtenção da cultura, exposição prévia (até 6 meses antes da cultura positivar) à terapia antimicrobiana (penicilinas/inibidores de betalactamases, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, glicopeptídeos, cotrimoxazol, lincosamidas, oxazolidinonas, polimixinas, tigeciclina);
- Dos pacientes que já apresentaram infecção/colonização quando foram internados: internações anteriores (até 6 meses anterior à atual internação);
- Dos pacientes que vieram a óbito: admissão na UTI (Unidade de Terapia Intensiva), uso de instrumentos invasivos (cateter venoso central, sonda vesical de demora, ventilação mecânica), realização de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou não) durante a internação, internações anteriores (até 6 meses anterior à atual internação), exposição à terapia antimicrobiana (penicilinas/inibidores de betalactamases, cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, fluoroquinolonas, glicopeptídeos, cotrimoxazol, lincosamidas, oxazolidinonas, polimixinas, tigeciclina).

4.4 TESTES MICROBIOLÓGICOS

4.4.1 CONFIRMAÇÃO DA ESPÉCIE BACTERIANA

Após semeadura e crescimento em ágar MacConkey, a confirmação da espécie bacteriana isolada foi realizada por inoculação nos meios TSI e nos meios de triagem para enterobactérias IAL ou Rugai & Araújo, modificado por Pessoa e Silva (RUGAI et al, 1968). Após a triagem inicial, testes bioquímicos complementares foram realizados (indol, VM, VP, citrato, lisina, arginina, ornitina, H₂S, urease, arabinose, maltose, manitol, sacarose, sorbitol, xilose, motilidade). Todos os meios de cultura utilizados na confirmação da espécie bacteriana foram preparados *in-house*. O controle de qualidade foi realizado com a utilização de cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

4.4.2 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS (TSA)

Os perfis de resistência das cepas isoladas foram analisados por meio do método de disco-difusão de Kirby-Bauer, de acordo com os padrões estabelecidos pelo CLSI 2015 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*).

Discos impregnados com concentrações padronizadas de antimicrobianos foram dispostos sobre uma placa de ágar Mueller-Hinton previamente semeada com a suspensão do isolado a ser analisado, preparado em uma concentração de 10⁸ UFC/ml (correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland). A placa foi incubada a 37°C por 18-24h e o diâmetro dos halos de inibição formados foi medido em milímetros, sendo avaliado quanto a seu padrão de resistência de acordo com os valores propostos pelo CLSI 2015.

Os dados do TSA dos isolados causadores de infecções foram colhidos diretamente com o laboratório de microbiologia clínica presente na instituição hospitalar pesquisada. Os seguintes antimicrobianos foram testados: ampicilina (10 µg), trimetoprim/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg), ciprofloxacino (5 µg), gentamicina (10 µg), amicacina (30 µg), ceftriaxona (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepime (30 µg), aztreonam (30 µg), amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), ticarcilina/clavulanato (75/10 µg), meropenem (10 µg), imipenem (10 µg). Em caso de infecção

urinária, os antimicrobianos nitrofurantoína (300 µg), ácido nalidíxico (30 µg) e norfloxacino (10 µg) foram testados adicionalmente.

Nos casos em que a presença de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos foi encontrada em culturas de *swab* anal de vigilância, o antibiograma foi realizado no laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), uma vez que o laboratório hospitalar não realiza a análise do perfil de resistência de isolados que caracterizam colonização bacteriana. Neste caso, somente antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, com adição da fosfomicina (200 µg - Cecon®), foram testados: amoxicilina/clavulanato (20/10 µg - Cecon®), cefazolina (30 µg - Cecon®), cefuroxima (30 µg - Cecon®), cefoxitina (30 µg - Cecon®), ceftazidima (30 µg - Cecon®), cefotaxima (30 µg - Cecon®), ceftriaxona (30 µg - Cecon®), cefepime (30 µg - Cecon®), aztreonam (30 µg - Cecon®), meropenem (10 µg - Cecon®), imipenem (10 µg - Cecon®) e ertapenem (10 µg - Oxoid®).

Durante a realização dos antibiogramas, na mesma placa e como metodologia complementar, foi realizado o teste de disco aproximação para pesquisa de ESBL (betalactamase de espectro estendido). Realizado numa placa de ágar Mueller Hinton previamente inoculada com o isolado teste, discos de ceftazidima, ceftriaxona, cefotaxima, cefepime e aztreonam são dispostos a uma distância de 20 mm centro a centro do disco de amoxicilina/ácido clavulânico. Após a incubação padrão por 18-24h, o aparecimento de uma “zona-fantasma” demonstra um resultado positivo, característico da produção de betalactamases do tipo ESBL.

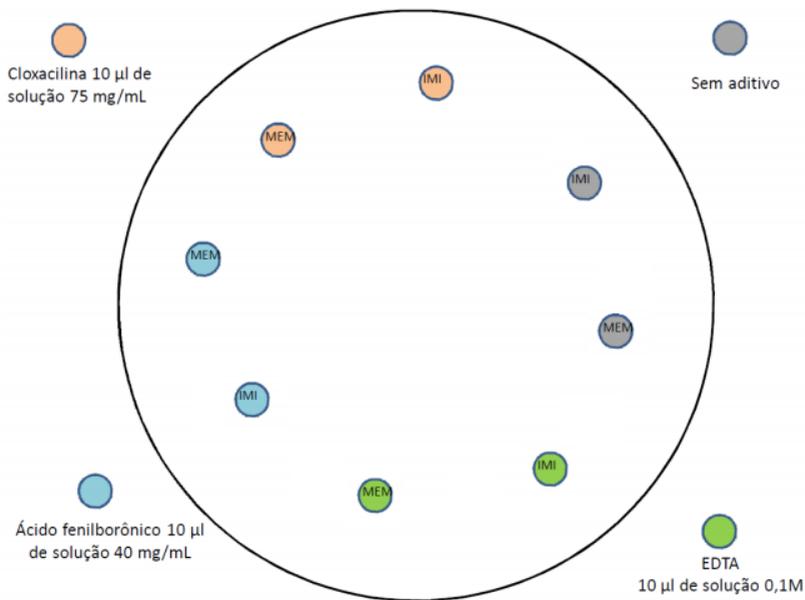
4.5 TESTES FENOTÍPICOS PARA PESQUISA DE CARBAPENEMASES

4.5.1 INIBIÇÃO ENZIMÁTICA

A detecção fenotípica de carbapenemases foi realizada com a utilização de inibidores enzimáticos por meio da técnica de disco combinado (Anvisa, 2013). Nesta metodologia, são preparados e dispostos sobre uma placa de ágar Mueller Hinton previamente inoculada com o isolado teste (preparado na turbidez 0,5 na escala de MacFarland), discos de antimicrobianos carbapenêmicos (imipenem e meropenem) com e sem a adição de três tipos de inibidores enzimáticos: o ácido fenilborônico (AFB), o EDTA e a Cloxacilina. O preparo dos discos dos antimicrobianos contendo os inibidores enzimáticos foi feito imediatamente antes da realização da metodologia, dispondo os discos

dos antimicrobianos em uma placa de Petri estéril aos quais foram adicionados 10 μ L da solução de EDTA, AFB ou Cloxacilina. Após a adição dos inibidores, o excesso de umidade foi evaporado em um tempo médio de 20 minutos de espera. Depois de prontos, os discos foram dispostos conforme a Figura 2 e incubados em estufa microbiológica a 37°C por 18 a 24h. Para a leitura dos resultados, o diâmetro do halo de inibição visto em torno dos discos de carbapenêmicos (imipenem e meropenem) sem a adição de inibidores foi comparado ao diâmetro formado em torno dos discos dos mesmos antimicrobianos acrescidos dos inibidores enzimáticos EDTA, AFB e Cloxacilina.

Figura 2. Esquema para realização de testes fenotípicos para identificação de carbapenemases por meio da utilização de inibidores enzimáticos



Fonte: ANVISA (2013).

As enzimas denominadas metalo-beta-lactamases, por apresentarem íons de zinco em seu sítio de ação, são inibidas por quelantes de metais, incluindo o EDTA. Por sua vez, as serino-carbapenemase, representadas majoritariamente pela KPC, são inibidas pelo AFB. Já as beta-lactamases do tipo ampC são inibidas pelo AFB e pela Cloxacilina.

Por essa razão, para isolados não pertencentes ao grupo CESP, no caso de uma diferença ≥ 5 mm no halo de inibição em volta do disco do carbapenêmico (imipenem e/ou meropenem) acrescido de EDTA, evidencia-se um possível produtor de metalo-betalactamase. Isolados com diferença ≥ 5 mm em volta do disco de carbapenêmicos contendo AFB evidenciam a presença de um produtor de serino-carbapenemase (KPC). Por fim, se a diferença ≥ 5 mm é vista em volta do disco contendo AFB e do disco contendo Cloxacilina, os isolados deverão ser considerados produtores de ampC plasmidial e deficientes em porinas. Isolados que apresentarem resultados negativos para a metodologia de inibição enzimática deverão ser considerados quanto à produção de carbapenemases da classe D de Ambler.

Para isolados pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia*, *Hafnia*), somente foi realizada a pesquisa de metalo-betalactamases, uma vez que espécies pertencentes a esse grupo, por serem produtoras de betalactamases ampC induzíveis, apresentam resultados falso-positivos para a detecção de KPC com a utilização do inibidor AFB.

Independente do resultado obtido, todos os resultados foram posteriormente confirmados por meio de metodologia molecular.

4.5.2 TESTE COLORIMÉTRICO – BLUECARBA

A verificação da produção de carbapenemases pelos isolados testados foi também avaliada pelo teste BlueCarba, uma metodologia bioquímica alternativa ao CarbaNP, teste originalmente proposto por Dortet e colaboradores, em 2012. Nele, a presença ou ausência de uma carbapenemase na bactéria teste é avaliada por meio da hidrólise do carbapenêmico presente no meio testado. Utilizando o indicador de pH azul de bromotimol, característica que deu nome à técnica, a hidrólise do carbapenêmico leva à acidificação do meio em que se encontra, resultando numa mudança visível de coloração.

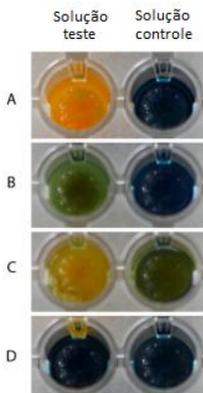
Para o preparo da metodologia, duas soluções padrões foram preparadas: a solução teste e a solução controle. A solução teste foi formulada com azul de bromotimol (ACS. Reag. PH Europeia - VETEC) 0,04% ajustada ao pH 6,0, 0,1mmol/L de ZnSO₄ (sulfato de zinco heptahidratado, Sigma Aldrich) e 3mg/mL de imipenem (Tienam 500; Merck Sharp & Dohme, France), sendo ajustada ao término do preparo para o pH 7,0. Em função da rápida degradação do imipenem, a solução teste foi preparada imediatamente antes de sua utilização. A

solução controle foi preparada apenas com azul de bromotimol 0,04% ajustada ao pH 7,0.

Uma alçada (1 μ L) pouco preenchida da bactéria teste, semeada em ágar Mueller Hinton foi ressuspensa em um poço contendo 100 μ L da solução teste e em um poço contendo 100 μ L da solução controle. Após ressuspensão, a placa com as duas soluções foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C sob agitação constante. A avaliação visual dos resultados foi feita a cada 10 minutos até o término de duas horas de incubação.

Um resultado positivo apresenta-se quando o pH da solução teste é mais ácido que da solução controle, neste caso, quando as colorações se encontram, respectivamente, amarelo e azul, amarelo e verde ou verde e azul. Já a coloração verde ou azul em ambas as soluções evidencia um resultado negativo para a produção de carbapenemas (Figura 3).

Figura 3. Resultados representativos da metodologia BlueCarba



A, B, C: resultados positivos; D: resultado negativo. Fonte: modificada de Pires et al, 2013.

4.6 TESTES GENOTÍPICOS

4.6.1 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA para utilização nas técnicas moleculares foi feita a partir de culturas de no máximo 24 horas das bactérias analisadas. Com uma alça estéril de 1 μ L, as colônias foram selecionadas, diluídas em 400 μ L de tampão de extração TES (Tris-HCl 1 M pH 8,0, EDTA

0,5 M pH 8,0, SDS 20%) e fervidas em banho-maria por 10 minutos. Após a fervura, foi adicionado 1 uL de proteinase K (50 mg/mL) a cada amostra. Os microtubos foram levemente homogeneizados e incubados novamente em banho-maria a 42°C por 1 hora. Dado o tempo da incubação, foram adicionados 84 µL de NaCl (6 M). Após leve homogeneização, os tubos foram centrifugados a 13.200 x g (14.000 rpm) por 3 minutos. Cerca de 300 µL do sobrenadante foram retirados e adicionados a outro microtubo previamente identificado. O DNA contido no sobrenadante foi então precipitado com duas vezes o volume de etanol absoluto gelado (600 µL) e centrifugado a 13.200 x g por 5 minutos. O etanol absoluto foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de álcool 70% gelado e centrifugado a 13.200 x g (14.000 rpm) por 2 minutos. Por fim, a última lavagem foi realizada novamente com 1 mL de etanol absoluto com posterior centrifugação a 13.200 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado em cada lavagem e os tubos foram mantidos em estufa a 60°C para secagem do DNA. O sedimento formado foi então ressuspensionado em 50 µL de água ultrapura livre de DNAses e RNAses.

O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria, em equipamento NanoVue Plus (GE- General Electric), sendo posteriormente diluído na concentração de 50 ng/µL. Sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% e a pureza por espectrofotometria pela relação 260/280nm e 260/230nm.

4.6.2 INICIADORES

Seis genes de maior predominância relacionados à produção de carbapenemases foram pesquisados, sendo eles: *blaKPC* (classe molecular A de Ambler), *blaOXA-48* (classe molecular D de Ambler), *blaSPM*, *blaVIM*, *blaIMP* e *blaNDM* (classe molecular B de Ambler). Os iniciadores utilizados estão descritos no Quadro 1. Cepas ATCC foram utilizadas como controle positivo das reações.

Todos os seis pares de primers utilizados foram desenhados *in-house*, sendo avaliados através do programa PrimerSelect (Lasergene®).

A especificidade de cada par foi avaliada pela ferramenta PrimerBlast (NCBI), sendo descrita em seguida.

Quadro 1. Iniciadores utilizados nas reações de PCR

Gene	Tamanho amplicon (pb)	Sequência dos iniciadores (5'- 3')	Tm dos iniciadores
<i>blaKPC</i>	404	F – GCC GGC TTG CTG GAC AC R – CGG ATG CGG TGG TTG C	61°C 58°C
<i>blaIMP</i>	399	F – 5' GCAGCATTTCTCTCATTTTC 3' R – 5' GTGATGCGTCTCCAACCTCA 3'	55°C 58°C
<i>blaVIM</i>	512	F – GTT TGA TGG CGC AGT CTA CC R – CCG GGT AGT GTT GTT GAA TCC	59°C 58°C
<i>blaNDM</i>	601	F - 5' GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC 3' R - 5' ATGCTGGCCTTGGGGAAC 3'	57°C 59°C
<i>blaSPM</i>	649	F – CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC R – TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC	58°C 59°C
<i>blaOXA-48-like</i>	489	F – 5' ACCAAGCATTTTTACCCGCA 3' R – 5' CCCAACCGACCCACCAG 3'	58°C 59°C

Fonte: da autora.

Os iniciadores KPC amplificam as seguintes subtipos enzimáticos: KPC-2, KPC-3, KPC-4, KPC-5, KPC-6, KPC-7, KPC-8, KPC-10, KPC-11, KPC-12, KPC-14, KPC-15, KPC-16, KPC-17, KPC-18, KPC-19, KPC-21, KPC-22, KPC-24, KPC-25, KPC-26, KPC-28.

Os iniciadores IMP amplificam: IMP-1, IMP-3, IMP-4, IMP-5, IMP-6, IMP-7, IMP-10, IMP-25, IMP-26, IMP-28, IMP-30, IMP-34, IMP-38, IMP-40, IMP-42, IMP-43, IMP-51, IMP-52, IMP-55, IMP-59, IMP-60, IMP-61, IMP-63.

Os iniciadores VIM amplificam: VIM-1, VIM-2, VIM-3, VIM-4, VIM-5, VIM-6, VIM-8, VIM-9, VIM-10, VIM-11, VIM-12, VIM-14, VIM-15, VIM-16, VIM-17, VIM-18, VIM-19, VIM-20, VIM-23, VIM-24, VIM-25, VIM-26, VIM-27, VIM-28, VIM-29, VIM-30, VIM-31, VIM-32, VIM-33, VIM-34, VIM-35, VIM-36, VIM-37, VIM-38, VIM-39, VIM-40, VIM-41, VIM-42, VIM-43, VIM-44, VIM-45, VIM-46, VIM-49, VIM-50, VIM-51.

Os iniciadores NDM amplificam: NDM-1, NDM-2, NDM-3, NDM-4, NDM-5, NDM-6, NDM-7, NDM-8, NDM-9, NDM-10, NDM-11, NDM-12, NDM-13, NDM-14, NDM-15, NDM-16.

Os iniciadores OXA-48-like amplificam: OXA-54, OXA-162, OXA-163, OXA-199, OXA-204, OXA- 244, OXA-245, OXA-247, OXA-252, OXA-370, OXA-405, OXA-416, OXA-438, OXA-439, OXA-505, OXA-514, OXA-515, OXA-538.

Por fim, os iniciadores SPM amplificam somente o subtipo SPM-1.

4.6.3 REAÇÕES DE PCR (*POLYMERASE CHAIN REACTION*)

A pesquisa dos seis genes de resistência foi realizada por meio da técnica de multiplex-PCR, que permite a pesquisa de mais de um gene de resistência em cada reação. Duas multiplex-PCRs foram realizadas no total, cada uma delas padronizada com três iniciadores. Na primeira multiplex-PCR (Multiplex 1), foram testados os iniciadores para *blaKPC*, *blaSPM* e *blaVIM*. Já na segunda multiplex-PCR (Multiplex 2), os iniciadores para *blaNDM*, *blaIMP* e *blaOXA-48-like* foram pesquisados.

As reações de amplificação foram padronizadas pela variação das concentrações dos reagentes e das temperaturas de ciclagem. Foi realizado um gradiente das temperaturas de hibridação entre 50°C e 64°C, com intervalos de 2°C entre cada teste. Além disso, as concentrações de MgCl₂ (0,5 mM, 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM, 3,0mM) e de iniciadores (0,25 µM, 0,5 µM, 1,0 µM) também foram avaliadas.

Ao término da padronização, a reação Multiplex 1 foi realizada em um volume final de 10 µl, contendo água ultrapura (4,8 µL), tampão de enzima Taq Buffer 10x (com (NH₄)₂SO₄) (1 µL), 1,5 mM de MgCl₂ (0,6 µL), 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (1,0 µL), 0,25 mM de cada um dos iniciadores (senso e antissenso) (0,25 µL), 0,5U de DNA polimerase (ThermoFisher®) (0,1 µL) e 50ng de DNA (1 µL).

As condições de amplificação se deram com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 62°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Já para a reação Multiplex 2, também realizada em um volume final de 10 µl, foi utilizado água ultrapura (0,2 µL), tampão de enzima Taq Buffer 10x (com (NH₄)₂SO₄) (1 µL), 1,5 mM de MgCl₂ (0,6 µL), 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (1,0 µL), 1,0 mM de cada um dos iniciadores (senso e antissenso) (1,0 µL), 1U de DNA polimerase (ThermoFisher®) (0,2 µL) e 50ng de DNA (1 µL).

As condições de amplificação se deram com uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 58°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.

Foram utilizadas cepas-controle positivas para cada gene (Quadro 2) e controles negativos para cada reação.

Quadro 2. Cepas controle para amplificação de genes de resistência

Gene de resistência	Espécie	Origem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UFSC – SC
NDM	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alerta – UNIFESP/SP
VIM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hospital das Clínicas/SP
SPM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alerta – UNIFESP/SP
OXA-48-like	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Alerta – UNIFESP/SP
IMP	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Alerta – UNIFESP/SP

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA), corados pelo brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografados usando transiluminador. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o 100 bp ladder (Ludwig Biotec).

4.6.4 REP-PCR

A clonalidade dos isolados foi avaliada por meio da técnica de Rep-PCR modificada de Versalovic et al, 1991 e Otman et al, 2007. O ensaio da técnica foi realizado com os iniciadores Rep1R-I (5'-III ICG ICA TCI GGC-3') e Rep2-I (5'-ICG ICT TAT CIG GCC TAC-3') (MOHAPATRA et al., 2007; VERSALOVIC et al., 1991). A reação foi feita em um volume final de 10 µL contendo Buffer Green GoTaq 1x, MgCl₂ 25mM (3mM), dNTPs (0,2 mM), iniciadores (2 µM), Taq DNA polimerase GoTaq Hot Start (Promega®) (1 U) e DNA (50 ng/µL). A ciclagem de amplificação foi realizada sob as seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 7 minutos, 30 ciclos de 90°C por 30 segundos, 45°C por 1 minuto e 65°C por 8 minutos, e um alongamento final a 65°C por 16 minutos. Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,5%), com corrida de 3 horas e 40 min a 80V em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA), sendo posteriormente corados com brometo de etídio (1 µg/mL), visualizados em transiluminador e fotografados. O padrão de tamanho molecular utilizado foi o 100 bp ladder (Ludwig Biotec®).

Os perfis eletroforéticos gerados, após análise visual, foram convertidos em uma matriz binária aonde 0 (zero) e 1 (um) representam, respectivamente, a ausência e a presença de banda. Por meio de análise computacional do perfil binário gerado, uma matriz de distância foi

criada através do programa DendroUPGMA, sendo os percentuais de similaridade atribuídos pelo Coeficiente de Dice. Posteriormente, os dendrogramas foram construídos com o software MEGA 6.0 a partir da matriz que foi gerada, utilizando o modelo matemático UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*).

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram organizados em um banco de dados em planilha Excel® e posteriormente exportados para análise estatística no software MedCalc 14.8.1®. Para a análise descritiva dos dados, foram estimadas as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas. Para a comparação de variáveis categóricas, o teste estatístico Qui-quadrado foi realizado. Os testes foram realizados em um nível de significância estatística de 5%, com intervalo de confiança de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ASPECTOS CLÍNICOS

5.1.1 AMOSTRAS – CARACTERÍSTICAS GERAIS

A seguir serão apresentados e discutidos os resultados obtidos das análises realizadas com enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de Blumenau/SC entre outubro de 2015 e setembro de 2016.

Ao término da coleta, respeitando-se os critérios de inclusão e exclusão, foram obtidas 152 amostras bacterianas isoladas de 147 pacientes. A tabela 2 mostra a distribuição dos isolados bacterianos por amostra biológica.

Tabela 2. Quantidade de isolados bacterianos separados por espécie e por amostra biológica

Espécie Amostra	<i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	<i>S.</i> <i>marcescens</i>	<i>E.</i> <i>cloacae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E.</i> <i>aerogenes</i>	Total (%)
Swab anal	70	8	3	2	-	83 (54,6%)
Urina	26	3	-	-	-	29 (19%)
Aspirado traqueal	18	1	1	-	1	21 (13,8%)
Sangue	9	3	1	-	-	13 (8,6%)
Outros	5	-	-	-	-	5 (3,3%)
Não descrito	-	-	1	-	-	1 (0,7%)
Total (%)	128 (84,2%)	15 (9,9%)	6 (3,9%)	2 (1,3%)	1 (0,7%)	152

Fonte: da autora

Ao todo, somente cinco espécies bacterianas foram identificadas. *K. pneumoniae* foi a espécie mais encontrada, representando 84,2% (n = 128) do total de isolados obtidos. A segunda espécie mais prevalente foi *Serratia marcescens*, encontrada em 9,9% (n = 15) dos isolados. Isolados de *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* também foram identificados, embora numa proporção menor, representando 3,9% (n = 6), 1,3% (n = 2) e 0,7% (n = 1) do total de amostras, respectivamente.

Os isolados foram obtidos de diversos sítios biológicos: swab anal (n = 83), urina (n = 29), aspirado traqueal (n = 21), sangue (n = 13) e outros sítios em menor proporção, incluindo segmento de tendão (n = 2), secreção de fístula (n = 1) e secreção abdominal (n = 2). Um isolado de *E. cloacae* não foi reportado pelo sistema hospitalar, não podendo ser classificado quanto ao sítio biológico em que foi encontrado.

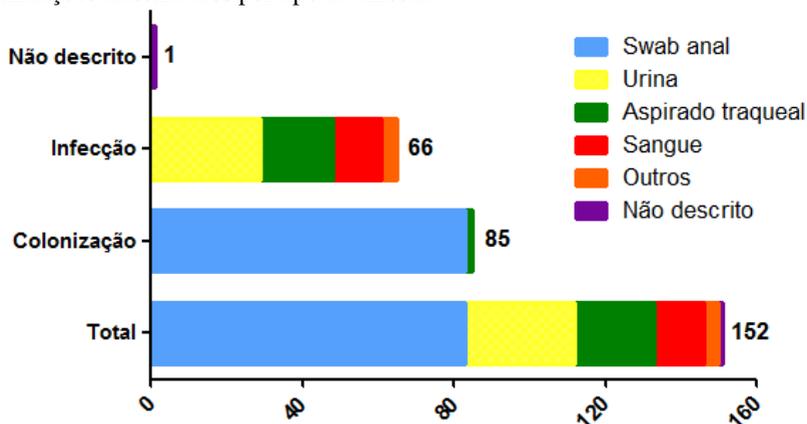
Curiosamente, em quatro pacientes mais de um gênero bacteriano foi isolado. Em um desses pacientes foi verificada a presença de *K. pneumoniae* e *S. marcescens* isoladas em amostras de sangue. Em outro, verificou-se a presença dessas mesmas espécies, porém isoladas em uma amostra de urina. Em outro paciente, isolados em *swab* anal de vigilância, foi verificada a presença de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Por fim, no quarto paciente, três espécies bacterianas, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *E. cloacae*, foram isoladas, respectivamente, em amostras de *swab* anal, sangue e em um sítio não descrito.

De forma geral, apesar da espécie *K. pneumoniae* ser a principal espécie bacteriana envolvida em infecções nosocomiais e de apresentar elevados índices de resistência aos carbapenêmicos, outras espécies da família Enterobacteriaceae, incluindo *S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. coli* e *E. aerogenes* são também descritas como agentes envolvidos em infecções em ambientes hospitalares (TZOUVELEKIS et al, 2012). Inclusive, a descrição de resistência em carbapenêmicos na espécie *S. marcescens* constitui uma importante fonte de preocupação em razão dessa espécie ser intrinsecamente resistente à polimixina, uma das únicas opções terapêuticas remanescentes para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos (SAMONIS et al, 2014; SILVA et al, 2015). No presente trabalho, os isolados de *S. marcescens* foram encontrados principalmente em amostras provenientes de *swabs* anais (8/15; 53,3%), colonizando o paciente. Os demais isolados foram encontrados em amostras de urina, sangue e aspirado traqueal. Em relação aos seis isolados de *E. cloacae*, três foram encontrados em amostras de *swab* anal (50%) e as demais em amostras de aspirado traqueal, sangue e em outro sítio biológico não descrito. Os dois isolados de *E. coli* foram isolados em amostras de *swab* anal e o único isolado de *E. aerogenes* foi isolado em uma amostra de aspirado traqueal (Tabela 2).

Ainda em relação aos isolados, conforme visualizado na Figura 4, 55,9% (n = 85) do total de amostras obtidas foram caracterizadas como colonizações bacterianas, constituindo a presença da bactéria no microbioma humano sem causar sinais e sintomas de infecção ativa. Dessas, 83 foram provenientes de amostras de *swab* anal de vigilância e 2 de aspirado traqueal. As demais 66 amostras (43,4%), distribuídas entre amostras de urina, sangue, aspirado traqueal e outros sítios biológicos, caracterizaram isolados envolvidos em processos infecciosos. Como explicado anteriormente, um isolado de *E. cloacae*

(0,7%), em função de não ter sido descrito pelo sistema hospitalar, não pôde ser classificado quanto à natureza de sua presença.

Figura 4. Número total dos isolados bacterianos obtidos de colonizações ou infecções classificados por tipo de amostra



Fonte: da autora

A colonização bacteriana baseia-se na presença comensal de microrganismo no hospedeiro e se dá, na maioria das vezes, no trato gastrointestinal do paciente, embora outros sítios biológicos possam também ser colonizados, incluindo a pele, o trato respiratório e o trato urinário (AKOVA et al, 2012).

Entretanto, dependendo de fatores relacionados à saúde do hospedeiro, incluindo, por exemplo, seu *status* imunológico, a presença de comorbidades e o desequilíbrio de sua biota normal, decorrente da utilização prévia de antimicrobianos, as bactérias que antes atuavam como comensais podem eventualmente se espalhar pelo organismo, alcançando inclusive sítios estéreis, como o sangue e a urina, e levar ao aparecimento de um processo infeccioso. Por essa razão, a colonização por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), bem como a presença de outros fatores, como a utilização de antimicrobianos, sobretudo de amplo-espectro, constitui um dos principais fatores que predis põem o desenvolvimento de infecções causadas por estes microrganismos. Apesar dos dados serem escassos, estima-se que 10% a 30% dos pacientes previamente colonizados por ERC desenvolvam algum tipo de infecção causada por esses agentes. (CHABAH et al,

2016; GASINK et al, 2009; CALFEE et al, 2008; BORER et al, 2009; TZOUVELEKIS et al, 2012; CDC, 2009)

Em estudo realizado por Peirano e colaboradores, em 2014, verifica-se que as infecções do trato urinário (ITU) constituem o tipo mais comum de infecção causada por ERC, geralmente afetando pacientes não hospitalizados e com um quadro geral estável (PEIRANO et al, 2014). Além das ITUs, os sítios de infecção mais relatados constituem o sistema respiratório e as infecções de corrente sanguínea associadas a cateteres intravenosos, sendo as infecções no trato respiratório geralmente relatadas em pacientes críticos, estando sobretudo relacionadas ao uso de ventilação mecânica (PARDO et al, 2014).

Estas informações condizem com a realidade do estudo realizado, uma vez que as ITUs constituíram o principal sítio de infecção relatado (n = 29), sendo que 48% das infecções relatadas nesse sítio foram externas à instituição analisada. Além disso, conforme mostrado na Figura 4, seguindo as amostras urinárias, as amostras de aspirado traqueal e sangue foram as mais relatadas.

5.1.2 TERAPIA ANTIMICROBIANA

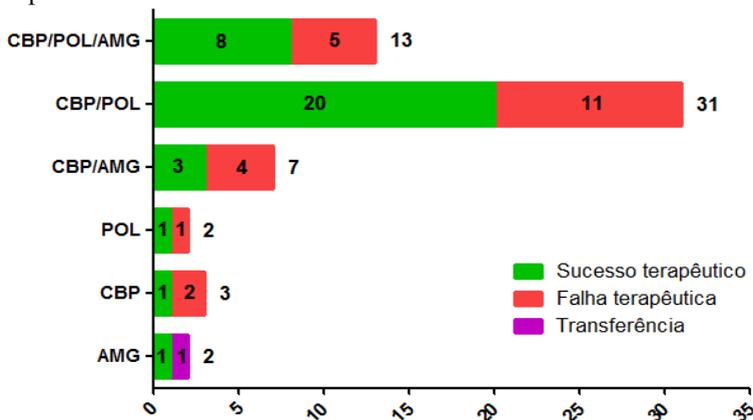
Entre os 66 isolados identificados como agentes causadores de infecção ativa, 51 (77,3%) foram tratados com a associação de pelo menos dois antimicrobianos, 7 (10,6%) foram tratados por meio de monoterapia e 8 (12,1%) não foram tratados na instituição hospitalar por irem a óbito logo após a liberação do diagnóstico laboratorial (7/8) ou receber tratamento no modelo *home-care* (1/8).

A monoterapia foi realizada com aminoglicosídeos (n = 2), carbapenêmicos (n = 3) ou polimixina B (n = 2) (Figura 5). Relatam-se casos de sucesso terapêutico com a utilização individual de carbapenêmicos quando a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para este antimicrobiano é consideravelmente baixa (o que não foi determinado pelo hospital) e quando o foco da infecção está bem controlado (TZOUVELEKIS et al, 2012). O mesmo se aplica à administração da polimixina e dos aminoglicosídeos em monoterapia (DOI et al, 2015). O uso de aminoglicosídeos em monoterapia pode ser considerado no tratamento de infecções não complicadas, incluindo infecções do trato urinário (VIDAL et al, 2007). Entretanto, de maneira geral, por favorecer o rápido desenvolvimento de resistência e a alta taxa de mortalidade verificada, a administração de esquemas monoterápicos

é geralmente desencorajada (PETROSILLO et al, 2014; RODRIGUEZ-BAÑO et al, 2014).

Já em relação à terapia associada, três tipos de esquemas foram administrados: carbapenêmico/aminoglicosídeo (n = 7), carbapenêmico/polimixina B (n = 31) e carbapenêmico/aminoglicosídeo/polimixina B (n = 13) (Figura 5).

Figura 5. Quantidade de pacientes em processo de infecção classificados quanto à terapia antimicrobiana utilizada



CBP – carbapenêmicos; POL – polimixina; AMG – aminoglicosídeos.

Fonte: da autora.

Estudos demonstram a superioridade da terapia combinada (dois ou mais agentes antimicrobianos ativos *in vitro*) em relação à monoterapia (um agente ativo *in vitro*). Em estudo publicado por Zarkotou, em 2011, a taxa de mortalidade foi de 0% e 46,7% para pacientes que receberam, respectivamente, terapia antimicrobiana combinada e monoterapia. Qureshi, em 2012, publicou taxas de 13,3% e 57,8%, respectivamente, para os mesmos esquemas terapêuticos.

De maneira geral, recomenda-se a associação de dois ou mais antimicrobianos na tentativa da ocorrência de sinergismo entre os fármacos, elevando a eficácia terapêutica do tratamento. Além disso, com o esquema terapêutico combinado, minimiza-se a chance de pressão seletiva sobre os isolados, evitando o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos utilizados (LIVERMORE et al, 2011).

Neste estudo, conforme visualizado na figura 5, nos esquemas terapêuticos nos quais os antimicrobianos foram utilizados em associação (n = 51), os índices de sucesso terapêutico foram mais

prevalentes, representando 60,7% (n = 31); os demais pacientes foram a óbito. Em esquemas monoterápicos (n = 7), o índice de sucesso terapêutico foi de 42,8% (n = 3). Entretanto, a discrepância no n verificado para os esquemas combinados versus esquemas monoterápicos não permite a elucidação de comparações estatísticas fidedignas entre os esquemas terapêuticos administrados. Além disso, é interessante destacar que além da terapia antimicrobiana administrada, a causa dos óbitos, representada pela falha terapêutica descrita na Figura 5, pode estar relacionada a múltiplos outros fatores, incluindo, por exemplo, o tipo e a severidade da infecção, a presença de comorbidades, o *status* imunológico e a idade avançada do paciente, o prolongado tempo de internação em unidades hospitalares e a admissão na ala de terapia intensiva (UTI), bem como a realização de procedimentos invasivos de risco, incluindo, como exemplo, o transplante de órgãos sólidos (PARDO et al, 2014; PATEL et al, 2008; AKOVA et al, 2012; TZOUVELEKIS et al, 2012; LEE et al, 2012).

Geralmente, os índices mais baixos de mortalidade são relatados com a utilização de três agentes antimicrobianos (TUMBARELLO et al, 2012). Em estudo divulgado por Tzouveleki e colaboradores, em 2012, a terapia combinada que utilizou carbapenêmicos apresentou uma taxa de mortalidade menor do que a terapia combinada que não os utilizou (18,8% versus 30,7%). Além disso, a associação de carbapenêmicos a outros antimicrobianos, incluindo a polimixina e/ou a tigeciclina, mostra-se eficaz inclusive no tratamento de infecções por enterobactérias resistentes à polimixina (LEE et al, 2016). Dessa maneira, recomenda-se a utilização de pelo menos um carbapenêmico nos esquemas de terapia antimicrobiana combinada (PARDO et al, 2014). Na instituição analisada, a presença de um carbapenêmico (meropenem ou imipenem) foi verificada em todos os esquemas terapêuticos combinados administrados.

Em nota técnica proposta pela ANVISA, em 2013, recomenda-se a associação de dois ou três antimicrobianos, sendo um deles a polimixina B ou a polimixina E (colistina). Recomenda-se manter o uso de no mínimo dois antimicrobianos com sensibilidade comprovada *in vitro*. No caso de um segundo fármaco não mostrar perfil de sensibilidade, recomenda-se manter a terapia combinada de polimixina (B ou E) com um carbapenêmico ou tigeciclina. Dependendo do perfil de sensibilidade, um aminoglicosídeo também poderá ser utilizado (ANVISA, 2013). Infelizmente, conforme mostrado na sessão 5.2.1, o teste de sensibilidade aos antimicrobianos polimixina B e tigeciclina,

que deve ser realizado por técnicas que definam sua Concentração Inibitória Mínima (CIM), não é realizado pelo laboratório de microbiologia clínica do hospital, sendo sua utilização guiada exclusivamente por critérios empíricos. De qualquer forma, de todos os esquemas antimicrobianos em associação administrados (n = 51), a polimixina B foi utilizada em 86,2% (n = 44).

É interessante destacar que a polimixina não deve ser administrada no tratamento de infecções causadas por enterobactérias dos gêneros *Proteus spp.*, *Morganella spp.* e *Serratia spp.*, em função desses gêneros apresentarem resistência intrínseca a esse antimicrobiano.

5.1.3 ORIGEM DA COLONIZAÇÃO/INFECÇÃO

Dos 147 pacientes totais analisados, 87 (60%) deles apresentaram processos de colonização/infecção com origem na instituição hospitalar analisada. Os demais 60 pacientes (40%) já chegaram na instituição previamente colonizados ou com um processo infeccioso ativo consequente da presença de uma enterobactéria resistente à carbapenêmicos. Dentre esses, 41 (68%) haviam sido internados pelo menos uma vez em um período de até seis meses anteriores à internação na instituição estudada, levantando a hipótese de contaminação prévia em outras instituições de saúde.

Apesar de enterobactérias serem frequentemente encontradas em ambiente hospitalar e usualmente serem detectadas em equipamentos utilizados pelos profissionais da saúde, incluindo luvas e vestimentas, a distribuição de ERC apresenta-se de forma muito mais ampla, sendo encontradas também na comunidade, em ambientes abertos, como a água, o solo e o esgoto, além de conseguirem sobreviver em ambientes hostis por longos períodos de tempo (ROCK et al, 2014; PITOUT et al, 2015, GALLER et al, 2014). Além disso, a presença desses microrganismos colonizando pacientes institucionalizados pode persistir por longos períodos (> 3 anos), dependendo de fatores que contribuam para a manutenção de sua presença (LUBBERT et al, 2014), constituindo um importante foco de transmissão e disseminação para si próprio e para os demais pacientes e profissionais (CARLET, 2012; TOFTELAND et al, 2013). Da mesma maneira, quando não mais se encontram aos cuidados hospitalares, constituem importante foco de disseminação em ambientes comunitários e, pelo lado inverso, quando o paciente torna-se novamente hospitalizado, verifica-se novamente a

introdução de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar (ARPIN et al, 2003). Por essas razões, pela elevada disseminação desses microrganismos em ambientes variados, hospitalares ou não, incluindo a criação de animais, é possível supor a razão da alta prevalência de pacientes que deram entrada na instituição hospitalar já previamente colonizados (LEE et al, 2016; PARDO et al, 2014).

Nesse sentido, o rastreamento de pacientes colonizados por meio do cultivo de amostras abotidas por *swabs* anais de vigilância e a identificação bacteriana se faz necessária, uma vez que o isolamento do paciente colonizado é essencial para evitar a disseminação desses microrganismos. A redução da prescrição antimicrobiana também é peça fundamental no controle desses microrganismos, uma vez que a pressão seletiva decorrente de sua utilização favorece a seleção e multiplicação de isolados resistentes (CHABAH et al, 2016).

Na instituição estudada, a cultura de *swabs* anais de vigilância a fim de verificar a colonização do paciente só é realizada quando o paciente estava previamente internado em outra unidade hospitalar, quando dá entrada na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e, posteriormente, antes de sair da UTI, sendo transferido para outra ala de internação ou recebendo alta e, eventualmente, quando há a suspeita de colonização e/ou a pedido do clínico responsável. Caso o paciente admitido na instituição não tenha sido transferido de outra instituição hospitalar, por questões econômicas, a cultura de vigilância não é realizada. A realização de culturas semanais de vigilância dos pacientes internados também não é financeiramente viável para a instituição, embora existam planos para a implementação da coleta semanal na UTI. Para o presente trabalho, a colonização dos pacientes foi considerada proveniente da atual internação quando a segunda amostra da cultura de vigilância foi positiva, sendo a primeira cultura negativa para a presença de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos.

Caso o paciente apresente manifestações clínicas de infecção a partir de 72h após a admissão no hospital, constitui-se o processo de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS), quando a infecção do paciente em questão é advinda de uma contaminação sucedida na atual internação. São também consideradas infecções hospitalares as manifestadas antes de 72 horas de internação quando associadas a processos diagnósticos e/ou terapêuticos realizados durante este período. Em caso negativo, a infecção é considerada comunitária (ANVISA, 1998).

Das colonizações e infecções (IRAS) registradas e provenientes da internação do paciente na instituição analisada, 68 (78,2%) ocorreram quando o paciente se encontrava internado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Entre as demais, uma ocorreu no serviço de Emergência, uma no Centro Cirúrgico e as restantes em alas de internação diversas. A admissão do paciente na Unidade de Terapia Intensiva é um fator de risco relacionado à colonização/infecção por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos ressaltado em múltiplos trabalhos (PARDO et al, 2014; CORREA et al, 2013; SCHWABER et al, 2008; BORER et al, 2009, HUSSEIN et al, 2009).

Em média, os pacientes permaneceram internados 17 dias antes da obtenção de uma cultura positiva para ERC (mediana: 15 dias). De acordo com alguns estudos, o tempo médio entre a admissão do paciente no hospital e a obtenção de uma cultura positiva é de aproximadamente 2 a 4 semanas, dados concordantes com nosso estudo. Dessa forma, conclui-se que a infecção/colonização por uma ERC constitui uma complicação consequente de um período de internação prolongado (MOULOUDI et al, 2010; PARDO et al, 2013; CORREA et al, 2013; SWAMINATHAN et al, 2013; SCHWABER et al, 2008).

A tomada de medidas que promovam o controle das infecções/colonizações causadas por enterobactérias produtoras de carbapenemases podem ser melhor guiadas quando se conhecem os fatores de risco relacionados à contaminação por estes microrganismos (PARDO et al, 2014). Os fatores de risco relacionados à aquisição de uma ERC são comuns a uma gama de bactérias resistentes, incluindo *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), *Enterococcus* resistente à Vancomicina (VRE), bacilos Gram-negativos produtores de ESBL, *Clostridium difficile* e *Candida* (SADFAR et al, 2002; PARDO et al, 2014). Logo, o conhecimento acerca dos fatores de risco implicados em muito contribuiria para a contenção da contaminação por múltiplos patógenos multirresistentes.

No trabalho realizado, no que se refere aos fatores de risco implicados na ocorrência das colonizações e infecções por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, foram pesquisadas a utilização de instrumentos invasivos e a realização de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou não) anterior à obtenção de uma cultura positiva e a utilização prévia de antimicrobianos em um período de até seis meses. São apresentados na tabela 3 os fatores significativamente relevantes ($p < 0,05$) para a colonização/infecção dos pacientes analisados. Os fatores não significativamente relevantes, incluindo a

exposição prévia a antimicrobianos de diferentes grupos (cefalosporinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos, cotrimoxazol, fluoroquinolonas, glicopeptídeos, lincosamidas, macrolídeos, oxazolidinonas e polimixinas), não foram apresentados.

Tabela 3. Fatores de risco significativamente relevantes para a colonização/infecção por ERC

Fator de risco	Sim		Não		P
	n	%	n	%	
Uso de CVC ^a	69	79,3%	18	20,7%	<0,001
Uso de SVD ^b	72	82,8%	15	17,2%	<0,001
Uso de VM ^c	66	75,9%	21	24,1%	<0,001
Realização de procedimentos invasivos	71	81,6%	16	18,4%	<0,001
Utilização de penicilinas + inibidores de betalactamases	56	64%	31	36%	0,007

^aCVC, Cateter Venoso Central; ^bSVD, Sonda Vesical de Demora; ^cVM, Ventilação Mecânica

Fonte: da autora.

Entre todos os antimicrobianos pesquisados, somente a exposição prévia aos antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, mais especificamente as penicilinas/inibidores de betalactamases, foi apresentada como um fator de risco significativo para a infecção/colonização dos pacientes analisados.

De maneira geral, a utilização de antimicrobianos de amplo espectro tem sido descrita como um dos principais fatores de risco envolvidos na colonização por ERC. A pressão seletiva decorrente do uso de antimicrobianos, mesmo durante curtos períodos de tempo, leva a alterações na biota intestinal, incluindo a redução da diversidade microbiana e ao predomínio de bactérias resistentes aos antimicrobianos utilizados (SCHJORRING et al, 2011, JERNBERG et al, 2010). Entre eles, destacam-se a classe dos betalactâmicos (GASINK et al, 2009; KRITSOTAKIS et al, 2011; BEN-DAVID et al, 2011; KWAK et al, 2005; PATEL et al, 2008), incluindo o grupo das penicilinas/inibidores de betalactamases (BEN-DAVID et al, 2011; KRITSOTAKIS et al, 2011), quinolonas (GASINK et al, 2009; SCHECHNER et al, 2011), aminoglicosídeos (DEBBY et al, 2012; LEAVITT et al, 2007) e glicopeptídeos (SWAMINATHAN et al, 2013). Além disso, o espectro de ação do antimicrobiano, a dosagem e a duração do tratamento contribuem para a persistência da colonização por esses

microrganismos, representando um maior risco para o desenvolvimento de infecções causadas por esses agentes, sobretudo em pacientes vulneráveis (LADIRAT et al, 2013; GASINK et al, 2009; ; KRITSOTAKIS et al, 2011; BEN-DAVID et al, 2011; KWAK et al, 2005; PATEL et al, 2008). A exposição prévia a carbapenêmicos é importante, embora não essencial para a colonização por ERC. Em dois estudos, a taxa de utilização de carbapenêmicos anterior à aquisição de uma ERC variou de 15 e 75% (LEAVITT et al, 2007; WEI et al, 2007). Outro estudo indica a prévia exposição a carbapenêmicos como um fator de risco não significativo (CORREA et al, 2013). Em nosso estudo, a exposição prévia a carbapenêmicos não foi um fator de risco significativamente relevante ($p = 0,59$).

A utilização de instrumentos invasivos, incluindo a ventilação mecânica e o uso de cateteres vesicais e, majoritariamente, cateteres venosos de acesso central, também tem sido amplamente relacionada com o aumento das taxas de colonização/infecção verificadas (BORER et al, 2009; PATEL et al, 2008; CORREA et al, 2013; SWAMINATHAN et al, 2013; FELDMAN et al, 2013), influenciando também no tipo de infecção que pode ocorrer (HERRA et al, 2002). A ocorrência de infecções no trato urinário (ITU) relaciona-se diretamente com a utilização de sondas vesicais de demora, por exemplo. No nosso estudo, entre as amostras de aspirado traqueal, 90,5% foram associadas à utilização anterior de ventilação mecânica ($p = 0,0002$), constituindo as Pneumonias Associadas à Ventilação Mecânica (PAV). Em relação às ITU, em 80% dos casos notou-se a utilização prévia de Sondas Vesicais de Demora (SVD) ($p = 0,02$). A utilização de Cateter Venoso Central (CVC) normalmente associa-se à ocorrência de Infecções Primárias de Corrente Sanguínea (IPCS). Em nosso estudo, a associação entre uso de CVC e IPCS não foi significativa ($p = 0,24$).

Além de seu uso propriamente dito, o tempo de uso dos cateteres também pode ser considerado um fator de risco para a colonização/infecção por enterobactérias resistentes à carbapenêmicos (CORREA et al, 2013).

A admissão em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI), transferência entre unidades hospitalares, prolongado tempo de internação, compartilhamento do quarto com paciente colonizado e realização de procedimentos cirúrgicos são também descritos em outros estudos como significativos fatores de risco implicados na colonização/infecção por enterobactérias resistentes a carbapenêmicos

(GREGORY et al, 2010; PARDO et al, 2014; BEM-DAVID et al, 2011; DEBBY et al, 2012).

5.1.4 DESFECHO CLÍNICO

Em relação ao desfecho clínico dos 147 pacientes analisados, 99 (67,3%) receberam alta, 46 (31,3%) vieram a óbito e 2 (1,4%) foram transferidos para outra instituição hospitalar. Dentre os pacientes que vieram a óbito, 34 (74%) tiveram a causa do óbito relacionada à infecção existente, 7 (16%) vieram a óbito por causas não relacionadas à infecção e 5 (10%) não apresentaram informações referentes à causa do óbito. A ocorrência de choque séptico foi relatada em 20 (58,8%) dos 34 pacientes cujo óbito foi relacionado diretamente à infecção estabelecida.

De maneira geral, as taxas de mortalidade relatadas pela presença de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos apresentam uma ampla taxa de variação (10% a 72%) (PARDO et al, 2014). As altas taxas de mortalidade relatadas geralmente são consequentes das poucas opções terapêuticas restantes, geralmente restritas ao uso de antimicrobianos como a tigeciclina, polimixina e aminoglicosídeos (MUÑOZ-PRICE et al, 2013).

Entretanto, as variantes taxas de mortalidade relacionadas à presença de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos também estão ligadas a uma série de fatores que interlaçam o estado geral do hospedeiro, as características da infecção e as características relacionadas à internação hospitalar (PARDO et al, 2014). Sobre os fatores relacionados ao hospedeiro, a idade avançada, a severidade das comorbidades presentes e o baixo *status* imunológico representam significativos fatores de risco para a mortalidade do paciente (SCHWABER et al, 2008; AKOVA et al, 2012; TZOUVELEKIS et al, 2012). Além disso, a realização de transplantes de órgãos sólidos e a presença de neoplasias também são reportados como fatores de risco significativos em pacientes internados (SCHWABER et al, 2008; PATEL et al, 2008).

O tipo e a severidade da infecção existente também implicam nas taxas de mortalidade apresentadas. Infecções de corrente sanguínea ou pneumonia, por exemplo, estão associadas a maiores índices de falha terapêutica, ao passo em que infecções do trato urinário apresentam maiores índices de cura (LEE et al, 2012). A presença de bacteremia e a ocorrência de choque séptico também são considerados fatores significativos para a mortalidade dos pacientes (AKOVA et al, 2012;

CAPONE et al, 2013). Já no que se refere à terapia antimicrobiana empregada, índices maiores de mortalidade são verificados com o emprego de monoterapia, ao passo em que a terapia antimicrobiana combinada apresenta melhores taxas de sucesso terapêutico (ZARKOTOU et al, 2011).

Em nosso trabalho, entre os fatores de risco analisados, a admissão na Unidade de Terapia Intensiva, o uso de instrumentos invasivos, incluindo cateteres venosos de acesso central, sondas vesicais de demora e ventilação mecânica, a realização de procedimentos invasivos (cirúrgicos ou não) e a internação anterior em um período de até seis meses anterior a internação atual apresentam-se como fatores de risco estatisticamente significativos ($p < 0,05$) relacionados ao óbito dos pacientes (Tabela 4). Os demais fatores que não apresentaram relevância estatística (exposição prévia aos antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, polimixinas, fluoroquinolonas, oxazolidinonas, lincosamidas, cotrimoxazol e glicopeptídeos) não foram apresentados.

Tabela 4. Fatores de risco significativamente relacionados à mortalidade dos pacientes

Fator de risco	Sim		Não		P
	n	%	n	%	
Internação na UTI	37	(80,4%)	9	(19,6%)	<0,0001
Uso de CVC ^a	38	(82,6%)	8	(17,4%)	<0,0001
Uso de SVD ^b	38	(82,6%)	8	(17,4%)	<0,0001
Uso de VM ^c	36	(78,3%)	10	(21,7%)	<0,0001
Realização de procedimentos invasivos	38	(82,6%)	8	(17,4%)	<0,0001
Internações anteriores	30	(65,2%)	16	(34,8%)	0,03

^aCVC, Cateter Venoso Central; ^bSVD, Sonda Vesical de Demora; ^cVM, Ventilação Mecânica

Fonte: da autora.

Em estudos previamente realizados, os fatores apresentados na tabela 4 também foram considerados importantes fatores de risco relacionados à mortalidade de pacientes (PARDO et al, 2014; SCHWABER et al, 2008). Inclusive, a retirada de cateteres venosos e urinários, quando estes constituem a fonte da infecção, em muito contribuem para uma resposta clínica favorável, reduzindo as taxas de mortalidade (PATEL et al, 2008; NGUYEN et al, 2010).

Quando avaliados em comparação aos pacientes que receberam alta, nenhum fator de risco descrito foi significativo (Tabela 5).

Tabela 5. Fatores de risco analisados em pacientes que receberam alta e pacientes que vieram a óbito

Fatores de risco	Total (n = 147)	Altas (n = 99)	Óbitos (n = 46)	P (altas x óbitos)
Realização de procedimentos invasivos	118 (80,3%)	78 (78,7%)	38 (82,6%)	0,67
Instrumentos invasivos				
CVC ^a	113 (76,9%)	73 (73,7%)	38 (82,6%)	0,36
SVD ^b	112 (76,2%)	73 (73,7%)	38 (82,6%)	0,34
VM ^c	106 (72,1%)	68 (68,6%)	36 (78,2%)	0,33
Admissão na UTI	112 (76,2%)	73 (73,7%)	37 (80,4%)	0,49
Internações anteriores	76 (51,7%)	45 (45,4%)	30 (65,2%)	0,08
Exposição a antimicrobianos				
<i>Penicilina/inibidor de betalactamase</i>	102 (69,4%)	64 (64,6%)	36 (78,2%)	0,16
<i>Cefalosporina</i>	55 (37,4%)	37 (37,3%)	17 (36,9%)	0,93
<i>Carbapenêmico</i>	106 (72,1%)	70 (70,7%)	35 (76%)	0,62
<i>Aminoglicosídeos</i>	31 (21,1%)	19 (19,1%)	11 (23,9%)	0,48
<i>Fluoroquinolonas</i>	31 (21,1%)	18 (18,1%)	12 (26%)	0,33
<i>Glicopeptídeos</i>	29 (19,7%)	21 (21,2%)	8 (17,3%)	0,67
<i>Cotrimoxazol</i>	21 (14,3%)	16 (16,1%)	5 (10,8%)	0,58
<i>Lincosamida</i>	10 (6,8%)	7 (7%)	3 (6,5%)	0,92
<i>Macrolídeos</i>	26 (17,7%)	17 (17,1%)	9 (19,5%)	0,75
<i>Oxazolidinonas</i>	2 (1,4%)	0 (0%)	2 (4,3%)	0,10
<i>Polimixina</i>	69 (46,9%)	44 (44,4%)	24 (52,1%)	0,68
<i>Tigeciclina</i>	1 (0,7%)	1 (1%)	0 (0%)	0,78

^aCVC, Cateter Venoso Central; ^bSVD, Sonda Vesical de Demora; ^cVM, Ventilação Mecânica

Fonte: da autora

5.2 ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

5.2.1 TESTE DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

Conforme dito, 66 (43,4%) dos isolados obtidos estavam envolvidos em um processo infeccioso. Para estes, os antibiogramas foram realizados no laboratório de microbiologia clínica da instituição estudada. O antibiograma de uma amostra de *S. marcescens* isolada no trato urinário não foi realizado, sendo posteriormente feito pelo Laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA). Dessa

forma, foram realizados, ao todo, 65 antibiogramas pelo laboratório hospitalar: 56 para *K. pneumoniae*, 6 para *S. marcescens*, 2 para *E. cloacae* e um para a espécie *E. aerogenes* (Tabela 6).

Em relação às amostras que caracterizaram colonização (n = 85), com a adição da amostra de *S. marcescens* isolada em uma amostra de urina cujo antibiograma não havia sido realizado e de uma amostra de *E. cloacae* não descrito pelo sistema hospitalar e não caracterizado quanto à natureza de sua presença (infecção ou colonização), os antibiogramas foram realizados no laboratório de Microbiologia Molecular Aplicada (MIMA), totalizando ao final da contagem 87 antibiogramas realizados (Tabela 7). Por questões econômicas, somente antimicrobianos da classe dos betalactâmicos foram testados, com a adição da fosfomicina. Ao todo, 72 antibiogramas foram realizados para *K. pneumoniae*, 9 para *S. marcescens*, 4 para *E. cloacae* e 2 para *E. coli*.

Comumente a realização de antibiogramas para amostras que caracterizam colonizações não é realizada pelos laboratórios clínicos de microbiologia com o objetivo de não incentivar o seu tratamento em razão desses microrganismos viverem como comensais no organismo do hospedeiro e de assim permanecerem, na maioria dos casos, por tempo limitado até a sua eliminação. Dessa maneira, o tratamento da colonização bacteriana por ERC, além de não ser necessário, não é recomendado (CHABAH et al, 2016).

De forma geral, os índices de sensibilidade de todos os isolados separados por espécies, tanto em processo de colonização quanto de infecção, são apresentados na Tabela 8.

Tabela 6. Fenótipos de resistência dos isolados bacterianos envolvidos em infecções

		Fenótipos																		
		<i>K. pneumoniae</i>											<i>S. marcescens</i>				<i>E. cloacae</i>		<i>E. aerogenes</i>	
Classe	Antibiótico	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	A	B	C	E	F	A	B	A
Penicilina	Ampicilina	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Sulfas	Sulfazotrim	R	-	-	-	S	-	I	-	-	-	-	S	S	S	S	R	R	-	S
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	R	-	-	-	S	-	-	-	-	I	-	S	S	R	I	R	I	R	S
Aminoglicosídeo	Gentamicina	R	S	S	-	S	-	S	S	-	S	-	S	S	S	S	S	R	-	S
Aminoglicosídeo	Amicacina	R	S	S	S	S	-	S	S	S	S	I	S	S	S	S	S	R	S	S
Cefalosporina III	Ceftriaxona	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Cefalosporina III	Cefotaxima	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Cefalosporina III	Ceftazidima	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	S	-	-	-	R	-	R
Cefalosporina IV	Cefepime	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	I
Monobactâmico	Aztreonam	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Penicilina/inibidor	Amox + clav	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Penicilina/inibidor	Amp + sulb	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Penicilina/inibidor	Pipe + tazo	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	I	-	-	-	R	-	R
Penicilina/inibidor	Ticar + clav	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Carbapenêmico	Imipenem	R	I	-	I	-	I	I	S	-	I	-	R	-	-	-	-	R	I	I
Carbapenêmico	Meropenem	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	I
Carbapenêmico	Ertapenem	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	-	-	-	-	R	-	R
Total		23	13	10	3	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1

R – resistência total; I – resistência intermediária; S – susceptível; - (hífen) - perfil de resistência igual ao fenótipo A de sua espécie.

Fonte: da autora.

Tabela 7. Fênótipos de resistência dos isolados bacterianos envolvidos em colonizações

		Fenótipos																	
		<i>K. pneumoniae</i>												<i>S. marcescens</i>	<i>E. cloacae</i>			<i>E. coli</i>	
Classe	Antibiótico	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	A	A	B	C	A	B
Penicilina	Amox/clav	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefalosporina I	Cefazolina	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefalosporina II	Cefuroxima	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefalosporina III	Ceftriaxona	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefalosporina III	Cefotaxima	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefalosporina III	Ceftazidima	R	-	-	-	I	-	-	-	S	-	-	-	R	R	-	-	R	I
Cefalosporina IV	Cefepime	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	I	-	R	R	-	-	R	-
Monobactâmico	Aztreonam	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Cefamicina	Cefoxitina	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
Carbapenêmico	Imipenem	R	-	-	I	-	S	I	S	-	I	I	S	R	R	S	-	R	-
Carbapenêmico	Meropenem	R	-	-	-	-	-	I	-	-	I	I	I	R	R	-	-	R	-
Carbapenêmico	Ertapenem	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	-	-	R	-
	Fosfomicina	R	S	I	S	I	I	I	-	-	S	S	-	S	R	S	S	R	S
Total		21	22	12	5	3	2	2	1	1	1	1	1	9	2	1	1	1	1

R – resistência total; I – resistência intermediária; S – susceptível; - (hífen) - perfil de resistência igual ao fenótipo A de sua espécie.

Fonte: da autora.

Tabela 8. Quantidade de isolados classificados como “sensíveis” (S) aos antimicrobianos testados separados por espécie e características do isolamento (colonização/infecção)

Classe	Fármaco	<i>K. pneumoniae</i>				<i>S. marcescens</i>				<i>E. cloacae</i>		<i>E. coli</i>	<i>E. aerogenes</i>
		Infecção (n = 56)		Colonização (n = 72)		Infecção (n = 6)		Colonização (n = 9)		Infecção (n = 2)	Colonização (n = 4)	Colonização (n = 2)	Infecção (n = 1)
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	n	n	n
Penicilina	Ampicilina	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	NT	NT	0
Cefalosporina I	Cefazolina	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	0	0	NT
Sulfas	Sulfazotrim	1	1,8%	NT	NT	5	83,3%	NT	NT	0	NT	NT	1
Fluoroquinolona	Ciprofloxacina	1	1,8%	NT	NT	3	50%	NT	NT	0	NT	NT	1
Aminoglicosídeo	Gentamicina	27	48,3%	NT	NT	6	100%	NT	NT	0	NT	NT	1
Aminoglicosídeo	Amicacina	31	55,3%	NT	NT	6	100%	NT	NT	1	NT	NT	1
Cefalosporina II	Cefuroxima	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	0	0	NT
Cefalosporina III	Ceftriaxona	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Cefalosporina III	Cefotaxima	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Cefalosporina III	Ceftazidima	0	0%	1	1,4%	1	16,6%	0	0%	0	0	0	0
Cefalosporina IV	Cefepime	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Monobactâmico	Aztreonam	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Cefamicina	Cefoxitina	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	0	0	NT
Penicilina/inibidor	Amox + clav	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Penicilina/inibidor	Amp + sulb	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	NT	NT	0
Penicilina/inibidor	Pipe + tazo	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	NT	NT	0
Penicilina/inibidor	Ticar + clav	0	0%	NT	NT	0	0%	NT	NT	0	NT	NT	0
Carbapenêmico	Imipenem	1	1,8%	4	5,6%	0	0%	0	0%	0	1	0	0
Carbapenêmico	Meropenem	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
Carbapenêmico	Ertapenem	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0	0	0
	Fosfomicina	NT	NT	29	40,2%	NT	NT	9	100%	NT	2	1	NT

n – total de isolados que apresentaram sensibilidade ao devido antimicrobiano; NT – antimicrobiano não testado. Fonte: da autora.

Em relação aos isolados em processo de infecção (Tabela 6), de forma geral, foram evidenciados 11 fenótipos distintos para os isolados de *K. pneumoniae*, 5 para a espécie *S. marcescens*, 2 para a espécie *E. cloacae* e, evidentemente, um para o único isolado de *E. aerogenes*. Entre os perfis fenotípicos gerados, destaca-se a considerável e ainda presente sensibilidade aos aminoglicosídeos. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, 55,3% (n = 31) mostraram-se susceptíveis à amicacina, um isolado (1,7%) apresentou resistência intermediária à amicacina e 48,3% (n = 27) dos isolados mostraram-se também susceptíveis à gentamicina. Em relação à espécie *S. marcescens*, todos os isolados mostraram-se susceptíveis à gentamicina e amicacina. Um isolado de *E. cloacae* apresentou sensibilidade à amicacina e o único isolado de *E. aerogenes* mostrou-se também susceptível à ação dos dois aminoglicosídeos.

De acordo com alguns estudos publicados, uma considerável proporção de Enterobactérias produtoras de carbapenemases permanece susceptível à ação de aminoglicosídeos, sobretudo à gentamicina (TZOUVELEKIS et al, 2012; TZOUVELEKIS et al, 2014). Em um estudo publicado em 2009, por Borer e colaboradores, 60% dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos permaneceram sensíveis à ação da gentamicina, índices semelhantes ao nosso estudo (BORER et al, 2009). No Brasil, em trabalho realizado na Universidade Federal de Santa Maria, a taxa de sensibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina foi de, respectivamente, 91,5% e 57,4% (SEIBERT et al, 2014). Em Porto Alegre, 97,5% dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC apresentaram sensibilidade à amicacina e 70% à gentamicina (ALVES et al, 2013). Em outro estudo semelhante, 100% e 62,5% dos isolados produtores de KPC apresentaram-se sensíveis à amicacina e gentamicina, respectivamente (SOARES, 2012). Inclusive, verificou-se que o ST258, o clone mais prevalente de *K. pneumoniae* portador do gene KPC, apresenta maior índice de sensibilidade à gentamicina quando comparado a outros STs (NEPARSTEK et al, 2014). O uso de aminoglicosídeos só é desaconselhado no caso de infecções causadas por enterobactérias produtoras de NDM, uma vez que a produção da enzima 16S ribossomal RNA metil-transferase as torna completamente resistentes à essa classe de antimicrobianos (LIVERMORE et al, 2011).

Cinco dos seis (83,3%) isolados de *S. marcescens* apresentaram também sensibilidade ao sulfazotrim, característica compartilhada pelo único isolado de *E. aerogenes* e por um único isolado de *K. pneumoniae* (1,8%). Nesta espécie, outro isolado também apresentou resistência

intermediária à essa classe de fármaco. Dentre as fluoroquinolonas, a sensibilidade ao ciprofloxacino também é relatada. Três dos seis (50%) isolados de *S. marcescens* apresentam sensibilidade a esse fármaco e um isolado apresenta resistência intermediária. Entre os isolados de *K. pneumoniae*, um (1,8%) apresenta resistência intermediária e outro (1,8%) mostra-se sensível à sua ação. Um dos dois isolados de *E. cloacae* apresenta resistência intermediária a este antimicrobiano. O único isolado de *E. aerogenes* também mostra-se susceptível à ação do ciprofloxacino.

Em estudo realizado em 2011, em que foram analisadas enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, o ciprofloxacino, considerado a fluoroquinolona mais ativa contra Enterobacteriaceae, somente mostrou-se eficaz em 15 – 25% dos isolados (LIVERMORE et al, 2011). A sensibilidade ao sulfazotrim foi verificada em estudo publicado por Monaco e colaboradores, em 2014, onde 18% dos isolados de *K. pneumoniae* coletados de 21 laboratórios hospitalares na Itália demonstraram sensibilidade a este antimicrobiano (MONACO et al, 2014).

Em relação aos isolados em processo de colonização, conforme apresentado na tabela 7, visualiza-se a presença de 12 fenótipos distintos para *K. pneumoniae*, 3 fenótipos para a espécie *E. cloacae* e 2 para a espécie *E. coli*. Os isolados da espécie *S. marcescens* foram agrupados em somente um fenótipo.

De acordo com o CLSI, o resultado do antibiograma da fosfomicina só deve ser liberado para infecções do trato urinário causadas por *E. coli* (CLSI, 2016). Entretanto, com o objetivo de triar a resistência a esse antimicrobiano, sua utilização foi feita para todas as espécies. Inclusive, alguns autores têm utilizado os valores de corte determinados para *E. coli* para a determinação do perfil de sensibilidade à fosfomicina em outras espécies bacterianas (LU et al, 2011; TUON et al, 2013). A fosfomicina atua inibindo a formação da parede celular bacteriana, sendo ativa contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. No Brasil, é apresentada em forma farmacêutica de uso oral, sendo amplamente utilizada no tratamento de infecções do trato urinário (ITU) não complicadas. Entretanto, em alguns países, seu uso é liberado na forma parenteral, alcançando elevados níveis séricos e urinários, além de apresentar uma boa penetração nos tecidos (FALAGAS et al, 2008). A fosfomicina tem sido usada no tratamento de infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemases; entretanto, recomenda-se sua utilização em esquemas terapêuticos combinados, uma vez que sua

utilização em monoterapia pode induzir o desenvolvimento de resistência (PONTIKIS et al, 2014; LIVERMORE et al, 2011; SOULI et al, 2011; FALAGAS et al, 2008). Curiosamente, 29 (40,2%) isolados de *K. pneumoniae* mostraram-se susceptíveis e 19 (26,3%) apresentaram resistência intermediária a esse antimicrobiano. Em um estudo realizado em 2015, na China, isolados de *K. pneumoniae* obtidos em 12 hospitais apresentaram índices de sensibilidade à fosfomicina de 39,2%, similares ao nosso trabalho (JIANG et al, 2015). Em outro estudo, os índices de sensibilidade a esse antimicrobiano alcançaram 43,4% (LI et al, 2012). Em nosso estudo, além da *K. pneumoniae*, todos os isolados de *S. marcescens* (100%) também apresentaram sensibilidade à fosfomicina. Já em relação às espécies *E. cloacae* e *E. coli*, respectivamente, dois e um isolado também se apresentaram sensíveis a esse fármaco. Dessa forma, uma vez disponível em território nacional, a administração injetável da fosfomicina pode ser uma alternativa viável para o tratamento de infecções por enterobactérias resistentes à carbapenênicos quando em associação, apesar dos já elevados índices de resistência.

Sobre os carbapenênicos, os antimicrobianos imipenem, meropenem e ertapenem foram testados para todos os isolados, independente se provenientes de infecção ou colonização. Entre os 128 isolados de *K. pneumoniae*, 28 (21,8%) apresentaram resistência intermediária ao imipenem, 5 (3,9%) apresentaram sensibilidade ao imipenem (4 isolados em colonizações e 1 em infecção) e 5 (3,9%) apresentaram resistência intermediária ao meropenem. Entre os seis isolados de *E. cloacae*, um apresentou resistência intermediária e um apresentou sensibilidade ao imipenem. O único isolado de *E. aerogenes* mostrou resistência intermediária ao imipenem. De forma geral, o meropenem apresenta os melhores resultados de sensibilidade e especificidade quando relacionado à procura de produtores de carbapenemases (BrCAST, 2015; NORDMANN et al, 2012a). Todos os isolados de todas as espécies apresentaram resistência total ao ertapenem. O ertapenem geralmente é utilizado como marcador de resistência, uma vez que na presença de carbapenemases, apresenta maiores valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) quando comparado a outros carbapenênicos (NORDMANN et al, 2012a). Apesar da elevada sensibilidade, o ertapenem pode não ser tão específico para a detecção de isolados produtores de carbapenemases, uma vez que mostra-se instável frente a enzimas do tipo ESBL e ampC associada à perda de porinas (BrCAST, 2015; NORDMANN et al,

2012a). Dessa maneira, o ertapenem torna-se instável quando utilizado em isolados pertencentes ao grupo CESP (*E. cloacae*, *E. aerogenes* e *S. marcescens*), uma vez que os isolados pertencentes a esse grupo são produtores induzíveis de betalactamases cromossomais do tipo ampC. Quando produzidas em larga escala, e quando associadas a outros mecanismos de resistência, incluindo a redução na expressão de porinas, as ampCs apresentam um fenótipo de resistência aos carbapenêmicos, sobretudo ao ertapenem, por ser um melhor marcador de resistência (NAVARRO et al, 2010; JACOBY, 2009).

É interessante verificar que uma grande proporção de enterobactérias produtoras de carbapenemases permanece susceptível à ação de alguns carbapenêmicos, tornando seu uso ainda considerável para o tratamento de infecções causadas por esses microrganismos (DAIKOS et al, 2011; TZOUVELEKIS et al, 2012). Em estudo realizado em 2011 por Daikos e colaboradores, verifica-se que a eficácia terapêutica de carbapenêmicos é maior quando os isolados testados apresentam CIM para carbapenêmicos ≤ 4 mg/L. Neste sentido, destaca-se a importância da determinação da CIM para os antimicrobianos carbapenêmicos, uma vez que o nível de resistência de isolados produtores de carbapenemases varia entre $< 0,12$ mg/L a > 256 mg/L. Melhores índices de sucesso terapêutico também são alcançados quando o uso do carbapenêmico é associado à utilização de outros antimicrobianos (DAIKOS et al, 2011; TZOUVELEKIS et al, 2012). Curiosamente, estudos apresentam bons resultados com a associação de dois carbapenêmicos, sendo um deles o ertapenem, por apresentar maior afinidade pela enzima KPC. Neste exemplo, o ertapenem ligado às carbapenemases presentes permitiria a atuação livre do segundo carbapenêmico utilizado, que se ligaria ao sítio das proteínas ligadoras de penicilina (PBPs), impedindo a síntese da parede celular bacteriana (BULIK et al, 2011; GIAMARELLOU et al, 2013).

Além dos antimicrobianos supracitados, a determinação do perfil de resistência à tigeciclina e à polimixina é essencial ao tratamento dos pacientes, uma vez que constituem as duas principais opções terapêuticas ainda eficazes no combate às infecções causadas por enterobactérias resistentes à carbapenêmicos. De acordo com o BrCast, a avaliação de sensibilidade às polimixinas e tigeciclina só pode ser realizada por meio da verificação da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Além disso, a determinação da CIM da polimixina, tigeciclina e carbapenêmicos é essencial ao ajuste da dose do antimicrobiano utilizado, contribuindo na eficácia do tratamento. Infelizmente, a

metodologia que permite a verificação da CIM para esses antimicrobianos não é realizada pelo laboratório da instituição e, por questões financeiras, também não pôde ser realizado no nosso. Consequentemente, a utilização da polimixina B nos casos de processos infecciosos é implementada de forma exclusivamente empírica. De acordo com a Nota Técnica da ANVISA, publicada em 2013, o tratamento empírico iniciado com a polimixina deve ser subsidiado pelos posteriores resultados da CIM, uma vez que, em algumas instituições hospitalares, a taxa de resistência à polimixina alcança 9% (ANVISA, 2013). Em estudos realizados na Itália, a taxa de resistência às polimixinas foi de 51% e 43% (MONACO et al, 2014; GIACOBBE et al, 2015). Além disso, de forma geral, casos de resistência à polimixina são relatados em pacientes previamente expostos a esse antimicrobiano (ARPIN et al, 2012). Dessa maneira, a verificação do perfil de sensibilidade à polimixina torna-se essencial nesses pacientes (DOI et al, 2015).

5.2.2 PESQUISA FENOTÍPICA DE ESBL

Adicionalmente aos antibiogramas, a pesquisa fenotípica de ESBLs (betalactamases de espectro estendido) foi realizada para todos os isolados bacterianos. Para tal, a metodologia de disco aproximação foi utilizada por meio do posicionamento de um disco de amoxicilina/ácido clavulânico a 20 mm de distância centro a centro dos discos de ceftriaxona, ceftazidima, cefotaxima, cefepime e aztreonam. O princípio da técnica se baseia na capacidade que o inibidor de betalactamases ácido clavulânico tem de inibir enzimas do tipo ESBL. Logo, a difusão do ácido clavulânico próxima ao disco de cefalosporinas e/ou monobactâmico gera uma distorção no halo gerado conhecida como “zona-fantasma”, evidenciando um resultado positivo (Figura 6).

A presença de enzimas do tipo ESBL foi evidenciada em 34% (n = 52) dos isolados bacterianos, sendo encontrada em todas as espécies bacterianas pesquisadas (Tabela 9). A associação entre ESBL e carbapenemases do tipo KPC tem sido geralmente descrita em *K. pneumoniae*, além de também ter sido relatada em outras espécies de Enterobacteriaceae, incluindo *E. cloacae* e *E. coli* (BRADFORD et al, 2004; PETRELLA et al, 2008).

Figura 6. Resultados representativos para a pesquisa fenotípica de enzimas do tipo ESBL

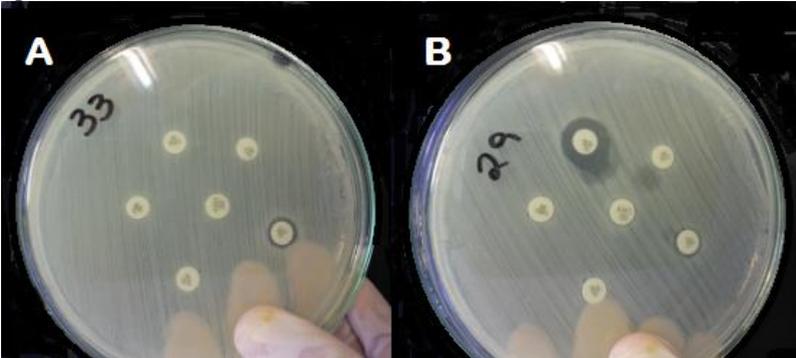


Figura. A: Resultado negativo para ESBL. B: Resultado positivo para ESBL, evidenciado pela presença de uma “zona-fantasma”.

Fonte: da autora.

Tabela 9. Resultados para pesquisa de ESBL nos isolados pesquisados

Bactéria	ESBL	
	Positivo	Negativo
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	48	80
<i>Serratia marcescens</i>	1	14
<i>Enterobacter cloacae</i>	1	5
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1	0
<i>Escherichia coli</i>	1	1
Total	52	100

Fonte: da autora.

De forma geral, a metodologia de disco-aproximação apresenta bons resultados de sensibilidade e de especificidade, tendo sido extensivamente utilizada na identificação de enterobactérias produtoras de ESBL (DRIEUX et al, 2008). Entretanto, testes com resultados falso-negativos podem ser apresentados quando há a produção concomitante de betalactamases do tipo ampC, sobretudo quando hiperexpressas (BRCAST, 2015; DRIEUX et al, 2008). Em nosso estudo, de todos os 22 isolados pertencentes ao grupo CESP (*S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*), conhecidos produtores de betalactamases ampC induzíveis, somente três (13,6%) apresentaram resultados positivos para a produção de ESBL por meio da metodologia de disco-aproximação. Neste caso, o mascaramento das enzimas do tipo ESBLs pode ser consequência da presença das betalactamases ampC, uma vez que essas enzimas não são

usualmente inibidas por inibidores de betalactamases, como o ácido clavulânico, além de apresentarem maior nível de resistência contra as cefalosporinas (BUSH et al, 2010).

A presença de ESBLs também pode ser camuflada pela presença de carbapenemases, incluindo as carbapenemases de classe A KPC e as metalo-betalactamases, embora o mesmo não ocorra com a presença de carbapenemase do tipo OXA (oxacilinas) (TSAKRIS et al, 2009, BRCAS, 2015). Carbapenemases do tipo KPC apresentam a capacidade de hidrolisar praticamente todos os antimicrobianos da classe dos betalactâmicos, mascarando dessa forma a expressão de enzimas do tipo ESBL. Além disso, por serem fracamente inibidas por inibidores de betalactamases, incluindo o ácido clavulânico, as carbapenemases do tipo KPC podem ser confundidas com as enzimas ESBL, levando a erros de interpretação (TSAKRIS et al, 2008; NORDMANN et al, 2009). Por essas razões, a detecção fenotípica de enzimas do tipo ESBL pode ser dificultada com a presença concomitante de carbapenemases. Em nosso estudo, conforme descrito anteriormente, a presença de ESBLs somente foi verificada em 34% dos isolados, sendo que a maior parte deles é produtor da carbapenemase KPC, como detalhado em sessões posteriores. Logo, em função dos possíveis erros de interpretação que podem ocorrer, a confirmação por meio de técnicas genotípicas apresentaria resultados mais confiáveis.

Apesar de sua presença contribuir na disseminação de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos, principalmente por serem predominantemente mediadas por plasmídeos, a importância da detecção de enzimas ESBL em isolados produtores de carbapenemases é duvidosa, uma vez que as carbapenemases representam um maior desafio pelo seu elevado grau de resistência (DRIEUX et al, 2008; NORDMANN et al, 2009). Entretanto, caso seja necessário, a utilização de metodologias moleculares pode ser recomendada (BRCAS, 2015).

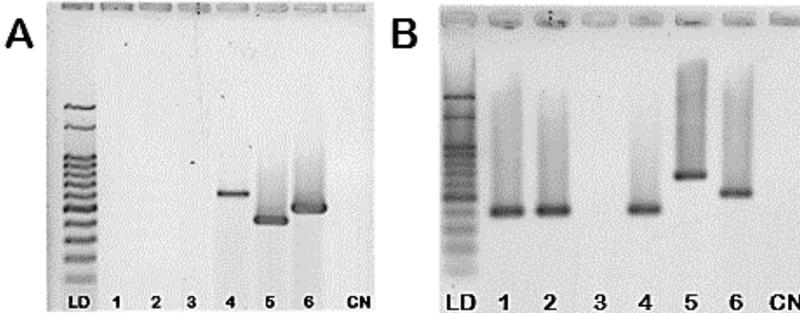
5.3 PESQUISA GENOTÍPICA DE CARBAPENEMASES – PCR

Os genes codificadores de carbapenemases *blaKPC*, *blaIMP*, *blaNDM*, *blaOXA-48-like*, *blaSPM* e *blaVIM*, foram pesquisados por meio da realização de duas PCRs do tipo multiplex (Figura 7).

Todas as 152 amostras foram testadas. Entre elas, 150 (98,6%) apresentaram resultado positivo para a presença do gene *blaKPC*. Todos os isolados pertencentes às espécies *S. marcescens*, *E. cloacae*, *E. coli* e *E. aerogenes* apresentaram a presença do gene *blaKPC*. Somente dois

isolados pertencentes à espécie *K. pneumoniae* apresentaram resultado negativo para a presença do gene. Nenhuma outra carbapenemase foi encontrada na pesquisa realizada.

Figura 7. Resultados representativos das Multiplex-PCR realizadas para pesquisa dos genes KPC, IMP, NDM, OXA-48-like, SPM e VIM



A: Multiplex 2 para pesquisa dos genes NDM, IMP e OXA-48-like. LD: padrão de tamanho molecular. Poços 1, 2 e 3: amostras negativas para a presença dos genes pesquisados. Poço 4: controle positivo de NDM (601 pb). Poço 5: controle positivo de IMP (399 pb). Poço 6: controle positivo de OXA-48-like (489 pb). CN: controle negativo. B: Multiplex 1 para pesquisa dos genes KPC, SPM e VIM. LD: padrão de tamanho molecular. Poços 1 e 2: amostras positivas para o gene KPC. Poço 3: amostra negativa para a presença dos genes pesquisados. Poço 4: controle positivo de KPC (404 pb). Poço 5: controle positivo de SPM (649 pb). Poço 6: controle positivo de VIM (512 pb). CN: controle negativo.

Fonte: da autora.

A KPC é considerada a carbapenemase de classe A mais relatada em espécies da família Enterobacteriaceae, sendo descrita sobretudo na espécie *K. pneumoniae* (TANGDEN et al, 2015; RAPP et al, 2012). Sua presença é considerada endêmica em diversos países, incluindo o Brasil (Figura 1). Em países como a Itália e o Canadá, a carbapenemase KPC foi encontrada em 89% dos isolados produtores de carbapenemases (GIANI et al, 2013; LEFEBVRE et al, 2015). No Brasil, em estudo realizado com 3.085 isolados de *K. pneumoniae* obtidos em 10 hospitais de São Paulo entre os anos de 2011 e 2015, a carbapenemase KPC foi encontrada em 96,2% dos isolados resistentes a carbapenêmicos analisados (BARTOLLETTI et al, 2016). Atualmente, a presença do gene *blaKPC* em espécies de *K. pneumoniae* já foi descrita na maior parte dos estados brasileiros (SAMPAIO et al, 2016).

Apesar da disseminação de KPC ter sido comumente relatada em Enterobacteriaceae, sobretudo em espécies de *K. pneumoniae*, outras espécies da família, além de bacilos Gram-negativos não fermentadores, também são relatadas como produtores dessa carbapenemase, embora em uma frequência menor (MARGATE et al, 2015; DING et al, 2016). A resistência aos carbapenêmicos em isolados de *S. marcescens*, por exemplo, tem sido cada vez mais descrita, embora seja majoritariamente atribuída à presença de metalo-betalactamases do tipo IMP e VIM, ou por carbapenemases do tipo SME, pertencentes à classe A de Ambler (MUNOZ-PRICE et al, 2009). O primeiro relato de *S. marcescens* produtora de KPC ocorreu em 2007, na China (ZHANG et al, 2007). Até o momento, relatos esparsos acerca da produção de KPC em *S. marcescens* foram feitos na China, EUA e parte da Europa (NORDMANN et al, 2011). No Brasil, até o presente momento, a presença de *S. marcescens* produtora de KPC foi verificada em instituições hospitalares da região sul, sudeste e nordeste do país e, mais recentemente, a coprodução de KPC e IMP foi verificada em isolados pertencentes a essa espécie na região centro-oeste do país (SILVA et al, 2015; RIBEIRO et al, 2013; GUIMARAES et al, 2013; SAMPAIO et al, 2016).

Da mesma forma, a produção de carbapenemases no gênero *Enterobacter spp.*, sobretudo KPC, apesar de esporadicamente descrita, tem ainda sido relativamente baixa. Em estudo realizado em 2014 por Kiedrowski e colaboradores, 17 dos 19 isolados da espécie *E. cloacae* apresentavam o gene *blaKPC* (KIEDROWSKI et al, 2014). A distribuição das carbapenemases varia muito de acordo com a região geográfica analisada. Na Austrália, por exemplo, o maior desafio consiste na presença dominante da metalo-betalactamase IMP sobretudo em espécies de *E. cloacae* (SIDJABAT et al, 2015). Em 2010, foi reportado o primeiro caso de *E. cloacae* produtor de NDM, na Índia (CDC, 2010). Recentemente na Venezuela, em 2015, foi reportada nessa espécie a coprodução de carbapenemases do tipo KPC e VIM (MARTINEZ et al, 2015). No Brasil, o primeiro relato de um isolado de *E. cloacae* produtor de KPC foi no ano de 2007, em Porto Alegre (ZAVASCKI et al, 2009). Relatos da produção de KPC em isolados de *E. cloacae* foram também reportados nos estados do Ceará, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro (QUILES et al, 2015; RIBEIRO et al, 2013; ANDRADE et al, 2011; TAVARES et al, 2015; SAMPAIO et al, 2016). Recentemente, a coprodução de carbapenemases do tipo NDM e KPC foi relatada no Rio

de Janeiro (QUILES et al, 2015). Isolados pertencentes à espécie *E. aerogenes* produtores de KPC também foram relatados no território brasileiro, sendo descritos nos estados do Ceará, Distrito Federal e Pernambuco (TAVARES et al, 2015; SAMPAIO et al, 2016).

No Brasil, em espécies de *E. coli*, a presença de KPC foi também relatada nos estados da Bahia, Distrito Federal, Minas Gerais, Pernambuco e Rio de Janeiro (D'ALINCOURT et al, 2010; ALMEIDA et al, 2012; SAMPAIO et al, 2016). Os primeiros relatos da produção de KPC em isolados de *E. coli* foram feitos no Rio de Janeiro, entre 2008 e 2009 (D'ALINCOURT et al, 2010).

Curiosamente, no presente estudo, nos quatro pacientes em que mais de um gênero bacteriano foi encontrado (presença concomitante de a) *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, b) *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, c) *K. pneumoniae* e *E. coli*, d) *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *E. cloacae*), todos esses isolados apresentaram resultados genotípicos para a presença da carbapenemase do tipo KPC, o que poderia indicar a transferência horizontal de genes de resistência entre as espécies (BARAN et al, 2016).

Além disso, é interessante notar que apesar da grande prevalência do gene KPC, muitos isolados apresentaram um fenótipo de resistência intermediária ao imipenem, conforme descrito anteriormente na seção antibiogramas, o que comprova o fato de que, mesmo produzindo carbapenemases, os isolados bacterianos podem muitas vezes apresentar baixo nível de resistência aos carbapenêmicos (HAMMOUDI et al, 2014).

É importante também verificar que os dois isolados que não apresentaram resultado positivo para a presença de genes codificadores de carbapenemases mostraram, mesmo assim, o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos. Ambos os isolados, pertencentes à espécie *K. pneumoniae*, apresentaram resistência ao ertapenem e meropenem e sensibilidade ao imipenem (fenótipo H – Tabela 7 e fenótipo H – Tabela 6). Conforme discute-se nas sessões 5.4.1 e 5.4.2, esses mesmos isolados apresentam resultado negativo por meio das metodologias fenotípicas para a detecção de carbapenemases (inibição enzimática e BlueCarba). Em alguns trabalhos, resultados discrepantes obtidos com a utilização de meropenem e imipenem também foram verificados nas espécies *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. Para *P. aeruginosa*, notou-se a resistência ao imipenem e sensibilidade ao meropenem (EPP et al, 2001; PAI et al, 2001; KAO et al, 2016). Já para *K. pneumoniae*, foi verificada a resistência ao meropenem e sensibilidade ao imipenem

(SHIGEMOTO et al, 2011; HARINO et al, 2013). Os estudos indicam a perda de porinas e variações nas bombas de efluxo como responsáveis por esses fenótipos de resistência. Por essa razão, em nosso estudo, acredita-se que o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos se deve à presença de outros mecanismos de resistência que não a produção de carbapenemases, entre eles destacando-se a redução na expressão de porinas e/ou o aumento de bombas de efluxo associados ou não à produção de outras betalactamases, como ESBLs e ampC. Neste sentido, evidencia-se a importância da pesquisa destes mecanismos na conferência de resistência aos carbapenêmicos. Outra possibilidade seria a presença de uma carbapenemases do tipo OXA não pesquisada por PCR, uma vez que não é detectada por meio da metodologia de inibição enzimática e pode apresentar resultados falso-negativos por meio da metodologia BlueCarba, conforme discutido na sessão 5.4.1. Não se pode excluir a possibilidade da presença de outros genes de resistência envolvidos na resistência aos carbapenêmicos que não foram pesquisados na técnica de PCR em questão. Isso evidencia uma desvantagem na metodologia de PCR, uma vez que somente alvos pré-definidos são pesquisados (COHEN STUART et al, 2010; NORDMANN et al, 2012a).

5.4 TESTES FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES

5.4.1 ENSAIO COLORIMÉTRICO – BLUECARBA

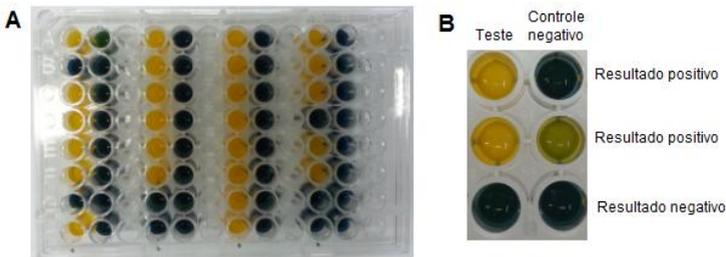
Para a avaliação da performance das metodologias fenotípicas de detecção de carbapenemases, os resultados obtidos nas PCRs (padrão-ouro) foram utilizados como medida de comparação. Conforme descrito anteriormente, dos 152 isolados testados, 150 apresentaram resultado positivo para o gene *blaKPC*, pertencente à classe A de Ambler. Nenhum outro gene de resistência pesquisado foi detectado.

O princípio da metodologia BlueCarba se baseia na hidrólise *in vitro* do imipenem quando em contato direto com colônias de bactérias produtoras de carbapenemases, não havendo a necessidade da lise celular bacteriana prévia, realizada na metodologia original, o CarbaNP. Neste caso, a quebra do anel betalactâmico efetuada por meio da enzima resulta em um decréscimo no pH do meio, sendo revelada pela presença do indicador azul de bromotimol (PASTERAN et al, 2015).

O trabalho de Pires, em 2013, relata que o tempo necessário de incubação que permite a verificação de um resultado positivo varia de

acordo com o tipo de carbapenemase produzida. Isolados produtores de carbapenemases do tipo KPC ou metalo-betalactamases, que apresentam maior potencial hidrolítico, podem apresentar resultados positivos em até 30 minutos. Já para as enzimas do tipo OXA, o tempo necessário de incubação pode chegar a 2h, pela da baixa capacidade de hidrólise que apresentam (PIRES et al, 2013). No experimento realizado, para a obtenção de um resultado positivo, o tempo médio necessário para a viragem do pH foi de aproximadamente quinze minutos, uma vez que os isolados analisados eram produtores de carbapenemases do tipo KPC. Entretanto, apesar da rapidez na obtenção dos resultados positivos, o período de incubação de 2h foi respeitado a fim de garantir um verdadeiro resultado para as amostras negativas (não produtoras de carbapenemases) (Figura 8).

Figura 8. Resultados representativos obtidos por meio da metodologia BlueCarba



A: Placa contendo os resultados obtidos por meio da metodologia BlueCarba após 2h de incubação. B: demonstração de resultados positivos e negativos.
Fonte: da autora.

Sete isolados não apresentaram resultados concordantes por meio da metodologia BlueCarba. Em quatro isolados de *K. pneumoniae*, dois isolados de *E. cloacae* e um de *E. aerogenes*, os resultados obtidos indicaram a ausência de carbapenemases, ao passo que na metodologia genotípica foi confirmada a presença de genes codificadores da carbapenemase de classe A KPC (sensibilidade 95,3%). Esse resultado pode ocorrer quando a enzima é pouco ou não expressa, apesar da presença do gene codificador da carbapenemase. Entretanto, esse não parece ser o caso, uma vez que os isolados que apresentaram resultados não concordantes apresentaram o fenótipo de resistência aos carbapenêmicos no antibiograma realizado anteriormente. Os dois isolados que não apresentaram a presença do gene *blaKPC* por meio da

metodologia genotípica também foram negativos por meio da metodologia BlueCarba (especificidade 100%).

Em trabalho realizado por Pires, em 2013, a sensibilidade e especificidade do BlueCarba para espécies de *Pseudomonas spp.*, *Acinetobacter spp.* e Enterobacteriaceae produtores de carbapenemases foi de 100%. Em outro trabalho realizado por Pires, em 2016, a sensibilidade apresentada também foi de 100%. Entretanto, a metodologia BlueCarba mostrou-se um pouco menos específica quando comparada ao CarbaNP (98.9% vs. 91.7%, respectivamente) (PIRES et al, 2016). No estudo de Pasteran, em 2015, 300 isolados clínicos (188 produtores de carbapenemases e 112 não produtores) foram avaliados quanto ao resultado obtido por meio da metodologia BlueCarba. A presença de betalactamases e a análise de bombas de efluxo, permeabilidade celular e hiperprodução de cefalosporinases do tipo ampC foi verificada anteriormente. Todos os isolados produtores de carbapenemases de classe A e B foram detectados pela metodologia proposta, incluindo isolados que apresentaram baixa CIM (Concentração Inibitória Mínima) e enzimas com baixo potencial hidrolítico, como as carbapenemases de classe A do tipo GES e SME. Os únicos resultados não concordantes foram verificados em cinco isolados da família Enterobacteriaceae produtores de carbapenemase do tipo OXA. As oxacilinas presentes nas espécies de *Acinetobacter spp.* foram todas detectadas. A sensibilidade e especificidade da metodologia proposta foi de, respectivamente, 97% e 100% (PASTERAN et al, 2015).

Falhas na detecção de carbapenemases de classe D foram também relatadas em outros trabalhos realizados (PIRES et al, 2013; OSTERBLAD et al, 2014). Entretanto, na comparação entre as metodologias BlueCarba e CarbaNP, resultados positivos para produtores de carbapenemases OXA ficavam muito mais evidentes com o BlueCarba (TARTARI, 2016). Isso se deve provavelmente em razão do tampão de extração “B-PERII” utilizado na metodologia CarbaNP: a menor capacidade hidrolítica das oxacilinas não produzindo metabólitos suficientes para superar a capacidade tamponante apresentada, não é evidenciada pelo indicador de pH utilizado vermelho de fenol (DORTET et al, 2014).

A elevada sensibilidade e especificidade do teste BlueCarba o tornam uma metodologia alternativa eficaz para a detecção de carbapenemases. Além disso, por ser de fácil realização, não demandar a utilização de reagentes caros e apresentar resultados em um tempo

reduzido (aproximadamente 2h), a implementação desta técnica em muito contribuiria para as rotinas dos laboratórios de microbiologia clínica. Ademais, além das vantagens já citadas, destaca-se a possibilidade de verificar a presença de carbapenemases desconhecidas, independentemente de sua classificação estrutural ou funcional, uma vez que o princípio da técnica baseia-se na hidrólise do carbapenêmico utilizado (NORDMANN et al, 2013). A técnica também permite diferenciar isolados produtores de carbapenemases de isolados resistentes a carbapenêmicos em função da presença de outros mecanismos de resistência, incluindo a redução da permeabilidade celular e a expressão conjunta de outros tipos de betalactamases, como ESBLs e cefalosporinases do tipo ampC, por exemplo (NORDMANN et al, 2012d). Infelizmente, como desvantagens, a metodologia não permite a diferenciação entre as classes de carbapenemases e também apresenta um baixo potencial de detecção para carbapenemases com baixo potencial hidrolítico, incluindo as enzimas do tipo GES e OXA-48-like (TIJET et al, 2013; DORTET et al, 2012).

5.4.2 INIBIDORES ENZIMÁTICOS

O teste fenotípico de inibição enzimática foi preconizado pela ANVISA, em 2013, para a realização em todos os laboratórios de microbiologia clínica. Todos os isolados que apresentem sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos devem ser testados quanto à produção ou não de carbapenemases.

Os isolados não pertencentes ao grupo CESP foram testados quanto à presença de carbapenemases da classe A e B de Ambler, e também quanto à presença de betalactamases da classe C (cefalosporinases), uma vez que podem também levar à resistência aos carbapenêmicos. Para tal, foram utilizados todos os inibidores enzimáticos disponíveis (AFB: ácido fenilborônico; EDTA e Cloxacilina) (Figura 9).

Figura 9. Teste com todos os inibidores enzimáticos testados para espécies não pertencente ao grupo CESP



À esquerda, discos de meropenem com AFB (ácido Fenilborônico), EDTA e Cloxacilina. Ao centro, discos de ertapenem, imipenem e meropenem sem inibidores e disco sem antimicrobiano contendo apenas EDTA. À direita, discos de imipenem com AFB, EDTA e Cloxacilina. Verifica-se o aumento do halo em torno dos discos de imipenem e meropenem com AFB, evidenciando resultado positivo para carbapenemase da classe A de Ambler (KPC).

Fonte: da autora.

Dentre os isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*, não pertencentes ao grupo CESP, três isolados de *K. pneumoniae* não apresentaram resultados concordantes com a pesquisa genotípica. Enquanto a metodologia de PCR evidenciou a presença do gene *blaKPC* para as três amostras, uma delas apresentou resultado fenotípico negativo para a presença de carbapenemases, uma apresentou sinergismo para o inibidor Cloxacilina, indicando a presença de uma cefalosporinase (*ampC*) e outra evidenciou a presença concomitante de carbapenemases de classe A (concordante com o resultado da PCR) e de classe B (metalo-betalactamases), o que discorda do resultado genotípico (Tabela 10).

Em relação à amostra que apresentou resultado negativo para a produção de carbapenemases e à amostra que evidenciou a presença de

ampC, curiosamente, ambas também apresentaram resultado negativo na metodologia colorimétrica BlueCarba, o que poderia indicar a baixa quantidade enzimática da carbapenemase do tipo KPC das duas amostras ou a ausência de expressão enzimática, apesar da presença do gene. Apesar disso, conforme dito anteriormente na avaliação da metodologia BlueCarba, as duas amostras apresentaram fenótipo de resistência aos carbapenêmicos: a amostra que apresentou resultado negativo nas duas metodologias fenotípicas apresentou sensibilidade ao imipenem e resistência intermediária ao meropenem (fenótipo L – tabela 7); a amostra que apresentou resultado positivo para ampC apresentou resistência total ao meropenem e resistência intermediária ao imipenem (fenótipo D – tabela 7). Ambas apresentaram resistência total ao ertapenem. Em função de não pesquisarmos a presença de cefalosporinases do tipo ampC genotipicamente, o resultado obtido no teste fenotípico não pode ser considerado discordante, uma vez que a presença dessa enzima pode coexistir com as carbapenemases do tipo KPC. Além disso, de qualquer maneira, o halo de inibição em torno do antimicrobiano contendo AFB apresentou diferença superior a 5mm em relação ao diâmetro do halo em volta do antimicrobiano sem o inibidor, sendo concordante com o resultado para pesquisa da carbapenemase de classe A, KPC. Neste caso, a avaliação mais aprofundada do mecanismo enzimático presente, incluindo a procura por cefalosporinases do tipo ampC por PCR, seria de grande valia para a caracterização dos isolados bacterianos avaliados.

Sobre a amostra que apresentou resultado positivo para a presença de KPC e metalo-betalactamase, sabe-se que o EDTA utilizado, embora esteja numa baixíssima concentração, pode causar a morte da célula bacteriana em função de levar ao aumento da permeabilidade celular (CHU et al, 2005). Dessa forma, o halo de inibição formado em volta do disco dos carbapenêmicos + EDTA poderia ser em decorrência da ação direta do EDTA sobre a célula bacteriana e não relacionado à inibição enzimática de uma possível carbapenemase de classe B. Por essa razão, utilizamos em todos os testes um disco de papel filtro sem antimicrobianos impregnado somente com a concentração recomendada de EDTA, a fim de verificar a ocorrência ou não de morte celular por esse composto (RATKAI et al, 2009). Apesar disso, o resultado mostrou-se de fato positivo para a presença de uma metalo-betalactamase. Neste caso, é possível a presença de uma MBL não pesquisada em metodologia genotípica. Embora essa hipótese seja pouco provável, uma vez que as principais

MBLs encontradas em Enterobacteriaceae foram investigadas, essa amostra será posteriormente analisada pois pode conter um novo gene de MBL.

Já para os isolados pertencentes ao grupo CESP, incluindo as espécies encontradas de *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *S. marcescens*, somente a pesquisa de metalo-betalactamases por meio da utilização de EDTA foi realizada. Isso se deve ao fato das espécies bacterianas pertencentes ao grupo CESP apresentarem o gene codificante da betalactamase ampC a nível cromossomal e de forma induzível. Neste caso, a bactéria inicia a expressão enzimática de ampC somente quando exposta a certos antimicrobianos, incluindo imipenem, amoxicilina, ácido clavulânico e cefalosporinas (BUSH, JACOBY, 2010). Dessa forma, a presença de ampCs induzíveis pode levar ao aparecimento de resultados falso-positivos para a detecção de KPC no grupo CESP, uma vez que as ampCs são também inibidas pelo ácido fenilborônico e o aumento do halo de inibição em torno dos antimicrobianos com AFB poderia falsamente indicar a presença de uma carbapenemase de classe A, KPC (ANVISA, 2013). Assim, além da pesquisa fenotípica só incluir o inibidor enzimático EDTA para pesquisa de metalo-betalactamases, a pesquisa de carbapenemases de classe A no grupo CESP deve ser feita somente por meio de pesquisa genotípica (PCR).

Entre as 22 amostras pertencentes ao grupo CESP, 19 apresentaram resultado fenotípico negativo para a produção de carbapenemases de classe B, concordando com o resultado genotípico obtido (ausência de metalo-betalactamases). Entretanto, duas amostras de *S. marcescens* e uma de *E. cloacae* apresentaram resultados fenotípicos positivos para a presença de MBL e negativos para a detecção dos genes (Tabela 10). Conforme dito anteriormente, esse resultado pode indicar a presença de uma nova MBL ou de outra não pesquisada pelos métodos genotípicos realizados.

As duas amostras que apresentaram resultados negativos na PCR também mostraram-se negativas para a produção de carbapenemases por meio da metodologia de inibição enzimática.

Tabela 10. Resultados do teste com inibição enzimática não concordantes com a metodologia genotípica

Grupo	Espécie	Teste Inibidores	Resultado PCR	BlueCarba	ESBL
Não-CESP	<i>K. pneumoniae</i>	Negativo	KPC + MBL -	Negativo	Negativo
		ampC	KPC + MBL -	Negativo	Negativo
		KPC/MBL	KPC + MBL -	Positivo	Negativo
CESP	<i>S. marcescens</i>	MBL	KPC + MBL -	Positivo	Positivo
		MBL	KPC + MBL -	Positivo	Negativo
	<i>E. cloacae</i>	MBL	KPC + MBL -	Positivo	Positivo

Fonte: da autora.

De forma geral, apesar das possíveis discordâncias, essa metodologia apresentou uma boa sensibilidade (96%) e especificidade (100%), semelhantes à metodologia BlueCarba. Inclusive, alguns trabalhos reportam índices de sensibilidade e especificidade semelhantes aos encontrados em nosso estudo, todos superiores a 95% (TSAKRIS et al, 2009b; TSAKRIS et al, 2010). De forma geral, a metodologia de inibição enzimática parece ser uma boa opção aos laboratórios de microbiologia clínica, sobretudo em função de diferenciar o grupo a que a enzima encontrada pertence. Entretanto, os inibidores enzimáticos, sobretudo a cloxacilina e o ácido fenilborônico, costumam apresentar um custo elevado e, além disso, o tempo médio para obtenção dos resultados demora entre 18 a 24h, atrasando a implementação de uma antibioticoterapia ideal. Além disso, infelizmente a metodologia não permite a pesquisa de carbapenemases de classe D, tendo em vista que nenhum inibidor enzimático para esta classe de enzimas foi desenvolvido em função da grande diversidade estrutural característica dessa classe. Dessa forma, cabe ao laboratório de microbiologia verificar qual, entre as metodologias de inibição enzimática e BlueCarba, melhor se aplica à realidade hospitalar existente.

Estatisticamente, conforme visualizado na Tabela 11, não houve diferença significativa entre as performances das duas metodologias fenotípicas para detecção de carbapenemases.

Tabela 11. Avaliação das metodologias fenotípicas utilizadas para a pesquisa de carbapenemases

	Metodologia empregada	
	BlueCarba	Inibição enzimática
Sensibilidade	95,3%	100%
Especificidade	96%	100%
Área sob a Curva (AUC)	0,977	0,980
Intervalo de Confiança (95%)	0,960 a 0,994	0,964 a 0,996
Valor de p	<0,0001	<0,0001

Fonte: da autora.

5.5 ANÁLISE DE CLONALIDADE

A tipagem molecular bacteriana apresenta um grande valor epidemiológico no reconhecimento de surtos, contribuindo para analisar a transmissão dos microrganismos envolvidos, determinar a fonte da infecção e verificar a quantidade de perfis genéticos circulantes, constatando se eles são ou não relacionados entre si (GUNAWARDANA et al, 2000).

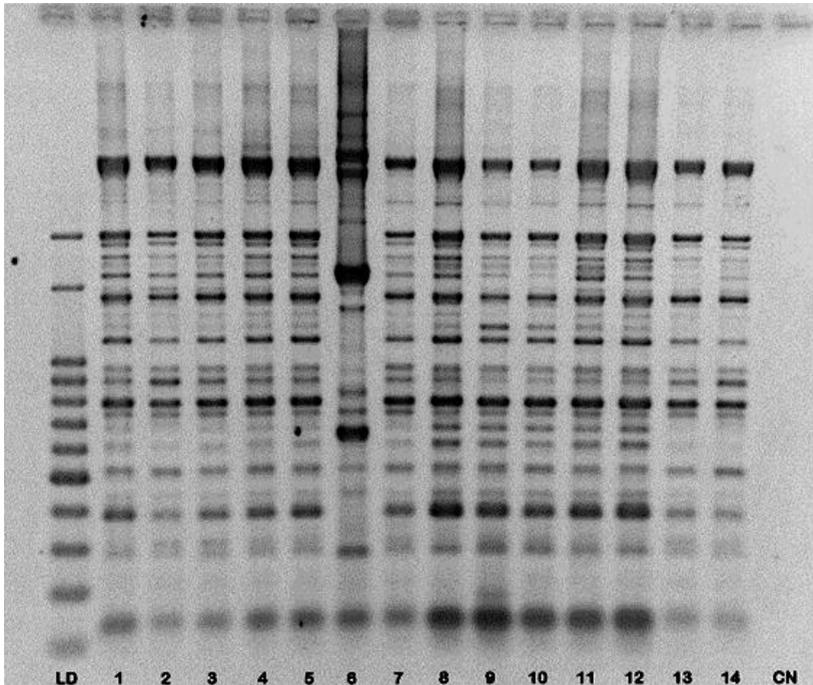
Apesar da PFGE (*Pulsed Gel Field Electrophoresis*) ser considerada o padrão-ouro entre os métodos de tipagem molecular, sua execução é trabalhosa, cara e demorada, não sendo viável à prática dos laboratórios clínicos. Por essa razão, a utilização de técnicas baseadas em PCR, incluindo a rep-PCR, tem se mostrado vantajosa, uma vez que apresenta menor dificuldade técnica, é rápida, mais barata e apresenta, em geral, boa correlação entre os resultados apresentados pela PFGE (OLIVE et al, 1999; LIU et al, 1997; CASTRO-ALARCON et al, 2009; STUMPF et al, 2005; HAHM et al, 2003).

Em estudos publicados, a utilização da metodologia rep-PCR foi utilizada com sucesso na avaliação de isolados pertencentes à diversas espécies, inclusive as espécies *K. pneumoniae* (LI et al, 2013; VESPERO, 2007; QUIÑONES et al, 2014; OTMAN et al, 2007), *E. cloacae* (CASTRO-ALARCON et al, 2009, TREVINO et al, 2009; FERNANDEZ et al, 2011; STUMPF et al, 2005), *E. aerogenes* (GEORGHIOU et al, 2005), *E. coli* (CHAPAVAL et al, 2010; MOHAPATRA et al, 2007; DOMBEK et al, 2000, HAHM et al, 2003) e *S. marcescens* (SHIN, 2003; PATTON et al, 2001, LIGOZZI et al, 2010). Em nosso estudo, em média, foram visualizadas em torno de 13 a 30 bandas nos isolados pertencentes à espécie *K. pneumoniae* por meio

da técnica de Rep-PCR. Para os isolados de *S. marcescens*, foram visualizados entre 18 e 27 bandas. As análises de similaridade para os isolados de *E. cloacae* e *E. coli* geraram perfis com menor quantidade de bandas. Cerca de 12 bandas foram visualizadas para a espécie *E. coli* e, para os isolados de *E. cloacae*, esse número foi de 10 a 15 (Figura 10).

De acordo com Tenover, quem primeiro propôs critérios de interpretação para a análise de clonalidade por técnicas de *fingerprinting*, um perfil somente é válido quando pelo menos 10 bandas são geradas. Quando um número menor de bandas é visualizado, a interpretação gerada não apresenta significativa robustez e poder de discriminação (TENOVER, 1995).

Figura 10. Fotografia representativa dos resultados obtidos pela metodologia de REP-PCR



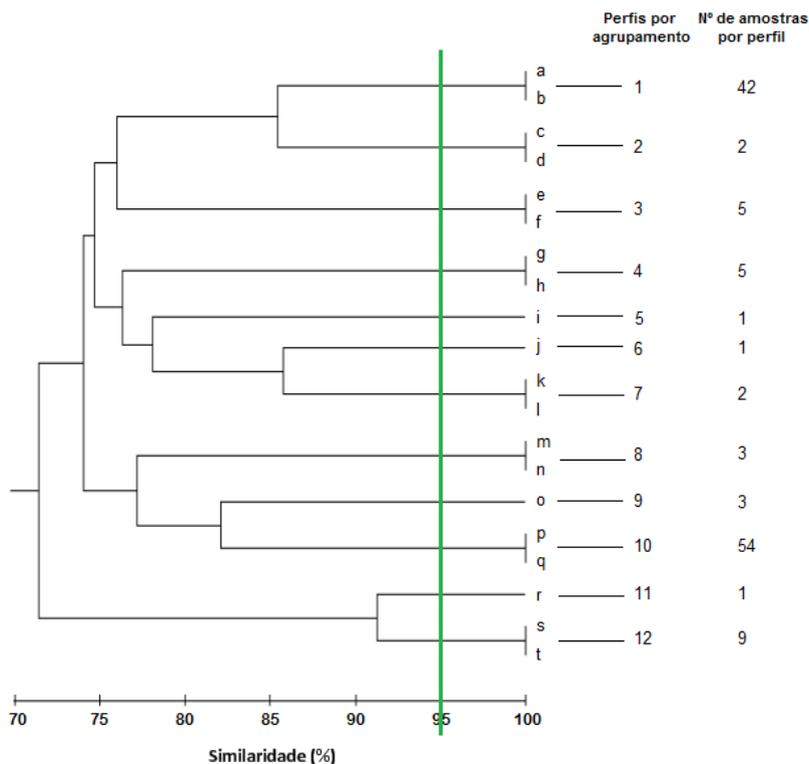
LD: padrão de tamanho molecular. Poços 1 a 14: isolados bacterianos com alta similaridade genética, exceto pela amostra 6. CN: controle negativo.

Fonte: da autora.

A análise da similaridade genética dos 128 isolados de *K. pneumoniae* resultou em 20 diferentes perfis clonais (perfis *a* ao *t*). De

forma geral, conforme visualiza-se no dendrograma apresentado na Figura 11, todas as amostras apresentam um coeficiente de similaridade global de 72%. O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,77, e mede o grau de ajuste entre a matriz de dissimilaridade original e a matriz resultante da simplificação devido ao método de agrupamento. Um valor $> 0,7$ indica que o método de agrupamento foi adequado (SOKAL et al, 1962).

Figura 11. Dendrograma dos isolados de *K. pneumoniae*



Linha verde: similaridade de 95%

Fonte: da autora.

Em trabalhos que utilizam o rep-PCR como metodologia de tipagem, os perfis que apresentam similaridade genética $\geq 95\%$ são considerados clonais. Similaridade $> 98\%$ classifica os isolados como indistinguíveis e índices de similaridade $< 95\%$ os classificam como diferentes (FLUIT et al, 2010, PITOUT et al, 2009; BAE et al, 2014).

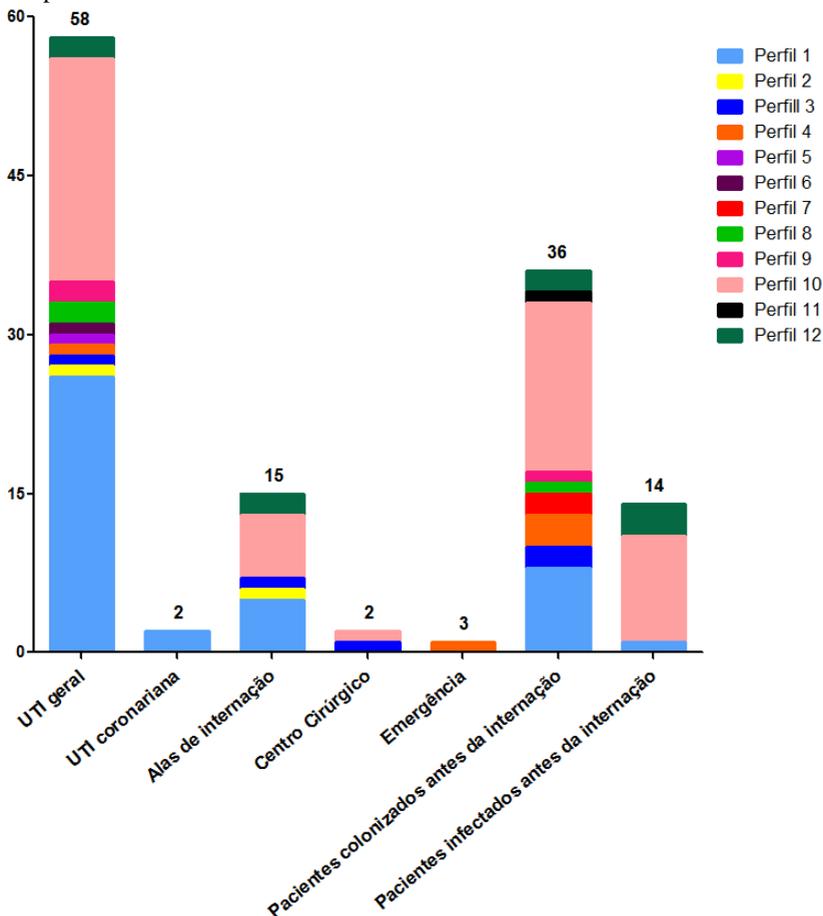
Em presente estudo, em razão de alguns padrões apresentarem índices de similaridade genética superiores a 95%, conforme visualiza-se à direita da linha verde (similaridade 95%) traçada no dendrograma (Figura 11), com o objetivo de facilitar a análise, fez-se o agrupamento de alguns perfis gerados, por serem considerados clonais. Os padrões *a* e *b*, por exemplo, podem ser agrupados em um só perfil clonal. O mesmo se aplica aos perfis *c* e *d*, *e* e *f*, *g* e *h*, *k* e *l*, *m* e *n*, *p* e *q* e, por fim, *s* e *t*. Dessa maneira, após o agrupamento, dentre todos os isolados de *K. pneumoniae*, um total de 12 perfis clonais foram gerados por meio da análise de similaridade genética. Dentre todos os 128 isolados de *K. pneumoniae*, 96 (75%) pertencem a apenas dois perfis clonais (Perfis 1 e 10). Os demais perfis visualizados apresentam um menor número de isolados (variando entre 1 e 9).

O grande número de perfis genéticos visualizados difere de outros trabalhos, onde a maioria dos isolados pertence a um único perfil genético prevalente (APPANNANAVAR et al, 2015; OTMAN et al, 2007, QUINONES et al, 2014). Entretanto, na maioria dos trabalhos, a coleta dos isolados é feita com o objetivo de analisar a ocorrência de surtos. No caso do nosso trabalho, durante o andamento das coletas, nenhum surto foi notificado, o que é comprovado pela longa distribuição temporal dos dois perfis genéticos com maior número de isolados, tendo sido encontrados ao longo dos 12 meses de coleta (dados apresentados adiante). Entretanto verificamos que esses dois perfis prevalentes são endêmicos na instituição. Além disso, a chance da verificação de um número elevado de perfis genéticos é aumentada quando o período da coleta é prolongado (TENOVER, 1995), como foi o caso do nosso estudo.

De forma geral, por meio da figura 12, visualiza-se uma grande quantidade de clones circulantes entre todas as alas hospitalares, com destaque para a UTI geral, onde dez dos doze perfis gerados foram encontrados. Além disso, nove dos doze perfis foram isolados de pacientes que já chegaram na instituição hospitalar previamente colonizados. Em relação aos pacientes que já chegaram na instituição em curso de infecção pelo microrganismo analisado, três perfis foram verificados, incluindo os dois perfis mais prevalentes. A grande quantidade de perfis genéticos encontrados em pacientes que já entraram no hospital colonizados ou infectados indica a circulação de diversas estirpes de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em ambientes comunitários e, possivelmente, em instituições hospitalares próximas. As demais alas hospitalares (UTI coronariana, alas de internação, centro

cirúrgico e emergência) apresentam uma menor diversidade de clones circulantes, consequência da menor quantidade de isolados verificados nesses setores. Os dois perfis mais prevalentes (perfil 1 e 10) apresentaram uma variada distribuição geográfica, tendo sido encontrados em todas as alas hospitalares, com exceção da Emergência.

Figura 12. Distribuição dos perfis clonais de *K. pneumoniae* nas alas hospitalares



Fonte: da autora.

Também é interessante notar na figura 12 que a Emergência, representando a porta de entrada de pacientes da comunidade, apresenta

somente um perfil clonal, o qual provavelmente representa a variabilidade genética das bactérias comunitárias, embora sejam poucas amostras para sustentar a hipótese.

Baixa variabilidade de perfis clonais também pode ser observada na UTI coronariana, entretanto o perfil clonal existente também circula em outras alas, o que pode indicar carreamento deste perfil pelos profissionais da saúde. O baixo número de IRAS nessa ala e no centro cirúrgico também podem indicar que os cuidados com a segurança do paciente (higienização das mãos, etc) são melhor executados nestas alas.

Além disso, conforme visualizado no quadro 3, é interessante verificar que os isolados pertencentes aos dois perfis clonais mais prevalentes distribuem-se ao longo dos doze meses de coleta. Os demais perfis gerados distribuíram-se de forma mais limitada, por um período de até oito meses.

Quadro 3. Distribuição temporal dos perfis clonais de *K. pneumoniae*

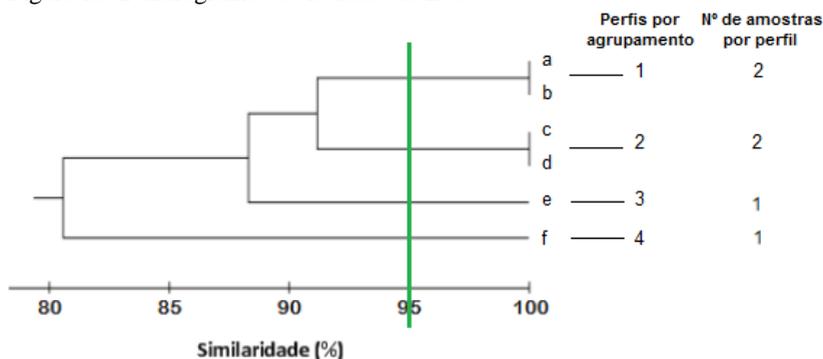
Perfil	2015			2016								
	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set
1												
2												
3												
4												
5												
6												
7												
8												
9												
10												
11												
12												

Fonte: da autora

Em relação à espécie *E. cloacae*, todos os seis isolados obtidos pertenciam, cada um, a um perfil genético diferente (*a* a *f*), conforme visualizado na Figura 13. Por apresentarem similaridade genética superior a 95% (linha verde), o perfil *a* e *b* e o perfil *c* e *d* foram agrupados, resultando em quatro perfis distintos gerados. O perfil 1 foi encontrado em uma ala de internação e na UTI geral. O perfil 2 foi encontrado na UTI coronariana e em um paciente que já chegou na

instituição colonizado ou em processo de infecção pelo microrganismo em questão. Já os perfis 3 e 4 foram exclusivamente encontrados em pacientes que já chegaram na instituição colonizados. Os dois isolados do perfil 1 foram obtidos com um intervalo de dois meses entre a coleta de um e outro. O mesmo ocorre com os dois isolados do perfil 2. Já em relação aos perfis 3 e 4, como possuem apenas um representante, não tiveram a sua distribuição temporal avaliada. Conforme dendrograma, a similaridade global dos isolados de *E. cloacae* é de 81%. O coeficiente de correlação cofenética foi de 0,79.

Figura 13. Dendrograma dos isolados de *E. cloacae*



Linha verde: similaridade de 95%

Fonte: da autora.

Não foi gerado um dendrograma para os diferentes padrões de *S. marcescens* e *E. coli*, uma vez que foi verificada a existência de apenas dois perfis diferentes para cada espécie. Dentre os 15 isolados de *S. marcescens*, 14 pertenciam ao perfil mais prevalente (Perfil 1). Da mesma forma que os perfis mais prevalentes de *K. pneumoniae*, o perfil genético mais prevalente de *S. marcescens* foi encontrado em diversos setores hospitalares, incluindo a UTI geral e coronariana, centro cirúrgico e também em pacientes que já chegaram ao hospital colonização/infectados com o microrganismo em questão. A permanência temporal desse clone foi de 6 meses. O único representante do segundo perfil genético (Perfil 2) gerado foi encontrado em uma ala de internação.

Da mesma forma que os isolados de *E. cloacae*, os únicos dois representantes da espécie *E. coli* pertenciam a dois perfis genéticos distintos. Curiosamente, ambos os perfis foram encontrados em pacientes já colonizados/infectados. Sua distribuição temporal não foi

avaliada. A análise da similaridade genética não foi realizada para o único isolado pertencente à espécie *E. aerogenes*.

Curiosamente, dos 46 pacientes que vieram a óbito em nosso estudo ao longo dos doze meses de coleta, foram isolados ao todo 49 isolados bacterianos, 40 de *K. pneumoniae*, 7 de *S. marcescens* e 2 de *E. cloacae*. Dos 40 isolados de *K. pneumoniae*, 30 (75%) pertenciam aos dois perfis clonais mais prevalentes encontrados (Perfis 1 e 10). Todos os isolados de *S. marcescens* envolvidos em óbitos pertenciam a apenas um perfil clonal (Perfil 1). Já os dois isolados de *E. cloacae* isolados em pacientes que vieram a óbito pertenciam aos perfis 2 e 3.

É interessante verificar que a maioria dos isolados encontrados em pacientes que posteriormente vieram a óbito pertencem a clones bacterianos encontrados em diversos setores hospitalares. Neste sentido, deve-se atentar à ampla circulação dos perfis bacterianos encontrados, sendo necessária a tomada de medidas que tenham em vista o controle de sua disseminação.

6 SUMÁRIO DE RESULTADOS

- Durante os doze meses de coleta, foram isolados na instituição analisada 152 enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, provenientes de 147 pacientes. Entre os isolados, predominaram duas espécies: 128 (84,2%) pertenciam à espécie *Klebsiella pneumoniae* e 15 (9,9%) à espécie *Serratia marcescens*;
- Os isolados foram majoritariamente obtidos em amostras de swab anal de vigilância (54,6%), seguidos por amostras de urina (19%), aspirado traqueal (13,8%), sangue (8,6%) e outros sítios descritos em menor proporção (4%);
- Em relação aos isolados, 85 (55,9%) foram caracterizados como colonizações. Os demais 66 isolados (43,4%) estavam envolvidos em processos infecciosos e um (0,7%) não foi caracterizado quanto à natureza de sua presença.
- Entre os 66 isolados envolvidos no curso de infecções, 51 (77,3%) foram tratados com a associação de pelo menos dois antimicrobianos, 7 (10,6%) foram tratados por meio de monoterapia e 8 não foram tratados.
- Três tipos de esquemas terapêuticos em associação foram utilizados: carbapenêmico/ aminoglicosídeo, carbapenêmico/polimixina B e carbapenêmico/aminoglicosídeo/polimixina B. O índice de sucesso terapêutico da terapia combinada foi de 60,7%.
- Dos 147 pacientes analisados, 87 (60%) apresentaram processos de colonização/infecção com origem na instituição hospitalar analisada. Os demais 60 pacientes (40%) já chegaram na instituição previamente colonizados ou com um processo infeccioso ativo consequente da presença de uma enterobactéria resistente aos carbapenêmicos;
- Das colonizações e infecções (IRAS) registradas e provenientes da internação do paciente na instituição analisada, 68 (78,2%) ocorreram quando o paciente se encontrava internado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI).
- A média do tempo de internação antes da obtenção de uma cultura positiva para EPC foi de 17 dias;
- Entre os fatores de risco significativamente relevantes para a obtenção de uma cultura positiva para ERC, destacaram-se o uso de instrumentos invasivos, a realização de procedimentos invasivos e a prévia exposição aos antimicrobianos de amplo espectro do grupo das penicilinas/inibidores de betalactamases;

- Dos 147 pacientes analisados, 99 (67,3%) ganharam alta, 46 (31,3%) vieram a óbito e 2 (1,4%) foram transferidos para outra instituição hospitalar;
- Entre os fatores de risco relacionados às taxas de mortalidade dos pacientes analisados, foram significativamente relevantes a internação em UTI, utilização de instrumentos invasivos, realização de procedimentos invasivos e internações anteriores;
- Em relação às enterobactérias isoladas em processos infecciosos, nota-se o alto índice de sensibilidade aos aminoglicosídeos amicacina e gentamicina (60% e 52%, respectivamente). Índices menores de sensibilidade foram também reportados em relação aos antimicrobianos sulfazotrim e ciprofloxacino (7% e 10%, respectivamente).
- Em relação aos isolados bacterianos provenientes de processos de colonizações, um índice de sensibilidade ainda elevado (47%) foi verificado em relação à fosfomicina;
- A pesquisa fenotípica para ESBL apresentou resultados positivos para a classe enzimática em 52 isolados (34%);
- O gene *blaKPC* foi encontrado em 150 (98,6%) isolados. Somente dois isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resultado negativo para a presença do gene. Nenhum outro gene de resistência pesquisado foi detectado;
- As metodologias fenotípicas de inibição enzimática e BlueCarba, utilizadas para a pesquisa de carbapenemases apresentaram, ambas, ótimos resultados de sensibilidade (96% e 95,3%) e especificidade (100%) quando comparadas à metodologia genotípica PCR;
- A metodologia de tipagem molecular rep-PCR pôde ser aplicada com sucesso na avaliação da clonalidade dos isolados das espécies *K. pneumoniae*, e apesar do pequeno número de isolados, forneceu uma estimativa da variabilidade genética dos isolados de *S. marcescens*, *E. cloacae* e *E. coli*;
- Doze perfis clonais foram verificados nos isolados de *K. pneumoniae*, sendo que 75% dos isolados distribuíram-se em dois perfis clonais prevalentes.
- Os dois perfis clonais prevalentes foram encontrados ao longo dos doze meses de coleta em múltiplas alas hospitalares, incluindo a UTI geral, UTI coronariana, alas de internação, centro cirúrgico e pacientes que já chegaram na instituição hospitalar colonizados ou em curso de processo infeccioso pelo microrganismo em questão,

indicando a elevada circulação dentro da instituição hospitalar e em ambientes comunitários;

- Dois perfis clonais foram encontrados entre as espécies *S. marcescens*, sendo que 14 pertenciam ao perfil mais prevalente, não geneticamente relacionado ao único representante do segundo perfil genético encontrado;
- Os seis isolados de *E. cloacae* pertenciam a quatro perfis genéticos distintos e os dois isolados de *E. coli* pertenciam a dois perfis genéticos distintos.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esse foi o primeiro estudo realizado na cidade de Blumenau (SC) acerca dos aspectos clínicos, microbiológicos e moleculares de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Levando em conta os resultados obtidos, verifica-se a elevada prevalência do gene *blaKPC* entre todas as cinco espécies encontradas. A detecção fenotípica de carbapenemases por meio das metodologias de inibição enzimática e colorimétrica também apresentaram excelentes resultados em termos de sensibilidade e especificidade. Além disso, o método de tipagem molecular por rep-PCR pôde ser aplicado com sucesso na diferenciação dos isolados, enfatizando a presença de um elevado número de perfis genéticos. Também foi demonstrada a grande circulação dos clones detectados de *K. pneumoniae* entre todas as alas hospitalares durante todo o período do estudo, evidenciando a endemicidade dos clones prevalentes nesta instituição.

Em relação aos aspectos clínicos pesquisados, a utilização de antimicrobianos de amplo espectro, o uso de instrumentos invasivos, incluindo cateteres venosos e vesicais e ventilação mecânica, bem como a realização de procedimentos invasivos foram constatados como importantes fatores de risco relacionados à obtenção de uma cultura positiva para ERC. Já em relação aos fatores relacionados à mortalidade dos pacientes, sendo esta verificada em 31% dos pacientes analisados, destaca-se também a utilização de instrumentos invasivos e a realização de procedimentos invasivos, além da prévia admissão em UTI e internações prévias. De forma geral, a determinação dos aspectos clínicos gerais e dos fatores de risco envolvidos em muito contribuem para o melhor entendimento das características relacionadas à presença desses microrganismos, auxiliando na tomada de medidas para o controle e prevenção de infecções e/ou colonizações decorrentes de sua presença em instituições de saúde, além de evitarem maus prognósticos entre pacientes.

8 PERSPECTIVAS

- Determinar o perfil de sensibilidade completo aos antimicrobianos dos isolados testados;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados para os antimicrobianos meropenem, imipenem, polimixina e tigeciclina;
- Sequenciar os genes amplificados para verificação do subtipo enzimático presente;
- Comparar a tipagem molecular obtida por rep-PCR com a metodologia PFGE e MLST.

9 REFERÊNCIAS

ABRAHAM, E. P., et al. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Rev. Infect. Dis**, v.10, p.677–678, 1940.

AKOVA, M., et al. Interventional strategies and current clinical experience with carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**, v.18, p.439-48, 2012.

ALEKSHUN, M. N., et al. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. **Cell**, v.128, p.1037–50, 2007.

ALMEIDA, A. C., et al. Escherichia coli ST502 and K. pneumoniae ST11 sharing an IncW plasmid harbouring the bla(KPC-2) gene in an Intensive Care Unit patient. **Int J Antimicrob Agents**, v.40, n.4, p.374-376, 2012.

ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Rev AMRIGS**, v.57, n.3, p.213-8, 2013.

AMBLER, R. P., et al. A standard numbering scheme for the class A betalactamases. **Biochem. J.**, v.276, p.269-270, 1991.

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.

ANDRADE, L. N., 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 Chemother**, v. 55, n.7, p.3579-3583, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação em Vigilância Sanitária. PORTARIA N° 2.616, DE 12 DE MAIO DE 1998, 1998.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta N. 01/2011. Detecção de metalobetalactamases do tipo NDM em dois isolados de

Klebsiella pneumoniae na Guatemala. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2011.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 6 : Detecção e identificação de bactérias de importância médica /Agência Nacional de Vigilância Sanitária.– Brasília: Anvisa, 150p., 2013b.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota Técnica 01/2016/CECISS/LACEN, 2016.

ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Programa nacional de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde (2013 – 2015), 2013.

APPANNANAVAR, S. B., et al. Utility of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for the rapid detection of nosocomial outbreaks of multidrug resistant organisms: Experience at a tertiary care center in North India. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v.33, n. 2, p. 221-224, 2015.

ARIAS, C. A., et al. A new antibiotic and the evolution of resistance. **N Engl J Med**, v.372, p.1168- 1170, 2015.

ARPIN, C., et al. Extended-spectrum betalactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. **Antimicrob Agents Chemother**, v.47, n.11, p.3506-14, 2003.

ARPIN, C., et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.6, p.3432–3434, 2012.

BAE, K.; KIM, J., et al. Comparison of pulsed-field gel electrophoresis & repetitive sequence-based PCR methods for molecular epidemiological studies of *Escherichia coli* clinical isolates. **Indian J Med Res**, v. 140, p. 679-685, 2014.

BARAN, I.; AKSU, N. Phenotypic and genotypic characteristics of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level reference hospital in Turkey. **Ann Clin Microbiol Antimicrob**, v. 15, n.20, 2016.

BARTOLLETTI, F., et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, Sao Paulo, Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v.22, n.10, p.1849–1851, 2016.

BEN-DAVID, D., et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in post-acute-care facilities in Israel. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.32, n.9, p.845-53. 2011.

BLAIR, J. M. A., et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews**, v.13, p.42-51, 2015.

BORER, A., et al. Attributable mortality rate for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.30, p.972–976, 2009.

Bradford, P. A. Extended-spectrum betalactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev.**, v.14, p.933-951, 2001.

BRADFORD, P. A., BRATU, S., et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor resistant TEM-30 betalactamases in New York City. **Clin Infect Dis**, v.39, p. 55–60, 2004.

BRADLEY, J. S., et al. Carbapenems in clinical practice: a guide to their use in serious infection. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.11, p.93–100, 1999.

Brasil. Lei no. 9.431, de 06 de Janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade de manutenção de programas de controle de infecção hospitalar pelos hospitais do país. Brasília: Diário Oficial da União, 06 de janeiro de 1997.

BRATU, S., et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of

polymyxin B and other agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.128-132, 2005.

BRCAS.T. BRAZILIAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistências

BULIK, C. C.; NICOLAU, D. P. Double-carbapenem therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.6, p.3002–3004, 2011.

BUSH, K. Alarming b-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Current opinion in Microbiology**, v.13, p.558-564, 2010a.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for betalactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.6, p. 1211-33, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. Updated Functional Classification of b-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.54, n.3, p.969-76, 2010.

BUSHNELL, G., et al. Emergence of New Delhi metallo-betalactamase type 1 producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. **Int J Infect Dis**, v.17, p.325–33, 2013.

CAI, Y., et al. Colistin resistance of *Acinetobacter baumannii*: clinical reports, mechanisms and antimicrobial strategies. **J. Antimicrob. Chemother**, v.67, p.1607–1615, 2012.

CALFEE, D.; JENKINS, S. G. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.29, p.966–8, 2008.

CAMARGO, C. H., et al. Detection of SPM and IMP metallo-betalactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a

Brazilian public tertiary hospital. **Braz J Infect Dis**, v.15, n.5, p.478-481, 2011.

CANNATELLI, A., et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Anti Ag Chem**, v.58, p.5696–5703, 2014.

CAPONE, A., et al. High rate of colistin resistance among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection accounts for an excess of mortality. **Clin Microbiol Infect.**, v.19, p.23-30, 2013.

CARATTOLI, A. Plasmids and the spread of resistance. **Int J Med Microbiol**, v.303, p.298-304, 2013.

CARDO, D., et al. Moving toward elimination of healthcare-associated infections: a call to action. **Am J Infect Control**, v.31, n.11, p.1101-5, 2010.

CARLET, J. The gut is the epicentre of antibiotic resistance. **Antimicrob Resist Infect Control**, v.1, n.39, 2012.

CARRER, A., et al. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.54, p.1369–1373, 2010.

CARVALHAES, C. G., et al. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **J Antimicrob Chemother**, n.65, p.249–251, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P., et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.68, n.3, p.337-8, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P., et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Anti Chem**, v.68, p.2956–7, 2013.

CASTRO-ALARCON, N., et al. A Validation of two rep-PCR techniques for molecular typing of extended-spectrum betalactamase-producing *Enterobacter cloacae* isolates. **Bioquimia**, v.34, n.4, 2009.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Detection of Enterobacteriaceae isolates carrying metallo-beta-lactamase—United States, 2010. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 59, n. 24, p. 750, 2010.

CDC, Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in acute care facilities, 2009.

CDC, Centers for Disease Control and prevention. Healthcare-associated Infections (HAI) Progress Report, 2016.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013.

CDDEP, The Center for Disease Dynamics, Economics & Policy. The State of the World's Antibiotics 2015, 2016.

CHABAH, M., et al. Healthcare-associated infections due to carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Bacteriological profile and risk factors. **Médecine et maladies infectieuses**, v.46, p.157–162, 2016.

CHANG, M. R., et al. 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.**, v. 46, n. 1, p. 114-115, 2013 .

CHAPAVAL, L., et al. Detecção de *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pela técnica de REP-PCR no monitoramento da qualidade do leite de cabra em sala de ordenha. **Comunicata Scientiae**, v.1, b.1, p. 49-56, 2010

CHEN, L., et al. Comparative genomic analysis of KPC-encoding pKpQIL-like plasmids and their distribution in New Jersey and New York hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**. v.58, p.2871- 7, 2014.

CHU, Y. W.; CHEUNG, T. K., et al. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo-beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem EDTA disk method. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.26, n.4, p.340–341, 2005.

CIZMAN, M. The Use and Resistance to Antibiotics in the Community. **Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, n.4, p.297-307, 2003.

COHEN STUART, J., et al. Guideline for phenotypic screening and confirmation of carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v.36, n.3, p. 205-210, 2010.

CORREA, L., et al. A hospital based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **BMC Infect Dis.**, v.13, n.80, 2013.

COSGROVE, S. E., et al. Comparison of mortality with methicillin-resistant and methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. **Clin Infect Dis**, v.36, p.53-59, 2003.

CUZON, G., et al. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. **Antimicrob Agents Chemother.** v.55, p.5370-3, 2011.

CUZON, G., et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce betalactamase blaKPC-2 gene. **Emerging Infect. Dis.** v.16, n.9, p.1349–1356, 2010.

CUZON, G., et al. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolyzing betalactamase OXA-48 in an imipenem-susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. **Anti Ag Chem.** v.52, p.3463–3464, 2008.

CUZON, G., et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing OXA-48 betalactamase in *Klebsiella pneumoniae* from Tunisia. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.36, p.91–93, 2010.

DAHMEN, S., et al. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated to the combination of plasmid-mediated CMY-4 AmpC beta-lactamase and loss of an outer membrane protein. **Microb. Drug Resist.** v.18, n.5, p.479-483, 2012.

DAIKOS, G. L., et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: lowering mortality by antibiotic

combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, p.2322-8, 2014.

DAIKOS, G. L., et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*:(when) might we still consider treating with carbapenems? **Clin Microbiol Infect.**, v.17, p.1135-41, 2011.

D'ALLINCOURT CARVALHO-ASSEF, A. P., et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.68, n.3, p.337-338, 2010.

DALMARCO, E. M., et al. Identificação laboratorial de betalactamases de espectro estendido (ESBLs) – Revisão. **Revista Brasileira de Analises Clinicas**, v.38, n.3, p.171-7, 2006.

DEBBY, B. D.; GANOR, O., et al. Epidemiology of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* colonization in an intensive care unit. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, v.31, p.1811-7, 2012.

DING, B.; SHEN, Z.; HU, F., et al. In vivo Acquisition of Carbapenemase Gene blaKPC-2 in Multiple Species of Enterobacteriaceae through Horizontal Transfer of Insertion Sequence or Plasmid. **Frontiers in Microbiology.**, v.7, 2016.

DOMBEK, P. E.; JOHNSON, L. K., et al. Use of Repetitive DNA Sequences and the PCR To Differentiate *Escherichia coli* Isolates from Human and Animal Sources. **Applied and Environmental Microbiology.**, v.66, n. 6, p. 2572-2577, 2000.

DORTET, L., et al. CarbAcineto NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Acinetobacter* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v.52, p. 2359–2364, 2014b.

DORTET, L., POIREL, L., et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Pseudomonas* spp. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 11, . 3773–3776, 2012.

DORTET, L., POIREL, L., et al. Rapid Identification of Carbapenemase Types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas* spp. by Using a Biochemical Test. **Anti Ag Chem**, v.56, n.12, p. 6437– 6440, 2012a.

DRIEUX, L., et al. Phenotypic detection of extended-spectrum betalactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.14, p. 90-103, 2008.

DU, J., et al. Phenotypic and Molecular Characterization of Multidrug Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolated from a University Teaching Hospital, China. **PLoS ONE**, v.9, n.4, 2014.

ELANDER, R. P. Industrial production of betalactam antibiotics. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v.61, p.385–392, 2003.

EMA, European Medicines Agency and ECDC, European Centre for Disease Prevention and Control. The Bacterial Challenge: Time to React a Call to Narrow the Gap Between multidrug-Resistant Bacteria in the EU and Development of New Antibacterial Agents. Stockholm. 2009.

EPP, S. F., et al. C-terminal region of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin OprD modulates susceptibility to meropenem. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.45, n.6, p.1780–7, 2001.

específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. 2015.

FALAGAS, M. E., et al. Antibiotic treatment of infections due to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: systematic evaluation of the available evidence. **Antimicrob Agents Chemother**, v.58, p. 654–663, 2014.

FALAGAS, M. E., et al. Fosfomycin: use beyond urinary tract and gastrointestinal infections. **Clin Infect Dis.**, v.46, p.1069-77, 2008.

FELDMAN, N.; ADLER, A., et al. Gastrointestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* following hospital discharge: duration of carriage and risk factors for persistent carriage. **Clin Microbiol Infect.**, v.19, p.190-6, 2013.

FERNANDEZ, A., et al. Emergence in Spain of a Multidrug-Resistant *Enterobacter cloacae* Clinical Isolate Producing SFO-1 Extended-Spectrum betalactamase. **J Clin Micro.**, v.49, n.3, p.822-828, 2011.

FIGUEIREDO, D. Q., et al. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, n.3, p. 177-184, 2009.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **Br. J. Exp. Pathol.**, v.10, p.226–236, 1929.

FLUIT, A. C., et al. Evaluation of the DiversiLab System for Detection of Hospital Outbreaks of Infections by Different Bacterial Species. **J Clin Micro**, v. 48, n.11, p. 3979–3989, 2010.

GALES, A. C., et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.73, n.4, p. 354–360, 2012.

GALES, A. C.; BOLMSTROM, A., et al. Antimicrobial susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) isolated in hospitals in Brazil. **Braz J Infect Dis.**, v.1, n.4, p.196–203, 1997.

GALLER, H., et al. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harboring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, p.132-134, 2014.

GASINK, L. B., et al. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.** v.30, p.1180 –1185, 2009.

GAYNES, R.; EDWARDS, J. R. Overview of nosocomial infections caused by gram-negative bacilli. **Clin Infect Dis**, v.41, p.848-854, 2005.

GEORGHIOU, P. R., et al. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital outbreak-associated strains by molecular techniques. **Clin. Infect. Dis.**, v.20, p.84-94, 1995.

GIACOBBE, D. R., et al. Risk factors for bloodstream infections due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: results from a

multicenter case-control study. **Clin. Microbiol. Infect.** v.21, n. 12, p. 1-8, 2015.

GIAKKOUPI, P., et al. IBC-1, a Novel Integron-Associated Class A betalactamase with Extended-Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. **Anti Ag Chem.** v.44, n.9, p.2247-2253, 2000.

GIAMARELLOU, H., et al. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.57, n.5, p.2388–2390, 2013.

GIANI, T., et al. Epidemic diffusion of KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy: results of the first countrywide survey, 15 May to 30 June 2011. **Euro. Surveill.** v.18, 2013.

GIRLICH, D.; POIREL, L., et al. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n.2, p. 477–479, 2012.

GIRMENIA, C., et al. Epidemiology of Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infections in Mediterranean Countries. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases.** v.8, n.1, 2016.

GISKE, C. G., et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect**, v.17, p.552–556, 2011.

GLASNER, C.; ALBINGER, B., et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. **Euro Surveill.**, v.18, 2013.

GLUPCZYNSKI, Y., et al. Rapid emergence and spread of OXA-48-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, p. 168–172, 2012.

GODOY, C. V., et al. In vitro susceptibility to a new antimicrobial agent (imipenem) of pathogens isolated from inpatients at various centers. **Rev Inst Med Trop**, v.31, n.3, p.169–176, 1989.

GOERING, R. V. Molecular epidemiology of nosocomial infection: Analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-Field gel electrophoresis. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.14, p. 595-600, 1993.

GOMEZ, S., et al. Emergence of metallo-beta-lactamases in Enterobacteriaceae from Argentina. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.69, n.1, p.94–97, 2011 .

GREGORY, C. J., et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, p.476-84, 2010.

GUIMARAES, A. C. C., et al. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates sharing an IncK plasmid containing blaKPC-2. **Int J Antimicrob Agents**, v.42, p.369–370, 2013.

GULMEZ, D., et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.31, p.523–526, 2008.

GUNAWARDANA, G. A., et al. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. **Veterinary Microbiology**, v.72, p. 97-109, 2000.

GUTIERREZ, O., et al. Molecular epidemiology and mechanisms of carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Spanish hospitals. **Anti Ag Chem**, v.51, n. 12, p. 4329–4335, 2007.

HAHM, B. K., et al. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. **J Microbiol Methods**, v.53, p.387-99, 2003.

HAMMOUDI, D.; MOUBARECK, C. A.; SARKIS, D. K. How to detect carbapenemase producers? A literature review of phenotypic and molecular methods. **J Microbiol Methods**, v.107, p.106–18, 2014.

HAN, H.; ZHOU, H., et al. Optimization of Pulse-Field Gel Electrophoresis for Subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. **Int. J. Environ. Res. Public Health**, v.10, n.7, p.2720-31, 2013.

HARINO, T., et al. Meropenem resistance in imipenem-susceptible meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates not detected by rapid automated testing systems. *J Clin Microbiol.*, v.51, n.8, p.2735–8, 2013.

HEALY, M.; HUONG, J., et al. Microbial DNA typing by automated repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.*, v. 43, p. 199–207, 2005.

HERRA, C.; FALKINER, F. R. *Serratia marcescens*. Disponível em: <<http://www.antimicrobe.org/b26.asp>>. Acesso em: 02 fev, 2017.

HIDRON, A. I., et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.29, p.996-1011, 2008.

HIGGINS, P. G., et al. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.233–8, 2010.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **J Anti Chem**, v.65, p. 1119–1125, 2010.

HONG, T., et al. *Escherichia coli*: Development of Carbapenem Resistance During Therapy. **Clin Infect Dis**, v.40, n.10, p.84-86, 2005.

HOSAM, M. Z., et al. The emerging threat of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in urology. **Nat Rev Urology**, v.12, p.570–584, 2015.

HRABAK, J., et al. Detection of carbapenemases in Enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. *Clinical Microbiology and Infection*. **Clin Microbiol Infect**, v.20, p. 839–853, 2014.

HUSSEIN, K., et al. Carbapenem resistance among *K pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, p. 666–671, 2009.

ITO, H., et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-*betalactamase* gene *bla*(IMP) among clinically isolated strains of *Serratia marcescens*. **Anti Agents and Chem**, v.39, n.4, p. 824–829, 1995.

JACOBY, G. AmpC β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v.22, p.161-82, 2009.

JERNBERG, C., et al. Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. **Microbiology**, v.156, p.3216-23, 2010.

JJIANG, Y., et al. Dissemination of a clone carrying a *fosA3*-harbouring plasmid mediates high fosfomycin resistance rate of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.45, p.66–70, 2015.

JOHNSON, A. P., et al. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-*betalactamase* (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol.**, v.62 ,p.499-513, 2013.

KAHAN, J. S., et al. Thienamycin, a new *betalactam* antibiotic. I. Discovery, taxonomy, isolation and physical properties. **J. Antibiot.**, v.32, p.1–12, 1979.

KAO, C. Y., et al. Overproduction of active efflux pump and variations of *OprD* dominate in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with bloodstream infections in Taiwan. **BMC Microbiol.**, v.16, n.1, p.107, 2016.

KIEDROWSKI, L. M., et al. Carbapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* Isolates Producing KPC-3, North Dakota, USA. **Emerging Infectious Diseases.**, v.20, n.9, p.1583-1585, 2014.

KITCHEL, B., et al. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *K pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p. 4201–7, 2010.

KOJIMA, S.; NIKAIDO, H. Permeation rates of penicillins indicate that *Escherichia coli* porins function principally as nonspecific channels. **Proc. Natl Acad. Sci. USA**, v. 110, p. 2629-2634, 2013.

KRITSOTAKIS, E. I., et al. Antibiotic use and the risk of carbapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infection in hospitalized patients: results of a double case-control study. **J Antimicrob Chemother**, v.66, v.6, p.1383-91, 2011.

KUMARASAMY, K.K., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis**, v.10, p. 597–602, 2010.

KWAK, Y. G., et al. Risk factors for the acquisition of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* among hospitalized patients. **Microb Drug Resist.**, v.11, p.165-9, 2005.

LADIRAT, S. E.; SCHOLS, H. A., et al. High-throughput analysis of the impact of antibiotics on the human intestinal microbiota composition. **J Microbiol Methods.**, v.92, n.3, p.387-97, 2013.

LASCOLS, C.; PEIRANO, G.; HACKEL, M., et al. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* that produce carbapenemases; the first report of OXA-48-like enzymes in North America. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, p. 130–136, 2013.

LAURETTI, L., et al. Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Anti Ag Chemother.**, v.43, p.1584-90, 1999.

LCF, LAHEY CLINIC FOUNDATION. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-**

Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 30 jan. 2017.

LEAVITT, A., et al. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.51, p.3026-9, 2007.

LEE, C. R., et al. Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection **Methods. Front. Microbiol.**, v.7, n.895, 2016.

LEE, J. H.; BAE, I. K.; LEE, S.H. New definitions of extended-spectrum betalactamase conferring worldwide emerging antibiotic resistance. **Med Res Rev.**, v.32, n.1, p.216-32, 2012.

LEE, K.; CHONG, Y., et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.7, n.2, p.88–91, 2001.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Ann Clin Microbiol Antimicrob.**, v.11, n.32, 2012.

LEFEBVRE, B., et al. Carbapenem non-susceptible enterobacteriaceae in Quebec, Canada: results of a laboratory surveillance program (2010-2012). **PLoS ONE**, v.10, 2015.

LEVINSON, W. *Microbiologia médica e imunologia*. 7 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

LEVY, S. B.; MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat. Med.**, v.10, p.122-129, 2004.

LI, J. J., et al. Epidemic of *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase RmtB in a Chinese University Hospital. **BMC Infect. Dis.**, v.12, n.373, 2012.

LI, J., et al. Analysis of an outbreak of *Klebsiella pneumoniae* by the DiversiLab system and pulsed-field gel electrophoresis. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n.39, p. 4717-4721, 2013.

LIGOZZI, M., et al. Comparative Evaluation of an Automated Repetitive-Sequence-Based PCR Instrument versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis in the Setting of a *Serratia marcescens* Nosocomial Infection Outbreak. **J. Clin. Microbiol.** v. 48, n.5, 1690-1695, 2010.

LINCOPAN, N., et al. First isolation of metallo-beta-lactamase producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.1, p.516–519, 2005.

LIU, P. Y., et al. Use of different PCR-based DNA fingerprinting techniques and pulsed-field gel electrophoresis to investigate the epidemiology of *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.29, n.1, p.19-28, 1997.

LIVERMORE, D. M. beta-lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.41, p.25–41, 1998.

LIVERMORE, D. M., et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. **J Antimicrob Chemother.**, v.66, n.1, p.48–53, 2011.

LIVERMORE, D. M., et al. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.37, p.415–419, 2011.

LU, C. L.; LIU, C. Y.; HUANG, Y. T., et al. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomycin determined by agar dilution and disk diffusion methods. **Antimicrobial Agents Chemother**, v.55, p. 4295-301, 2011.

LUBBERT, C., et al. Long-term carriage of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2-producing *K. pneumoniae* after a large single-center outbreak in Germany. **Am. J. Infect. Control**, v.42, p.376–380, 2014.

MAHAPATRA, B. R., et al. Comparison of five rep-PCR genomic fingerprinting methods for differentiation of fecal *Escherichia coli* from humans, poultry and wild birds. **FEMS Microbiol Lett**, v.277, n.1, p. 98-106, 2007.

MALATHUM, K., et al. Repetitive Sequence-Based PCR versus Pulsed-Field Gel Electrophoresis for Typing of *Enterococcus Faecalis* at the Subspecies Level. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, v.1 p. 211–215, 1998. Print.

MARCANO, D., et al. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v.2, n.3, p.241–244, 2008.

MARGATE, E., et al. KPC-PRODUCING *Serratia marcescens* IN A HOME-CARE PATIENT FROM RECIFE, BRAZIL. **Rev. Inst. Med. trop.** , v. 57, n. 4, p. 359-360, 2015 .

MARTINEZ, D., et al. KPC and VIM producing *Enterobacter cloacae* strain from a hospital in northeastern Venezuela. **Invest Clin.**, v.56, n.2, p.182-7, 2015.

MARTINEZ-MARTINEZ, L., et al. Roles of betalactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.43, p.1669-73, 1999.

MARTINEZ-MARTINEZ, L.; GONZALEZ-LOPEZ, J. J. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: types and molecular epidemiology. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v.32, n.4, p.4-9, 2014.

MARTINS, W. M., et al. Comparison of phenotypic tests for detecting BKC-1-producing Enterobacteriaceae isolates. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.84, n.3, p.246–248, 2016.

MATAR, G. M., et al. Spread of OXA-48-mediated resistance to carbapenems in Lebanese *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* that produce extended spectrum betalactamase. **Ann. Trop. Med. Parasitol**, v.104, p.271–274, 2010.

MERKIER, A. K., et al. *Serratia marcescens* Argentinean Collaborative Group, Centrón D. Outbreak of a cluster with epidemic behavior due to *Serratia marcescens* after colistin administration in a hospital setting. **J Clin Microbiol**, v.51, p. 2295-2302, 2013.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **J Bras Patol Med Lab**, v. 47, n. 1, p. 25-31, 2011.

MIRIAGOU, V., et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.16, n.2, p.112–122, 2010.

MONACO, M., et al. Colistin resistance superimposed to endemic carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*: a rapidly evolving problem in Italy November 2013 to April 2014. **Euro. Surveill.**, v.19, p.209-39, 2014.

MONTEALEGRE, M. C., et al. Colombian Nosocomial Resistance Study Group. Novel VIM metallo-betalactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.55, n.5, p.2428–2430, 2011.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F., et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.

MORFIN-OTERO, R., et al. Dissemination of a bla(VIM-2)-carrying integron among Enterobacteriaceae species in Mexico: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Microb. Drug Resist.**, v.15, n.1, p.33–35, 2009.

MOULOUDI, E., et al. Bloodstream infections caused by metallo-betalactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.31, p.1250-6, 2010.

MUÑOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L., et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis.**, v.3, p.785-96, 2013.

MUÑOZ-PRICE, L. S.; QUINN, J. P. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids, and transposons. **Clin. Infect. Dis.**, v.49, p.1739–1741, 2009.

MURPHY, T. A., et al. Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.47, n.2, p.582–587, 2003.

MURRAY, P. R., et al. *Microbiologia Médica*. 6 ed. Ed. Elsevier, 2009.

NAPARSTEK, L., et al. Biofilm formation and susceptibility to gentamicin and colistin of extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Antimicrob Chemother.**, v. 69, n.4, p.1027–1034, 2014.

NAVARRO, F., et al. Lectura interpretada del antibiograma de enterobacterias. **Enferm Infecc Micriobiol Clin**, v.28, p.638-45, 2010.

NGUYEN, M., et al. Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: factors correlated with clinical and microbiologic outcomes. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.67, p.180-4, 2010.

NICOLETTI, A. G., et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.59, n.9, p.5159–5164, 2015.

NÓBREGA, G. D. Investigação de beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp. isoladas de amostras clínicas obtidas em um hospital público de ensino de Campo Grande, MS. 2013. 52 f. Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, 2013.

NODARI, C. S., et al. Draft genome sequence of a GES-5-producing *Serratia marcescens* isolated in southern Brazil. **Braz J Microbiol.**, 2016.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: overview of a major public health challenge. **Med Mal Infect.**, v.44, n.2, p.51-6, 2014.

NORDMANN, P., et al. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends Mol Med.**, v.18, p.263-72, 2012.

NORDMANN, P., et al. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v.17, p.1791-1798, 2011.

NORDMANN, P., et al. Strategies for identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.68, n.3, p.487-489, 2013.

NORDMANN, P., et al. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol.** v. 19, n. 12, p. 588-95, 2011.

NORDMANN, P., et al. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v.9, p.228-36, 2009.

NORDMANN, P., et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin Microbiol Infect**, v.18, p. 432-8, 2012a.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: a call for action! **Clin Microbiol Infect.**, v. 18, n. 5, p. 411-2, 2012.

NORDMANN, P.; POIREL, L., et al. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg. Infect. Dis.**, v.18, n.9, p.1503-1507, 2012d.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **J Clin Microbiol**, v.37, n.6, p.1661-1669, 1999.

OLIVEIRA, M. V.; CARDOSO, A. M. A Importância da Detecção de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases pelo Teste de Hodge Modificado. **NewsLab**, v. 113, p. 168-172, 2012.

OSANO, E.; ARAKAWA, Y., et al. 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, n.1, p.71-78, 1994.

ÖSTERBLAD, M., et al. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.58, p.7553–7556, 2014.

OTEO, J., et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. **J Antimicrob Chemother.**, v.68, p.317-21, 2013.

OTMAN, J., et al. Atypical phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* isolates from an outbreak in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.273-277, 2007.

PAHO/OMS. Alerta epidemiológica: transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). 2012.

PAI, H., et al. Carbapenem resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.45, n.2, p.480–4, 2001.

Pan American Health Organization (PAHO). Informe Anual de la Red de Monitoreo/Vigilancia de la Resistencia a los Antimicrobianos y de Infecciones Asociadas a la Atención de la Salud. 2014.

PARDO, J. R. P., et al. Infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: Risk factors, clinical features and prognosis.

Enferm Infecc Microbiol Clin. v.32, n.4, p.41-48, 2014.

PARDO, J. R. P., et al. Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak. **J Antimicrob Chemother.**, v.68, p.89-96, 2013.

PASCUAL, A., et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: the end of the antibiotic era? **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v. 32, n. 4, p.1-3, 2014.

PASTERAN, F., et al. Evaluation of the Blue-Carba Test for Rapid Detection of Carbapenemases in Gram-Negative Bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, v.53, p.1996–1998, 2015.

PATEL, G., et al. Outcomes of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.29, p.1099-106, 2008.

PATTON, T. G., et al. Genotyping of clinical *Serratia marcescens* isolates: a comparison of PCR-based methods. **FEMS Microbiol Lett.**, v.194, n.1, p.19-25, 2001.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.53, n.6, 2009.

PEIRANO, G., et al. Carbapenem-hydrolysing betalactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.63, p.265-268, 2009.

PEIRANO, G., et al. Travel-related carbapenemase-producing Gram-negative bacteria in Alberta, Canada: the first 3 years. **J Clin Microbiol.**, v.52, p.1575-81, 2014.

PELEG, A. Y., et al. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria. *N Engl J Med.*, v. 362, n.19, p. 1804–1813, 2010.

PETRELLA, S., et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, p. 3725–3736, 2008.

PETROSILLO, N., et al. Clinical experience of colistin-glycopeptide combination in critically ill patients infected with Gram-negative bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.**, n.58, p. 851-8, 2014.

PFEIFER, Y., et al. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **Int J Med Microbiol.**, v.300, n.6, p.371-9, 2010.

PICAO, R. C., et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J Antimicrob Chemother.**, v.65, n.4, p.796–797, 2010.

PINHEIRO, H. M. H. Xenology of beta-lactamases: association of its genetic sources and putative pleiotropism. 63 f. Dissertação de Mestrado em Microbiologia Aplicada – Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Biologia Vegetal, Lisboa, 2013.

PIRES, J., et al. Blue-Carba, an Easy Biochemical Test for Detection of Diverse Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**, p. 51, n.12, p. 4281– 4283, 2013.

PIRES, J., et al. Comparison of the in-house made Carba-NP and Blue-Carba tests: Considerations for better detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Journal of Microbiological Methods**, v.122, p. 33–37, 2016.

PITOUT, J. D., et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.1, p.52-59, 2005.

PITOUT, J. D., et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*, a Key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.59, p.5873–5884, 2015.

PITOUT, J. D., et al. Using a commercial DiversiLab semiautomated repetitive sequence-based PCR typing technique for identification of *Escherichia coli* clone ST131 producing CTX-M-15. *J Clin Microbiol*, v.47, p. 1212-5, 2009.

POBOLELOVA, Y., et al. Multiplex PCR for joint amplification of carbapenemase genes of molecular classes A, B, and D. **Biochemistry (Moscow)**, v.79, n. 6, p. 566-570, 2014.

POIREL, L., et al. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiol.** v.2, p.501-12, 2007.

POIREL, L., et al. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.24–38, 2010.

POIREL, L., et al. Emergence of metallo-β-lactamase-NDM-1-producing multidrug resistant *Escherichia coli* in Australia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.4914–6, 2010.

POIREL, L., et al. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *K pneumoniae*. **Anti Ag Chem**, v.48, n.1, p.15-22, 2004.

POIREL, L., et al. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. **Anti Ag Chem**, v.56, p.559-62, 2012.

POIREL, L., et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis**, v.70, n.1, p.119–123, 2011b.

POIREL, L., et al. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, p.1597–606, 2012.

PONTIKIS, K., et al. Outcomes of critically ill intensive care unit patients treated with fosfomycin for infections due to pandrug-resistant and extensively drug-resistant carbapenemase-producing Gram-negative bacteria. **Int J Antimicrob Agents.**, v.43, n.1, p.52–59, 2014.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile-Lactamases. **Clin Micr Rev**, v.20, n. 3, p.440–458, 2007.

QUILES, M. G., et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Braz J Med Biol Res.**, v. 48, n. 2, p. 174-177, 2015 .

QUINONES, D., et al. Emergence of Klebsiella pneumoniae clinical isolates producing KPC-2 carbapenemase in Cuba. **New Microbes and New Infections**, v.2, n.4, p.123-126, 2014.

QURESHI, Z. A., et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing Klebsiella pneumoniae: superiority of combination antimicrobial regimens. **Anti Agents Chem**, v.56, p.2108-13, 2012.

RAPP, R. P.; URBAN, C. Klebsiella pneumoniae carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. **Pharmacotherapy**, v.32, p.399-407, 2012.

RATKAI, C.; QUINTEIRA, S., et al. Controlling for false positives: interpreting MBL Etest and MBL combined disc test for the detection of metallo-beta-lactamases. **J. Anti Chem**. v.64, n.3, p. 657-658, 2009.

RIBEIRO, V. B., et al. Molecular characterization of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. **J Med Microbiol**, v.62, p.1721-1727, 2013.

ROBLEDO, I. E., et al. Detection of KPC in Acinetobacter spp. in Puerto Rico. **J. Antimicrob. Agents Chem.**, v.54, p.1354-1357, 2010.

ROCK, C., et al. Frequency of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing Klebsiella species contamination of healthcare workers and the environment. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v.35, p. 426-429, 2014.

RODRIGUEZ-BAÑO, J., et al. Treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Enferm Infecc Microbiol Clin.**, v.32, p.49-55, 2014.

ROJAS, L. J., et al. Emergence of Klebsiella pneumoniae coharboring KPC and VIM carbapenemases in Colombia. **Anti Agents Chemother.**, v.57, n.2, p.1101-1102, 2013.

ROSALEZ, F. P., et al. Emergence of NDM -1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. **Int J Infect Dis.**, v.25, p.79–81, 2014.

RUGAI & ARAÚJO. Meios de cultura para identificação presuntiva de bacilos intestinais gram-negativos. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 28:79-83 1968

SADER, H. S.; FARRELL, D. J., et al. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in United States and European hospitals (2009-2011). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.78, p. 443-448, 2014.

SADFAR, N.; MAKI, D. G. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant Staphylococcus aureus, enterococcus, gram-negative bacilli, Clostridium difficile, and Candida. **Ann Intern Med**, v.136, p.834-44, 2002.

SALABI, A. E., et al. First report of the metallo-beta-lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, n.1, 2010.

SAMONIS, G., et al. Trends of isolation of intrinsically resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a tertiary hospital. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.33, p.1505–1510, 2014.

SAMPAIO, J. L. M., et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-Related Class D beta-lactamase, in Enterobacter hormaechei from Brazil. **Anti Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 6, p.3566-3567, 2014.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Braz. J. Microbiol.**, v. 47, supl. 1, p. 31-37, 2016 .

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto contexto - enferm.*, Florianópolis, v. 13, 2004.

SCHECHNER, V., et al. Predictors of rectal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE) among patients with known CRE

carriage at their next hospital encounter. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.32, p.497-503, 2011.

SCHEFFER, M. C., et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clonal spread in southern Brazil and in the state of Goiás. **Braz J Infect Dis**, v.14, n.5, p.508-509, 2010.

SCHJORRING, S.; KROGFELT, K. A. Assessment of bacterial antibiotic resistance transfer in the gut. **Int J Microbiol.** v. 31, 2011.

SCHWABER, M. J., et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. **Anti Agents Chem.**, v.52, p.1028-33, 2008.

SEAH, C., et al. Comparative evaluation of a chromogenic agar medium, the modified Hodge test, and a battery of meropenem-inhibitor discs for detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol.**, v.49, p.1965–1969, 2011.

SEIBERT, G., et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. **Einstein.**, v.12, n.3, p.282-6, 2014.

SHAH, P. M. Parenteral carbapenemas. **Clinical microbiology and infection**, v. 14, p. 175-180, 2008.

SHARAN, H., et al. Emergence of Hospital Acquired Carbapenem Resistant Non-Fermenters in Teaching Institute. **J Clin Diagn Res.**, v.10, n.12, p.20-23, 2016.

SHIGEMOTO, N., et al. Emergence in Japan of an imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-6. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.72, n.1, p.109–12, 2012.

SHIN, K. S. Molecular Typing of *Serratia marcescens* by RAPD, ERIC-PCR and REP-PCR. **Annals of Lab Medicine**, v.23, p.119-125, 2003.

SIDJABAT, H. E., et al. Dominance of IMP-4-Producing *Enterobacter cloacae* among Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in Australia. **Anti Ag Chem.**, v.59, n.7, p.4059-4066, 2015.

SILVA, K. E., et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from an outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **J Clin Microbiol.**, v.53, n.7, p.2324–2328, 2015.

SOARES, V. M. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing (KPC) in a tertiary hospital. **J Bras Patol Med Lab.**, v.48, n.4, p.251-3, 2012.

SOKAL, R. R., ROHLF, F. J. The Comparison of Dendrograms by Objective Methods. **International Association for Plant Taxonomy**, v.11, p.33-40, 1962.

SOOD, S. Identification and Differentiation of Carbapenemases in *Klebsiella Pneumoniae*: A Phenotypic Test Evaluation Study from Jaipur, India. **J of Clin and Diag Research**, v. 8, n.7, p. 01-03, 2014.

SOULI, M., et al. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. **Antim Agents Chem**, v.55, p.2395-7, 2011.

STUMPF, A. N., et al. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the Enterobacter cloacae complex. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.53, p. 9–16, 2005.

SWAMINATHAN, M., et al. Prevalence and risk factors for acquisition of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in the setting of endemicity. **Infect Control Hosp Epidemiol.**, v.34, p.809-17, 2013.

TAMMA, P. D., et al. A Comparison of Eleven Phenotypic Assays for the Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, 2017.

TAMMA, P. D.; et al. Determining the Optimal Carbapenem MIC That Distinguishes Carbapenemase-Producing and Non-Carbapenemase-Producing Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.60, p.6425-6429, 2016.

- TANGDEN, T.; GISKE, C. G. Global dissemination of extensively drugresistant carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: clinical perspectives on detection, treatment and infection control. **J. Intern. Med.**, v.277, p.501–512, 2015.
- TARTARI, D. C. Rastreo, identificação e caracterização genética de *Acinetobacter* spp. Isolados de ambiente hospitalar. 2016. 130f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.
- TAVARES, C. P., et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-Klebsiella pneumoniae) isolated from Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.82, n.4, p.326-330, 2015.
- TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control**, v.34, n.5, p.3-10, 2006.
- TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233-2239, 1995.
- TIKET, N., et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. **Anti Agents Chemother.**, v.57, n.9, p.4578–4580, 2013.
- TIPPER, D. J.; STROMINGER, J. L. Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. **Proc. Natl Acad. Sci.** v.54, p.1133–1141, 1965.
- TOFTELAND, S., et al. A Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental Reservoir. **Plos One**, v. 8, n. 3, p. 1-8, 2013.
- TREVIÑO, M., et al. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.28, p. 1253-1258, 2009.

TSAKRIS, A., et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1664-1671, 2010.

TSAKRIS, A., et al. Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the Clinical Laboratory. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, n. 2, p.362-367, 2009b.

TSAKRIS, A., et al. Use of Boronic Acid Disk Tests To Detect Extended-Spectrum beta-lactamases in Clinical Isolates of KPC Carbapenemase-Possessing *Enterobacteriaceae*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 47, p. 3420-3426, 2009.

TUMBARELLO, M., et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin Inf Dis**, v.55, p. 943-50, 2012.

TUON, F. F., et al. Fosfomicin susceptibility of isolates with blaKPC-2 from Brazil. **J Infect**, v.67, p. 247-249, 2013.

TZOUVELEKIS, L. S., et al. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, p.682-707, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S., et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.20, p.862-872, 2014.

USITC, United States International Trade Commission. Brazil: Competitive Factors in Brazil Affecting U.S. and Brazilian Agricultural Sales in Selected Third Country Markets. Washington, DC: USITC, 2012. Disponível em: <<https://www.usitc.gov/publications/332/pub4310.pdf>>. Acesso em: 10 fev, 2017.

VAN BOECKEL, T. P., et al. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. **The Lancet Infectious Diseases**, v.3099, n.14, p.1-9, 2014.

- VAN BOECKEL, T. P., et al. Global Trends in Antimicrobial Use in Food Animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.112, n.18, p.5649-54, 2015.
- VARGIU, A. V., et al. Multidrug binding properties of the AcrB efflux pump characterized by molecular dynamics simulations. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v.109, p.20637–20642, 2012.
- VATOPOULOS, A. High rates of metallo-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. **Euro Surveill.**, v.13, 2008.
- VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T., et al. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research.**, v.19, n.24, p.6823-6831, 1991.
- VESPERO, E. C. Caracterização e Epidemiologia Molecular de Cepas de *Klebsiella pneumoniae* Produtoras de ESBLs Isoladas de Pacientes do Hospital Univesitário de Londrina, no período de 2000-2004. 2007. 90f. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2007.
- VIDAL, L., et al. Efficacy and safety of aminoglycoside monotherapy: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **J Antimicrob Agents**. v.60, p.247-57, 2007.
- VILLEGAS, M. V., et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.51, p. 1553-1555, 2007.
- WALSH, T. R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **Int J Antimicrob Agents**, v.36, p.8-14, 2010.
- WALSH, T. R., et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev**, v.18, p. 306–25, 2005.
- WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A., et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.**, v.18, p.306-25, 2005.

WALTHER-RASMUSSEN, J., et al. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.**, v.60, p.470-82, 2007.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.**, v.57, p. 373–83, 2006.

WATANABE, M., et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Anti Agents Chem**, v.35, n.1, p. 147–151, 1991.

WEF, World Economic Forum. The Global Risks Report 2017, 12 Edition, 2017. Disponível em <www3.weforum.org/docs/GRR17_Report_web.pdf>. Acesso em: 17 jan, 2017.

WEI, Z. Q., et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Anti Agents Chem.** v.51, p.763-5, 2007.

WHO, World Health Organization. Antimicrobial resistance. Draft global action plan on antimicrobial resistance, 2014

WHO. World Health Organization. Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance, 2014.

WINN, W.C., et al. Koneman, diagnóstico microbiológico : texto e atlas colorido. 6ª edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

YAMACHIKA, S.; SUGIHARA, C., et al. Correlation between penicillinbinding protein 2 mutations and carbapenem resistance in *Escherichia coli*. **J Med Microbiol.**, v.62, p.429-36, 2013.

YIGIT, H., et al. Novel carbapenem hydrolyzing betalactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.45, p. 1151-61, 2001.

YOHEI, D., et al. Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. **Semin Respir Crit Care Med.**, v.36, n.1, p. 74–84, 2015.

ZARKOTOU, O., et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC producing *Klebsiella*

pneumoniae and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clin Microbiol Infect**, v.17, p. 1798-803, 2011.

ZAVASCKI, A. P., et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Anti Agents**, v.34, p. 286–288, 2009.

ZHANG, R., et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **J Antimicrob Chemother**, v.59, p. 574–576, 2007.

ZHAO, W. H.; HU, Z. Q. IMP-type metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacilli: distribution, phylogeny, and association with integrons. **Crit Rev Microbiol.**, v. 37, p. 214-26, 2011.

ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR
APLICADA (MIMA)**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa:

“Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar”.

Informações:

Pesquisadores da Universidade Federal de Santa Catarina estão desenvolvendo um projeto de pesquisa para melhorar o rastreamento e identificação de bactérias associadas aos eventos de infecção hospitalar, em especial aquelas que apresentam resistência ao tratamento com antimicrobianos. Para isso, pedimos a sua permissão para realizar a análise de seu material biológico, além de coletar informações clínicas a respeito de sua internação por meio de entrevista e acesso ao seu prontuário médico. Se houver identificação de alguma bactéria patogênica ela poderá ser caracterizada através de métodos que irão possibilitar o melhoramento do processo de rastreamento desse microrganismo. Deixamos claro que sua participação é voluntária e que ela não influenciará nas suas atividades dentro do hospital, atendimento ou tratamento. Você poderá obter todas as suas informações e poderá retirar seu consentimento a qualquer momento. A equipe agradece antecipadamente sua colaboração e se coloca à disposição para responder qualquer pergunta ou esclarecer dúvidas que porventura apareçam. Para isso, você poderá telefonar para o número **(47) 9195-0318** com a mestrand **Suellen Gavronski**. Você poderá entrar em contato também com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFSC – através do endereço Campus Universitário Reitor João David Ferreira Lima Bairro Trindade, CEP 88.040-900 Florianópolis/SC, pelo telefone (48) 3721-9206 ou e-mail cep@reitoria.ufsc.br.

Procedimentos:

Caso você concorde em participar, você irá responder um questionário de duração aproximada de 15 minutos, para sabermos seu

histórico de internações, infecções hospitalares que já tenha tido, hábitos de higienização, etc. As análises serão realizadas em amostras previamente coletadas, sendo guardadas no Laboratório de Microbiologia Clínica sob responsabilidade da coordenadora do projeto. Nenhuma coleta será realizada para a realização da pesquisa.

Riscos:

A análise do material biológico para verificar a presença de bactérias associadas às infecções hospitalares é um procedimento normal e rotineiro dentro do hospital, que não influenciam em suas atividades no hospital ou em seu atendimento. Os possíveis riscos incluem a possibilidade de contaminação do ambiente pelos executores da pesquisa e o constrangimento do paciente ao responder o questionário proposto. As informações clínicas coletadas, bem como os resultados das análises microbiológicas e moleculares, serão mantidos em sigilo e serão utilizados somente pela equipe da pesquisa.

Custos:

Você não precisará pagar nada para fazer parte deste estudo

Benefícios:

Você não terá nenhum benefício direto ao participar desta pesquisa, mas os resultados deste estudo poderão proporcionar no futuro métodos mais eficientes de prevenção de infecções hospitalares, atuando no rastreamento contínuo e na rápida identificação da infecção, podendo beneficiar muitas outras pessoas.

Rubricas

DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO

Eu, _____, carteira de identidade no _____, órgão expedidor _____, fui esclarecido sobre a pesquisa “Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar” e compreendi o propósito e a relevância deste estudo e os procedimentos aos quais serei submetido. As explicações que recebi esclarecem os riscos e benefícios do estudo. Eu entendi que tenho liberdade para interromper minha participação a qualquer momento, sem justificar minha decisão e que isso não me trará nenhum prejuízo. Sei que meu nome não será divulgado, que não terei despesas e não receberei qualquer pagamento por participar do estudo. Concordo que meus dados sejam utilizados na realização da pesquisa citada acima. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador responsável, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do voluntário ou responsável legal:

Em caso de assinatura pelo responsável legal:

Nome completo do responsável legal: _____

RG/órgão expedidor: _____

Grau de parentesco com o voluntário: _____

Assinatura da pesquisadora responsável:

Prof. Dra. Thaís C. M. Sincero

Florianópolis, ____ de _____ de _____.

ANEXO 2
Questionário pacientes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
LABORATÓRIO DE MICROBIOLOGIA MOLECULAR
APLICADA (MIMA)

QUESTIONÁRIO – PACIENTES

Projeto de Pesquisa:

“Rastreamento, identificação e caracterização molecular de bactérias multirresistentes em ambiente hospitalar”.

Entrevistador: _____ **Assinatura:** _____

Data da entrevista e coleta: ___/___/_____

Setor onde foi realizada a entrevista:

Emergência Unidade de internação UTI Centro Cirúrgico

Nome do voluntário: _____

Nº do prontuário médico: _____

Identificação (MIMA): CL _____ a _____

Dados pessoais do voluntário:

Endereço: _____

Cidade/Estado: _____ Telefone residencial: _____

Telefone comercial: _____ Celular: _____

Data de nascimento: _____ Sexo: M F Profissão: _____

Dados médicos (dados coletados em entrevista com o voluntário ou consulta ao prontuário médico):

Motivo de atendimento no hospital: consulta ambulatorial
atendimento emergência cirurgia eletiva cirurgia emergência
transferência de outro hospital

Unidade e tempo de internação: emergência ambulatório UTI
CC

1 dia 2-3 dias 4-5 dias 1-2 semanas 2-4 semanas 1-2
meses > 2 meses

Cirurgia realizada (tipo/local): _____ Data: _____
 Desenvolveu algum tipo de infecção durante a estadia no hospital? ()
 Sim () Não
 Local/tipo da infecção: _____
 Microrganismo identificado: _____
 Medicamentos utilizados no tratamento da infecção:

 Tempo de tratamento da infecção: _____
 Foi identificado, através das culturas de vigilância, a colonização por
 algum microrganismo durante a estadia no
 hospital? _____

Histórico Médico:

Esteve internado ou frequentou alguma unidade de saúde nos últimos 12
 meses? () Sim () Não
 Tipo de unidade de saúde: _____
 Tempo de internação, permanência ou frequência:

 Realizou alguma cirurgia nos últimos 12 meses? () Sim () Não
 Cirurgia realizada (tipo/local): _____ Data: _____
 Teve alguma infecção durante o período de internação, permanência
 ou frequência na unidade de saúde ou após a cirurgia? () Sim () Não
 Local/tipo da infecção: _____
 Micro-organismo identificado: _____
 Medicamentos utilizados no tratamento da infecção:

 Tempo de tratamento da infecção: _____
 Possui alguma doença infecciosa (DSTs (Doenças Sexualmente
 Transmissíveis), tuberculose, etc.)? _____
 Possui alguma doença crônica (Diabetes, hipertensão, etc.)?

 Possui alguma condição de imunodepressão (Pós-transplantado,
 portador de HIV, câncer, etc.)?
