
**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESBL, CARBAPENEMASE DO TIPO
KPC E PORINAS COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE
Klebsiella pneumoniae E *Enterobacter* spp.**

MARILUCE DA ROCHA JASKULSKI

Março, 2013

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E
CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

**AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE ESBL, CARBAPENEMASE DO TIPO
KPC E PORINAS COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE
Klebsiella pneumoniae E *Enterobacter* spp.**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutora.

MARILUCE DA ROCHA JASKULSKI

ORIENTADORA: PROF^a. DR^a. DENISE CANTARELLI MACHADO

Março, 2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO

J39a Jaskulski, Mariluce da Rocha

Avaliação da presença de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas como mecanismo de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp / Mariluce da Rocha Jaskulski. Porto Alegre: PUCRS, 2013.

131f.: il. tab. Inclui artigo encaminhado para publicação.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Cantarelli Machado.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. ERTAPENEM. 2 ESBL. 3. KPC. 4. OMPC. 5. OMPF. 6. RESISTÊNCIA. 5. ESTUDO DE SÉRIE DE CASOS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

CDD 616.014
CDU 577.27(043.2)
NLM WC 195

Isabel Merlo Creso
Bibliotecária CRB 10/1201

*Dedico este trabalho a minha família,
pela compreensão das horas ausentes,
pelo incentivo e companheirismo.*

AGRADECIMENTOS

À Professora Denise Cantarelli Machado, minha orientadora, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade e generosidade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Meus respeitosos agradecimentos pela contribuição da banca do exame de qualificação e pela participação dos membros da banca examinadora da defesa.

À todos os estagiários e amigos do Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, pela forma carinhosa como sempre fui recebida, especialmente a Bruna Chagas Medeiros, Daniel Marinowick, Ricardo Zalewski, Juliano Borges e Miguel Cunha, pela disponibilidade manifestada, pelo incansável acompanhamento e apoio nos trabalhos realizados.

Às minhas amigas e ex-colegas Estér Tesser e Maria do Carmo Fontoura Pereira, sempre gentis, alegres e disponíveis, esclarecendo minhas dúvidas em alguns momentos, pela amizade e carinho.

Ao meu esposo, Paulo Roberto Medeiros Jaskulski, que sempre me estimula a crescer científica e pessoalmente. Acima de tudo, pelo inestimável apoio familiar e pela paciência e compreensão reveladas ao longo destes anos.

Aos meus filhos, Lucas e Paula, pela compreensão sempre manifestada, apesar da falta de atenção e ausência. Espero que o entusiasmo, seriedade e empenho que dedico ao trabalho lhes possa servir de estímulo para fazerem sempre “mais e melhor”.

À minha mãe, Maria Edy Pereira da Rocha, que sempre me apoiou incondicionalmente e que seguramente compartilha da minha alegria em todas as etapas da minha vida.

Ao meu irmão, Marion Pereira da Rocha, merece todo meu agradecimento e reconhecimento pela excelente amizade e apoio manifestado ao longo dos anos.

À Deus por me amparar nos momentos difíceis, por me dar energia e sabedoria para superar as dificuldades.

Agradeço as seguintes Instituições pelo apoio, condições de trabalho que me proporcionaram sem os quais não seria possível a concretização deste trabalho.

Instituto de Pesquisas Biomédicas PUCRS;

Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Nossa Senhora da Conceição;

Laboratório de Patologia Clínica do Hospital São Lucas da PUCRS;

Laboratório Enzilab;

Laboratório de Microbiologia da URI-Erechim;

Laboratório Ribeiro;

Unimed Erechim

Mais uma vez, a todos os meus mais sinceros agradecimentos.

*“Se as coisas são inatingíveis...ora!
não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
a mágica presença das estrelas!”*

Mário Quintana

RESUMO

A emergência e disseminação dos mecanismos de resistência em bacilos Gram-negativos têm complicado o tratamento de sérias infecções nosocomiais. Devido à ineficácia dos sistemas automatizados na detecção de isolados produtores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase) há a necessidade do desenvolvimento de melhores metodologias. Uma possibilidade é avaliar os isolados quanto à resistência ao ertapenem, o qual tem maior sensibilidade para detectar a expressão dos isolados produtores de KPC. Contudo, a especificidade pode ser reduzida devido à resistência conferida por outros mecanismos, tais como a expressão do gene *AmpC* ou a produção de ESBL associado a perda de porina. Este estudo incluiu 128 amostras de bacilos Gram-negativos de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem. O método de disco difusão e E-test[®] foram aplicados para determinar a suscetibilidade para imipenem, meropenem e ertapenem. Os isolados com suscetibilidade intermediária e resistentes para ertapenem foram avaliados e posteriormente foram investigados os mecanismos de resistência através da presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{KPC} para *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp., por meio da técnica de PCR. A presença de proteína da membrana externa (OMP) foi investigada por meio de *dot blot*. O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 52,9% e 10,3%; *bla*_{SHV} em 29,4% e 0,94%; *bla*_{CTX-M} em 41,4% e 1,9% e *bla*_{CTX-M-2} em 23,5% e 1,9% dos isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., respectivamente. O gene *bla*_{KPC} estava presente em 12,6% dos isolados de *Enterobacter* spp. As porinas OmpC e OmpF estavam presentes, concomitantemente, em 3,8% dos isolados de *Enterobacter cloacae*. A detecção da presença dos genes de resistência e as proteínas da membrana externa nos isolados produtores de carbapenemases indica que eles podem estar associados aos diversos mecanismos de resistência, contribuindo para a falha terapêutica e apontando para a necessidade de melhores métodos de detecção e estratégias de vigilância.

Palavras-chave: ertapenem, ESBL, KPC, OmpC, OmpF, resistência.

ABSTRACT

The emergence and spread of resistance mechanisms in Gram-negative bacilli have complicated the treatment of serious nosocomial infections. Due to the ineffectiveness of the automated detection of KPC producer isolates there is a need to develop better methodologies. One possibility is to evaluate the ertapenem resistance, which has greater sensitivity to detect the expression of KPC producing isolates. However, the specificity may be reduced due to the resistance attributed to other mechanisms, such as AmpC gene expression or ESBL production associated with the loss of porin. This study included 128 samples of Gram-negative bacilli of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. resistant to ertapenem. Disk diffusion and E-test[®] method were applied to determine the susceptibility to imipenem, meropenem and ertapenem. Isolates intermediate and resistant to ertapenem were evaluated and additional resistance mechanisms conferred by *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{KPC} for *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* genes were investigated by PCR technique. The presence of outer membrane protein (OMP) was investigated by dot blot. The gene *bla*_{TEM} was detected in 52.9% and 10.3%; *bla*_{SHV} in 29.4% and 0.94%; *bla*_{CTX-M} in 41.4% and 1.9%, and *bla*_{CTX-M-2} in 23.5% and 1.9% of *K. pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates, respectively. *bla*_{KPC} gene was present in 12.6% of *Enterobacter* spp. isolates. The OmpC and OmpF were present in 3.8% of *Enterobacter cloacae* isolates. Resistance genes and outer membrane proteins carbapenemases producing strains indicates that several resistance mechanisms contribute to therapeutic failure and point to the need for better detection methods and surveillance strategies.

Keywords: ertapenem, ESBL, KPC, OmpC, OmpF, resistance.

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das Beta-Lactamases[12].	20
Tabela 2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana para os 15 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
Tabela 3. Desempenho dos métodos de suscetibilidade para detectar resistência mediada por KPC [71]......	35
Tabela 4. Esquemas terapêuticos sugeridos para o tratamento de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos[127].	46
Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores relacionados aos genes de carbapenemase e ESBLs.....	54
Tabela 6. Frequência dos isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterobacter</i> spp. de acordo com o sítio de infecção.	59
Tabela 7. Resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana pelos métodos de E-test [®] e Disco Difusão dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL e <i>Enterobacter</i> spp. aos antibióticos imipenem, meropenem e ertapenem.....	64
Tabela 8. Padrão de sensibilidade (CIM) de 128 amostras resistentes e intermediárias ao ertapenem de acordo com o microrganismo isolado.....	66
Tabela 9. Classificação das concordâncias e erros entre os dois métodos de detecção de suscetibilidade aos antimicrobianos empregados neste estudo*	67
Tabela 10. Amostras positivas no teste de triagem para detecção de ESBL.....	68
Tabela 11. Amostras positivas no teste confirmatório para ESBL.	69
Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima dos carbapenens e genes que codificam as β -lactamases para os isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	71
Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima dos carbapenens e genes que codificam as β -lactamases para os isolados de <i>Enterobacter cloacae</i>	74
Tabela 14. Característica dos 14 isolados produtores de KPC dos pacientes do estudo.	78
Tabela 15. CIMs dos agentes antimicrobianos para cepas de <i>Enterobacter cloacae</i> que apresentaram OmpC e OmpF.	81
Tabela 16. Percentual (%) de ausência de porinas em isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> produtores e não produtores de KPC.....	83
Tabela 17. Presença de genes envolvidos em mecanismos de resistência e CIM ao ertapenem presente nos isolados do estudo.	84

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1. Disseminação internacional de <i>Enterobacteriaceae</i> produtora de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).[58].....	29
Figura 2. Disseminação nacional de <i>Enterobacteriaceae</i> produtora de <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC).....	31
Figura 3. Teste Modificado de Hodge.[71]	37
Figura 4. Teste utilizando ácido borônico.[77]	38
Figura 5. Distribuição por grupos etários dos pacientes avaliados nas 128 amostras bacterianas.....	60
Figura 6. Principais doenças de base dos pacientes infectados com <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtor de ESBL e <i>Enterobacter</i> spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem dos dois hospitais de Porto Alegre/RS.....	61
Figura 7. Frequência da distribuição por Unidade de Internação dos pacientes analisados nas amostras do estudo.	62
Figura 8. Teste de suscetibilidade por Disco Difusão e E-test [®]	65
Figura 9. Teste de triagem positivo para ESBL.....	68
Figura 10. Teste confirmatório para ESBL através do método de disco combinado.	69
Figura 11. Produto da amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{TEM} para os isolados de <i>K. pneumoniae</i>	73
Figura 12. Produto da amplificação por PCR dos genes <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{CTX-M-2} para os isolados de <i>K. pneumoniae</i>	73
Figura 13. Produto de amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{TEM} para os isolados de <i>Enterobacter cloacae</i>	74
Figura 14. Produto de amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{CTX-M} para os isolados de <i>Enterobacter cloacae</i>	75
Figura 15. Produto de amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{CTX-M-2} para os isolados de <i>Enterobacter cloacae</i>	75
Figura 16. Produto da amplificação por PCR do gene <i>bla</i> _{KPC}	76
Figura 17. <i>Dot blot</i> de duas amostras positivas para a porina OmpF de <i>Enterobacter cloacae</i>	80

LISTAS DE ABREVIATURAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AVC	Acidente vascular cerebral
CA	Câncer
CCIH	Comissão de controle de infecção hospitalar
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DM	<i>Diabetes Mellitus</i>
DPOC	Doença pulmonar obstrutiva crônica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERC	Enterobactérias resistentes aos carbapenens
ESBL	Beta-lactamase de espectro ampliado, do inglês: Extended-spectrum beta-lactamase
HAS	Hipertensão arterial sistêmica
HBP	Hiperplasia benigna de próstata
IRC	Insuficiência renal crônica
ITU	Infecção do trato urinário
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> produtora de carbapenemase
MLB	Metallo-beta-lactamase
MPA	Ácido mercaptoacético
NNIS	<i>National Nosocomial Infections Surveillance</i>
OMP	Proteína de membrana externa, do inglês: Outer membrane protein

PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês: Polymerase chain reaction
------------	--

TMH	Teste modificado de Hodge
------------	---------------------------

UTI	Unidade de tratamento intensivo
------------	---------------------------------

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS BETA-LACTAMASES	19
2.2 AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	21
2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA RELACIONADOS AOS CARBAPENÊMICOS.....	21
2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos em <i>Enterobacteriaceae</i>	21
2.4 PREVALÊNCIA DAS CEPAS PRODUTORAS DE ESBL.....	23
2.5 HISTÓRICO E PREVALÊNCIA DA FAMÍLIA KPC	24
2.6 FATORES DE RISCO RELACIONADOS COM CO-MORBIDADES DE PACIENTES COM INFECÇÕES CAUSADAS POR CEPAS PRODUTORAS DE KPC	31
2.7 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> E <i>Enterobacter</i> spp.	32
2.7.1 Teste de triagem para detecção da produção de carbapenemases	35
2.7.2 Teste fenotípico confirmatório.....	36
2.7.2.1 Teste Modificado de Hodge (TMH)	36
2.7.2.2 Teste do disco com ácido borônico	37
2.7.3 Métodos moleculares.....	38
2.7.3.1 Detecção de ESBL.....	38
2.7.3.2 Detecção de KPC.....	40
2.7.4 Análise de porinas da membrana externa	40
2.8 VIGILÂNCIA DE CEPAS PRODUTORAS DE KPC.....	42
2.9 ANTIBIOTICOTERAPIA FRENTE ÀS CEPAS PRODUTORAS DE KPC	43
3 OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL.....	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4 MATERIAIS E MÉTODOS	48
4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	48
4.1.1 Local de realização do estudo	48
4.1.2 Desenho do estudo.....	48
4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO	49

4.2.1	Identificação dos pacientes.....	49
4.2.2	Fatores relacionados com a infecção em pacientes por <i>Klebsiella pneumoniae</i> e de <i>Enterobacter</i> spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem	49
4.3	AVALIAÇÃO FENOTÍPICA	50
4.3.1	Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos	50
4.3.2	ESBL.....	51
4.3.2.1	Teste de Triagem	51
4.3.2.2	Teste Confirmatório.....	52
4.4	DIAGNÓSTICO MOLECULAR	52
4.4.1	Extração do DNA	53
4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	53
4.4.3	Análise fenotípica de porinas de membrana externa	55
4.4.3.1	Extração de porinas de membrana externa	55
4.4.3.2	Análise das porinas de membrana externa por <i>Dot blot</i>	56
4.5	TAMANHO AMOSTRAL	56
4.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	57
4.7	ASPECTOS ÉTICOS	57
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1	CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO	58
5.2	COMPARAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS OBTIDOS PELOS MÉTODOS KIRBY-BAUER (DISCO DIFUSÃO) E E-TEST [®]	63
5.3	EXPRESSÃO DE ESBL NAS CEPAS DE <i>K. pneumoniae</i> E <i>Enterobacter</i> spp.	67
5.3.1	Teste de Triagem.....	67
5.3.2	Teste Confirmatório por Disco Combinado	69
5.4	DETECÇÃO DOS GENES <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{CTX-M-2}	70
5.5	DETECÇÃO DO GENE <i>bla</i> _{KPC}	76
5.6	AVALIAÇÃO DAS PORINAS	80
	CONCLUSÃO.....	86
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS.....	105
	ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO COORDENADORA DO PG EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE	106
	ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	107

ANEXO C - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO	108
ANEXO D - DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DO PROJETO DAS CHEFIAS DO SERVIÇO	109
ANEXO E - DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DO PROJETO DE PESQUISA DAS CHEFIAS DE SERVIÇO DO HNSC	110
ANEXO F - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	111
ANEXO G - ARTIGO ORIGINAL.....	112

1 INTRODUÇÃO

A emergência e disseminação dos mecanismos de resistência em bacilos Gram-negativos têm complicado o tratamento de sérias infecções nosocomiais. Os agentes antimicrobianos beta-lactâmicos que geralmente eram empregados como agentes terapêuticos altamente eficazes contra os patógenos Gram-negativos, agora encontram diferentes mecanismos de resistência em espécies de *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Entre os mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, as beta-lactamases são preocupantes pelo seu potencial em desenvolver mutações, que podem ampliar seu espectro de hidrólise contra diferentes beta-lactâmicos, assim como sua habilidade de disseminação[1].

A *Klebsiella pneumoniae* é um patógeno nosocomial frequente, sendo a quarta e quinta causa de pneumonia e bacteremia, respectivamente, em unidades de cuidados intensivos de pacientes. Durante os anos de 1990, espécies de *Klebsiella* foram emergentes por possuírem beta-lactamases de espectro ampliado (ESBLs), conferindo resistência às cefalosporinas. De acordo com dados do *National Nosocomial Infections Surveillance* (NNIS), a resistência à cefalosporina tem sido encontrada em 14% de todos os isolados de *K. pneumoniae* obtidos de áreas de unidades de cuidados intensivos, e conforme a região esta porcentagem pode ser muito mais alta. A falha do tratamento clínico tem sido observada quando infecções causadas por isolados produtores de ESBL foram tratadas com cefalosporinas. Muitos destes patógenos são também resistentes aos antibióticos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, assim os carbapenens têm sido considerados a escolha para tratar sérias infecções causadas por estes patógenos portadores de ESBL[2].

O *Enterobacter* spp. é o terceiro patógeno mais comum causador de pneumonia e o quinto patógeno mais comum causador de sepse e infecções em sítios cirúrgicos em pacientes internados em centros de tratamentos intensivos nos Estados Unidos[3]. Embora aproximadamente 25% sejam resistentes às cefalosporinas de amplo espectro, o *Enterobacter* spp. resistente ao carbapenem ainda é encontrado raramente[4]. A resistência aos carbapenens em *Enterobacter aerogenes* tem sido atribuída à hiperprodução de cefalosporinase cromossômica e perda das porinas[5, 6].

As carbapenemases são beta-lactamases que podem degradar um amplo espectro de antibióticos beta-lactâmicos. Apesar do termo mais adequado ser de enzimas que hidrolisam carbapenêmicos, o termo carbapenemases tem sido amplamente utilizado na literatura, dada a importância dessa classe de fármacos na prática clínica.

Devido à ineficácia dos sistemas automatizados na detecção de isolados produtores de KPC (*K. pneumoniae* produtora de carbapenemase), há a necessidade do desenvolvimento de melhores metodologias. Uma possibilidade é avaliar os isolados quanto à resistência ao ertapenem, o qual tem maior sensibilidade para detectar os microrganismos produtores de KPC[7]. Contudo, a especificidade pode ser reduzida devido à resistência conferida por outros mecanismos, tais como AmpC ou a produção de ESBL associados à perda de porinas[8].

O presente estudo consistiu na avaliação da produção de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas em *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., visando verificar a relação dos mecanismos moleculares de resistência nos isolados clínicos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

O gênero *Klebsiella* pertence à tribo *Klebsielleae* e foi assim denominado por Edwin Klebs, microbiologista alemão no final do século XIX. O bacilo, agora conhecido como *Klebsiella*, também foi descrito por Carl Friedlander, e durante muitos anos o “bacilo de Friedlander” foi bem conhecido como causa de uma pneumonia grave, e com frequência, fatal. *K. pneumoniae* é a espécie protótipo desse gênero[9].

As espécies de *Klebsiella* estão amplamente distribuídas na natureza e no trato gastrintestinal do homem e de animais[9]. É isolada com mais frequência de amostras clínicas, e pode causar uma forma clássica de pneumonia primária. Não é comum encontrar essa bactéria na orofaringe de pessoas normais (1 a 6% são portadores), mas pode haver uma prevalência de 20% em pacientes hospitalizados. Essa colonização pode ser a fonte das infecções pulmonares que geralmente ocorrem em pacientes em condições debilitantes, como alcoolismo, diabetes melito e doença pulmonar obstrutiva crônica. A *K. pneumoniae* também pode causar infecções extrapulmonares, incluindo enterite e meningite (em lactentes), infecções urinárias (em crianças e adultos) e sepse[9].

O gênero *Enterobacter* apresenta as características gerais de *Klebsiella*, mas suas espécies podem ser diferenciadas da maioria das espécies de *Klebsiella* por serem móveis e positivas para ornitina. *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae* são as espécies mais comumente isoladas de amostras biológicas. Elas encontram-se amplamente distribuídas na água, esgoto, solo e vegetais e fazem parte da microbiota entérica. Também estão associadas a várias infecções oportunistas que afetam as

vias urinárias, o trato respiratório, as feridas cutâneas e, ocasionalmente, causam sepse e meningite[9].

A emergência da resistência aos carbapenêmicos mediada por beta-lactamase em isolados de *K. pneumoniae* e outras enterobactérias tem se tornado um sério problema de saúde pública[8].

Desde o início do uso clínico dos antibióticos beta-lactâmicos, as beta-lactamases têm desenvolvido resistência aumentando sua prevalência em microrganismos tais como *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*. Mais tarde as bactérias responderam com “novas” beta-lactamases incluindo as ESBLs, enzimas mediadas por plasmídios AmpC e beta-lactamases que hidrolisam os carbapenens (carbapenemases) que, com sucesso variável, podem conferir resistência para antibióticos beta-lactâmicos mais recentes[10].

2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

As beta-lactamases podem ser classificadas de acordo com as propriedades funcionais e moleculares. As taxas relativas de hidrólise dos substratos de beta-lactâmicos de amplo espectro e perfis inibidores permitiram a classificação de novas beta-lactamases. Após muitos anos, as beta-lactamases conhecidas foram finalmente classificadas em quatro principais grupos funcionais (grupos de 1 a 4), com múltiplos subgrupos no grupo 2 que são diferenciados de acordo com o substrato específico ou perfil inibidor[11]. Neste esquema de classificação funcional, as carbapenemases são encontradas principalmente nos grupos 2f e 3 (Tabela 1) e a classificação molecular em A, B, C e D. De acordo com a homologia de aminoácidos, as beta-lactamases podem ser agrupadas em quatro principais classes moleculares, com boa correlação com a função, mas sem implicações com a atividade enzimática. As beta-lactamases carbapenemases com eficiência catalítica para hidrólises dos carbapenêmicos apresentam elevadas CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas), inclusive enzimas de classes A, B e D[12-14].

Tabela 1. Classificação das Beta-Lactamases[12].

Grupo Bush, Jacoby (2009)	Grupo Bush, Jacoby e Medeiros (1995)	Classe Molecular Ambler (sub-classes)	Substrato(s)	Inibição pelo		Definindo característica(s)	Enzima(s) Representativa(s)
				CA ou TZB ¹	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilina; hidrólise de cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ²	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima e geralmente outros oximino- β -lactâmicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina do que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, primeiras cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilina e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactams	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactams	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos combinado com resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepime e cefpiroma	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro ampliado	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenens	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenens	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro ampliado	Sim	Não	Hidrólise de cefalosporinas. Inibida pelo ácido clavulânico mas não aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenens	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenens, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise de espectro ampliado incluindo carbapenens mas não monobactams	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
3b	3	B (B2)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenens	L1, CAU-1, GOB1, FEZ-1
NI	4	Desconhecido					CphA, Sfh-1

¹ CA, Ácido clavulânico; TZB, Tazobactam² NI, não incluído

2.2 AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

As enzimas da classe A, C e D (segundo Ambler) são serinas beta-lactamases e atuam sobre o antibiótico rompendo o anel beta-lactâmico por um mecanismo de hidrólise com consequente inativação da droga (hidrolisado).

As beta-lactamases da classe B utilizam íons zinco para romper o anel beta-lactâmico e inativar o antibiótico[12].

2.3 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA RELACIONADOS AOS CARBAPENÊMICOS

Os bacilos Gram-negativos têm desenvolvido diferentes estratégias em relação à ação dos carbapenens. Estes mecanismos incluem: a diminuição na captação da droga mediada por alterações na permeabilidade da membrana externa (ausência ou diminuição na expressão das proteínas da membrana externa, OMPs) ou a presença de sistemas ativos de expulsão do antibiótico (bombas de efluxo), a hiperprodução de beta-lactamases do tipo AmpC e a aquisição de beta-lactamases com capacidade de hidrolisar carbapenens.

2.3.1 Resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*

As carbapenemases adquiridas representam a maior ameaça frente a utilização clínica dos carbapenens[13]. No estudo de Woodford et al. (2007), foi ressaltado que a resistência mediada por carbapenemases é provavelmente resultado de combinações de uma beta-lactamase, geralmente uma ESBL codificada pelo gene *bla*_{CTX-M} em *Klebsiella* spp. ou

uma enzima AmpC em *Enterobacter* spp., com impermeabilidade e/ou aumento de efluxo[8].

Vários autores confirmaram que a resistência aos carbapenêmicos é decorrente de uma série de mecanismos. Um deles é a combinação do elevado nível de produção de uma beta-lactamase AmpC com a perda de proteínas da membrana externa apresentadas pelas espécies de *K. pneumoniae* e *Enterobacter*[14-17]. Outro mecanismo de resistência é a eficiência de beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* que é pouco comum, mas parece estar aumentando. Duas classes distintas de beta-lactamases têm a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos. Apesar da classe B (metalo-beta-lactamases) normalmente estar associada com *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, elas também podem ser encontradas em *K. pneumoniae*[18].

Uma das enzimas da classe A, mais frequentemente encontrada hidrolisando carbapenêmicos, são as beta-lactamases tipo KPC. Estas enzimas foram encontradas em plasmídios transferíveis, são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. O primeiro relato de uma destas beta-lactamases, KPC-1, envolveu uma cepa de *K. pneumoniae* resistente ao carbapenem, a qual foi recuperada na Carolina do Norte em 1996[19].

Alguns isolados portadores de KPC podem apresentar um baixo nível de resistência aos carbapenens, mas quando combinada com outras alterações celulares, tais como a perda de porinas, a CIM do carbapenem aumenta[20, 21].

Este grupo de enzimas, designadas KPC, tem sido cada vez mais encontrado em diferentes patógenos, sendo descritas em *Escherichia coli* [22], espécies de *Enterobacter* [23] e *Salmonella entérica* [24] e a maioria dos estudos tem envolvido espécies de *Klebsiella*[19, 20, 25].

O surgimento e a disseminação da resistência em *Enterobacteriaceae* estão complicando o tratamento de infecções nosocomiais graves[26]. Cerca de 20% das infecções causadas por *K. pneumoniae* e 31% por *Enterobacter* spp. em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) nos Estados Unidos envolvem

cepas não suscetíveis às cefalosporinas de terceira geração. Essa resistência às cefalosporinas de terceira geração em *K. pneumoniae* é tipicamente causada pela aquisição de plasmídios contendo genes que codificam as ESBLs, e estes plasmídios muitas vezes transportam também outros genes de resistência[26]. A resistência de *Enterobacter* spp. às cefalosporinas de terceira geração é mais tipicamente causada por uma hiperprodução de beta-lactamases AmpC, e o tratamento com cefalosporinas de terceira geração pode selecionar mutantes hiperprodutores de AmpC. Algumas cepas de *Enterobacter cloacae* são produtoras de ESBL e AmpC e conferem resistência a ambas cefalosporinas de terceira e quarta geração[26].

2.4 PREVALÊNCIA DAS CEPAS PRODUTORAS DE ESBL

Em hospitais brasileiros, a frequência de organismos produtores de ESBL tem sido mais alta do que nos hospitais dos EUA e da Europa, cerca de 50% dos isolados de *K. pneumoniae* são recuperados dos isolados das Unidades de Cuidados Intensivos, embora características moleculares destes isolados produtores de ESBL têm sido pobremente descritas. No Brasil, isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL têm emergido em hospitais e comunidade como uma importante causa de infecções[27]. De acordo com os resultados de 2004, do estudo SMART (Estudo para Monitoramento das Tendências de Resistência Antimicrobiana), a prevalência de ESBL nos EUA, Europa e América Latina entre espécies de *Klebsiella* foi de 5,3%, 8,8%, 27,6%, e entre espécies de *Enterobacter* foi de 25,3%, 11,8%, 31,1%. No mesmo estudo, isolados de ESBL no Brasil, foram positivas para 17% entre as espécies de *Klebsiella*, e 22% entre espécies de *Enterobacter*[28]. Encontrou-se elevada frequência de ESBL (48,3%) em cepas de *K. pneumoniae* oriundas de um hospital de emergência de Porto Alegre[29]. A presença de ESBL foi confirmada em 61,1% em amostras de *Klebsiella* spp. e *E. coli* em um hospital universitário de Santa Maria[30].

Cabe mencionar que o HNSC e o HSL apresentaram respectivamente 33,8% e 53,8% de cepas produtoras de ESBL no ano de 2009.

Peirano et al. (2009) caracterizaram isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e KPC, sugerindo que onde há alta prevalência de cepas produtoras de ESBL existe uma maior probabilidade de detectar carbapenemases KPC[31].

O elevado índice de ESBL conduz a necessidade do uso terapêutico de carbapenens. O uso indiscriminado destes antimicrobianos favorece o aparecimento de cepas produtoras de carbapenemases KPC[29].

2.5 HISTÓRICO E PREVALÊNCIA DA FAMÍLIA KPC

O primeiro membro da família KPC foi descoberto através do projeto de vigilância ICARE (*Integrated Care Antimicrobial Resistant Epidemiology*) em um isolado clínico de *K. pneumoniae* obtido na Carolina do Norte em 1996[19]. Este isolado foi resistente a todos os beta-lactâmicos testados, mas as CIMs dos carbapenens diminuíram na presença de ácido clavulânico. A atividade da carbapenemase, foi associada com um plasmídeo não-conjugativo que codificava a beta-lactamase KPC-1[19].

A descoberta da KPC-1 foi rapidamente seguida por vários relatos de uma variante em um único aminoácido, denominada KPC-2, ao longo da costa leste dos Estados Unidos[24].

KPC-2 e KPC-3 são as variantes mais frequentes. O re-sequenciamento do gene KPC-1 revelou ser idêntico ao KPC-2[32].

A KPC-2 foi descrita em quatro isolados de Baltimore, de 1998 a 1999, com CIMs de imipenem de 2 a 8 µg/mL[20]. Em 2001, em Boston, a KPC-2 foi isolada de uma amostra de *Enterobacter* spp[33]. KPC-2 foi então descrita em Maryland em um plasmídeo de *Salmonella enterica*[24]. Relatos de KPC-2, em Nova Iorque, começaram a aparecer em 2004 com isolados de *K. pneumoniae* expressando KPC[2, 34]. Ocorreram surtos de *Klebsiellae*

produtoras de ESBL para as quais os carbapenens foram considerados como uma das poucas opções de tratamento. Com um único aminoácido de diferença de KPC-2, KPC-3, foi relatado um surto de *K. pneumoniae* 2000-2001 em Nova Iorque[21]. A KPC-3 também foi detectada em *Enterobacter* spp.,[2] onde as CIMs para o imipenem não foram consistentemente resistentes. A cinética da enzima KPC-3 revelou um perfil semelhante ao da KPC-1 e KPC-2, com um ligeiro aumento na hidrólise de ceftazidima[35].

Após a rápida expansão da classe de carbapenemases KPC ao longo da costa leste dos Estados Unidos, relatos em todo o mundo começaram a aparecer. Um relato da França, em 2005, documentou a presença da KPC-2 em uma cepa de *K. pneumoniae* obtida de um paciente que havia estado em Nova Iorque para um tratamento médico[36]. As carbapenemases KPC foram detectadas na Colômbia,[37] Israel[38] e China[39]. A primeira detecção de KPC-2 em um plasmídeo em *P. aeruginosa* foi relatada, o que representa uma evolução preocupante na disseminação dessas carbapenemases[40].

Entre 8.885 *Enterobacteriaceae* investigadas no período entre 1999 e 2005, como parte do Programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) dos EUA, 51 cepas foram detectadas com valores de CIM ($\geq 2 \mu\text{g/mL}$) aumentados para o imipenem e meropenem e o gene bla_{KPC} foi identificado em 28 isolados de *K. pneumoniae* de 3 centros médicos, na cidade de Nova Iorque. Os resultados deste estudo indicaram que $bla_{(KPC-2/3)}$ surgiu (Nova Iorque, Arkansas, Delaware, e Ohio), entre enterobactérias isoladas nos participantes locais do referido programa e continua a ser isolado a partir de múltiplas espécies[41].

Deshpande et al. (2006) avaliaram a disseminação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemase em várias regiões geográficas, através do Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY entre 2000 a 2004. De 37.557 amostras de *Enterobacteriaceae* avaliadas, 119 (0,32%) tinham os valores da CIM dos carbapenens aumentados. A KPC-2 e KPC-3 foram as carbapenemases mais frequentemente

encontradas nos EUA (20,2%) e foram detectadas em cepas de *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. e *Serratia marcescens*[42].

Na Argentina a resistência aos carbapenens por enterobactérias ainda é pouco frequente. Através do Programa Whonet, Buenos Aires, em 2004 e 2006 foram isoladas cepas de *K. pneumoniae* e *Citrobacter freundii* produtoras de KPC[43].

Na Grécia, a primeira evidência de KPC foi em 2007, sendo confirmada por PCR e foram identificados os genes que codificam para carbapenemase *bla*_{KPC-2}[44].

De janeiro de 2007 a dezembro de 2008, em um Hospital Universitário da Grécia, 50 pacientes (34 em UTIs) foram colonizados ou infectados por *K. pneumoniae* produtora de KPC-2. A prevalência do aumento de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 coincidiu com a prevalência do decréscimo de isolados produtores de metalo-beta-lactamase na mesma UTI. O surto começou em fevereiro de 2008 e disseminaram-se rapidamente; 38 pacientes (76%) foram identificados depois de agosto de 2008. A mortalidade foi de 58,8% entre os pacientes da UTI e 37,5% entre os pacientes que não estavam na UTI. A emergência de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em hospitais gregos gera uma importante mudança para clínicos e epidemiologistas de hospitais, pois sabe-se o que isto representa em termos de resistência antimicrobiana[45].

Na Grécia, participaram 40 hospitais do Sistema Grego para Vigilância da Resistência Antimicrobiana (GRSSAR) para verificar a presença de bactérias produtoras de KPC. O estudo mostrou a presença de cepas KPC-2 em 173 pacientes de 18 hospitais durante um período de 11 meses, o qual detectou altas taxas de resistência para carbapenens em *K. pneumoniae*. Os autores enfatizaram a necessidade de sistemas de vigilância baseados nos dados de suscetibilidade, assim como a vigilância dos mecanismos de resistência[46].

Analisando 220 isolados Gram-negativos com perfis de resistência aos beta-lactâmicos recuperados de centros médicos dos EUA, o Programa MYSTIC (2007) mostrou que as serinas carbapenemases surgiram na

maioria das *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenens (geralmente *K. pneumoniae*), confirmando um problema epidêmico na cidade de Nova Iorque, comprometendo o tratamento das infecções Gram-negativas[1].

O estudo de Goldfarb et al. (2009) revelou os primeiros três casos de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase no Canadá. Houve evidência de transmissão de pessoa a pessoa em 2 pacientes[47].

Nadkarni et al. (2009) avaliaram sete pacientes com infecções da corrente sanguínea causadas por isolados de *K. pneumoniae* com diminuição de suscetibilidade para carbapenens entre janeiro e abril de 2005 e descreveram o primeiro surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em infecções isoladas de sangue, em um hospital de Manhattan[48].

A ocorrência de isolados carregando *bla*_{KPC} está aumentando e não está restrita aos EUA, com relatos de *bla*_{KPC} em Israel, América do Sul, Noruega e Suécia[49, 50].

O estudo de vigilância da tigeciclina (T.E.S.T.) monitorou a disseminação de cepas produtoras de KPC fora dos EUA e observou que de um total de 2.645 isolados clínicos coletados de 10 países durante 2005-2008, 86 isolados de distintas áreas geográficas. Um terço (29/86) dos isolados foram ESBLs positivos. A técnica da PCR revelou que 26 entre os 86 isolados (30%) eram KPCs positivos. Os isolados KPCs positivos foram obtidos em Israel (n=13), Porto Rico (n=8), Colômbia (n=4) e Grécia (n=1). Neste estudo, nenhum isolado KPC positivo foi detectado da Argentina, Brasil, Itália, Coreia do Sul, África do Sul ou Taiwan[51].

Na República da Irlanda, em 2009, o primeiro caso descrito de bactéria produtora de KPC foi detectado em um isolado respiratório resistente à carbapenem de *K. pneumoniae*. O isolado foi recuperado de uma amostra de escarro coletada 48 horas depois da admissão de um homem de 60 anos de idade com doença pulmonar obstrutiva crônica[52].

Surgiram casos de *K. pneumoniae* e *E. coli* portadores dos genes *bla*_{KPC-2} ou *bla*_{KPC-3} em instituições de saúde no nordeste da Flórida, os quais

foram identificados fenotipicamente e confirmados usando a técnica da PCR e sequenciamento do gene KPC[53].

Um surto de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tipo 2 foi detectado em setembro de 2009 em dois hospitais em Paris. No total, 13 amostras de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase tipo 2 foram identificadas de quatro pacientes com infecções e nove com colonizações do trato digestório[54].

Piekarska et al. (2010) observaram que cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemase KPC-2 foram encontradas na Polônia. Os isolados foram obtidos de dois hospitais em Varsóvia. A expressão de KPC foi confirmada em todos os isolados pelo resultado fenotípico com teste do ácido borônico, assim como pela presença do gene *bla_{KPC}* detectado por PCR[55].

Segundo Wendt et al. (2010), a presença do gene *bla_{KPC}* no primeiro surto de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase na Alemanha foi confirmado por PCR. Mesmo depois da introdução de medidas do controle de infecção, três dos pacientes morreram da infecção. Cinco meses depois do surto, uma *K. pneumoniae* produtora de KPC foi isolada de um paciente que já tinha sido tratado previamente na Grécia[56].

O estudo de Bogaerts et al. (2010) relatou o primeiro dos três casos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 que foram detectados na Bélgica subsequente da transferência dos pacientes de três hospitais gregos[57].

O mapa da Figura 1 indica os países onde bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC têm sido descritas.

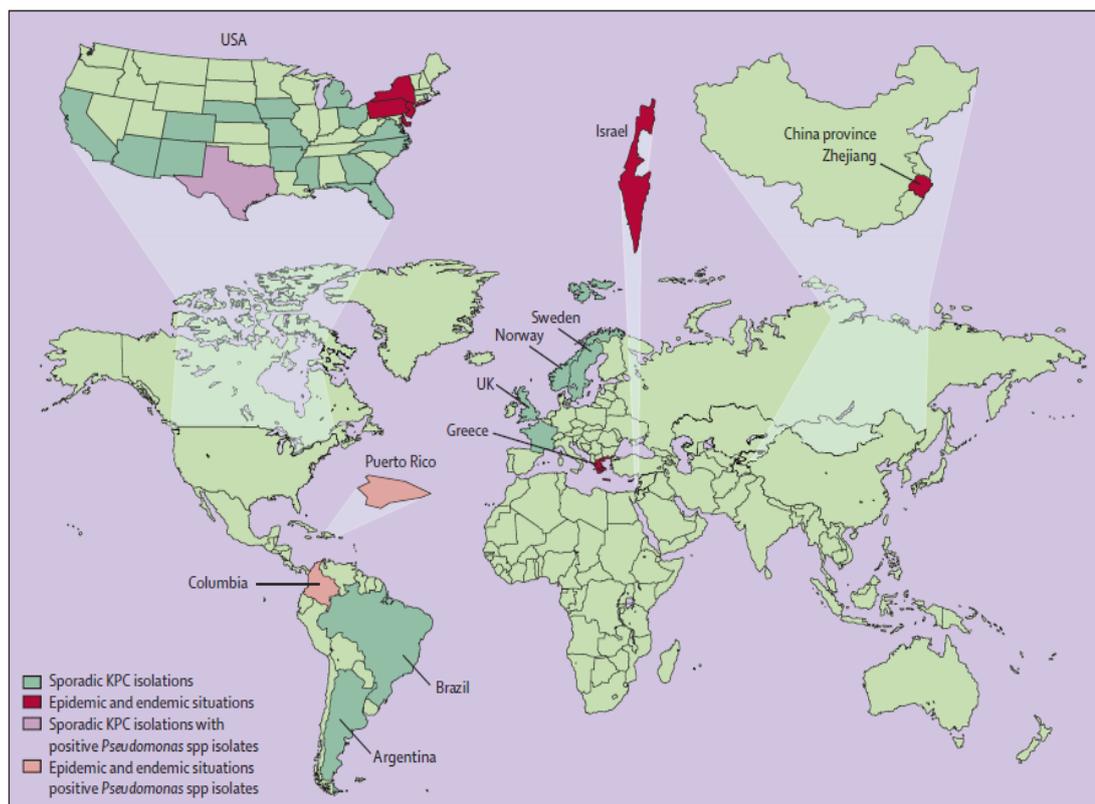


Figura 1. Disseminação internacional de *Enterobacteriaceae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)[58].

No Brasil, o primeiro relato de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foi em 2006, e foram isoladas de quatro pacientes hospitalizados em uma unidade de cuidados intensivos de um hospital em Recife. Duas destas cepas foram isoladas de urina e duas de sangue[59].

Um mês após, foi publicado outro relato de carbapenemase KPC-2 encontrada em seis isolados de *K. pneumoniae* recuperados de dois hospitais (de setembro de 2007 a maio de 2008) no Rio de Janeiro, todos os isolados foram positivos para ESBL e produção de carbapenemase classe A e negativos para a produção de metalo-beta-lactamase[31].

Apesar de que evidências de *K. pneumoniae* produtoras de KPC tenham surgido em hospitais brasileiros desde 2005. Um estudo foi conduzido em São Paulo de 2003 a 2008 com a finalidade de verificar a ocorrência de isolados resistentes à carbapenens e produtores de carbapenemases em isolados Gram-negativos. Neste estudo foram identificados genes de metalo-beta-lactamases e *bla*_{KPC}[60].

Em outubro de 2005, um isolado foi recuperado da urina de um paciente admitido em uma unidade de cuidados intensivos de um hospital em Florianópolis, sendo este o primeiro caso relatado no sul do Brasil[61].

Os isolados produtores de KPC estão ocorrendo em muitas regiões brasileiras. Os resultados da presença desses isolados por estado, entre agosto de 2009 e outubro de 2010: Alagoas (1), Distrito Federal (207), Minas Gerais (38), Pernambuco (38), Rio de Janeiro (42), São Paulo (70), Tocantins (1), Goiás (4), Espírito Santo (6), Paraíba (18), Paraná (24). Bahia e Ceará respectivamente 2 e 150 casos suspeitos.

Não incluiu os casos clínicos notificados em Santa Catarina (39), identificados entre outubro de 2010 e janeiro de 2011 e Mato Grosso identificado em 2011 (1)[62, 63].

A presença de KPC-2 foi identificada em dois isolados de *E. cloacae* obtidos de pacientes de duas diferentes cidades no Rio Grande do Sul. O primeiro foi recuperado em novembro de 2007 de um fragmento de um pé amputado de uma paciente diabética de 57 anos de idade admitida na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital São Lucas da PUCRS em Porto Alegre. O segundo isolado foi recuperado em outubro de 2008 de uma paciente com 48 anos de idade na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Bruno Born na cidade de Lajeado, a paciente tinha câncer endometrial e foi admitida para a cirurgia que complicou com sepse abdominal e choque séptico[64].

O mapa da Figura 2 indica os estados brasileiros onde bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC têm sido descritas.



Figura 2. Disseminação nacional de *Enterobacteriaceae* produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC).

2.6 FATORES DE RISCO RELACIONADOS COM CO-MORBIDADES DE PACIENTES COM INFECÇÕES CAUSADAS POR CEPAS PRODUTORAS DE KPC

Um estudo de caso-controle foi realizado por Gasink et al. (2009), para identificar os fatores de risco ou colonização com *K. pneumoniae* produtora de KPC ou impacto na mortalidade. Pacientes com KPC foram comparados com os pacientes com infecção por *K. pneumoniae* suscetíveis ao carbapenem (controles). Um estudo de coorte avaliou a associação entre *K. pneumoniae* produtora de KPC e mortalidade no hospital. Foram identificados 66 pacientes caso e 863 sujeitos controle. Análise multivariada, independente dos fatores de risco para *K. pneumoniae* produtora de KPC

foram: (1) doença severa, (2) uso prévio de fluoroquinolona e (3) uso prévio de cefalosporina de espectro estendido. Este estudo também revelou que *K. pneumoniae* produtora de KPC é um patógeno emergente associado com significativa mortalidade e que o uso limitado de certos antimicrobianos, especialmente fluoroquinolonas e cefalosporinas pode ser uma estratégia efetiva[65].

Woodford et al. (2004) analisaram vinte e quatro pacientes em UTIs no Hospital Tisch, em Nova Iorque, os quais foram colonizados ou infectados com *K. pneumoniae* resistente aos carbapenems entre abril de 2000 a 2001. *Klebsiella* com este fenótipo não havia sido detectada naquele hospital anteriormente. Referem que todas as infecções dos pacientes foram adquiridas nosocomialmente e os fatores de risco incluíram, hospitalização prolongada, internação em UTI e uso de ventilação mecânica[21].

2.7 DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA EM *Klebsiella pneumoniae* E

Enterobacter spp.

O surgimento e disseminação da enzima KPC tem criado sérios dilemas e deve-se olhar com considerável atenção para sua detecção, terapia e controle[34].

A detecção de bactérias produtoras de beta-lactamase mediada por carbapenemase entre isolados de *K. pneumoniae* e outras *Enterobacteriaceae* é um problema emergente. As enzimas KPC estão entre as beta-lactamases mais comuns mediando a resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de *Enterobacteriaceae*[6, 20, 21, 23, 34].

Os laboratórios de microbiologia têm encontrado dificuldade em obter resultados acurados dos testes de suscetibilidade para drogas carbapenêmicas. Estudos anteriores documentam uma falsa resistência para o imipenem devido à degradação da droga;[66] mais tarde estudos com o sistema VITEK (Bio Mérieux, Durham, NC, USA) demonstraram uma falsa resistência[67]. Vários estudos de teste de proficiência têm mostrado

problema de falsa resistência ao imipenem e meropenem entre várias espécies entéricas[68, 69].

O estudo de Bratu et al. (2005) apresentou resultados de falsa sensibilidade para isolados de *K. pneumoniae* com o sistema MicroScanAway (Dade MicroScan, Inc., West Sacramento, CA, USA), os quais foram atribuídos, em parte, ao pequeno tamanho dos inóculos. Para detecção de *K. pneumoniae* produtora de KPC, deve-se dar uma maior atenção em relação ao inóculo para que seja preparado com mais precisão para métodos de suscetibilidade em caldo. Além disso usar ertapenem ou meropenem para definir a suscetibilidade dos carbapenêmicos melhorará sua detecção. Uma detecção acurada de *K. pneumoniae* produtora de KPC será crucial no controle da disseminação. Não foi observado efeito do tamanho do inóculo com ertapenem, sendo este sugerido para o teste de suscetibilidade para a detecção dos isolados produtores de KPC[7].

Problemas similares com resultados de falsa sensibilidade foram notados com o sistema VITEK[2].

Tenover et al. (2006) avaliaram os métodos de testes de suscetibilidade para determinar se eram capazes de detectar consistentemente a resistência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* aos carbapenêmicos mediada pelo gene *KPC*. Os 15 isolados de *K. pneumoniae* selecionados de quatro hospitais de Nova Iorque apresentaram-se com diferentes resultados de suscetibilidade para imipenem e meropenem, avaliados por métodos fenotípicos de referência, como pode-se observar na Tabela 2. Estes autores referem que o reconhecimento de *K. pneumoniae* carbapenem resistente continua um desafio para os sistemas de suscetibilidade automatizados[70].

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade antimicrobiana para os 15 isolados de *Klebsiella pneumoniae*

Método	Imipenem (n = 15)			Meropenem (n= 15)		
	Resistente	Intermediário	Sensível	Resistente	Intermediário	Sensível
MDC*	13	2	0	14	1	0
Disco difusão	3	11	1	10	5	0
MicroScan	7	7	1	13	1	1
Phoenix	5	8	2	12	1	2
Sensititre	0	2	13	0	3	12
Vitek	5	0	10	2	3	10
Vitek 2**	4	6	5	4	4	5

¶(Adaptada de[70]); *MDC: Microdiluição em caldo; **Sem interpretação do meropenem para 2 microrganismos

Anderson et al. (2007) analisaram 31 isolados produtores de KPC em *Enterobacteriaceae*, 25 de *K. pneumoniae*, dois de *K. oxytoca*, um de *E. coli*, um de *Enterobacter* spp., um de *Citrobacter freundii*, e um de *Salmonella* spp., os quais foram isolados de diferentes pacientes internados em 13 diferentes instituições de saúde de sete estados diferentes: Maryland (um), Nova Jersey (dois), Nova Iorque (quatro), Pensilvania (dois), Michigan (duas), Missouri (um) e Carolina do Norte (um)[71]. Estes avaliaram a suscetibilidade antimicrobiana pelos métodos comumente utilizados, para identificar os mais sensíveis às condições de detecção de KPC,[71] como pode-se observar na Tabela 3. Todos os sistemas de automação podem falhar na detecção de carbapenemases[71, 72].

Tabela 3. Desempenho dos métodos de suscetibilidade para detectar resistência mediada por KPC [71].

Método	Sensibilidade (%) / Especificidade (%) do:					
	Resultado de suscetibilidade intermediário ou resistente ^a			Carbapenem CIM >1 µg/ml		
	Meropenem	Imipenem	Ertapenem	Meropenem	Imipenem	Ertapenem
Referência MDC	94/98	94/93	97/89	100/93	100/93	100/89
E-test	58/96	55/96	90/84	84/91	90/89	100/84
Disco difusão	71/96	42/96	97/87	NA ^b	NA	NA
Vitek Legacy	52/98	55/96	NA ^d	NA ^c	NA ^c	NA ^d
Vitek 2	48/96	71/96	94/93	71/93	94/89	94/89
MicroScan	84/98	74/96	100/89	100/93	100/93	NA ^c
Phoenix	61/98	81/96	NA ^d	74/96	87/93	NA ^d
Sensititre	42/98	29/96	NA ^d	81/96	NA ^c	NA ^d

^aCrítérios interpretativos foram baseados nos critérios CLSI; ^bNA, não aplicável; ^cNão aplicável porque a CIM testada não foi baixa o suficiente (ex., a mais baixa diluição testada foi 2 µg/mL ou 4 µg/mL) para a identificação da CIM >1 µg/mL de um carbapenem; ^dNão aplicável porque o ertapenem não foi avaliado no painel; MDC : Microdiluição em caldo

2.7.1 Teste de triagem para detecção da produção de carbapenemases

Os resultados de alerta para recomendação do teste confirmatório são utilizados como triagem para detecção de carbapenemases em *Enterobacteriaceae* avaliando-se o ertapenem como marcador e resistência de um ou mais agentes cefalosporina subclasse III (ie, cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima e ceftriaxona). Os pontos críticos da triagem inicial utilizados para o ertapenem, meropenem e imipenem devem estar de acordo com as recomendações das diretrizes atuais[73, 74].

2.7.2 Teste fenotípico confirmatório

Segundo os critérios do CLSI (janeiro 2010), o Teste Modificado de Hodge (TMH) era o teste fenotípico confirmatório que devia ser realizado a partir do teste de triagem positivo. Após, o TMH com ertapenem é recomendado para isolados com resultados positivos na triagem, somente com fins epidemiológicos.

As recomendações para o teste de triagem e confirmatório foram largamente testadas em isolados de *Enterobacteriaceae* dos Estados Unidos e fornece um alto nível de sensibilidade (>90%) e especificidade (>90%) para a detecção de carbapenemases tipo KPC nestes isolados[74].

2.7.2.1 Teste Modificado de Hodge (TMH)

O TMH também foi avaliado para detecção da resistência mediada por KPC[75]. Este é um teste fenotípico que pode ser utilizado para determinar se a reduzida suscetibilidade aos carbapenêmicos é mediada por uma carbapenemase.

Como mostra a Figura 3, o isolado A é um teste produtor de KPC positivo, para o TMH, enquanto que os isolados B, C, D e E não produziram carbapenemase e são negativos[71].

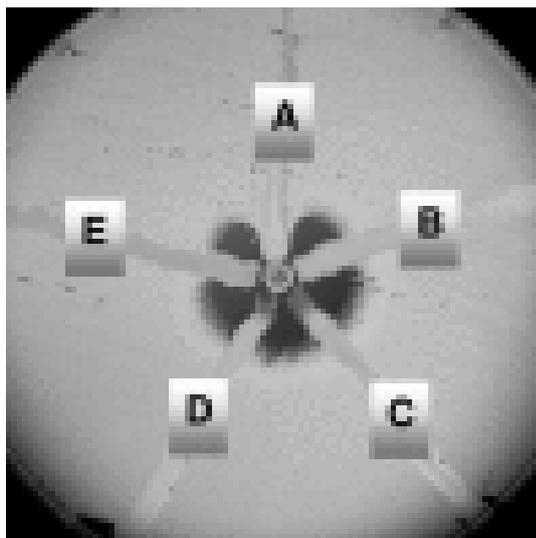


Figura 3. Teste Modificado de Hodge [71].

Desta forma os laboratórios devem confirmar a carbapenemase através da técnica da PCR para o gene bla_{KPC} , a qual tem a vantagem de detectar a presença da enzima[71].

2.7.2.2 Teste do disco com ácido borônico

Outro teste utilizado para detectar a produção da enzima KPC são os testes com discos de ácido borônico, baseados em derivados do ácido borônico (um teste de sinergia de duplo disco e disco combinado e testes CIM) usando imipenem, meropenem e ertapenem, em combinação com ácido 3-aminofenilborônico como um inibidor, foram desenhados como ferramentas confirmatórias, com a finalidade de ajudar na detecção fenotípica de enzimas KPC e sua distinção de enzimas AmpC mediadas por plasmídios. A Figura 4 apresenta os resultados representativos utilizando o método baseado no ácido borônico. Como pode-se observar nesta figura, o teste é considerado positivo quando a zona de diâmetro ao redor do disco contendo o antibiótico e o ácido borônico for ≥ 5 mm do que a zona de diâmetro ao redor do disco contendo somente o antibiótico[76, 77].

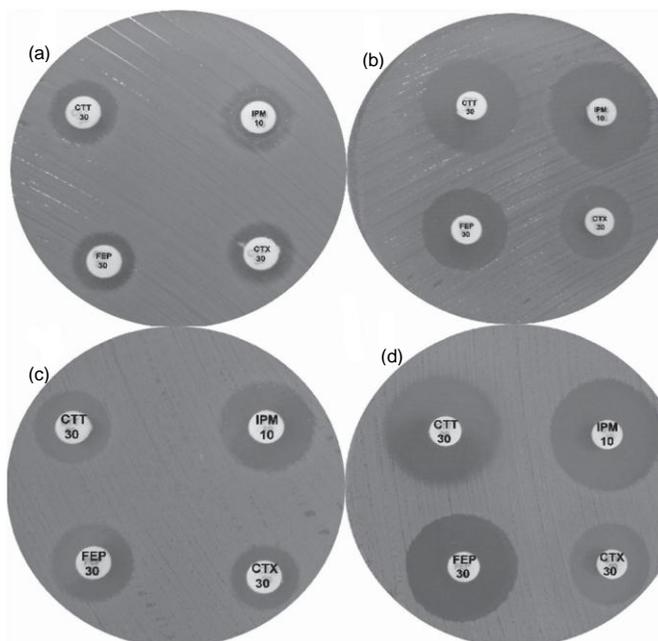


Figura 4. Teste utilizando ácido borônico [77]. Onde: (a e c) sem ácido borônico; (b e d) com ácido borônico; CTT (cefotetan); IPM (imipenem); FEP (cefepime); CTX (cefotaxima).

2.7.3 Métodos moleculares

Diagnóstico molecular foi reconhecido como uma importante ferramenta de diagnóstico para a rápida detecção e identificação de organismos patogênicos em amostras clínicas, e também é cada vez mais utilizado para detectar genes de resistência antimicrobiana em diversos microrganismos[78].

2.7.3.1 Detecção de ESBL

Existem muitos testes para detecção de ESBL, os quais se baseiam na detecção da presença da enzima através de suas características fenotípicas, como o teste de triagem e os testes confirmatórios: testes dos

discos combinados, testes de aproximação do disco, testes que determinam a CIM[79].

Segundo o CLSI (2009)[80] a confirmação da enzima ESBL em isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis* deveria ser feito por disco combinado de cefalosporinas de terceira geração com clavulanato. Por outro lado a descrição de ESBL em outras espécies de enterobactérias já foi relatada, podendo envolver espécies de *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Proteus*, *Providencia*, *Salmonella* e *Serratia* spp[38, 81-86]. Desde 2010 esse órgão mudou suas recomendações em relação à pesquisa e à confirmação dessa enzima nos isolados por meio da alteração de pontos de corte interpretativos para as cefalosporinas de amplo espectro[79]. Contudo, no contexto epidemiológico, reforça-se a relevância da pesquisa laboratorial contínua dada a capacidade elevada de transmissibilidade da ESBL via plasmídios[87].

Ainda existem muitos sistemas automatizados os quais podem detectar ESBL em cepas bacterianas[88]. Contudo, outros mecanismos de resistência aos beta-lactâmicos, incluindo a presença de enzimas AmpC,[12, 89] alteração de porinas[15, 90] e hiperprodução de K1[91] podem estar presentes isoladamente ou juntamente com a ESBL interferindo no resultado desses testes[92, 93]. Há casos nos quais as enzimas conferem baixos níveis de resistência e não são detectadas por testes fenotípicos[94]. Para estes casos o ideal é utilizar técnicas moleculares, como a PCR, que detectam especificamente os genes responsáveis pela resistência. Estas técnicas incontestavelmente são essenciais para monitorar a disseminação de um grande número de enzimas produtoras de ESBL nos hospitais e na comunidade[94].

2.7.3.2 Detecção de KPC

A técnica da PCR é uma importante ferramenta que auxilia na detecção de cepas produtoras de KPC, sendo considerada o método padrão ouro.

No estudo de Woodford et al. (2004), os autores avaliaram o mecanismo de resistência molecular de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenems usando iniciadores específicos para *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{SME}, *bla*_{NMC} e *bla*_{KPC}. PCR mostrou-se um teste de especial importância, pois com resultados positivos permite um tratamento precoce e eficaz com antibióticos no contexto das infecções de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenems, pois enquanto amostras estão sendo processadas, pacientes infectados ou colonizados não recebem tratamento ou na maioria das vezes recebem tratamento empírico inadequado e, ao mesmo tempo são capazes de transmitir os patógenos a outros pacientes hospitalizados[21].

Weisenberg et al. (2009) analisaram uma série de pacientes com infecções causadas por isolados de *K. pneumoniae*, com resultados de suscetibilidade ao imipenem, mas foram subsequentemente positivos para KPCs pela técnica da PCR[95].

2.7.4 Análise de porinas da membrana externa

O primeiro passo na interação do antibiótico com a bactéria Gram-negativa é atravessar a membrana externa, a qual forma uma barreira protetora contra ambientes hostis. O mecanismo exato de absorção através desta bicamada lipídica por compostos hidrofóbicos ainda não está bem entendido. A membrana é pontuada por porinas, as quais são as principais

proteínas da membrana externa (OMPs) que formam canais aquosos, que permitem a difusão através da membrana. Em geral, a difusão das porinas de muitas espécies de enterobactérias serve como uma porta de entrada para a passagem de beta-lactâmicos e fluoroquinolonas. Além disso, a alteração da permeabilidade da membrana externa inclui uma modificação na expressão das porinas e isto tem emergido como um mecanismo de resistência a drogas em *E. aerogenes* e outros patógenos. Para melhorar a eficiência da translocação de futuros antibióticos é vital o entendimento desses mecanismos moleculares de transporte[96].

Pagès et al. (2008) e Davin-Regli et al. (2008) relataram a baixa regulação na expressão de porinas ou uma alteração favorecendo a expressão dos pequenos canais como resposta à antibioticoterapia. Este fato resulta na reduzida permeabilidade da membrana que limita severamente o acúmulo intracelular da droga, permitindo a evolução e/ou aquisição de outros mecanismos de resistência, incluindo mutações no alvo, produção enzimática, entre outros[97, 98].

A resolução da estrutura tri-dimensional das porinas OmpF de *E. coli* e OmpK36 da *K. pneumoniae* tem levado à identificação dos domínios funcionais dos canais das enterobactérias[99].

A maioria dos estudos sobre as OMPs tem sido dedicado à duas porinas principais (OmpC e OmpF) associadas à resistência bacteriana em *E. coli*. A deficiência ou ausência na expressão das principais proteínas de membrana externa tem sido associada à presença de OmpK35 e OmpK36, em *K. pneumoniae*, Omp35 e Omp36 em *Enterobacter aerogenes*, OmpF e OmpC em *Enterobacter cloacae*; homólogos de OmpF e OmpC de *E. coli* [90, 96, 97, 100-103].

A resistência aos antibióticos carbapenêmicos por perda ou redução da expressão das porinas tem sido relatada em diversas partes do mundo e em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, principalmente em *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp. e *E. coli*. A seleção *in vivo* de mutantes deficientes de porinas são originadas de espécies produtoras de AmpC ou

ESBL que foram expostas a terapias prévias com antibióticos carbapenêmicos[14, 104-108].

O ertapenem é tipicamente ativo *in vitro* contra a família *Enterobacteriaceae* e alguns autores relataram que existe um mecanismo adicional desconhecido de bomba de efluxo que influencia a resistência ao ertapenem em *E. cloacae*[109].

2.8 VIGILÂNCIA DE CEPAS PRODUTORAS DE KPC

A vigilância da resistência de enterobactérias aos carbapenêmicos tem a proposta de identificar pacientes colonizados com *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC) no trato intestinal[109]. Os critérios nacionais da ANVISA, baseado no protocolo do CDC, uma modificação do procedimento descrito por Landman et al.[109-111], preconiza que todo caso confirmado de infecção ou colonização por bactéria produtora de enzima KPC deve ser notificado ao Centro Estadual de Vigilância em Saúde da Secretaria de Estado da Saúde do Rio Grande do Sul (CEVS/SES-RS). O rastreamento deve ser feito nos Hospitais que possuem UTI. Estas instituições devem obter amostras por *swab* retal dos pacientes procedentes de qualquer estabelecimento hospitalar, no Estado, país ou exterior, e que apresentem os seguintes fatores de risco para infecção por bactérias KPC nos últimos seis meses: internação em Unidade de Tratamento Intensivo e uso de antibióticos de amplo espectro. Estas amostras devem ser encaminhadas ao Laboratório de Referência Estadual (IPB-LACEN).

Pacientes com suspeita de colonização/infecção por bactérias resistentes aos carbapenêmicos devem ser mantidos preferencialmente em isolamento, e medidas de prevenção de contato devem ser reforçadas, principalmente na higiene das mãos, limpeza e desinfecção de superfícies e equipamentos. Caso o resultado do exame microbiológico seja positivo para enterobactérias resistentes a carbapenêmicos, este deve ser imediatamente

comunicado à CCIH da Instituição, visando à implementação das medidas de controle[111, 112].

2.9 ANTIBIOTICOTERAPIA FRENTE ÀS CEPAS PRODUTORAS DE KPC

A disseminação de organismos produtores de KPC representa um sério problema no controle de infecção e estratégia terapêutica[34, 113].

A tigeciclina é uma das poucas opções com atividade *in vitro* frente às carbapenemases, incluindo as KPCs, e as metalo-beta-lactamases produzidas por Gram-negativos[114, 115]. Bratu et al. (2005) encontraram em seu estudo que diversos isolados eram suscetíveis à tigeciclina com eficácia clínica[2].

Muitas bactérias da família *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases são altamente multiresistentes, mas podem permanecer suscetíveis para um ou mais aminoglicosídeos bem como para tigeciclina e/ou colistina[116].

Embora as CIMs para o meropenem observadas neste estudo, foram baixas pode ser arriscado usar meropenem isoladamente para o tratamento de infecções sistêmicas, porque infecções por bactérias que são altamente carbapenem resistentes podem ser selecionadas. No entanto, algumas evidências indicam que carbapenêmicos tem atividade *in vitro* contra *K. pneumoniae* produtora de KPC. A tigeciclina pode ser uma opção de tratamento, mas as baixas concentrações no soro podem impedir a sua utilização como monoterapia em pacientes com bacteremia ou infecções urinárias. Embora faltem dados sobre a farmacocinética, farmacodinâmica, toxicidade, e os melhores esquemas de dosagem de polimixinas, estão entre as poucas opções terapêuticas com atividade bactericida com os recentes relatos de boa resposta clínica[117, 118].

De um total de 15 estudos revisados o tratamento com aminoglicosídeos (75%), combinações com polimixina (73%) e tigeciclina

(71%) pareciam ter maiores taxas de sucesso. Em contraste, monoterapia com carbapenem (40%) e polimixina (14%) tiveram menores taxas de sucesso[32].

Vários novos inibidores de beta-lactamase que são capazes de resistir a hidrólise por ESBLs e carbapenemases classe A estão atualmente em desenvolvimento. Estes incluem NXL104, LK-157 e BLI-489. NXL104 mostrou restaurar a atividade de vários antibióticos beta-lactâmicos de isolados produtores de KPC[32].

Patel et al. (2008) e Mouloudi et al. (2010) relataram taxas de mortalidade aproximadas de 79% e 48% em infecções por KPC da corrente sanguínea, respectivamente. Dados de Lopez et al. (2011) evidenciaram que um surto de KPC-3 na Colômbia mostrou taxa de mortalidade de 63% entre os pacientes infectados[119-121].

A terapia de infecções causadas por espécies de *Klebsiella* resistentes ao imipenem tem sido obscura. Isolados resistentes à todos os antibióticos beta-lactâmicos e a maioria resistentes aos aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foram descritos no estudo de Bradford et al. (2004), os quais sugeriram que se a polimixina continuar proporcionando um tratamento efetivo, esta deverá permanecer como o tratamento de escolha, uma vez que este antibiótico é considerado como um dos últimos recursos para muitas infecções Gram-negativas[34].

Outros mecanismos de resistência são geralmente encontrados no mesmo plasmídeo em isolados KPC (ou seja, múltiplas enzimas), conferindo resistência cruzada a outras classes de antimicrobianos incluindo as fluoroquinolonas e aminoglicosídeos. Como resultado da resistência antimicrobiana de amplo espectro, opções de tratamento são muito limitadas[32].

A mortalidade associada à infecção causada por organismos produtores de KPC está estimada entre 22-59%[122-124] e muitos clínicos tem que recorrer ao uso da tigeciclina e polimixinas para tratamento. A experiência limitada à falta de familiaridade com tigeciclina em geral tem limitado o uso deste agente. A maioria dos organismos produtores de KPC

mantém-se suscetíveis à tigeciclina, como mostra o estudo de Castanheira et al. (2008), que analisaram 178 isolados produtores de KPC e encontraram apenas um (0,6%) isolado que não foi suscetível à tigeciclina pelos métodos de microdiluição em caldo, padronizado pelo CLSI[125].

A polimixina B e a colistina têm sido associadas com altas taxas de nefrotoxicidade e devem ser usadas com cautela. Além disso, há um aumento nos relatos do desenvolvimento de resistência para organismos produtores de KPC[125].

Estudos realizados no Rio de Janeiro com isolados de *K. pneumoniae* produtores de beta-lactamase e que hidrolisaram carbapenêmicos mostraram que os isolados eram produtores de ESBL e carbapenemases da classe A e negativos para a produção de metalo-beta-lactamase, e resistentes à todos os antibióticos beta-lactâmicos, ertapenem, ciprofloxacina e gentamicina, sendo suscetível somente à tigeciclina e à polimixina B[31].

Em um surto epidêmico de KPC em um centro médico terceirizado em Israel, todos os isolados foram resistentes a todas as fluoroquinolonas e antibióticos beta-lactâmicos testados, incluindo carbapenens e foram sensíveis somente à colistina, gentamicina e a maioria deles também apresentavam suscetibilidade à tigeciclina[126].

Embora o primeiro relato de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* tenha ocorrido no Brasil, em 2005 por meio da produção da carbapenemase KPC, desde 2007 esta resistência tem sido identificada em vários hospitais brasileiros com uma frequência cada vez maior. Surtos causados por cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC foram detectados em várias cidades brasileiras, mas devido à notificação dos casos às respectivas vigilâncias epidemiológicas, os surtos ocorridos em Londrina e em Brasília ganharam maior notoriedade e conduziram à ação emergencial por parte da ANVISA que culminou com a publicação da Norma Técnica Nº 1/2010. Nesta nota, resumidamente foram estabelecidas as diretrizes para o diagnóstico laboratorial e implementação de medidas de controle que

deveriam ser aplicadas para interromper a transmissão e assim prevenir o aparecimento de novos casos[73].

Diante da falta de evidências científicas que indiquem as opções terapêuticas mais adequadas para o tratamento das infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, principalmente, aquela decorrente da produção de KPC, o Comitê de Bacteriologia Clínica da Sociedade Brasileira de Infectologia, após a revisão dos dados microbiológicos e farmacocinéticos/farmacodinâmicos (pK/pD) mais recentemente relatados sobre enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, sugeriu que o tratamento das infecções causadas por estas enterobactérias seja realizado conforme descrito na Tabela 4[127].

Tabela 4. Esquemas terapêuticos sugeridos para o tratamento de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos[127].

Infecção	Opção terapêutica
<ul style="list-style-type: none"> • Infecção urinária • Infecção urinária com sinais de sepse 	<p style="text-align: center;">Aminoglicosídeo</p> <p style="text-align: center;">Polimixina B ou colistina + imipenem ou meropenem</p> <p style="text-align: center;">ou</p> <p style="text-align: center;">Polimixina B ou colistina + aminoglicosídeo</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Infecção de corrente sanguínea • Pneumonia associada à ventilação mecânica 	<p style="text-align: center;">Polimixina B ou colistina + aminoglicosídeo ± tigeciclina</p> <p style="text-align: center;">ou</p> <p style="text-align: center;">Polimixina B ou colistina + aminoglicosídeo ± meropenem</p> <p style="text-align: center;">ou imipenem</p>
<ul style="list-style-type: none"> • Infecção intra-abdominal • Infecção de pele e partes moles 	<p style="text-align: center;">Polimixina B ou colistina +tigeciclina</p>

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Detectar a prevalência de mecanismos de resistência em cepas de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem isoladas de infecções em dois hospitais de Porto Alegre.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar o perfil de suscetibilidade dos antimicrobianos ertapenem, imipenem e meropenem dos isolados incluídos no estudo.
 2. Analisar a frequência de ESBL através de métodos fenotípicos em *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp.
 3. Pesquisar a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2} em cepas de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado (ESBL).
 4. Verificar a presença de *bla*_{KPC} em cepas de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem.
 5. Pesquisar as porinas OmpC e OmpF nas cepas de *Enterobacter cloacae* relacionadas a alteração nas porinas.
-

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

4.1.1 Local de realização do estudo

O estudo foi realizado no Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), com amostras clínicas de pacientes internados no Hospital São Lucas (HSL-PUCRS) e do Hospital Nossa Senhora da Conceição (HNSC) localizados na cidade de Porto Alegre/RS.

4.1.2 Desenho do estudo

Trata-se de um estudo de série de casos com amostras oriundas de pacientes portadores de infecções bacterianas. Foram incluídas 128 amostras de bacilos Gram-negativos de *K. pneumoniae* (17), de *Enterobacter cloacae* (106) e de *Enterobacter aerogenes* (5) resistentes ao ertapenem, provenientes do setor de Microbiologia do Laboratório Central de Análises Clínicas do HNSC e Laboratório de Análises Clínicas do HSL-PUCRS. O período de obtenção das amostras foi de setembro de 2010 à setembro de 2011.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

4.2.1 Identificação dos pacientes

Os dados dos pacientes foram pesquisados através de levantamento do banco de dados do Laboratório de Microbiologia ou dos prontuários do Serviço de Arquivo Médico e Estatística (SAME) dos referidos hospitais de Porto Alegre/RS.

As amostras dos pacientes foram provenientes de diferentes sítios anatômicos.

4.2.2 Fatores relacionados com a infecção em pacientes por *Klebsiella pneumoniae* e de *Enterobacter* spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem

Para estudar os fatores relacionados à infecção por *K. pneumoniae* e de *Enterobacter* spp. foi realizada uma abordagem retrospectiva, analisando-se tanto as variáveis como as cepas com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem. Diversas variáveis foram avaliadas:

- Sexo
 - Idade
 - Sítio de infecção
 - Unidade de internação hospitalar
 - Doença de base
-

4.3 AVALIAÇÃO FENOTÍPICA

4.3.1 Avaliação da suscetibilidade aos antimicrobianos carbapenêmicos

Após a identificação fenotípica dos microrganismos e realização do teste de suscetibilidade, os isolados ficaram armazenados em caldo TSB (Tryptic Soy Broth - Caldo Tripticaseína de Soja) + glicerol, a -70°C para posterior confirmação e análise molecular.

O perfil de suscetibilidade frente aos antimicrobianos carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem foi retestado fenotipicamente, através do método Kirby-Bauer, de disco difusão (Cefar, Brasil) e E-test[®] (AB bioMérieux, Solna, Suíça), o qual está baseado na combinação dos métodos de difusão e diluição, com uma escala de concentrações do antimicrobiano impregnados em uma fita plástica. As suspensões bacterianas foram realizadas em solução salina até atingir a turvação equivalente à escala 0,5 de McFarland e inoculada em uma placa de ágar Mueller Hinton (Oxoid[®], EUA). As fitas e os discos foram adicionados nas placas e incubados a 35°C por 16-18 horas. Para o controle de qualidade dos testes de suscetibilidade foi utilizada a cepa *E. coli* 25922. As interpretações dos resultados do E-test[®] (CIMs) e Kirby-Bauer (mm) foram realizadas segundo os critérios da Nota Técnica da ANVISA N° 1/2010 [73, 74]. Após foi verificado a frequência dos isolados que expressaram erros muito maiores, maiores e menores. Erros muito maiores acontecem quando o teste de suscetibilidade *in vitro* é interpretado como "sensível", mas a bactéria é "resistente", ou seja, falso sensível. Os erros maiores são definidos quando se realiza a leitura de um resultado como "resistente", mas deveria dar "sensível", ou seja, falsa resistência. Enquanto que os erros menores são referenciados no resultado como "intermediário" e deveria dar sensível ou resistente. Essas categorias discordantes foram utilizadas quando comparadas pelos dois métodos utilizados, disco difusão e E-test[®][128-130].

4.3.2 ESBL

Posteriormente foi analisada a frequência dos isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. produtores de ESBL.

As amostras foram suspensas em tubos com aproximadamente 2 mL de solução de NaCl 0,9% e posteriormente, semeadas em placas de Petry com meio Mueller Hinton (Oxoid[®], EUA) e com os discos de antibióticos para teste de triagem para ESBL. Após foram incubadas em estufa microbiológica a 35°C por 16 - 18 horas. Foram realizadas as leituras dos halos de inibição dos antibióticos, observando se houve aumento ou distorção da zona de diâmetro ao redor do disco de oximino-beta-lactâmico. Nas amostras que indicaram a presença de uma ESBL no teste de triagem, foi realizado o teste confirmatório. As amostras positivas foram semeadas novamente, nas mesmas condições citadas acima, porém com os discos de antibióticos utilizados para o teste confirmatório.

4.3.2.1 Teste de Triagem

Foi realizado o teste de aproximação dos discos, para observar se houve formação da zona fantasma utilizando-se os discos cefotaxima (CTX: 30 µg), ceftriaxona (CRO: 30 µg), ceftazidima (CAZ: 30 µg), aztreonam (AZT: 30 µg) e amoxicilina/ácido clavulânico (AMC/CLA: 30/10 µg); todos da marca (Bio-Rad[®]).

Um disco contendo clavulanato foi colocado a 20 mm (distância de centro à centro) dos discos de beta-lactâmicos. As colônias bacterianas foram suspensas em solução salina e com um *swab*, inoculou-se em uma placa de ágar Mueller Hinton (Oxoid[®], EUA). Aguardou-se secar por 15 minutos e aplicou-se os discos. Colocou-se um disco de amoxicilina/ácido clavulânico no centro e lateralmente um disco de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam a uma distância de 20 mm, centro a centro, em

relação ao disco de amoxicilina/ácido clavulânico. Incubou-se por 18 horas, a 35°C.

O aumento ou distorção da zona de diâmetro ao redor do oximino-beta-lactâmico (chamada de zona fantasma) indicou a presença de uma ESBL[131]. Como controle positivo utilizou-se a cepa ATCC 700603 de *K. pneumoniae* produtora de ESBL.

4.3.2.2 Teste Confirmatório

Para confirmar os microrganismos produtores de ESBLs foi utilizado o método de disco combinado, estabelecido pelo CLSI 2010. Foram então utilizados os discos cefotaxima (CTX: 30 µg), cefotaxima/ácido clavulânico (CTX/CLA: 30/10 µg), ceftazidima (CAZ: 30 µg) e ceftazidima/ácido clavulânico (CAZ/CLA: 30/10 µg); todos da marca Bio-Rad®.

O teste confirmatório, com discos impregnados com a droga: disco combinado (beta-lactâmico/inibidor de beta-lactamase) e disco do mesmo beta-lactâmico não-combinado baseia-se no reconhecimento do aumento do halo do beta-lactâmico na presença do ácido clavulânico. O resultado é considerado positivo quando é obtida uma zona maior ou igual a 5 mm entre o disco combinado e o correspondente não-combinado[131].

4.4 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Posteriormente foi realizada a pesquisa dos genes de resistência através da técnica da PCR e análise das porinas da membrana externa pela técnica de *Dot-Blot*.

Os isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. que foram produtores de ESBL fenotipicamente, com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem foram submetidos aos testes moleculares e

pesquisados respectivamente os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2}. As porinas OmpC, OmpF foram pesquisadas e confirmadas com anticorpos específicos anti-OmpC e anti-OmpF.

4.4.1 Extração do DNA

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e *Enterobacter* spp. que estavam mantidos em glicerol foram ressuspensos em 200 µL de PBS.

A extração de DNA foi realizada adicionando-se 100 µL de SDS 10%, 20 µL de EDTA 0,5 M e 100 µL de Proteinase K (20 mg/mL). Após incubação a 55°C por 3 horas a amostra foi tratada com Fenol:Clorofórmio:Álcool isoamílico e centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 800 µL de isopropanol gelado e 180 µL de NaOAc 3M pH 5,2. O DNA foi precipitado à -20°C por pelo menos 2 horas e a amostra foi centrifugada a 14.000 rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi ressuspenso com 50 µL de água MilliQ e armazenado à -20°C até ser utilizado.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os microrganismos *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. produtores de ESBL resistentes ao ertapenem foram submetidos aos testes moleculares, através do método da reação em cadeia da polimerase, para verificar a presença dos genes de resistência: gene *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2}.

Este método foi realizado conforme as condições descritas na Tabela 5, contendo os seguintes reagentes: 5 µL de DNA, 100 µM de dNTPs, 2,5 U

de *Taq* DNA polimerase, 25 pmol de cada *primer*, 2,0 mM de MgCl₂ e água destilada estéril para um volume final de 50 µL. Foram incluídos, em cada série de PCR, controles positivos, negativos e uma mistura de reação que não contém DNA. Todas as reações da PCR foram submetidas a trinta ciclos, um ciclo inicial de 94°C por 5 minutos e um ciclo final de 72°C por 10 minutos em termociclador (MJ Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler). As temperaturas de anelamento para cada reação estão descritas na Tabela 5.

Uma amostra do produto amplificado (20 µL) foi separada por eletroforese em gel de agarose 2% contendo 2 µg/mL de brometo de etídio em tampão TAE (Tris-acetato 40mM, EDTA 1 mM pH 8,0) a 100 volts por 30 minutos. Finalmente, os produtos da PCR foram visualizados sob luz ultravioleta.

Tabela 5. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores relacionados aos genes de carbapenemase e ESBLs.

Gene	Oligonucleotídeos	Temp. * (°C)	Produtos esperados (pb)	Referência
<i>bla_{KPC}</i>	KPC: F: 5' TGTCACTGTATCGCCGTC 3'	65	1011	[19]
	KPC: R: 5' CTCAGTGCTCTACAGAAAACG 3'			
<i>bla_{TEM}</i>	TEM: F: 5' ATGAGTATTCAACATTTCCGTG 3'	50	861	[132]
	TEM: R: 5' TTACCAATGCTTAATCAGTGAG 3'			
<i>bla_{SHV}</i>	SHV: F: 5' ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC 3'	50	1051	[133]
	SHV: R: 5' TTTATGGCGTTACCTTTGACC 3'			
<i>bla_{CTX-M}</i>	CTX-M: F: 5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3'	56	544	[134]
	CTX-M: R: 5' CGATATCGTTGGTGGTGCCATA 3'			
<i>bla_{CTX-M-2}</i>	CTXM2: F: 5' AAATGTGCTGCTCCTTTTCGTGAGC 3'	64	988	[135]
	CTXM2:R: 5' AGGGTTCGTTGCAAGACAAGACTG 3'			

*Temp.: temperatura de anelamento

Para padronização das reações de PCR, para os diferentes genes de beta-lactamase foram utilizadas cepas gentilmente cedidas pela dra. Doroti Garcia do Instituto Adolf Lutz.

4.4.3 Análise fenotípica de porinas de membrana externa

4.4.3.1 Extração de porinas de membrana externa

Células bacterianas foram cultivadas por 18 horas em 30 mL de caldo BHI. Após o período de crescimento, as bactérias foram concentradas por centrifugação a 2.300 g por 15 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio (PBS) a 10 mM, pH 7,0, acrescido com o inibidor de protease fluoreto-metil-sulfonila (PMSF) na concentração de 1 mM e as células foram rompidas com o auxílio de um sonicador (Sonifier 450 Bronson-USA) utilizando-se 3 pulsos de 1 minuto cada, com intervalos de 1 minuto de resfriamento em banho de gelo entre cada pulso para preservação das proteínas. Os restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 1.800 g durante 15 minutos e o resultado do sobrenadante foi submetido à ultra centrifugação a 30.000 rpm (Sorvall[®], Ultraspeed Centrifuge Pro 80. USA) durante 120 minutos a 4°C para a coleta das frações de membrana. O sedimento resultante foi ressuspendido em 150 µL de solução tampão PBS 10 mM (pH 7) acrescido de PMSF 1 mM; 100 µL deste volume final foi tratado com 800 µL de solução de sarcosil a 2% por 20 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, a membrana externa foi obtida após a última centrifugação com rotação de 16.000 g durante 60 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em 50 µL de solução tampão PBS 10 mM (pH 7,0) acrescido de PMSF 1 mM e mantido sob refrigeração (4°C) durante 24 horas para solubilização[136, 137]. O produto da extração foi armazenado a -20°C para posterior análise por *Dot blot*.

4.4.3.2 Análise das porinas de membrana externa por *Dot blot*

Para determinar a presença das porinas foi aplicado o método de *Dot blot* em membrana de nitrocelulose (Hybond C, Super, Amersham Life Science, USA).

Uma alíquota de 5 µL de cada amostra (item 4.4.3.1) foi adicionada à membrana, após secagem, a mesma foi incubada com agitação durante a noite em solução de PBS contendo 5% de leite desnatado para bloqueio da membrana. Após lavagem em PBS as membranas foram incubadas com os anticorpos policlonais de coelho contra OMPC/HRP e OMPF/HRP (Bioss, Atlanta, Geórgia, USA) diluído 1:250 em PBS/leite 5% com agitação.

Após três lavagens com PBS/Tween 20 (0,05%), foi realizada uma lavagem final somente com PBS. A detecção do anticorpo foi realizada pelo método de quimioluminescência utilizando o reagente Western Blotting Luminol Reagent (Santa Cruz Biotechnology, Inc., CA, USA).

Após incubação da membrana por um minuto na solução de luminol (1 parte solução A: 1 parte solução B) o excesso foi descartado e as membranas, foram envoltas em filme plástico e colocadas em chassi próprio para sensibilizar filme de Raio-X (Kodak-X-OMat), com exposição por 5 minutos. Procedeu-se à revelação manual do filme de RX em sala escura e verificação do sinal do anticorpo.

4.5 TAMANHO AMOSTRAL

A definição do tamanho da amostra foi baseada no cálculo de proporção, utilizando-se um nível de confiança de 95% e uma margem de erro de 10%, para a ocorrência dos genes pesquisados, sendo o valor obtido de no mínimo 120 isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis foram apresentadas utilizando-se técnicas de estatística descritiva baseadas em frequências e percentuais.

Os dados foram analisados com o uso do aplicativo SPSS (Statistical Package for the Social Sciences).

4.7 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi avaliado e aprovado pela Comissão Científica (anexo A) do Curso de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, pelos Comitês de Ética em Pesquisa da PUCRS (CEP 09/04945), anexo B e do Grupo Hospitalar Conceição (CEP 09-178), anexo C. Os chefes de Serviço do Setor de Microbiologia e Coordenadoras dos Laboratórios de Análises Clínicas da PUCRS e HNSC assinaram um termo de conhecimento quanto a utilização dos dados coletados dos pacientes, dos quais foram obtidos os isolados referente as duas instituições (anexo D e E).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS INCLUÍDAS NO ESTUDO

No período entre setembro de 2010 e setembro de 2011, foram estudadas 128 culturas de isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem, provenientes de diferentes sítios anatômicos de pacientes infectados de dois hospitais de Porto Alegre/RS.

Os dados apresentados na Tabela 6 referem uma maior ocorrência dos isolados em urina, sangue e amostras respiratórias.

No estudo de Toufer Jr. et al (2003), detectaram que as taxas de prevalência de infecção mais frequentes ocorreram em sítios respiratórios, seguidas de sepse e infecção do trato urinário e as bactérias mais frequentemente isoladas foram da família *Enterobacteriaceae*[138].

Os resultados do estudo de Gröbner et al. (2009), são consistentes com o presente estudo em relação ao fato de que a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram amostras isoladas de urina (42,1%) seguidas de swabs intra-operatórios (12,8%), sangue (4,9%), e outras espécimes relevantes (1,4%)[139].

Tabela 6. Frequência dos isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. de acordo com o sítio de infecção.

Amostra Clínica	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Total
	n(%)	n(%)	n(%)	n(%)
Urina	12(70,6)	70(66,0)	03(60,0)	85(66,4)
Sangue	02(11,8)	11(10,4)	-	13(10,2)
Aspirado Traqueal	01(5,9)	03(2,8)	-	04(3,1)
Escarro	-	03(2,8)	-	03(2,3)
Ferida operatória	01(5,9)	02(1,9)	-	03(2,3)
Biópsia queimadura	-	02(1,9)	-	02(1,6)
Cateter	-	02(1,9)	-	02(1,6)
Líquido abdominal	-	01(0,9)	01(20,0)	02(1,6)
Secreção coxa	-	02(1,9)	-	02(1,6)
Líquido ascite	-	-	01(20,0)	01(0,8)
Líquido biológico*	-	01(0,9)	-	01(0,8)
LCR	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Líquido mediastino	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Líquido peritoneal	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Líquido pleural	01(5,9)	-	-	01(0,8)
Queimadura ombro	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Queimadura pé	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Secreção enxerto tórax	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Secreção fêmur direito	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Secreção ouvido	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Secreção tecido mole	-	01(0,9)	-	01(0,8)
Total	17(100,0)	106(100,0)	05(100,0)	128(100,0)

* não identificado; LCR: Líquido Cefalorraquidiano

Conforme de Champs et al.(2000), relataram que as proporções de 79 isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL de diferentes amostras em estudo envolvendo hospitais franceses foi a seguinte: 13,8% de cateteres intravasculares, 5,3% de trato respiratório, 2,9% de urina, 2,3% de culturas de sangue e 2% de feridas e líquidos serosos[140].

Em relação à distribuição percentual por sexo dos pacientes estudados no presente estudo, oriundos das duas instituições analisadas observou-se que 55,9% foram do sexo masculino e 44,1% do sexo feminino.

A distribuição por grupos etários dos pacientes avaliados neste estudo pode ser analisada na Figura 5.

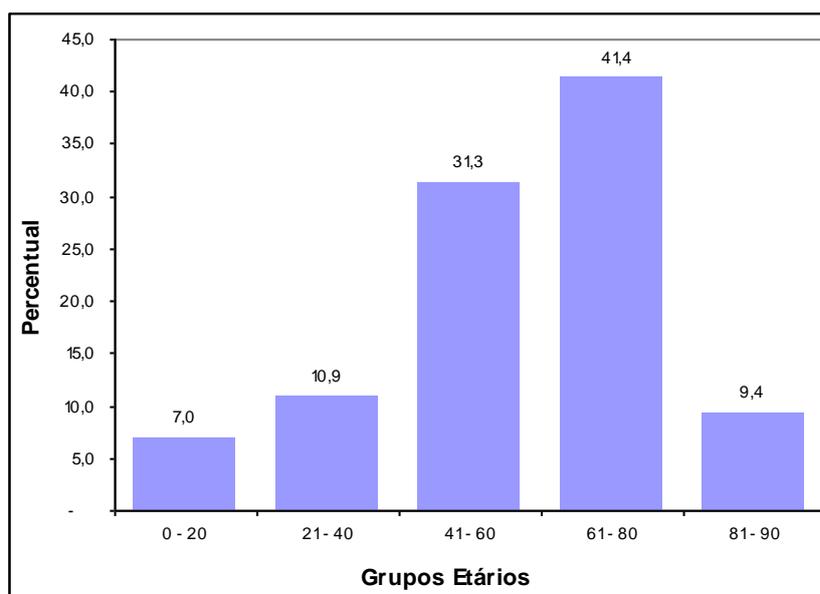


Figura 5. Distribuição por grupos etários dos pacientes avaliados nas 128 amostras bacterianas.

Infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de KPC têm sido associadas com o aumento do custo e tempo de permanência, bem como frequentes falhas no tratamento e morte. Fatores de risco para infecção incluem, além da idade avançada, pacientes severamente doentes, tratamento prévio com antibióticos, transplante de órgão ou de células-tronco, ventilação mecânica, e longo tempo de hospitalização[118].

Os dados das doenças de base dos pacientes cujos isolados apresentaram-se positivos para *K. pneumoniae* produtores de beta-lactamase e *Enterobacter* spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem estão referendados na Figura 6. Os casos com câncer foram os mais frequentes, dentre eles: câncer de colorretal (n=6), câncer de colo de útero (n=5), câncer de próstata (n=3), câncer pelve renal (n=2), câncer de

bexiga (n=2), câncer de ovário (n=1), câncer de órgãos digestivos (n=1), adenocarcinoma (n=1) e não identificados (n=2).

Nesta mesma figura o termo outros refere-se quando nos 128 isolados a doença foi citada somente uma vez, com exceção dos casos com câncer os quais foram citados anteriormente por ser a patologia mais prevalente.

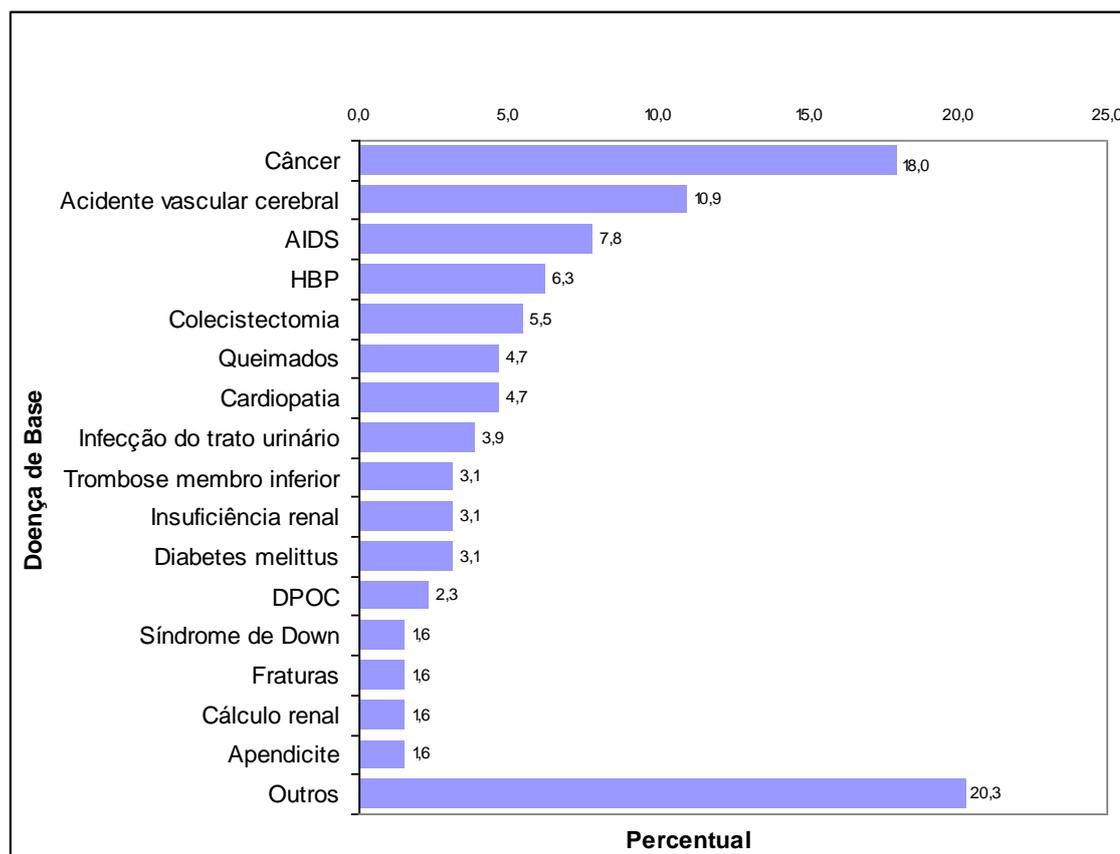


Figura 6. Principais doenças de base dos pacientes infectados com *Klebsiella pneumoniae* produtor de ESBL e *Enterobacter* spp. com suscetibilidade reduzida ou resistentes ao ertapenem dos dois hospitais de Porto Alegre/RS.

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida; HBP: Hiperplasia benigna de próstata; DPOC: Doença pulmonar obstrutiva crônica.

As doenças mais prevalentes no estudo de Kang et al. (2010), foram tumores (39,6%), doenças do fígado (13,2%) e doenças cardiovasculares (11,3%)[141].

As bactérias produtoras de KPC apresentam um problema significativo em situações clínicas em que a administração de antibióticos

empíricos eficazes é essencial para a prevenção da mortalidade. Isto aplica-se à infecções graves tais como a bacteremia, mas também se estende a outras infecções em pacientes submetidos à transplantes de órgãos e tratamento de câncer, em que o estado imunodeprimido desses pacientes requer antibióticos empíricos eficazes[118].

Todos estes casos foram distribuídos nos hospitais em diferentes unidades de internação como se pode observar na Figura 7.

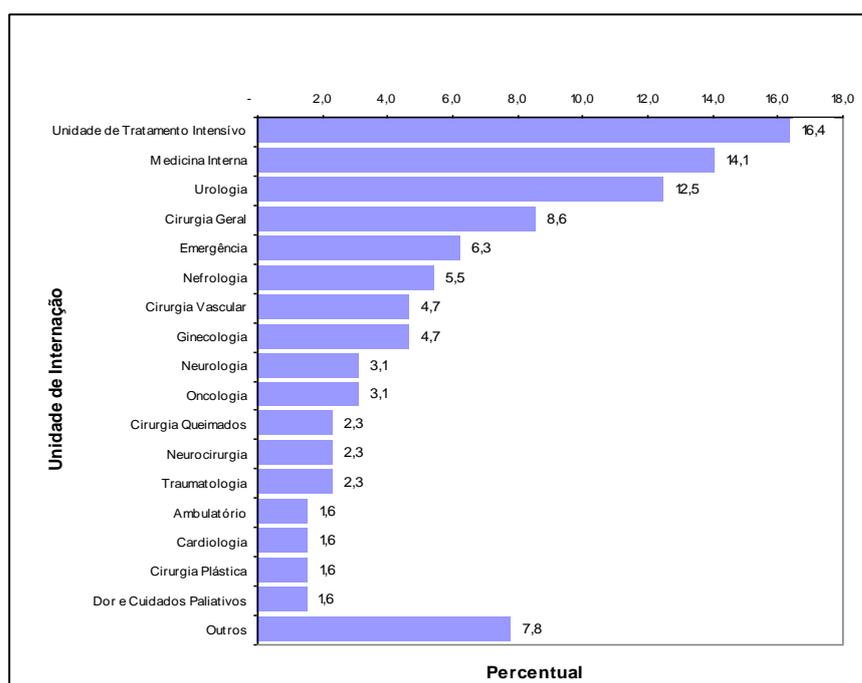


Figura 7. Frequência da distribuição por Unidade de Internação dos pacientes analisados nas amostras do estudo.

A distribuição dos microrganismos nos diferentes departamentos de internação dos pacientes nos hospitais do estudo são coerentes com estudos prévios, os quais relataram que nas clínicas de internação o CTI, assim como infecções do trato urinário e da corrente sanguínea obtiveram a maior prevalência[142, 143].

Considerando somente as cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL observou-se que a maioria das amostras do presente estudo foram isoladas de pacientes de unidades de tratamento intensivo 4/17 (23,5%),

departamentos de cirurgia 3/17 (17,6%), departamentos de urologia 2/17 (11,7%) e medicina interna 1/17 (5,9%).

O estudo de Gröbner et al. (2009), mostra conformidade com a presente pesquisa, pois a maioria das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL também foram isoladas de pacientes de unidades de cuidado intensivo (17,8%) departamentos de medicina interna (16,9%) e departamentos de cirurgia (11,2%)[139].

Conforme de Champs (2000), a proporção de cepas produtoras de ESBL entre *Enterobacteriaceae* variou entre 1,6% em unidades hematológicas para 7,1% em unidades de cuidado intensivo e para 7,7% em unidades de reabilitação em hospitais franceses[140].

5.2 COMPARAÇÃO DA SUSCETIBILIDADE ANTIMICROBIANA DOS ISOLADOS PELOS MÉTODOS KIRBY-BAUER (Disco Difusão) e E-test[®]

Os resultados de suscetibilidade para os carbapenêmicos de um total de 128 isolados conduzidos no presente estudo estão relatados na Tabela 7, os quais foram avaliados através das metodologias de E-test[®] e disco difusão.

Tabela 7. Resultados do teste de suscetibilidade antimicrobiana pelos métodos de E-test® e Disco Difusão dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL e *Enterobacter* spp. aos antibióticos imipenem, meropenem e ertapenem.

Resultado	E-test® n(%)			Disco Difusão n(%)		
	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Ertapenem (10 µg)	Imipenem (10 µg)	Meropenem (10 µg)	Ertapenem (10 µg)
Sensível	74(57,8)	100(78,1)	0(0,0)	104(81,4)	97(75,7)	0(0,0)
Intermediário	32(25,0)	15(11,8)	18(14,1)	12(9,3)	18(14,1)	12(9,4)
Resistente	22(17,2)	13(10,1)	110(85,9)	12(9,3)	13(10,2)	116(90,6)
Total	128(100,0)	128(100,0)	128(100,0)	128(100,0)	128(100,0)	128(100,0)

Pontos de corte utilizados para: sensível, intermediário e resistente, respectivamente: Imipenem: $\leq 1\mu\text{g/mL}$; $2\mu\text{g/mL}$ e $\geq 4\mu\text{g/mL}$ ou $\geq 23\text{mm}$; $20\text{-}22\text{mm}$ e $\leq 19\text{mm}$; Meropenem: $\leq 1\mu\text{g/mL}$; $2\mu\text{g/mL}$ e $\geq 4\mu\text{g/mL}$ ou $\geq 23\text{mm}$; $20\text{-}22\text{mm}$ e $\leq 19\text{mm}$; Ertapenem: $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$; $1\mu\text{g/mL}$ e $\geq 2\mu\text{g/mL}$ ou $\geq 25\text{mm}$; $22\text{-}24\text{mm}$ e $\leq 21\text{mm}$. Critérios de interpretação preconizados na nota técnica da ANVISA N° 01/2010.

A figura 8 apresenta os diferentes perfis de suscetibilidade aos carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem pelo método de Disco Difusão e E-test®.

Na Tabela 8, estão expressos os resultados da atividade antimicrobiana com suscetibilidade reduzida e resistência ao ertapenem. Dos 128 isolados clínicos do presente estudo, 85,9% mostraram-se resistentes ao ertapenem.

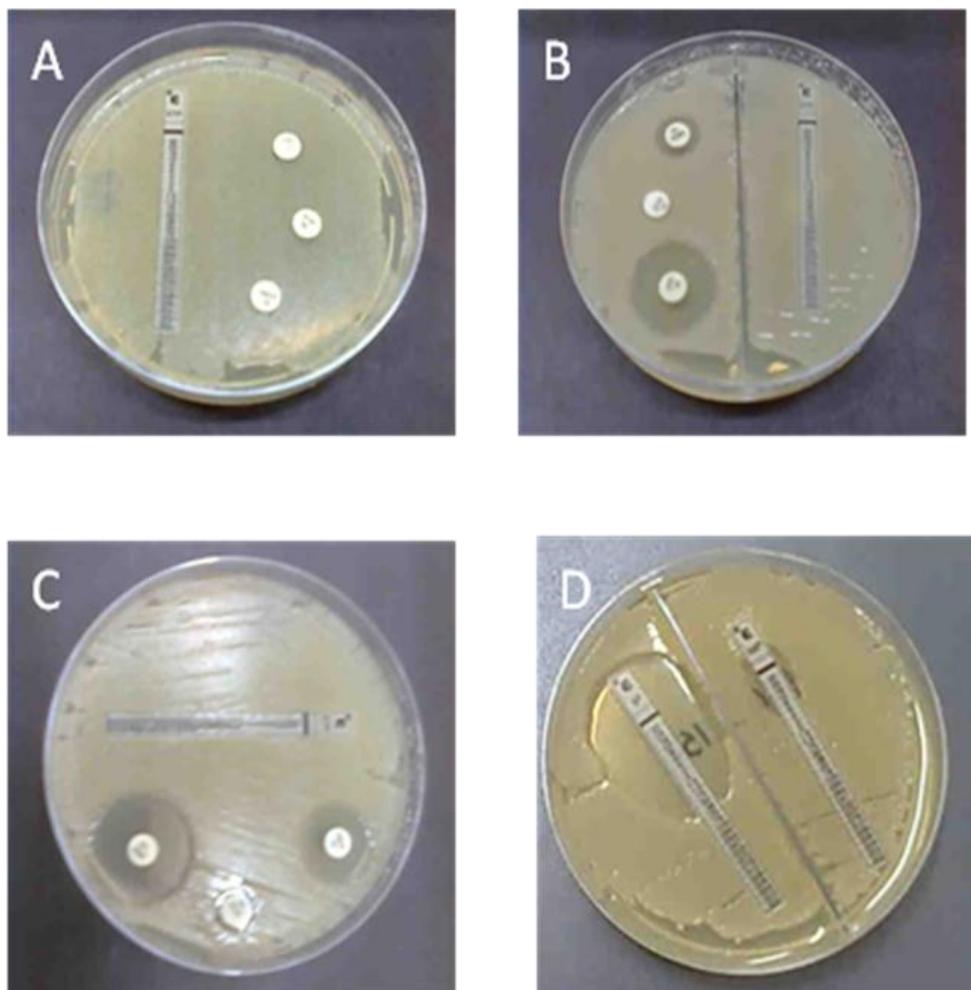


Figura 8. Teste de suscetibilidade por Disco Difusão e E-test[®]. (A) No teste de disco a bactéria se mostra resistente aos três carbapenêmicos imipenem, meropenem e ertapenem. No E-test[®] a bactéria é resistente ao ertapenem. (B) Somente o imipenem mostrou-se sensível pelo método de Disco Difusão. (C) Somente o ertapenem apresentou-se resistente pelos dois métodos: E-test[®] e Disco Difusão. (D) Discrepância de suscetibilidade do imipenem e meropenem pelo método do E-test[®].

Tabela 8. Padrão de sensibilidade (CIM) de 128 amostras resistentes e intermediárias ao ertapenem de acordo com o microrganismo isolado.

Antimicrobiano	Identificação bacteriana n(%)			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Total
Ertapenem (10 µg) Resistente	11(64,7)	94(88,7)	5(100,0)	110(85,9)
Ertapenem (10 µg) Intermediário	6(35,3)	12(11,3)	0(0)	18(14,1)
Total	17(100,0)	106(100,0)	5(100,0)	128(100,0)

Swenson et al. (2004), definiram os erros como muito maiores, maiores e menores. Um erro muito maior foi definido como um resultado falso sensível, erro maior representou um resultado falso resistente. Segundo estes autores, os quais compararam o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de microdiluição em caldo e disco-difusão, evidenciaram que erros muito maiores foram frequentes com antimicrobianos beta-lactâmicos. E que mesmo o método que é considerado o padrão ouro (microdiluição em caldo) apresentou problemas de interpretação. Discrepâncias entre as interpretações dos testes de microdiluição em caldo e disco difusão foram notadas e os laboratórios devem estar atentos para estas discrepâncias[128].

Problemas similares (diferença na intersecção em um dos lados da fita de E-test[®], colônias dentro do halo de inibição, efeito inóculo) foram encontrados nos testes realizados no presente estudo, no entanto procurou-se seguir rigorosamente as recomendações de interpretação do fabricante.

Em relação a discrepância dos resultados obtidos no presente estudo através dos dois métodos utilizados, o E-test[®] foi utilizado como referência para comparar com o método de disco difusão, pelo fato de seu resultado ser por CIM e os dados estão expressos na Tabela 9.

Tabela 9. Classificação das concordâncias e erros entre os dois métodos de detecção de suscetibilidade aos antimicrobianos empregados neste estudo *

Antibiótico	Concordância (%)	Erros muito maiores(%)	Erros maiores(%)	Erros menores(%)
Imipenem	77,4	10,1	4,7	7,8
Meropenem	87,5	0,8	1,6	10,1
Ertapenem	96,1	0,0	0,0	3,9

*Classificação de acordo com Swenson et al. (2004), Beuving et al. (2011) e Bulik et al. (2010) [128-130]

Os testes de suscetibilidade E-test[®] e disco difusão do presente estudo apresentaram maior concordância para o ertapenem entre os carbapenens testados.

McGettigan et al. (2009), estudaram 2696 isolados de *Enterobacteriaceae*, dentre estes 564 isolados de *Enterobacter* spp. e 1352 de *K. pneumoniae* e encontraram 85 isolados ertapenem resistentes ou intermediários, 63 foram KPCs positivos e todos *K. pneumoniae*. Também referem que 7 e 12% de KPCs foram meropenem suscetível quando testados pelos métodos de E-test[®] e disco difusão, enquanto que 65 e 48%, quando testados imipenem e meropenem, por automação, os quais não reproduzem resultados fidedignos quanto a suscetibilidade[144].

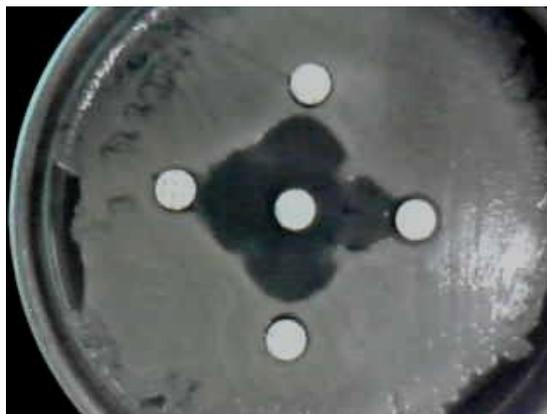
5.3 EXPRESSÃO DE ESBL NAS CEPAS DE *K. pneumoniae* E *Enterobacter* spp.

5.3.1 Teste de Triagem

Foi realizado o teste de triagem nas 128 amostras analisadas (17 *K. pneumoniae*, 5 *E. aerogenes* e 106 *E. cloacae*), o resultado é mostrado na Tabela 10. Das 30 amostras positivas, 17 *K. pneumoniae* e 13 *Enterobacter cloacae* foram produtoras de ESBL pelo teste de triagem (Figura 9).

Tabela 10. Amostras positivas no teste de triagem para detecção de ESBL

	Nº de amostras	% de amostras
ESBL positiva	30	24
ESBL negativa	98	76
Total	128	100

**Figura 9.** Teste de triagem positivo para ESBL

5.3.2 Teste Confirmatório por Disco Combinado

Após a realização do teste de triagem foi realizado o teste confirmatório para ESBL, através da utilização do método do disco combinado, os resultados são apresentados na Tabela 11 e Figura 10.

Tabela 11. Amostras positivas no teste confirmatório para ESBL.

	Nº de amostras	% de amostras
ESBL positiva	28	93,4
ESBL negativa	2	6,6
Total	30	100

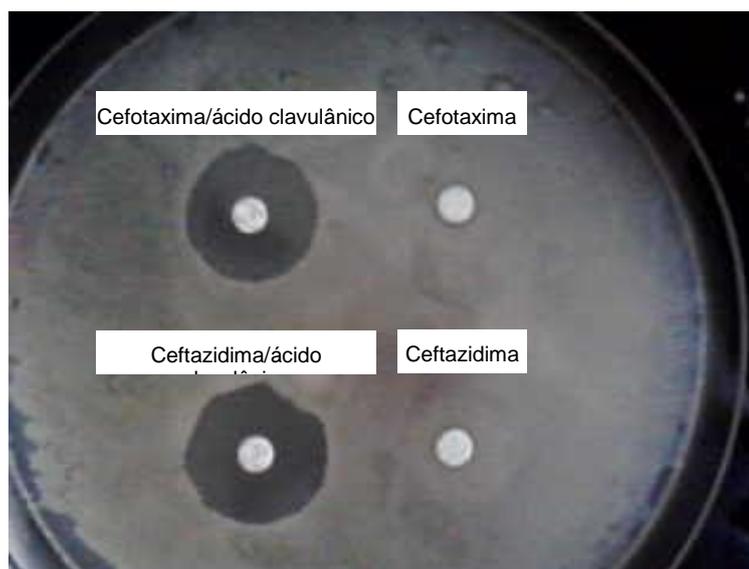


Figura 10. Teste confirmatório para ESBL através do método de disco combinado.

Os 2 isolados que mostraram-se negativos no teste confirmatório foram de *Enterobacter cloacae*. No teste de triagem podem ocorrer casos falso-positivos, por isso é importante a realização de testes confirmatórios que se baseiam na inibição da enzima pelo ácido clavulânico[131].

No estudo realizado por Lago e colaboradores (2010) 30% das espécies produtoras de ESBL foram de *Enterobacter* spp[145]. No presente estudo, das 28 amostras que se apresentaram produtoras de ESBL pelo teste confirmatório, 11 (39,3%) eram de *Enterobacter cloacae*. Arpin et al. (2003) [146], relataram que 49% dos isolados produtores de ESBL foram *E. aerogenes*, discordando deste estudo, provavelmente esse fato possa estar associado ao baixo número de amostras desta espécie.

Por se tratarem de microrganismos de âmbito hospitalar, esta prevalência de ESBL pode estar relacionada a fatores como: uso prolongado de antibióticos, duração do período de internação e a grande capacidade de sobrevivência e disseminação deste microrganismo no ambiente hospitalar[147, 148].

Quando o teste de triagem é positivo e o confirmatório é negativo, são apresentadas algumas possibilidades. Uma delas está relacionada a presença de beta-lactamases AmpC mediada por plasmídio, esta beta-lactamase é induzível, presente no grupo CESP e pode ser transmitida para plasmídios de *E. coli* e *Klebsiella* spp. Quando isso ocorre, grande quantidade de beta-lactamase é produzida, levando à resistência a cefalosporinas de espectro ampliado e cefamicinas que não são inibidas pelo clavulanato, dificultando a interpretação das ESBLs[131].

Outra possibilidade é a hiperprodução de ESBL ou a combinação de mecanismos de resistência, como, presença de mais de um tipo de ESBL; presença de ESBL e AmpC; presença de ESBL e mutação em porinas; e ainda ESBL não-contida pelos inibidores de beta-lactamases[131].

5.4 DETECÇÃO DOS GENES *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2}

Das 128 amostras dos pacientes do estudo, 17 foram previamente identificadas como *K. pneumoniae* produtoras de ESBL e foram analisadas através da técnica da PCR para determinar a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2}. Ressalta-se que 5 amostras das 17 mostraram

ausência destes genes. Estes genes também foram pesquisados para os isolados de *Enterobacter cloacae* produtores de ESBL e serão descritos mais adiante.

De acordo com a Tabela 12, pode-se observar a presença de mais de um tipo de ESBL em uma mesma amostra, sendo detectado o gene *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} em duas e *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2} em outras duas. Oito amostras mostraram-se resistentes ao ertapenem.

Mais do que uma ESBL foi encontrada em 19,2% (14 de 173) dos isolados no estudo de Paterson e colaboradores, os quais pesquisaram a prevalência de beta-lactamases em infecções da corrente sanguínea, em sete países, Argentina, Austrália, Bélgica, Taiwan, Turquia e EUA. Encontraram que dez dos isolados tinham ESBLs tipo TEM e SHV; duas tinham TEM, SHV e CTX-M e duas tinham SHV e PER[149].

Tabela 12. Concentração Inibitória Mínima dos carbapenens e genes que codificam as β -lactamases para os isolados de *Klebsiella pneumoniae*.

Isolado	Genes	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		Imipenem	Meropenem	Ertapenem
2008	<i>bla</i> _{TEM}	2	0,25	4
2010	<i>bla</i> _{TEM}	0,5	0,19	1,5
1002	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV}	2	3	> 32
2006	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV}	0,25	0,094	1
1006	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV} ; <i>bla</i> _{CTX-M}	0,5	1	> 32
1158	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV} ; <i>bla</i> _{CTX-M}	0,5	0,5	2
1011	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	1	1,5	12
1034	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0,25	0,125	1
1099	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0,5	0,25	1
1052	<i>bla</i> _{SHV}	2	2	> 32
2011	<i>bla</i> _{CTX-M}	2	0,19	6
1035	<i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	2	3	> 32

Pontos de corte utilizados para: sensível, intermediário e resistente, respectivamente: Imipenem: $\leq 1\mu\text{g/mL}$; $2\mu\text{g/mL}$ e $\geq 4\mu\text{g/mL}$; Meropenem: $\leq 1\mu\text{g/mL}$; $2\mu\text{g/mL}$ e $\geq 4\mu\text{g/mL}$; Ertapenem: $\leq 0,5\mu\text{g/mL}$; $1\mu\text{g/mL}$ e $\geq 2\mu\text{g/mL}$. Critérios de interpretação preconizados na nota técnica da ANVISA N° 01/2010.

Moland et al. (2007), relataram um isolado de *K. pneumoniae* que produziu 10 diferentes tipos de beta-lactamases, as quais foram detectadas por focalização isoelétrica (IEF) e incluíam AmpC plasmidial, ESBLs e KPC. Foi indicado para a confirmação de ESBLs utilizar o teste confirmatório segundo as padronizações do CLSI e não foi possível detectar a presença dessas, demonstrando a necessidade de testes moleculares para detecção enzimática em casos de isolados com múltiplas beta-lactamases[150].

Somente a detecção do gene não prediz o nível de expressão, pois também depende da força dos promotores, o número de cópias dos genes e o perfil fenotípico pode ser influenciado pelas mudanças nas proteínas da membrana externa, o inóculo testado e as condições de crescimento utilizadas[88].

Cepas expressando beta-lactamases tipo CTX-M tem sido isoladas de muitas partes do mundo, mas a maioria tem sido associada com surtos no leste Europeu, América do Sul e Japão[81].

A resistência para o ertapenem em *K. pneumoniae* depende da produção de beta-lactamases e defeitos na permeabilidade. Na maioria das cepas a perda da suscetibilidade foi mais marcada para ertapenem do que para imipenem ou meropenem,[101] concordando com os dados obtidos no presente estudo.

Na Figura 11, visualiza-se o produto da amplificação do gene *bla*_{TEM} e na Figura 12 dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTXM-2} após eletroforese em gel de agarose a 2%.



Figura 11. Produto da amplificação por PCR do gene *bla*_{TEM} para os isolados de *K. pneumoniae*. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1,2: amostras *bla*_{TEM} negativas; 3: amostra *bla*_{TEM} positiva; 4,5: amostras negativas; 6: controle da mistura da reação.



Figura 12. Produto da amplificação por PCR dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M-2} para os isolados de *K. pneumoniae*. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1,2,3: amostras *bla*_{SHV} positivas; 4: amostra *bla*_{CTX-M-2} positiva; 5: controle da mistura da reação.

A presente pesquisa avaliou a presença dos genes de ESBLs que foram confirmados fenotipicamente para *Enterobacter cloacae*. Estes estiveram presentes nos produtos da amplificação por PCR apresentados nas Figuras 13, 14 e 15.

Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima dos carbapenems e genes que codificam as β -lactamases para os isolados de *Enterobacter cloacae*.

Isolado	Genes	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		Imipenem	Meropenem	Ertapenem
1004	<i>bla</i> _{TEM}	1	0,5	8
1019	<i>bla</i> _{TEM}	1	0,25	4
1041	<i>bla</i> _{TEM}	0,75	0,38	> 32
1053	<i>bla</i> _{TEM}	0,5	1,5	>32
1068	<i>bla</i> _{TEM}	0,75	0,5	1,5
1090	<i>bla</i> _{TEM}	1	1	1
1097	<i>bla</i> _{TEM}	1	0,38	4
1102	<i>bla</i> _{TEM}	1	1	4
1113	<i>bla</i> _{TEM}	1	0,5	3
1008	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0,38	0,5	4
1014	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0,75	0,75	6

Pontos de corte utilizados para: sensível, intermediário e resistente, respectivamente: Imipenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$; $2 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$; Meropenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$; $2 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$; Ertapenem: $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$; $1 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Critérios de interpretação preconizados na nota técnica da ANVISA N° 01/2010

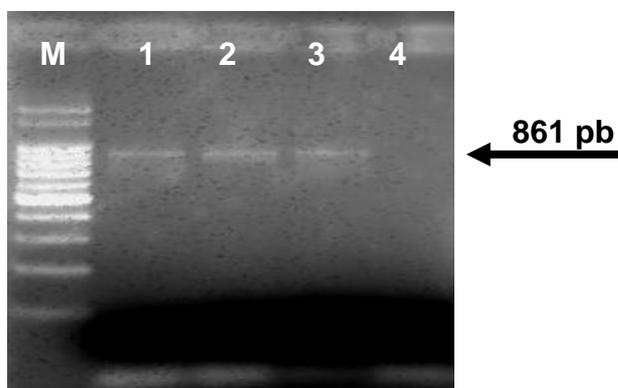


Figura 13. Produto de amplificação por PCR do gene *bla*_{TEM} para os isolados de *Enterobacter cloacae*. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1, 2 e 3: amostras *bla*_{TEM} positivas; 4: controle da mistura da reação.

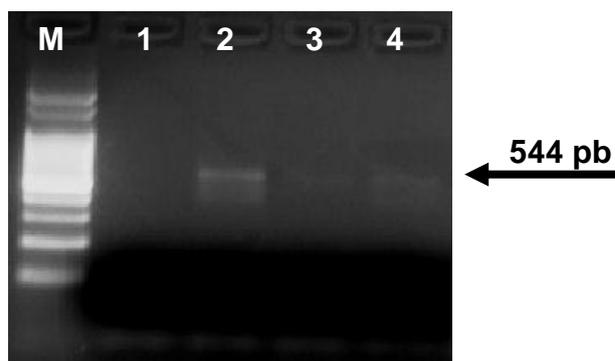


Figura 14. Produto de amplificação por PCR do gene *bla*_{CTX-M} para os isolados de *Enterobacter cloacae*. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1: controle da mistura da reação; 2, 3 e 4 amostras positivas.

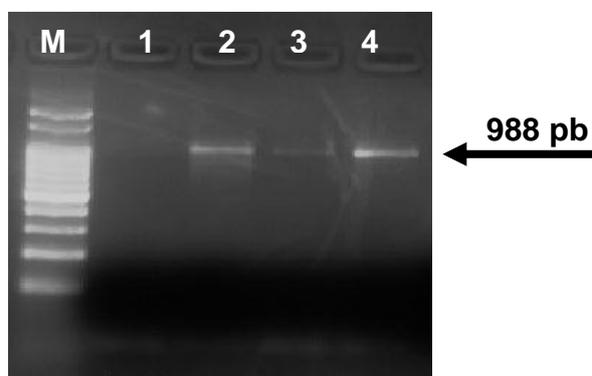


Figura 15. Produto de amplificação por PCR do gene *bla*_{CTX-M-2} para os isolados de *Enterobacter cloacae*. M: marcador de peso molecular 100 pb; 1: controle da mistura da reação; 2, 3 e 4 amostras positivas.

De uma maneira geral o método molecular de detecção dos genes de resistência (PCR) demonstrou a presença de 23/28 (82,1%) genes de ESBLs, sendo um único gene em 13 (46,4%) isolados, dois ou mais genes em 10 (35,7%) previamente identificados pelo teste confirmatório fenotípico. Provavelmente outros genes que não são a proposta do estudo poderiam ser detectados nos isolados que apresentaram ausência dos genes pesquisados.

No presente estudo houve prevalência do gene *bla*_{TEM} nas cepas de *Enterobacter* spp., contrastando com os tipos de ESBLs SHV e CTX-M, predominantes na Europa, mas por outro lado evidenciam similaridade com a América do Norte, onde o predomínio é de enzimas TEM.[10] Estudos

realizados no Brasil evidenciam um predomínio de cefotaximases em segundo lugar a ocorrência de SHV-1. Na cidade do Rio de Janeiro foi evidenciado a presença do gene CTX-M-8 em *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*[151]. No Brasil, apesar de poucas publicações com caracterização molecular dessas enzimas há um predomínio de CTX-M e SHV[151-156]. Dentre as cefotaximases, no Brasil, por relatos anteriores, há o predomínio do CTX-M2, justificando a proposta do estudo, apesar de não ter sido a mais frequente[135, 151, 155, 157-164].

5.5 DETECÇÃO DO GENE *bla*_{KPC}

Os resultados da amplificação do gene *bla*_{KPC} através da técnica da PCR nas 128 amostras bacterianas dos diferentes sítios anatômicos dos pacientes com infecções mostrou que 10,9% (14 amostras) dos isolados eram positivos para esse gene, presente somente nos isolados de *Enterobacter* spp.

Na Figura 16, pode-se observar o produto de amplificação por PCR do gene *bla*_{KPC}.

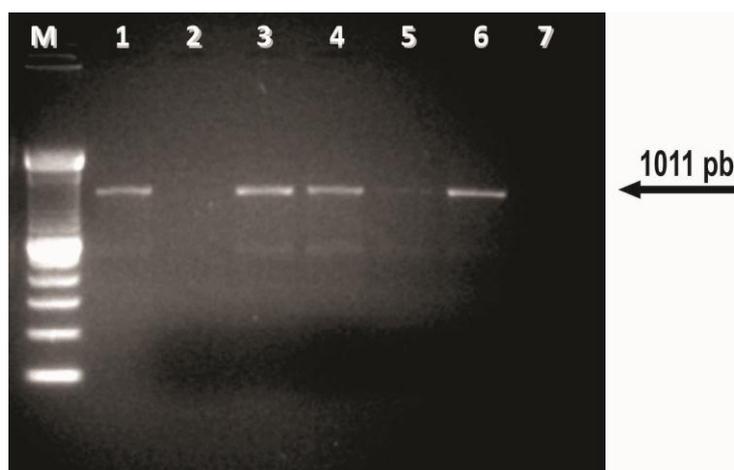


Figura 16. Produto da amplificação por PCR do gene *bla*_{KPC}. M; marcador de peso molecular 100 pb; 1, 3, 4, 5: amostras KPC positivas; 2: amostra KPC negativa; 6: controle positivo; 7: controle da mistura da reação.

Os genes que codificam as ESBLs, assim como seus produtos, já foram detectados em diversas espécies de Enterobactérias, mas a maior prevalência é observada em *K. pneumoniae*, *E. coli* e espécies do gênero *Enterobacter* [10].

No presente estudo a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2} foi avaliada nos 14 isolados de *Enterobacter* spp. produtores de KPC. A presença do gene *bla*_{TEM} foi evidenciada em duas amostras, em uma apresentava-se isoladamente e em outra associado ao gene *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-2}. As outras não apresentaram os genes de ESBLs pesquisados no presente estudo, indicando que mesmo outros genes ESBL possam estar presentes ou mesmo outros mecanismos possam estar associados.

A prevalência crescente de *Enterobacteriaceae* carreando carbapenemases é alarmante. Os dados de infecções notificados para CDC em 2007 indicaram que 8% de todos os isolados de *Klebsiella* foram carbapenem resistentes, em comparação com 1% em 2000[165].

Um aspecto interessante é que o microrganismo produtor de KPC predominante no Brasil e no mundo é a *K. pneumoniae*, enquanto que na região sul, as evidências deste e outros estudos indicam a presença de *Enterobacter*[61, 64].

Já foram descritas carbapenemases KPC em *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*, evidenciando a disseminação de determinantes genéticos móveis entre gêneros bacterianos distintos, dada a localização plasmidial dos genes descritos até o momento[166].

Os dados apresentados na Tabela 14 indicam que os microrganismos produtores de KPC eram *Enterobacter cloacae* (n=13) e *E. aerogenes* (n=1). A amostra clínica mais prevalente foi urina, seguida de sangue, a ocorrência foi maior em pacientes com câncer e todos mostraram-se resistentes ao ertapenem.

Tabela 14. Característica dos 14 isolados produtores de KPC dos pacientes do estudo.

Nº	Microrganismo isolado	Idade	Sítio de infecção	Doença de base	Suscetibilidade Antimicrobiana (µg/mL)*		
					Imipenem	Meropenem	Ertapenem
1010	<i>Enterobacter cloacae</i>	65	Urina	Fístula do intestino	> 32	> 32	> 32
1044	<i>Enterobacter cloacae</i>	30	Urina	Insuficiência renal crônica	3	3	> 32
1128	<i>Enterobacter cloacae</i>	82	Urina	Acidente vascular cerebral	> 32	> 32	> 32
1159	<i>Enterobacter cloacae</i>	44	Urina	Cálculo renal	1	1	> 32
1005	<i>Enterobacter cloacae</i>	58	Cateter	Embolia e trombose dos MI	0,38	> 32	> 32
1132	<i>Enterobacter cloacae</i>	35	Urina	Câncer de colo de útero	4	0,75	8
1014**	<i>Enterobacter cloacae</i>	71	Urina	DM, HAS, AVC	0,75	0,75	6
1138	<i>Enterobacter cloacae</i>	60	Sangue	Câncer de cólon	1	0,75	6
1129	<i>Enterobacter cloacae</i>	42	Biópsia queimadura	Queimadura de tronco	4	0,75	6
1102**	<i>Enterobacter cloacae</i>	57	Urina	Câncer de reto	1	1	4
1136	<i>Enterobacter cloacae</i>	38	Urina	Câncer colo de útero	2	0,75	4
1103	<i>Enterobacter aerogenes</i>	62	Urina	DM	1	0,38	4
1022	<i>Enterobacter cloacae</i>	28	Sangue	Cardiopatia	2	0,5	3
1042	<i>Enterobacter cloacae</i>	62	Urina	Atrofia muscular espinhal	1,5	0,25	2

* Pontos de corte utilizados para definir sensibilidade, suscetibilidade reduzida e resistência, respectivamente dos isolados: Imipenem: ≤ 1 µg/mL; 2 µg/mL e ≥ 4 µg/mL; Meropenem: ≤ 1 µg/mL; 2 µg/mL e ≥ 4 µg/mL; Ertapenem: ≤ 0,5 µg/mL; 1 µg/mL e ≥ 2 µg/mL. Critérios de interpretação preconizados na nota técnica da ANVISA N° 01/2010. AVC: Acidente vascular cerebral; MI: Membros inferiores; DM: Diabetes *mellitus*; HAS: Hipertensão arterial sistêmica

** Cepas produtoras de ESBL

A média de idade dos pacientes que apresentaram infecção por KPC no presente estudo foi de 52,4 anos (variação de 28-82 anos). Resultados similares ao estudo de Bergamasco et al. (2012), no qual a média de idade foi de 54,5 anos (variação, 37-74 anos)[117]. A incidência de infecção KPC após o transplante durante o período do estudo foi de 16,7% (2/12), 12,9% (4 / 31), e 26,3% (5/19) para o coração, fígado, rim respectivamente[117].

Almeida et al. (2009), relataram ter encontrado 60% de isolados de *K. pneumoniae* positivos para o gene *bla*_{KPC} por PCR, em infecções da corrente sanguínea em Recife, Brasil. O perfil de suscetibilidade mostrou 100% de resistência para ertapenem e 50% para imipenem e meropenem. Este trabalho confirmou que isolados produtores de KPC podem ser clinicamente não reconhecidos por não mostrarem-se *in vitro* resistentes aos carbapenens[167].

O presente trabalho demonstrou resultados coerentes com os dados dos autores citados anteriormente no que se refere ao perfil de suscetibilidade dos isolados produtores de KPC, apresentaram-se 100%

resistentes ao ertapenem e resistentes ao imipenem e meropenem respectivamente em 35,7% e 28,5%.

No que se refere ao sítio de infecção dos 14 isolados produtores de KPC dos pacientes do estudo, 71,4% foram diagnosticados com infecção do trato urinário, 14,3% com sepse, enquanto que no primeiro surto por KPC, descrito por Vespero et al. (2009), em 19 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC em um hospital universitário na cidade de Londrina, Paraná, Brasil, todos foram positivos para o gene *bla*_{KPC}. Dentre os pacientes-caso 26,3% eram pacientes vítimas de trauma, 21,0% neuropatias, 15,8% cardiopatas, 15,8% diagnosticados com infecção do trato urinário, 10,5% pneumonia, 5,2% tétano e 5,2% com sepse relacionada a cateter[168].

No estudo de Won et al. (2011), os sítios isolados de bactérias produtoras de KPC mais frequentes foram urina (30%), escarro ou aspirado traqueal (30%) e sangue (7,5%)[169].

Em um surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 foi identificado em um hospital escola, público, terciário em São Paulo, Brasil, em junho de 2009 ocorreram 12 episódios de infecção por *K. pneumoniae* produtora de KPC, em pacientes com transplante de órgão sólido, 2 em coração, 4 no fígado e 6 no rim com taxas de incidência de 16,7%, 12,9% e 26,3% em transplante de coração, fígado e rim, respectivamente. Infecção ocorreu num tempo médio de 20 dias após transplante. Os sítios de infecção primária foram os seguintes: 4 infecções do trato urinário, 4 infecções sanguíneas, 2 pneumonias, e 2 infecções de sítio cirúrgicos[117].

Um total de 22 amostras clínicas foram recuperadas a partir destes pacientes; amostras foram constituídas de 7 hemoculturas, 6 amostras de urina, 2 respiratórias (lavado broncoalveolar ou aspirado traqueal), 4 secreções de sítio cirúrgico, e 3 de ponta de cateter[117].

A ocorrência de falso-positivos pelo TMH é observada provavelmente devido à associação de perda de porina e produção de ESBL CTX-M do que beta-lactamases hiper produtoras de AmpC, justificando a não realização deste teste no presente estudo. Esta hipótese é reforçada pelo aumento de

resultados falso-positivos relacionados ao aumento do inóculo da cepa teste ATCC 25922, além de que os laboratórios precisam ficar atentos aos resultados falso-positivos que possam ocorrer, especialmente em áreas onde há alta prevalência de isolados produtores de ESBL, sendo necessário um método alternativo como a PCR[170].

Novas recomendações para triagem de ESBLs e KPCs foram publicadas pelo CLSI no decorrer do presente estudo, utilizando outros pontos de corte para imipenem, meropenem e ertapenem, provavelmente esta nova triagem detectaria um número mais baixo de KPCs positivos.

5.6 AVALIAÇÃO DAS PORINAS

A resistência dos carbapenes em *Enterobacteriaceae* está aumentando e geralmente requer além da produção de beta-lactamases, outros mecanismos, particularmente a perda de porinas.

As proteínas da membrana externa (OmpC e OmpF) dos isolados do estudo foram avaliadas com anticorpos específicos (Figura 17) para verificar possíveis mecanismos de resistência alternativos nos 106 isolados de *Enterobacter cloacae*. Destes somente sete mostraram-se positivos conforme resultados apresentados na Tabela 15.



Figura 17. Dot blot de duas amostras positivas para a porina OmpF de *Enterobacter cloacae*.

Tabela 15. CIMs dos agentes antimicrobianos para cepas de *Enterobacter cloacae* que apresentaram OmpC e OmpF.

Isolado			MIC($\mu\text{g/mL}$) [*]		
	OmpC	OmpF	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
1008	+	-	0.38	0.5	4
1018	+	+	0.38	0.25	6
1041	+	-	0.75	0.38	> 32
1042	-	+	1.5	0.25	2
1079	+	+	1	2	3
1082	+	+	0.5	0.38	> 32
1102	+	+	1	1	4

* Pontos de corte utilizados para definir sensibilidade, suscetibilidade reduzida e resistência, respectivamente dos isolados: Imipenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$; $2 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$; Meropenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$; $2 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 4 \mu\text{g/mL}$; Ertapenem: $\leq 0,5 \mu\text{g/mL}$; $1 \mu\text{g/mL}$ e $\geq 2 \mu\text{g/mL}$. Critérios de interpretação preconizados na nota técnica da ANVISA N° 01/2010.

Os isolados 1042 e 1102 da Tabela 15 foram produtores de KPC, assim como também porinas OmpC e/ou OmpF estavam presentes. O isolado 1102 também foi produtor de ESBL- gene *bla*_{TEM}.

Tem sido relatado que a deficiência ou perda de porina OmpC ou OmpF, ou ambas, é acompanhado por um aumento na resistência dos antimicrobianos e que a maioria dos relatos tem mostrado que, das 2 porinas, a expressão da porina OmpF é perdida preferencialmente durante o desenvolvimento da resistência antimicrobiana e isto é provavelmente devido ao poro maior, comparado com OmpC[171]. Este fato está expresso na Tabela 15.

A produção de beta-lactamase combinada com deficiência das OmPs resulta na resistência do ertapenem e suscetibilidade reduzida para imipenem e meropenem. OmpC e OmpF podem ter uma função importante na resistência ou suscetibilidade reduzida para os carbapenens em *Enterobacter* spp.

Os isolados de *Enterobacter cloacae* produtores de KPC que foram positivos para OmpC ou OmpF tendem a ter CIMs mais baixas para os carbapenens, podendo tornar mais difícil a detecção pelos laboratórios

clínicos, assim como referem Landman, Bratu e Quale em 2009 em relação à OmpK36[172].

Da mesma forma relataram Cai et al. (2008), que a produção de múltiplas beta-lactamases, especialmente KPC-2 e perda de uma porina em *Enterobacter cloacae* resulta em resistência para os carbapenens[173]. Este relato está refletido na Tabela 17, no isolado 1014, no qual podemos observar que foi produtor de KPC, de ESBL com múltiplas beta-lactamases e ausência de porinas OmpC e OmpF.

Tem sido previamente relatado que a permeabilidade da membrana externa e alto nível de produção de cefalosporinase pode agir em combinação em isolados clínicos de *Enterobacter cloacae* conferindo resistência para os carbapenens[174].

Jacoby et al. (2004), detectaram que a maioria das cepas de *K. pneumoniae* deficientes em porinas, as quais produziram beta-lactamases e foram resistentes para ertapenem, mostraram suscetibilidade reduzida para imipenem e meropenem[101].

O nível de suscetibilidade do imipenem em *E. cloacae* e *K. pneumoniae* é mais dependente da beta-lactamase do tipo AmpC. A resistência do imipenem pode ocorrer em *K. pneumoniae* quando alto nível de AmpC é produzida em combinação com perda de proteína da membrana externa, não sendo a proposta do presente estudo[14, 17].

O fato que o ertapenem é mais afetado do que outros carbapenens pelo mecanismo das OMPs pode refletir uma penetração mais lenta através das porinas menores que são perdidas e talvez possa ser dependente do seu tamanho maior e da carga negativa. Embora a prevalência desses isolados seja extremamente rara, merecem ser monitorados e é notável que embora o ertapenem é o mais afetado dos carbapenens, existem relatos da seleção pelos outros carbapenens[103].

É interessante notar, como mostra a Tabela 16, que 11/13 (84,6%) dos isolados de *Enterobacter cloacae* produtores de KPC apresentaram ausência de porinas. A alta taxa de ausência de porinas 95/115 (82,6%) em

isolados KPC negativos confirma o mecanismo de impermeabilidade, evidenciado pela resistência ao ertapenem.

Tabela 16. Percentual (%) de ausência de porinas em isolados de *Enterobacter cloacae* produtores e não produtores de KPC.

Mecanismo de resistência	Ausência de porinas (-/n)	Percentual(%)
KPC positivos	11/13	84,6
KPC negativos	95/115	82,6
Total	106/128	82,8

Provavelmente os dados dos isolados KPC positivos com ausência de porinas apresentam uma sinergia entre os mecanismos de resistência relacionados à impermeabilidade e expressão de carbapenemases do tipo KPC.

No que diz respeito aos isolados KPC negativos, a taxa de ausência de porinas foi marcante de 82,6%, confirmando o mecanismo de impermeabilidade relacionado à resistência ao ertapenem.

Por outro lado, a detecção da presença de porinas em 17,4% dos isolados KPC negativos sugere outro mecanismo de resistência, possivelmente relacionado à superexpressão de bombas de efluxo.

No estudo de Hernández-Allés et al. (1999), também foi revelado uma estranha correlação entre a expressão de ambas porinas e ESBLs negativas, ou expressão de somente uma porina e ESBL positiva. Tem sido demonstrado claramente que ambas as deficiência de porina e produção de ESBL interagem no aumento da resistência para os antimicrobianos[171].

Enfim, os resultados dos diferentes mecanismos de resistência envolvidos nos isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* do presente estudo: produção de ESBL, cepas produtoras de KPC, presença de OmpC e OmpF, com suas respectivas CIMs em relação ao ertapenem estão expressos na Tabela 17.

Tabela 17. Presença de genes envolvidos em mecanismos de resistência e CIM ao ertapenem presente nos isolados do estudo.

Isolado	Microrganismo	Mecanismo de resistência						CIM (µg/mL)	
		ESBLs				Carbapenemase	OMPs		
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>bla</i> _{KPC}	OmpC		OmpF
1002	<i>K. pneumoniae</i>	x	x						> 32
1006		x	x						> 32
1011		x		x	x				12
1034		x		x	x				1
1035				x	x				> 32
1052			x						> 32
1099		x		x	x				1
1158		x	x	x					2
2008		x							4
2011				x					6
2010		x							1,5
2006		x	x						1
1004	<i>E. cloacae</i>	x							8
1005						x			> 32
1008		x		x	x		x		4
1010						x			> 32
1014		x	x	x	x	x			6
1018							x	x	6
1019		x							4
1022						x			3
1041		x					x		> 32
1042						x		x	2
1044						x			> 32
1053		x							> 32
1068		x							1,5
1079							x	x	3
1082							x	x	> 32
1090		x							1
1097		x							4
1102		x					x	x	4
1113		x							3
1128							x		> 32
1129							x		6
1132							x		8
1136							x		4
1138							x		6
1159						x		> 32	

As porinas estavam presentes tanto em isolados produtores de KPC quanto em não produtores de KPC. Dos 13 isolados de *Enterobacter cloacae* produtores de KPC, em dois foram observadas a presença de porinas.

Estudos adicionais serão necessários para definir outros mecanismos de resistência envolvidos e determinar os genes responsáveis para que se possa estabelecer uma terapia apropriada e com novas estratégias para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Assim, este estudo contribuiu para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência em bactérias *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp., assim como dados epidemiológicos dos dois hospitais da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil.

CONCLUSÃO

1. Entre os 128 isolados analisados, 85,9% mostraram-se resistentes ao ertapenem e 14,1% com suscetibilidade reduzida. A resistência ao imipenem foi detectada em 15% e ao meropenem em 7% dos isolados.
 2. A prevalência de ESBL definida pelo método fenotípico foi de 28/128 (21,9%) na série de casos do estudo.
 3. Todos os isolados de *Klebsiella pneumoniae* (17/17) 100% foram positivos para ESBL pelo teste fenotípico confirmatório, assim como (11/106) 10,4% dos isolados de *Enterobacter cloacae*.
 4. O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 20/28 (71,4%) dos isolados, *bla*_{CTX-M} em 9/28 (32,1%), *bla*_{CTX-M-2} em 6/28 (21,4%) dos isolados e *bla*_{SHV} em 6/28 (21,4%) dos isolados.
 5. O gene *bla*_{KPC} estava presente em 14 (10,9%) isolados e todos mostraram-se resistentes ao ertapenem.
 6. As proteínas de membrana externa OmpC e OmpF para *Enterobacter cloacae* estavam presentes em 7 (6,6%) isolados, destes 4/106 (3,8%) OmpC e OmpF, somente OmpC em 2/106 (1,9%) e OmpF foi detectado em 1/106 (0,9%) isolado.
-

REFERÊNCIAS

1. Castanheira, M., Mendes, R.E., Rhomberg, P.R., Jones, R.N., Rapid emergence of bla CTX-M among Enterobacteriaceae in US medical centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microbial Drug Resistance*, 2008. **14**(3): p. 211-216.
 2. Bratu, S., Landman, D., Haag, R., Recco, R., Eramo, A., Alam, M., Quale, J., Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Archives of internal medicine*, 2005a. **165**(12): p. 1430.
 3. Weber, D.J., Raasch, R., Rutala, W.A., Nosocomial Infections in the ICU*. *Chest*, 1999. **115**(suppl 1): p. 34S-41S.
 4. Cosgrove, S.E., Kaye, K.S., Eliopoulos, G.M., Carmeli, Y., Health and economic outcomes of the emergence of third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacter* species. *Archives of internal medicine*, 2002. **162**(2): p. 185.
 5. Bornet, C., Davin-Regli, A., Bosi, C., Pages, J.M., Bollet, C., Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *Journal of clinical microbiology*, 2000. **38**(3): p. 1048-1052.
 6. Yigit, H., Anderson, G.J., Biddle, J.W., Steward, C.D., Rasheed, J.K., Valera, L.L., McGowan Jr, J.E., Tenover, F.C., Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002. **46**(12): p. 3817-3822.
 7. Bratu, S., Mooty, M., Nichani, S., Landman, D., Gullans, C., Pettinato, B., Karumudi, U., Tolaney, P., Quale, J., Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005b. **49**(7): p. 3018-3020.
 8. Woodford, N., Dallow, J.W.T., Hill, R.L.R., Palepou, M.F.I., Pike, R., Ward, M.E., Warner, M., Livermore, D.M., Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *International journal of antimicrobial agents*, 2007. **29**(4): p. 456-459.
 9. Koneman, E.W., Color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 5th ed. 1997, Philadelphia: Lippincott. xv, 1395, 1-63 p., 65 p. of plates.
 10. Jacoby, G.A., Munoz-Price, L.S., The new β -lactamases. *New England Journal of Medicine*, 2005. **352**(4): p. 380-391.
 11. Bush, K., Jacoby, G.A., Medeiros, A.A., A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular
-

- structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995. **39**(6): p. 1211.
12. Bush, K., Jacoby, G.A., Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2010. **54**(3): p. 969-976.
 13. Livermore, D.M., Woodford, N., Carbapenemases: a problem in waiting? *Current opinion in Microbiology*, 2000. **3**(5): p. 489-495.
 14. Bradford, P.A., Urban, C., Mariano, N., Projan, S.J., Rahal, J.J., Bush, K., Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1997. **41**(3): p. 563-569.
 15. Martínez-Martínez, L., Pascual, A., Hernández-Allés, S., Alvarez-Díaz, D., Suárez, A.I., Tran, J., Benedí, V.J., Jacoby, G.A., Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1999. **43**(7): p. 1669-1673.
 16. Cao, V.T., Arlet, G., Ericsson, B.M., Tammelin, A., Courvalin, P., Lambert, T., Emergence of imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* owing to combination of plasmid-mediated CMY-4 and permeability alteration. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2000. **46**(6): p. 895-900.
 17. Raimondi, A., Traverso, A., Nikaido, H., Imipenem- and meropenem-resistant mutants of *Enterobacter cloacae* and *Proteus rettgeri* lack porins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1991. **35**(6): p. 1174-1180.
 18. Yan, J.J., Ko, W.C., Tsai, S.H., Wu, H.M., Wu, J.J., Outbreak of infection with multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying blaIMP-8 in a university medical center in Taiwan. *Journal of clinical microbiology*, 2001a. **39**(12): p. 4433-4439.
 19. Yigit, H., Queenan, A.M., Anderson, G.J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.W., Steward, C.D., Alberti, S., Bush, K., Tenover, F.C., Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2001. **45**(4): p. 1151-1161.
 20. Moland, E.S., Hanson, N.D., Herrera, V.L., Black, J.A., Lockhart, T.J., Hossain, A., Johnson, J.A., Goering, R.V., Thomson, K.S., Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2003. **51**(3): p. 711-714.
 21. Woodford, N., Tierno Jr, P.M., Young, K., Tysall, L., Palepou, M.F.I., Ward, E., Painter, R.E., Suber, D.F., Shungu, D., Silver, L.L., Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(12): p. 4793-4799.
-

22. Bratu, S., Brooks, S., Burney, S., Kochar, S., Gupta, J., Landman, D., Quale, J., Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. *Clinical infectious diseases*, 2007. **44**(7): p. 972-975.
 23. Bratu, S., Landman, D., Alam, M., Tolentino, E., Quale, J., Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005c. **49**(2): p. 776-778.
 24. Miriagou, V., Tzouvelekis, L.S., Rossiter, S., Tzelepi, E., Angulo, F.J., Whichard, J.M., Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003. **47**(4): p. 1297-1300.
 25. Queenan, A.M., Bush, K., Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical microbiology reviews*, 2007. **20**(3): p. 440-458.
 26. Paterson, D.L., Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *American journal of infection control*, 2006. **34**(5): p. S20-S28.
 27. Rossi, F., The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical infectious diseases*, 2011. **52**(9): p. 1138.
 28. Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P.R., Paterson, D.L., Bochicchio, G.V., Snyder, T.A., Satishchandran, V., McCarroll, K., DiNubile, M.J., Chow, J.W., In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART (Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2006. **58**(1): p. 205-210.
 29. Meyer, G., Picoli, S.U., Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. *J Bras Patol Med Lab*, 2011. **47**(1): p. 25-31.
 30. Oliveira, C., Dal Forno, N.L.F., Alves, I., Horta, J.A., Rieger, A., Alves, S.H., Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2009. **42**: p. 556-560.
 31. Peirano, G., Seki, L.M., Passos, V.L.V., Pinto, M.C.F.G., Guerra, L.R., Asensi, M.D., Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. **63**(2): p. 265-268.
 32. Hirsch, E.B., Tam, V.H., Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010. **65**(6): p. 1119-1125.
 33. Hossain, A., Ferraro, M., Pino, R.M., Dew III, R., Moland, E., Lockhart, T., Thomson, K., Goering, R., Hanson, N., Plasmid-mediated
-

- carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(11): p. 4438-4440.
34. Bradford, P.A., Bratu, S., Urban, C., Visalli, M., Mariano, N., Landman, D., Rahal, J.J., Brooks, S., Cebular, S., Quale, J., Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clinical infectious diseases*, 2004. **39**(1): p. 55.
35. Alba, J., Ishii, Y., Thomson, K., Moland, E.S., Yamaguchi, K., Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005. **49**(11): p. 4760-4762.
36. Naas, T., Nordmann, P., Vedel, G., Poyart, C., Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2005. **49**(10): p. 4423-4424.
37. Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Suarez, C.J., Lopez, J.A., Vallejo, M., Quinn, J.P., First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(8): p. 2880-2882.
38. Navon-Venezia, S., Chmelnitsky, I., Leavitt, A., Schwaber, M.J., Schwartz, D., Carmeli, Y., Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(9): p. 3098-3101.
39. Wei, Z.Q., Du, X.X., Yu, Y.S., Shen, P., Chen, Y.G., Li, L.J., Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. **51**(2): p. 763-765.
40. Villegas, M.V., Lolans, K., Correa, A., Kattan, J.N., Lopez, J.A., Quinn, J.P., First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. **51**(4): p. 1553-1555.
41. Deshpande, L.M., Rhomberg, P.R., Sader, H.S., Jones, R.N., Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of *Enterobacteriaceae* isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2006a. **56**(4): p. 367-372.
42. Deshpande, L.M., Jones, R.N., Fritsche, T.R., Sader, H.S., Occurrence and characterization of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microbial Drug Resistance*, 2006b. **12**(4): p. 223-230.
43. Pasteran, F.G., Otaegui, L., Guerriero, L., Radice, G., Maggiora, R., Rapoport, M., Faccone, D., Di Martino, A., Galas, M., *Klebsiella*
-

- pneumoniae Carbapenemase–2, Buenos Aires, Argentina. *Emerging infectious diseases*, 2008. **14**(7): p. 1178.
44. Cuzon, G., Naas, T., Demachy, M.C., Nordmann, P., Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008. **52**(2): p. 796-797.
 45. Souli, M., Galani, I., Antoniadou, A., Papadomichelakis, E., Poulakou, G., Panagea, T., Vourli, S., Zerva, L., Armaganidis, A., Kanellakopoulou, K., An Outbreak of Infection due to β -Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2–Producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: Molecular Characterization, Epidemiology, and Outcomes. *Clinical infectious diseases*, 2010. **50**(3): p. 364.
 46. Giakoupi, P., Maltezou, H., Polemis, M., Pappa, O., Saroglou, G., Vatopoulos, A., KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Eurosurveillance*, 2009. **14**(21).
 47. Goldfarb, D., Harvey, S.B., Jessamine, K., Jessamine, P., Toye, B., Desjardins, M., Detection of plasmid-mediated KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: evidence of intrahospital transmission. *Journal of clinical microbiology*, 2009. **47**(6): p. 1920-1922.
 48. Nadkarni, A.S., Schliep, T., Khan, L., Zeana, C.B., Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. *American journal of infection control*, 2009. **37**(2): p. 121-126.
 49. Walther-Rasmussen, J., Høiby, N., Class A carbapenemases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007. **60**(3): p. 470-482.
 50. Samuelsen, Ø., Naseer, U., Tofteland, S., Skutlaberg, D.H., Onken, A., Hjetland, R., Sundsfjord, A., Giske, C.G., Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. **63**(4): p. 654-658.
 51. Hawser, S.P., Bouchillon, S.K., Hoban, D.J., Hackel, M., Johnson, J.L., Badal, R.E., *Klebsiella pneumoniae* isolates possessing KPC β -lactamase in Israel, Puerto Rico, Colombia and Greece. *International journal of antimicrobial agents*, 2009. **34**(4): p. 384-385.
 52. Roche, C., Cotter, M., O Connell, N., Crowley, B., First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. 2009.
 53. Halstead, D.C., Sellen, T.J., Adams-Haduch, J.M., Dossenback, D.A., Abid, J., Doi, Y., Paterson, D.L., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, northeast Florida. *Southern medical journal*, 2009. **102**(7): p. 680-687.
-

-
54. Carbonne, A., Thiolet, J., Fournier, S., Fortineau, N., Kassis-Chikhani, N., Boytchev, I., Aggoune, M., Segquier, J., Senechal, H., Tivolacci, M., Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill*, 2010. **15**: p. 48.
 55. Piekarska, K., Zacharczuk, K., Szych, J., Zawadzka, E., Wilk, E., Wardak, S., Jagielski, M., Gierczyński, R., Dissemination of the KPC carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Warsaw, Poland]. *Medycyna doświadczalna i mikrobiologia*, 2010. **62**(1): p. 9.
 56. Wendt, C., Schütt, S., Dalpke, A., Konrad, M., Mieth, M., Trierweiler-Hauke, B., Weigand, M., Zimmermann, S., Biehler, K., Jonas, D., First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*, 2010. **29**(5): p. 563-570.
 57. Bogaerts, P., Montesinos, I., Rodriguez-Villalobos, H., Blairon, L., Deplano, A., Glupczynski, Y., Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010. **65**(2): p. 361-362.
 58. Nordmann, P., Cuzon, G., Naas, T., The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet infectious diseases*, 2009. **9**(4): p. 228-236.
 59. Monteiro, J., Santos, A.F., Asensi, M.D., Peirano, G., Gales, A.C., First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009. **53**(1): p. 333-334.
 60. Pavez, M., Mamizuka, E.M., Lincopan, N., Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009. **53**(6): p. 2702-2702.
 61. Zavascki, A.P., Zoccoli, C.M., Machado, A., De Oliveira, K., Superti, S.V., Pilger, D.A., Cantarelli, V.V., Barth, A.L., KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: A widespread threat in waiting? *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 2010. **14**(6): p. e539.
 62. Brasil, A.-A.N.d.V.S. O desafio dos microrganismos multiresistentes... *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase(KPC). 2011 [Acesso em: 30 out de 2011]; Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>.
 63. Brasil, M.d.S.S.d.V.e.S. Bactéria KPC. 2010 [Acesso em: 29 out de 2010]; Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/clipping_232425102010.pdf.
 64. Zavascki, A.P., Machado, A.B.M.P., Oliveira, K.R.P., Superti, S.V., Pilger, D.A., Cantarelli, V.V., Pereira, P.R., Lieberkmecht, A.C., Barth, A.L., KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from
-

- Southern Brazil. *International journal of antimicrobial agents*, 2009. **34**(3): p. 286-288.
65. Gasink, L.B., Edelstein, P.H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M., Fishman, N.O., Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infection control and hospital epidemiology: the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America*, 2009. **30**(12): p. 1180.
66. White, R., Kays, M., Friedrich, L., Brown, E., Koonce, J., Pseudoresistance of *Pseudomonas aeruginosa* resulting from degradation of imipenem in an automated susceptibility testing system with predried panels. *Journal of clinical microbiology*, 1991. **29**(2): p. 398-400.
67. Doern, G.V., Brueggemann, A.B., Perla, R., Daly, J., Halkias, D., Jones, R.N., Saubolle, M.A., Multicenter laboratory evaluation of the bioMérieux Vitek antimicrobial susceptibility testing system with 11 antimicrobial agents versus members of the family Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of clinical microbiology*, 1997. **35**(8): p. 2115-2119.
68. Steward, C.D., Wallace, D., Hubert, S.K., Lawton, R., Fridkin, S.K., Gaynes, R.P., McGowan, J.E., Tenover, F.C., Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of Project ICARE laboratories. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2000. **38**(1): p. 59-67.
69. Steward, C.D., Mohammed, J.M., Swenson, J.M., Stocker, S.A., Williams, P.P., Gaynes, R.P., McGowan Jr, J.E., Tenover, F.C., Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Journal of clinical microbiology*, 2003. **41**(1): p. 351-358.
70. Tenover, F.C., Kalsi, R.K., Williams, P.P., Carey, R.B., Stocker, S., Lonsway, D., Rasheed, J.K., Biddle, J.W., McGowan Jr, J.E., Hanna, B., Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerging infectious diseases*, 2006. **12**(8): p. 1209.
71. Anderson, K., Lonsway, D., Rasheed, J., Biddle, J., Jensen, B., McDougal, L., Carey, R., Thompson, A., Stocker, S., Limbago, B., Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*, 2007. **45**(8): p. 2723-2725.
72. Sampaio, J., Consenso em detecção de resistência bacteriana aos antimicrobianos em bacilos Gram-negativos. *Revista da Sociedade Brasileira de Microbiologia*, 2008. **3**: p. 18-27.
73. Brasil, A.-A.N.d.V.S.-. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por
-

- microrganismos multirresistentes. 2010 [Acesso em: 08 nov de 2010]; Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad77d15359461/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES>.
74. Institute, C.L.S., Methods for dilution antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically., in *Approved standard M02–A10 and M07-A8. CLSI, Wayne, PA.* 2010.
 75. Lee, K., Chong, Y., Shin, H., Kim, Y., Yong, D., Yum, J., Modified Hodge and EDTA - disk synergy tests to screen metallo - β - lactamase - producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical microbiology and infection*, 2001. **7**(2): p. 88-91.
 76. Pasteran, F., Mendez, T., Guerriero, L., Rapoport, M., Corso, A., Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology*, 2009. **47**(6): p. 1631-1639.
 77. Tsakris, A., Kristo, I., Poulou, A., Markou, F., Ikonomidis, A., Pournaras, S., First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. **62**(6): p. 1257-1260.
 78. Tenover, F.C., Reller, L.B., Weinstein, M.P., Rapid detection and identification of bacterial pathogens using novel molecular technologies: Infection control and beyond. *Clinical infectious diseases*, 2007. **44**(3): p. 418-423.
 79. Institute, C.a.L.S., Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Twentieth Informational Supplement. . 2010: CLSI document M100-S20. Wayne, PA.
 80. Institute, C.a.L.S., Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing-Table M100-S19. 2009: Wayne, PA, USA.
 81. Bradford, P., Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev*, 2001. **14**: p. 933-951.
 82. Coudron, P.E., Moland, E.S., Sanders, C.C., Occurrence and detection of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae* at a veterans medical center: seek and you may find. *J Clin Microbiol*, 1997. **35**(10): p. 2593-7.
 83. Emery, C.L., Weymouth, L.A., Detection and clinical significance of extended-spectrum beta-lactamases in a tertiary-care medical center. *Journal of clinical microbiology*, 1997. **35**(8): p. 2061-2067.
 84. Gangoue-Pieboji, J., Bedenic, B., Koulla-Shiro, S., Randegger, C., Adiogo, D., Ngassam, P., Ndumbe, P., Hachler, H., Extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Yaounde, Cameroon. *J Clin Microbiol*, 2005. **43**(7): p. 3273-7.
-

85. Luzzaro, F., Mezzatesta, M., Mugnaioli, C., Perilli, M., Stefani, S., Amicosante, G., Rossolini, G.M., Toniolo, A., Trends in production of extended-spectrum β -lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. *Journal of clinical microbiology*, 2006. **44**(5): p. 1659-1664.
 86. Spanu, T., Luzzaro, F., Perilli, M., Amicosante, G., Toniolo, A., Fadda, G., Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in members of the family Enterobacteriaceae in Italy: implications for resistance to beta-lactams and other antimicrobial drugs. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002. **46**(1): p. 196-202.
 87. Martins, A.C., Picoli, S.U., Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bras. Patol. Med. Lab*, 2011. **47**(4): p. 421-426.
 88. Hall, M.A.L., Fluit, A.C., Paauw, A., Box, A.T.A., Bricse, S., Verhoef, J., Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 Automated Instruments for Detection of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. *Journal of clinical microbiology*, 2002. **40**(10): p. 3703-3711.
 89. Nordmann, P., Trends in β -lactam resistance among Enterobacteriaceae. *Clinical infectious diseases*, 1998. **27**(Supplement 1): p. S100.
 90. Ardanuy, C., Liñares, J., Domínguez, M.A., Hernández-Allés, S., Benedí, V.J., Martínez-Martínez, L., Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1998. **42**(7): p. 1636-1640.
 91. Sanders, C.C., Barry, A.L., Washington, J.A., Shubert, C., Moland, E.S., Traczewski, M.M., Knapp, C., Mulder, R., Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. *Journal of clinical microbiology*, 1996. **34**(12): p. 2997-3001.
 92. d'Azevedo, P.A., Gonçalves, A.L.S., Musskopf, M.I., Ramos, C.G., Dias, C.A.G., Laboratory tests in the detection of extended spectrum beta-lactamase production: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) screening test, the E-test, the double disk confirmatory test, and cefoxitin susceptibility testing. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 2004. **8**(5): p. 372-377.
 93. Murray, P.R., Baron, E.J., Jorgensen, J., Landry, M., Pfaller, M., eds. *Manual of clinical microbiology*. 9th ed. 2007, ASM Press: Washington, D.C. 1114-45.
 94. Pitout, J.D.D., Laupland, K.B., Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *The Lancet infectious diseases*, 2008. **8**(3): p. 159-166.
 95. Weisenberg, S.A., Morgan, D.J., Espinal-Witter, R., Larone, D.H., Clinical outcomes of patients with *Klebsiella pneumoniae*
-

- carbapenemase-producing *K. pneumoniae* after treatment with imipenem or meropenem. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2009. **64**(2): p. 233-235.
96. James, C.E., Mahendran, K.R., Molitor, A., Bolla, J.M., Bessonov, A.N., Winterhalter, M., Pagès, J.M., How β -lactam antibiotics enter bacteria: a dialogue with the porins. *PLoS One*, 2009. **4**(5): p. e5453.
97. Pagès, J.M., James, C.E., Winterhalter, M., The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 2008. **6**(12): p. 893-903.
98. Davin-Regli, A., Bolla, J.M., James, C.E., Lavigne, J.P., Chevalier, J., Garnotel, E., Molitor, A., Membrane permeability and regulation of drug influx and efflux in Enterobacterial pathogens. *Current drug targets*, 2008. **9**(9): p. 750-759.
99. Bornet, C., Saint, N., Fetnaci, L., Dupont, M., Davin-Régli, A., Bollet, C., Pagès, J.M., Omp35, a new *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(6): p. 2153-2158.
100. Nikaido, H., Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2003. **67**(4): p. 593-656.
101. Jacoby, G.A., Mills, D.M., Chow, N., Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(8): p. 3203-3206.
102. Paterson, D.L., Rossi, F., Baquero, F., Hsueh, P.R., Woods, G.L., Satishchandran, V., Snyder, T.A., Harvey, C.M., Teppler, H., DiNubile, M.J., In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2005b. **55**(6): p. 965-973.
103. Doumith, M., Ellington, M.J., Livermore, D.M., Woodford, N., Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2009. **63**(4): p. 659-667.
104. Crowley, B., Benedí, V.J., Doménech-Sánchez, A., Expression of SHV-2 β -lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2002. **46**(11): p. 3679-3682.
105. Poirel, L., Héritier, C., Spicq, C., Nordmann, P., In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, 2004. **42**(8): p. 3831-3833.
-

106. Kaczmarek, F.M., Dib-Hajj, F., Shang, W., Gootz, T.D., High-level carbapenem resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of blaACT-1 β -lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the phosphate transport porin phoE. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(10): p. 3396-3406.
 107. Palasubramaniam, S., Karunakaran, R., Gin, G.G., Muniandy, S., Parasakthi, N., Imipenem-resistance in *Klebsiella pneumoniae* in Malaysia due to loss of OmpK36 outer membrane protein coupled with AmpC hyperproduction. *International journal of infectious diseases*, 2007. **11**(5): p. 472-474.
 108. Elliott, E., Brink, A.J., Van Greune, J., Els, Z., Woodford, N., Turton, J., Warner, M., Livermore, D.M., In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum β -lactamase. *Clinical infectious diseases*, 2006. **42**(11): p. e95-e98.
 109. CDC, C.f.D.C.a.P., Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase producing, *Klebsiella* spp. and *E. coli* from rectal swabs., C.f.D.C.a.P.A.R. Team, Editor. 2009: Atlanta GA.
 110. Landman, D., Salvani, J., Bratu, S., Quale, J., Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. *Journal of clinical microbiology*, 2005. **43**(11): p. 5639-5641.
 111. Sul, G.d.E.d.R.G.d. Notificação e investigação de "bactéria multirresistente: bactéria portadora do gene KPC" no Rio Grande do Sul. 2011 [Acesso em: 29 nov de 2011]; Disponível em: <http://www.saude.rs.gob.vr/dados/1298636254910Nota%20Tecnica%20KPC%20fevereiro%202011.pdf>.
 112. Brasil. Governo do Distrito Federal. Secretaria de Estado de Saúde. Subsecretaria de Vigilância à Saúde. Gerência de Investigação e Prevenção à Infecção e Eventos Adversos em Serviços de Saúde. Protocolo para Manejo de Surto de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase tipo KPC. 2011 [Acesso em: 29 no de 2011]; Disponível em: <http://www.saude.df.gov.br/sites/300/313/00000048.pdf>.
 113. LF, C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: extended spectrum beta-lactamase: infection control and treatment. [Acesso em: 02 dec de]; Disponível em: http://www.medscape.com/viewarticle/587949_4.
 114. Souli, M., Kontopidou, F.V., Koratzanis, E., Antoniadou, A., Giannitsioti, E., Evangelopoulou, P., Kannavaki, S., Giamarellou, H., In vitro activity of tigecycline against multiple-drug-resistant, including pan-resistant, Gram-negative and Gram-positive clinical isolates from Greek hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2006. **50**(9): p. 3166-3169.
-

-
115. Woodford, N., Zhang, J., Warner, M., Kaufmann, M.E., Matos, J., MacDonald, A., Brudney, D., Sompolinsky, D., Navon-Venezia, S., Livermore, D.M., Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. **62**(6): p. 1261-1264.
 116. Livermore, D., Mushtaq, S., Warner, M., Zhang, J.C., Maharjan, S., Doumith, M., Woodford, N., Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011. **66**(1): p. 48-53.
 117. Bergamasco, M., Barroso Barbosa, M., Oliveira Garcia, D., Cipullo, R., Moreira, J., Baia, C., Barbosa, V., Abboud, C., Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) - producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation. *Transplant Infectious Disease*, 2012.
 118. Arnold, R.S., Thom, K.A., Sharma, S., Phillips, M., Johnson, J.K., Morgan, D.J., Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. *Southern medical journal*, 2011. **104**(1): p. 40.
 119. Patel, G., Huprikar, S., Factor, S.H., Jenkins, S.G., Calfee, D.P., Outcomes of carbapenem - resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2008. **29**(12): p. 1099-1106.
 120. Mouloudi, E., Protonotariou, E., Zagorianou, A., Iosifidis, E., Karapanagiotou, A., Giasnetsova, T., Tsioka, A., Roilides, E., Sofianou, D., Gritsi - Gerogianni, N., Bloodstream Infections Caused by Metallo- β - Lactamase/*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. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2010. **31**(12): p. 1250-1256.
 121. Lopez, J., Correa, A., Navon - Venezia, S., Correa, A., Torres, J., Briceno, D., Montealegre, M., Quinn, J., Carmeli, Y., Villegas, M., Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC - 3 - producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clinical microbiology and infection*, 2010. **17**(1): p. 52-56.
 122. LF, C., DJ, A., BB, R., al, e., Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing organisms in a community hospital in Virginia., in *A Joint Meeting of the American Society for Microbiology and the Infectious Diseases Society of American.*, P.a.a.o.t.^tA.I.I.^tA. Meeting., Editor. 2008: Washington, DC.
 123. J, L., F, P., F, Y.e., Is there a difference in clinical outcomes for KPC2 versus KPC-3, in *A Joint Meeting of the American Society for Microbiology and the infectious Diseases of America*, P.a.a.^tA.I.^tA. Meeting?, Editor. 2008: Washington, DC.
-

-
124. Kelesidis, T., Karageorgopoulos, D.E., Kelesidis, I., Falagas, M.E., Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. **62**(5): p. 895-904.
 125. M, C., LM, D., RE, M., N, K., P, D.-L., RN, J., Polymyxin-resistant KPC-3-producing *K. pneumoniae* in the USA and Israel? challenging therapies and molecular typing methods., in *A Joint Meeting of the American Society for Microbiology and the Infectious Diseases Society of America*, P.a.a.o.t.†A.I.I.†A. Meeting, Editor. 2008: Washington DC.
 126. Samra, Z., Ofir, O., Lishtzinsky, Y., Madar-Shapiro, L., Bishara, J., Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. *International journal of antimicrobial agents*, 2007. **30**(6): p. 525-529.
 127. KPC., C.d.B.C.d.S.B.d.I.C.P.C.B.C. Sugestões para tratamento das infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. 2010 [Acesso em: 12 Mai de 2010]; Disponível em:
http://www.infectologia.org.br/anexos/Consulta%20publica_comite%20obacteriologia%20clinica_KPC_marco%202011.pdf.
 128. Swenson, J.M., Killgore, G.E., Tenover, F.C., Antimicrobial susceptibility testing of *Acinetobacter* spp. by NCCLS broth microdilution and disk diffusion methods. *Journal of clinical microbiology*, 2004. **42**(11): p. 5102-5108.
 129. Beuving, J., Verbon, A., Gronthoud, F.A., Stobberingh, E.E., Wolffs, P.F.G., Antibiotic Susceptibility Testing of Grown Blood Cultures by Combining Culture and Real-Time Polymerase Chain Reaction Is Rapid and Effective. *PLoS One*, 2011. **6**(12): p. e27689.
 130. Bulik, C.C., Fauntleroy, K.A., Jenkins, S.G., Abuali, M., LaBombardi, V.J., Nicolau, D.P., Kuti, J.L., Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *Journal of clinical microbiology*, 2010. **48**(7): p. 2402-2406.
 131. Rossi, F., Andreazzi, D., eds. Resistência Bacteriana Interpretando o Antibiograma. 2005, Ed. Atheneu: São Paulo.
 132. Kruger, T., Szabo, D., Keddy, K.H., Deeley, K., Marsh, J.W., Hujer, A.M., Bonomo, R.A., Paterson, D.L., Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2004. **48**(11): p. 4263-4270.
 133. Yagi, T., Kurokawa, H., Shibata, N., Shibayama, K., Arakawa, Y., A preliminary survey of extended - spectrum β - lactamases (ESBLs) in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in Japan. *FEMS microbiology letters*, 2000. **184**(1): p. 53-56.
-

134. Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L., Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian hospitals. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003. **47**(12): p. 3724-3732.
 135. de Oliveira Garcia, D., Doi, Y., Szabo, D., Adams-Haduch, J.M., Vaz, T.M.I., Leite, D., Padoveze, M.C., Freire, M.P., Silveira, F.P., Paterson, D.L., Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2008. **52**(5): p. 1790-1793.
 136. Achtman, M., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A., Heuzenroeder, M., Aaronson, W., Sutton, A., Silver, R., Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infection and immunity*, 1983. **39**(1): p. 315-335.
 137. Fung-Tomc, J.C., Gradelski, E., Kolek, B., Minassian, B., Pucci, M., Kessler, R.E., Bonner, D.P., Activity of carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas aeruginosa* is not dependent on porin protein D2. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1995. **39**(2): p. 386-393.
 138. Paulo, M.S., Prevalence rates of infection in intensive care units of a tertiary teaching hospital. 2003.
 139. Gröbner, S., Linke, D., Schütz, W., Fladerer, C., Madlung, J., Autenrieth, I.B., Witte, W., Pfeifer, Y., Emergence of carbapenem-non-susceptible extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates at the university hospital of Tübingen, Germany. *Journal of medical microbiology*, 2009. **58**(7): p. 912-922.
 140. De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Bonnet, R., Sirot, J., A 1998 survey of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in France. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000. **44**(11): p. 3177-3179.
 141. Kang, C.I., Chung, D.R., Ko, K.S., Peck, K.R., Song, J.H., Clinical predictors of *Enterobacter* bacteremia among patients admitted to the ED. *Am J Emerg Med*, 2012. **30**(1): p. 165-9.
 142. Blatt, J.M., Miranda, M., Perfil dos microrganismos causadores de infecções do trato urinário em pacientes internados. *Rev Panam Infectol*, 2005. **7**(4): p. 10-4.
 143. Mitt, P., Adamson, V., Lõivukene, K., Lang, K., Telling, K., Pärtel, K., Room, A., Naaber, P., Maimets, M., Epidemiology of nosocomial bloodstream infections in Estonia. *Journal of Hospital Infection*, 2009. **71**(4): p. 365.
 144. McGettigan, S.E., Andreacchio, K., Edelstein, P.H., Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Journal of clinical microbiology*, 2009. **47**(3): p. 785-786.
-

145. Lago, A., Fuentefria, S.R., Fuentefria, D.B., Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2010. **43**(4): p. 430-434.
 146. Arpin, C., Dubois, V., Coulange, L., André, C., Fischer, I., Noury, P., Grobost, F., Brochet, J.P., Jullin, J., Dutilh, B., Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003. **47**(11): p. 3506-3514.
 147. Branger, C., Lesimple, A., Bruneau, B., Berry, P., Lambert-Zechovsky, N., Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum β -lactamases in a university hospital. *Journal of medical microbiology*, 1998. **47**(3): p. 201-209.
 148. Cassettari, V., Da Silveira, I., Dropa, M., Lincopan, N., Mamizuka, E., Matté, M., Matté, G., Menezes, P., Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. *Journal of Hospital Infection*, 2009. **71**(4): p. 340-347.
 149. Paterson, D.L., Hujer, K.M., Hujer, A.M., Yeiser, B., Bonomo, M.D., Rice, L.B., Bonomo, R.A., Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003. **47**(11): p. 3554-60.
 150. Moland, E.S., Hong, S.G., Thomson, K.S., Larone, D.H., Hanson, N.D., *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC β -lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007. **51**(2): p. 800-801.
 151. Bonnet, R., Sampaio, J., Labia, R., De Champs, C., Sirot, D., Chanal, C., Sirot, J., A Novel CTX-M β -Lactamase (CTX-M-8) in Cefotaxime-Resistant Enterobacteriaceae Isolated in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000. **44**(7): p. 1936-1942.
 152. Dropa, M., Balsalobre, L.C., Lincopan, N., Mamizuka, E.M., Cassettari, V.C., Matte, G.R., Matte, M.H., Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants bla(SHV-40), bla(TEM-116) and the class 1 integron-associated bla(GES-7) in Brazil. *Clin Microbiol Infect*, 2010. **16**(6): p. 630-2.
 153. Bonnet, R., Dutour, C., Sampaio, J.L., Chanal, C., Sirot, D., Labia, R., De Champs, C., Sirot, J., Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*, 2001. **45**(8): p. 2269-75.
-

154. Nogueira Kda, S., Higuti, I.H., do Nascimento, A.J., Terasawa, L.B., de Oliveira, S., Matos, A.P., de Souza, H.A., Cogo, L.L., Dalla Costa, L.M., Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. *Braz J Infect Dis*, 2006. **10**(6): p. 390-5.
 155. Tollentino, F.M., Polotto, M., Nogueira, M.L., Lincopan, N., Neves, P., Mamizuka, E.M., Remeli, G.A., De Almeida, M.T., Rubio, F.G., Nogueira, M.C., High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. *Microb Drug Resist*, 2011. **17**(1): p. 7-16.
 156. Lincopan, N., Leis, R., Vianello, M.A., de Araujo, M.R., Ruiz, A.S., Mamizuka, E.M., Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol*, 2006. **55**(Pt 11): p. 1611-3.
 157. Andrade, L.N., Minarini, L.A., Pitondo-Silva, A., Climaco, E.C., Palazzo, I.C., Medeiros, M.I., Darini, A.L., Determinants of beta-lactam resistance in meningitis-causing Enterobacteriaceae in Brazil. *Can J Microbiol*, 2010. **56**(5): p. 399-407.
 158. Lopes, A.C., Veras, D.L., Lima, A.M., Melo Rde, C., Ayala, J., bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2010. **105**(2): p. 163-7.
 159. Minarini, L.A., Camargo, I.L., Pitondo-Silva, A., Darini, A.L., Multilocus sequence typing of uropathogenic ESBL-producing *Escherichia coli* isolated in a Brazilian community. *Curr Microbiol*, 2007. **55**(6): p. 524-9.
 160. Fernandes, S.A., Paterson, D.L., Ghilardi-Rodrigues, A.C., Adams-Haduch, J.M., Tavechio, A.T., Doi, Y., CTX-M-2-producing *Salmonella Typhimurium* isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. *Microb Drug Resist*, 2009. **15**(4): p. 317-21.
 161. Picão, R.C., Poirel, L., Gales, A.C., Nordmann, P., Further identification of CTX-M-2 extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2009. **53**(5): p. 2225-2226.
 162. Minarini, L.A.R., Poirel, L., Trevisani, N.A.C., Darini, A.L.C., Nordmann, P., Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. *Diagnostic microbiology and infectious disease*, 2009. **65**(2): p. 202-206.
 163. Warren, R., Ensor, V., O'Neill, P., Butler, V., Taylor, J., Nye, K., Harvey, M., Livermore, D., Woodford, N., Hawkey, P., Imported chicken meat as a potential source of quinolone-resistant *Escherichia*
-

- coli producing extended-spectrum β -lactamases in the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. **61**(3): p. 504-508.
164. Do Carmo, F.J.R., Silva, R., Castanheira, M., Tognim, M., Gales, A., Sader, H., Prevalence and genetic characterization of blaCTX-M among *Klebsiella pneumoniae* isolates collected in an intensive care unit in Brazil. *Journal of chemotherapy (Florence, Italy)*, 2008. **20**(5): p. 600.
165. Srinivasan, A., Patel, J.B., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, 2008. **29**(12): p. 1107-1109.
166. Cuzon, G., Naas, T., Truong, H.V., Villegas, M.V., Wisell, K.T., Carmeli, Y., Gales, A.C., Navon-Venezia, S., Quinn, J.P., Nordmann, P., Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce β -lactamase blaKPC-2 gene. *Emerging infectious diseases*, 2010. **16**(9): p. 1349.
167. ACS, A., FLS, C., MA, V., MAM, J., MMC, M., Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC in *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections in Recife, in *25º Congresso Brasileiro de Microbiologia*. 2009: Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil.
168. EC, V., M, P., AC, R., R, P., GLG, M., MRE, P., RMB, Q., AC., G., Surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC em um hospital universitário, in *25º Congresso Brasileiro de Microbiologia*. 2009: 8 a 12 de novembro de 2009, Porto de Galinhas, Pernambuco, Brasil.
169. Won, S.Y., Munoz-Price, L.S., Lolans, K., Hota, B., Weinstein, R.A., Hayden, M.K., Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae. *Clinical infectious diseases*, 2011. **53**(6): p. 532-540.
170. Carvalhaes, C.G., Picão, R.C., Nicoletti, A.G., Xavier, D.E., Gales, A.C., Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010. **65**(2): p. 249-251.
171. Hernández-Allés, S., Albertí, S., Álvarez, D., Doménech-Sánchez, A., Martínez-Martínez, L., Gil, J., Tomás, J.M., Benedí, V.J., Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*, 1999. **145**(3): p. 673-679.
172. Landman, D., Bratu, S., Quale, J., Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of medical microbiology*, 2009. **58**(10): p. 1303-1308.
173. Cai, J., Zhou, H., Chen, G., Zhang, R., Detection of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in a strain of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2008. **88**(2): p. 135.
-

174. Lee, E., Nicolas, M., Kitzis, M., Pialoux, G., Collatz, E., Gutmann, L., Association of two resistance mechanisms in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* with high-level resistance to imipenem. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1991. **35**(6): p. 1093-1098.
 175. CDC, C.f.D.C.a.P., National nosocomial infections surveillance system report, data summary from January 1992 to June 2002. *Am J Infect Control*, 2002. **(30)**: p. 458-75.
-

ANEXOS

ANEXO A - APROVAÇÃO DA COMISSÃO COORDENADORA DO PG EM
MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
FACULDADE DE MEDICINA
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

Of. 469/09-PG

Porto Alegre, 26 de novembro de 2009.

A Pós-Graduanda
Mariluce da Rocha Jaskulski
N/Faculdade

Prezada Pós-Graduanda:

Comunicamos que a proposta de tese intitulada **"DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA EM CEPAS DE KLEBSIELLA E ENTEROBACTER SPP. ISOLADAS DE INFECÇÕES EM DOIS HOSPITAIS DE PORTO ALEGRE/RS"** foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde.

A mesma deverá ser encaminhada ao Comitê de Ética em Pesquisa, através do CINAPE, 2º andar do Hospital São Lucas/PUCRS. Em anexo, cópia da avaliação.

Atenciosamente,


Profa. Dr. Magda Lahorgue Nunes
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Medicina e Ciências da Saúde

C/c: Profa. Dr. Denise Cantarelli Machado

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - P. 60 - 3º andar - CEP 90610-000
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3318 - Fax (51) 3320-3316
E-mail: medicina-pg@pucrs.br
www.pucrs.br/famed/pos

ANEXO B - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

OF.CEP-995/10

Porto Alegre, 21 de setembro de 2010.

Senhora Pesquisadora,

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa registro CEP 09/04945 intitulado "**Deteção de genes de resistência em cepas de Klebsiella e Enterobacter spp. resistentes ao ertapenem isolada de infecções de dois hospitais de Porto Alegre/RS**".

Salientamos que seu estudo pode ser iniciado a partir desta data.

Os relatórios parciais e finais deverão ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Rodolfo Herberto Schneider
Coordenador do CEP-PUCRS

Data: 23/12/10

Ilma. Sra.
Profa. Dra. Denise Cantarelli Machado
Nesta Universidade

PUCRS

Campus Central
Av. Ipiranga, 6690 - 3º andar - CEP: 90610-000
Sala 314 - Fone Fax: (51) 3320-3345
E-mail: cep@pucrs.br
www.pucrs.br/prppg/cep

ANEXO C - APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Truan 596
CEP 91360-700 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.2000
CNPJ: 92.787.118/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Pediátrica do Hospital Nossa
Senhara da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Rubião, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 92.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardeiro, 17
CEP 91420-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3316.5200
CNPJ: 92.693.334/0001-63



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em 13 de outubro de 2010 reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 09-178

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

DENISE CANTARELLI MACHADO
MARILUCE DA ROCHA JASKULSKI

Título: Detecção de Genes de resistência em cepas de Klebsiella e Enterobacter spp. isoladas de infecções em dois hospitais de Porto Alegre/RS

Documentação: Aprovados
Aspectos Metodológicos: Aprovados
Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.

Porto Alegre, 13 de outubro de 2010.

Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

ANEXO D - DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DO PROJETO DAS
CHEFIAS DO SERVIÇO

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2009.

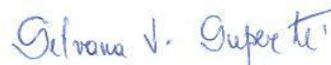
Ao Comitê de Ética e Pesquisa/PUCRS

Prezados Senhores:

Declaro que tenho conhecimento do projeto de Pesquisa intitulado "Detecção de genes de resistência em cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* spp.resistentes ao ertapenem isoladas de infecções em dois hospitais de Porto Alegre/RS" proposto por Mariluce da Rocha Jaskulski , sob a orientação do(a) Prof(a). Denise Cantarelli Machado a ser desenvolvido pela Faculdade de Medicina da PUCRS.

O referido projeto será realizado no(a) Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS, o qual só poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Atenciosamente,



Dra. Silvana Vargas Superti
Chefe Serviço Setor de Microbiologia do
Laboratório de Patologia Clínica da PUCRS



Dra. Myriam Fortes Perénoud
Coordenadora do Laboratório de Patologia Clínica
da PUCRS

ANEXO E - DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DO PROJETO DE
PESQUISA DAS CHEFIAS DE SERVIÇO DO HNSC

Porto Alegre, 18 de dezembro de 2009.

Ao Comitê de Ética e Pesquisa/PUCRS

Prezados Senhores:

Declaro que tenho conhecimento do projeto de Pesquisa intitulado "Detecção de genes de resistência em cepas de *Klebsiella* e *Enterobacter* spp. resistentes ao ertapenem isoladas de infecções em dois hospitais de Porto Alegre/RS " proposto por Mariluce da Rocha Jaskulski , sob a orientação do(a) Prof(a). Denise Cantarelli Machado a ser desenvolvido pela Faculdade de Medicina da PUCRS.

O referido projeto será realizado no(a) Laboratório de Biologia Celular e Molecular do Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS , o qual só poderá ocorrer a partir da apresentação da carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS.

Atenciosamente,


Dra. Maria do Carmo Fontoura Pereira
Assistente Técnica Setor de Microbiologia do
Laboratório de Análises Clínicas do HNSC


Dra. Andréa Cauduro de Castro
Coordenadora do Laboratório de Análises Clínicas
do HNSC

ANEXO F - COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO

Denise Cantarelli Machado

De: ees.ijaa.0.1ea294.63168cb8@eesmail.elsevier.com em nome de International Journal of Antimicrobial Agents [ijaa@elsevier.com]
Enviado em: quinta-feira, 17 de janeiro de 2013 17:26
Para: Denise Cantarelli Machado; deni2004@terra.com.br
Assunto: Your PDF has been built and requires approval

International Journal of Antimicrobial Agents
Title: Assessment of ESBL, KPC carbapenemase and porins resistance mechanisms in clinical samples of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter spp.
Authors: Mariluce R Jaskulski, PhD; Bruna C Medeiros, Physical Therapist; Juliano V Borges, Biologist; Ricardo Zalewsky, Biologist; Miguel C Fonseca, Biologist; Daniel R Marinowic, MSc; Marion P Rocha, Microbiologist; Pietrine Nodari, Microbiologist; Denise Cantarelli Machado, PhD

Dear Dr. Machado,

The PDF for your submission, "Assessment of ESBL, KPC carbapenemase and porins resistance mechanisms in clinical samples of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter spp." has now been built and is ready for your approval. Please view the submission before approving it, to be certain that it is free of any errors. If you have already approved the PDF of your submission, this e-mail can be ignored.

To approve the PDF please login to the Elsevier Editorial System as an Author:

<http://ees.elsevier.com/ijaa/>
Your username is: dcm@puhrs.br

Then click on the folder 'Submissions Waiting for Author's Approval' to view and approve the PDF of your submission. You may need to click on 'Action Links' to expand your Action Links menu.

You will also need to confirm that you have read and agree with the Elsevier Ethics in Publishing statement before the submission process can be completed. Once all of the above steps are done, you will receive an e-mail confirming receipt of your submission from the Editorial Office. For further information or if you have trouble completing these steps please go to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Please note that you are required to ensure everything appears appropriately in PDF and no change can be made after approving a submission. If you have any trouble with the generated PDF or completing these steps please go to: http://help.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/88/p/7923.

Your submission will be given a reference number once an Editor has been assigned to handle it.

Thank you for your time and patience.
Kind regards,
Editorial Office
International Journal of Antimicrobial Agents

For further assistance, please visit our customer support site at <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.

1 ANEXO G - ARTIGO ORIGINAL

2

3 Assessment of ESBL, KPC carbapenemase and porins resistance
4 mechanisms in clinical samples of *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter*
5 spp.

6

7 Jaskulski, M. R.^{a,b}; Medeiros, B. C.^a; Borges, J.V.^a; Zalewski, R.^a; Fonseca,
8 M. E.C.^a; Marinowic, D.R.^a; Rocha, M.P.^d; Nodari, P.^b; Machado, D.C.^{a,c*}.

9

10 ^aLaboratory of Cellular and Molecular Biology, Biomedical Research Institute
11 of Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga
12 6690, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

13 ^bRegional Integrated University, Av. Sete de Setembro, 1621, CEP 99700-
14 000, Erechim, RS, Brazil.

15 ^cSchool of Medicine, Department of Internal Medicine, Pontifical Catholic
16 University of Rio Grande do Sul (PUCRS). Av. Ipiranga 6690, CEP 90610-
17 000, Porto Alegre, RS, Brazil.

18 ^dEnzilab Laboratory, Rua Marechal Deodoro, 189, CEP 96810-110, Santa
19 Cruz do Sul, RS, Brazil.

20

21 *Corresponding author:

22 Denise Cantarelli Machado

23 Address: Av. Ipiranga, 6690

24 Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

25 CEP:906100-000

26 E-mail: dcm@pucrs.br

27 Telephone: 55 51 33203000 ext. 2364

28 Fax: 55 51 3320 3312

29 **Abstract**

30 The emergence and spread of resistance mechanisms in Gram-negative
31 bacilli have complicated the treatment of serious nosocomial infections. Due
32 to the ineffectiveness of the automated detection of KPC producer isolates
33 there is a need to develop better methodologies. One possibility is to
34 evaluate the ertapenem resistance, which has greater sensitivity to detect the
35 expression of KPC producing isolates. However, the specificity may be
36 reduced due to the resistance attributed to other mechanisms, such as AmpC
37 gene expression or ESBL production associated with the loss of porin. This
38 study included 128 samples of Gram-negative bacilli of the genus *Klebsiella*
39 *pneumoniae* and *Enterobacter* spp. resistant to ertapenem. Disk diffusion
40 and E-test[®] method were applied to determine the susceptibility to imipenem,
41 meropenem and ertapenem. Isolates intermediate and resistant to
42 ertapenem were evaluated and additional resistance mechanisms conferred
43 by *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{KPC} for *Klebsiella pneumoniae*
44 and *Enterobacter* spp genes were investigated by PCR technique. The
45 presence of outer membrane protein (OMP) was investigated by *dot blot*. The
46 gene *bla*_{TEM} was detected in 52.9% and 10.3%; *bla*_{SHV} in 29.4% and 0.94%;
47 *bla*_{CTX-M} in 41.4% and 1.9%, and *bla*_{CTX-M-2} in 23.5% and 1.9% of *K.*
48 *pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* isolates, respectively. *bla*_{KPC} gene
49 was present in 12.6% of *Enterobacter* spp. isolates. OmpC and OmpF were
50 present in 6.6% of *Enterobacter cloacae* isolates. Resistance genes and
51 outer membrane proteins carbapenemases producing strains indicate that
52 several resistance mechanisms contribute to therapeutic failure and point to
53 the need of better detection methods and surveillance strategies.

54 **Keywords:** ertapenem, ESBL, OmpC, OmpF, KPC, resistance.

55

56 **1 Introduction**

57

58 Gram-negative pathogens such as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*
59 *aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* are now developing new resistance
60 mechanisms against highly effective beta-lactam antimicrobial agents usually
61 employed as therapeutic agents. Among the resistance mechanisms to beta-
62 lactam antibiotics, beta-lactamases producing bacteria are the most worrying
63 due to its potential to acquire mutations that can extend its hydrolysis
64 spectrum against different beta-lactam antibiotics, as well as its ability to
65 easily spread[1].

66 Due to the ineffectiveness of automated detection of KPC (*Klebsiella*
67 *pneumoniae* carbapenemase)-producing isolates require better methods to
68 detect gene expression. One possibility is to assess the isolates for
69 resistance to ertapenem, which has higher sensitivity to detect
70 microorganisms that produce KPC[175]. However, the specificity may be
71 reduced due to the resistance conferred by other mechanisms, such as
72 AmpC or ESBL production associated with the loss of porins[5].

73 This study evaluated phenotypic and genotypic resistance in *Klebsiella*
74 *pneumoniae* and *Enterobacter* spp. ESBL and KPC-producing isolates, as
75 well as alterations on outer membrane proteins to verify the resistance
76 mechanisms relation in clinical isolates.

77 2. Materials and methods:

78 2.1. Bacterial isolates

79 The ertapenem susceptible clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* (n=17),
80 *Enterobacter aerogenes* (n=5) and *Enterobacter cloacae* (n=106) were
81 obtained from two microbiology laboratories from Hospital São Lucas da
82 PUCRS and Hospital Nossa Senhora da Conceição, located in Porto Alegre,
83 RS, Brazil between September 2010 and September 2011. Clinical
84 characteristics were investigated through electronic medical record review,
85 and isolation sites were as follows: urine (85 isolates), blood (13 isolates),
86 tracheal aspirate (4 isolates), sputum and surgical wound (3 isolates each),
87 and others (20 isolates).

88 The E-test[®] method (AB Biodisk) was previously used to determine
89 ertapenem susceptibility.

90

91 2.2. Antimicrobial susceptibility testing

92 The antimicrobial susceptibility to imipenem, meropenem and ertapenem was
93 tested by E-test[®] and disk diffusion methodology. The interpretations
94 followed the ANVISA Technical Note No. 1/2010 (Brazil) and CLSI 2010
95 criteria [73, 74]. The susceptible/intermediate/resistant (S/I/R) break-points
96 used were: Imipenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, $2 \mu\text{g/mL}$, and $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ or $\geq 23 \text{ mm}$, 20-22
97 mm, and $\leq 19 \text{ mm}$; Meropenem: $\leq 1 \mu\text{g/mL}$, $2 \mu\text{g/mL}$, and $\geq 4 \mu\text{g/mL}$ or ≥ 2
98 3mm, 20-22 mm, and $\leq 19 \text{ mm}$; Ertapenem: $\leq 0.5 \mu\text{g/mL}$; $1 \mu\text{g/mL}$ and ≥ 2
99 $\mu\text{g/mL}$ or $\geq 25 \text{ mm}$, 22-24 mm, and $\leq 21 \text{ mm}$ respectively.

100

101 2.3 β -Lactamase characterization (ESBL)

102 The screening test was conducted by double disk approximation test using
103 cefotaxime (CTX: 30 μg), ceftriaxone (CRO: 30 μg), ceftazidime (CAZ: 30
104 μg), aztreonam (AZT: 30 μg), and amoxicillin/clavulanic acid (AMC/CLA:
105 30/10 μg). Additionally, the combined disk method was used with cefotaxime
106 (CTX: 30 μg), cefotaxime/clavulanic acid (CTX/CLA: 30/10 μg), ceftazidime

107 (CAZ: 30 µg) and ceftazidime/clavulanic acid (CAZ/CLA: 30/10 µg). The
108 interpretation criteria followed the CLSI 2010 criteria(5).

109

110 *2.4 β-Lactamase gene identification by PCR*

111 Detection of genes encoding β-lactamases and ESBL was performed by
112 PCR amplification, using the primers listed in Table 1.

113

114 *2.5 Examination of porin expression*

115 Bacterial outer membrane proteins (OMPs) were isolated and purified by
116 treatment with 2% sodium-*N*-lauryl sarcosinate (Sigma-Aldrich), as described
117 previously (6,7). Briefly, bacterial cells were disrupted by ultrasonic
118 disintegration and OMPs were collected by centrifugation followed by dot blot
119 analysis on nitrocellulose membrane (Hybond™-C, Amersham Life Science).
120 Rabbit policlonal antibodies against OmpC and OmpF HRP conjugated were
121 (Bioss, Atlanta, Geórgia, USA) diluted 1:250 in PBS/5% Milk. The detection
122 was performed by chemiluminescence using Western Blotting Luminol
123 Reagent (Santa Cruz Biotechnology Inc. CA, USA) and the membranes
124 exposed to X-Ray film (Kodak-X-Omat®).

125

126 3. Results

127 3.1 Antimicrobial susceptibilities

128 According to E-test[®] and disk diffusion assay, the susceptibility to imipenem,
129 meropenem, and ertapenem (Table 2) was detected in all 128 isolates
130 included in this study.

131

132 3.2 Phenotypical analysis of ESBL

133 The prevalence of ESBL among the isolates was 21.9% (28/128). All
134 *Klebsiella pneumoniae* isolates (100%) were ESBLs positive and the
135 prevalence of *Enterobacter cloacae* positive isolates was 10.4% (11/106) by
136 the confirmatory test. All *Enterobacter aerogenes* isolates did not express
137 ESBL.

138

139 3.3 Carbapenem susceptibility and β -lactamase expression

140 Carbapenem MIC distribution of beta-lactamases encoded genes *bla*_{TEM},
141 *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-2} of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* and
142 *Enterobacter cloacae* isolates are shown on Tables 3 and 4, respectively.
143 Twelve *K. pneumoniae* isolates possess at least one gene, and five isolates
144 present three resistance genes investigated in this study, whereas only two
145 *Enterobacter cloacae* isolates have shown the presence of more than one
146 resistance gene.

147 The *bla*_{TEM} gene was the most prevalent and occurred more often associated
148 with gene *bla*_{CTX-M}.

149 Of 128 bacterial samples, 14 (10.9%) isolates *bla*_{KPC} positive were
150 ertapenem resistant: *Enterobacter aerogenes* (1) and *Enterobacter cloacae*
151 (13).

152 3.5 Outer membrane protein analysis (OMPs)

153 The outer membrane proteins, OmpC and OmpF were found in 6.6%
154 (7/106) *Enterobacter cloacae* isolates (Table 5). Overall, 3.8% (4/106)

155 isolates expressed OmpC and OmpF, 1.9% (2/106) only OmpC, and OmpF
156 was detected in 0.9% (1/106) isolate.

157

158 *3.6 Resistance mechanisms and ertapenem susceptibility*

159 *K. pneumoniae* isolates did not express more than one resistance
160 mechanism within those evaluate in this study. Five *Enterobacter cloacae*
161 (20%) presented ESBL and/or KPC β -lactamase co-production associated
162 with membrane impermeability as shown on Table 6.

163

164

165

166

167 Discussion

168 The rapid emergence and spread of carbapenem resistance among Gram-
169 negative pathogens is a challenge. Institutional protocols with alternatives to
170 assist physicians in empirical therapy are needed(8).

171 The increasing prevalence of *Enterobacteriaceae* carrying carbapenemases
172 is alarming. The infections data reported to CDC in 2007 pointed that 8% of
173 all *Klebsiella* isolates were carbapenem resistant, compared with only 1%
174 reported in the year 2000(9).

175 Bacterial isolates were found in urinary tract (66.4%), blood (10.2%), tracheal
176 aspirate (3.1%), and other sites of infection which are the most common
177 infectious sites described in the literature(10).

178 In our study, 24% (30/128) of isolates were positive for the screening test;
179 from those 21,9% confirmed positive by the combined test disk. When the
180 screening test is positive and the confirmatory test is negative, is possible
181 that other resistance mechanisms are involved. One possibility is the
182 expression of AmpC β -lactamase mediated-plasmid, present in the CESP
183 group that can be exchanged by plasmids between *E. coli* and *Klebsiella* spp.
184 When this occurs, a large amount of β -lactamase is produced, conferring
185 extended-spectrum cephalosporins and cephamycins resistance. These
186 resistances are not inhibited by clavulanate, which mislead ESBLs
187 interpretations (11).

188 Another possibility is the overproduction of ESBL or a combination of
189 mechanisms such as the presence of more than one type of ESBL; presence
190 of ESBL and AmpC; presence of ESBL, and outer membrane protein (OMP)
191 alteration(11).

192 The genes encoding the ESBLs as well as their products have been detected
193 in several species of *Enterobacteriaceae*, but the highest prevalence is
194 observed in *K. pneumoniae*, *E. coli*, and *Enterobacter* spp. (12). Indeed, the
195 same pattern were found in the present study with 100% of *K. pneumoniae*
196 isolates expressing at least one resistance gene, whereas 10.4% of *E.*
197 *cloacae* isolates expressed one ESBL gene.

198 Only gene detection does not predict expression level since it also depends
199 of promoters strength, gene copy number, and phenotypic profile that can be
200 affected by changes in outer membrane proteins, inoculums pattern and
201 growth conditions(13).

202 Strains expressing β -lactamase CTX-M type have been isolated in many
203 parts of the world, but most of them have been associated with outbreaks in
204 Eastern Europe, South America and Japan(14).

205 The occurrence of false positives by modified Hodge test (MHT) is probably
206 due to an association of porin loss and ESBL producing CTX-M and not by β -
207 lactamases hyper-producing AmpC. For this reason we did not use MHT to
208 evaluate our isolates(15).

209 The predominant KPC-producing microorganism in Brazil and in the world is
210 *K. pneumoniae*, however, in southern Brazil evidence shows different
211 pattern. This and other studies indicate the presence of *Enterobacter*
212 spp.(16).

213 Many *Enterobacteriaceae* producing carbapenemases are highly
214 multiresistant, but may remain susceptible to one or more aminoglycosides
215 and to tigecycline and/or colistin(17). Drugs that exhibit in vitro activity
216 against KPC producer isolates are polymyxins, tigecycline, and
217 aminoglycosides. In spite of low meropenem MICs, it can be risky if used
218 alone to treat systemic infections due to the possibility to select highly
219 carbapenem-resistant bacteria(18).

220 It was detected a combination of porin, KPC and ESBL in our isolates.
221 Unfortunately it remains difficult to identify carbapenem-resistant
222 microorganisms and the frequency of porin alterations is underestimated. It
223 has been proposed that the loss of OMPs is a needed cofactor for isolates
224 that reach high levels of carbapenems resistance(19).

225 There are reports showing the association between the loss of porins and
226 increased resistance to antimicrobial agents in other species of
227 *Enterobacteriaceae*, including *Enterobacter* spp.(20).

228 The carbapenems are the most frequent antimicrobial agents used to treat
229 ESBL producing Gram-negative bacterial infections leading clinicians to rely
230 on carbapenems to fight infections. The presence of multiple resistance
231 mechanisms found in this study confirms the ESBL, KPC, and porins
232 alterations resistance complexity(21).

233

234

235 **Concluding remarks**

236 The spreading of potential multiresistant microorganisms is clear, and
237 requires constant and effective monitoring. Health professionals should
238 maintain strict hygiene control procedures and implement screening systems
239 to identify carriers to prevent possible outbreaks.

240 The number of new drugs approved for commercialization has decreased
241 over the years and microorganisms are acquiring new and multiple
242 resistance mechanisms. In the present study some genes and outer
243 membrane proteins involved in multiple resistance mechanisms were
244 investigated in carbapenemases producing isolates.

245 Additional studies are required to define the resistance mechanisms and to
246 develop new antimicrobial drugs using molecular methods.

247 **Acknowledgements:** PCR reactions were standardized with primer´s
248 provided by Dr. Dorothy Garcia. Bacterial isolates were provided by Dr. Maria
249 do Carmo Fontoura Pereira, Dr. Estér Tesser, Dr. Silvana Vargas Superti or
250 Dr. Vany Elisa Pagnussatti.

251

252 **References**

- 253 1. Castanheira M, Mendes RE, Rhomberg PR, Jones RN. Rapid
254 emergence of blaCTX-M among *Enterobacteriaceae* in US medical
255 centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007).
256 *Microb Drug Resist* 2008;14:211-216.
- 257
- 258 2. Centers for Disease Control and Prevention. National nosocomial
259 infections surveillance system report, data summary from January
260 1992 to June 2002. *Am J Infect Control* 2002; 30:458-475.
- 261
- 262 3. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem
263 resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane
264 permeability. *J Clin Microbiol* 2000; 38:1048-1052.
- 265
- 266 4. Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas para
267 identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à
268 assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. 2010
269 [Acesso em: 08 nov de 2010]; Disponível em:
270 [http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad77d15359461/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES)
271 [77d15359461/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/161dcf8044726d11972ad77d15359461/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES).
- 272
- 273 5. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution
274 antimicrobial susceptibility test for bacteria that grow aerobically;
275 approved standard M02–A10 and M07-A8. Wayne, PA: CLSI; 2010.
- 276
- 277 6. Achtman M, Mercer A, Kusecek B, Pohl A, Heuzenroeder M,
278 Aaronson W et al. Six widespread bacterial clones among *Escherichia*
279 *coli* K1 isolates. *Infect Immunity* 1983; 39:315-335.
- 280
- 281 7. Fung-Tomc, JC, Gradelski E, Kolek B, Minassian B, Pucci M, Kessler
282 RE, et al. Activity of carbapenem BMS-181139 against *Pseudomonas*
283 *aeruginosa* is not dependent on porin protein D2. *Antimicrob Agents*
284 *Chemother* 1995; 39:386-393.
- 285
- 286 8. Pitout JDD, Laupland KB. Extended-spectrum β -lactamase-producing
287 *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. *Lancet Infect*
288 *Dis* 2008; 8:159-166.
- 289
- 290 9. Srinivasan A, Patel JB. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–
291 producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound
292 of cure. *Infect Control Hosp Epid* 2008; 29:1107-1109.
-

-
- 293 10. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden
294 MK. Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae*
295 Carbapenemase–Producing Enterobacteriaceae. Clin Infect Dis 2011;
296 53:532-540.
297
- 298 11. Tenover FC, Raney PM, Williams PP, Rasheed JK, Biddle JW, Oliver
299 A, et al. Evaluation of the NCCLS extended-spectrum beta-lactamase
300 confirmation methods for *Escherichia coli* with isolates collected during
301 Project ICARE. J Clin Microbiol. 2003 Jul;41(7):3142-6.
302
- 303 12. Jacoby GA, Munoz-Price LS. The new β -lactamases. N Engl J Med
304 2005; 352:380-391.
305
- 306 13. Hall MAL, Fluit AC, Paauw A, Box ATA, Brisse S, Verhoef J.
307 Evaluation of the Etest ESBL and the BD Phoenix, VITEK 1, and
308 VITEK 2 Automated Instruments for detection of Extended-Spectrum
309 Beta-Lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp.
310 J Clinical Microbiol 2002;40:3703-3711.
311
- 312 14. Bradford P. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century:
313 characterization, epidemiology, and detection of this important
314 resistance threat. Clin Microbiol Rev 2001;14:933-951.
315
- 316 15. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC.
317 Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase
318 production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive
319 results. J Antimicrob Chemother 2010;(65):249-251.
320
- 321 16. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado ABPM, De Oliveira KRP, Superti
322 SV, Pilger DA et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil:
323 A widespread threat in waiting? Int J Infect Dis 2010;14:e539-e540.
324
- 325 17. Livermore D, Mushtaq S, Warner M, Zhang JC, Maharjan S, Doumith
326 M et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against
327 carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* isolates. J Antimicrob
328 Chemother 2011; 66:48-53.
329
- 330 18. Bergamasco MD, Barroso BM, Oliveira GD, Cipullo R, Moreira JC,
331 Baia C, et al. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
332 (KPC) - producing *K. pneumoniae* in solid organ transplantation.
333 Transplant Infect Dis 2012;14:198-205.
-

-
- 334 19. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria:
335 *Enterobacteriaceae*. Am J Med, 2006;119:S20-S28.
336
- 337 20. Hopkins JM, Towner KJ, Enhanced resistance to cefotaxime and
338 imipenem associated with outer membrane protein alterations in
339 *Enterobacter aerogenes*. J Antimicrob Chemother 1990; 25: 49-55.
340
- 341 21. Brandon K, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF,
342 Bonomo RA et al. Genetic factors associated with elevated
343 carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*.
344 Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:4201-4207.
345
- 346 22. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle
347 JW, Steward CD et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase,
348 KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.
349 Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:1151-1161.
350
- 351 23. Kruger T, Szabo D, Keddy KH, Deeley K, Marsh JW, Hujer AM et al.
352 Infections with nontyphoidal *Salmonella* species producing TEM-63 or
353 a novel TEM enzyme, TEM-131, in South Africa. Antimicrob Agents
354 Chemother 2004; 48:4263-4270.
355
- 356 24. Yagi T, Kurokawa H, Shibata N, Shibayama K, Arakawa Y. A
357 preliminary survey of extended - spectrum β - lactamases (ESBLs) in
358 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in
359 Japan. FEMS Microbiol Lett 2000; 184: 53-56.
360
- 361 25. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L.
362 Prevalence and molecular epidemiology of CTX-M extended-spectrum
363 β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in
364 Russian hospitals. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3724-3732.
365
- 366 26. de Oliveira Garcia D, Doi Y, Szabo D, Adams-Haduch JM, Vaz TMI,
367 Leite D et al. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing
368 extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-
369 59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. Antimicrob Agents
370 Chemother 2008; 52:1790-1793.
371
372
373
374
-

375 Table 1. Primes used in this study.

Gene(s)	Oligonucleotide sequence (5' - 3')	bp	Reference
<i>bla</i> _{KPC}	KPC: F: 5' TGTCACTGTATCGCCGTC 3'	1011	(22)
	KPC: R: 5' CTCAGTGCTCTACAGAAAACG 3'		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM: F: 5' ATGAGTATTCAACATTTCCGTG 3'	861	(23)
	TEM: R: 5' TTACCAATGCTTAATCAGTGAG 3'		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV: F: 5' ATTTGTCGCTTCTTTACTCGC 3'	1051	(24)
	SHV: R: 5' TTTATGGCGTTACCTTTGACC 3'		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M: F: 5' TTTGCGATGTGCAGTACCAGTAA 3'	544	(25)
	CTX-M: R: 5' CGATATCGTTGGTGGTGCCATA 3'		
<i>bla</i> _{CTX-M-2}	CTXM2: F: 5' AAATGTGCTGCTCCTTTTCGTGAGC 3'	988	(26)
	CTXM2:R: 5' AGGGTTCGTTGCAAGACAAGACTG 3'		

376

377 Table 2. Carbapenems susceptibility of *K. pneumoniae* and *Enterobacter* spp.
 378 isolates* according to E-test[®] and Disk Diffusion.

Result	E-test [®]			Disk Diffusion		
	IPM	MER	ERT	IPM	MER	ERT
Susceptible	74(57.8)	100(78.1)	0(0.0)	104(81.4)	97(75.7)	0(0.0)
Intermediate	32(25.0)	15(11.8)	18(14.1)	12(9.3)	18(14.1)	12(9.4)
Resistant	22(17.2)	13(10.1)	110(85.9)	12(9.3)	13(10.2)	116(90.6)

379 *Total of 128 isolates.

380 IPM: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem (10 µg/mL each).

381

382 Table 3. Minimum inhibitory concentration of carbapenems and β -lactamases
 383 in *Klebsiella pneumoniae* isolates.

Isolate	β -lactamases genes	MIC		
		IPM	MER	ERT
2008	<i>bla</i> _{TEM}	2	0.25	4
2010	<i>bla</i> _{TEM}	0.5	0.19	1.5
1002	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV}	2	3	> 32
2006	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV}	0.25	0.094	1
1006	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV} ; <i>bla</i> _{CTX-M}	0.5	1	> 32
1158	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{SHV} ; <i>bla</i> _{CTX-M}	0.5	0.5	2
1011	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	1	1.5	12
1034	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0.25	0.125	1
1099	<i>bla</i> _{TEM} ; <i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0.5	0.25	1
1052	<i>bla</i> _{SHV}	2	2	> 32
2011	<i>bla</i> _{CTX-M}	2	0.19	6
1035	<i>bla</i> _{CTX-M} ; <i>bla</i> _{CTX-M-2}	2	3	> 32

384 IPM: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem (μ g/mL each).
 385

386 Table 4. Minimum inhibitory concentration of carbapenems and β -lactamases
 387 in *Enterobacter cloacae* isolates.

Isolate	Beta-lactamase genes	MIC ($\mu\text{g/mL}$)		
		IPM	MER	ERT
1004	<i>bla</i> _{TEM}	1	0.5	8
1019	<i>bla</i> _{TEM}	1	0.25	4
1041	<i>bla</i> _{TEM}	0.75	0.38	> 32
1053	<i>bla</i> _{TEM}	0.5	1.5	>32
1068	<i>bla</i> _{TEM}	0.75	0.5	1.5
1090	<i>bla</i> _{TEM}	1	1	1
1097	<i>bla</i> _{TEM}	1	0.38	4
1102	<i>bla</i> _{TEM}	1	1	4
1113	<i>bla</i> _{TEM}	1	0.5	3
1008	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0.38	0.5	4
1014	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	0.75	0.75	6

388 IPM: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem (10 $\mu\text{g/mL}$ each).
 389

390 Table 5. Minimum inhibitory concentration in *Enterobacter cloacae* porin
 391 positive isolates.

Isolate	Porin expression		MIC($\mu\text{g/mL}$)		
	OmpC	OmpF	IPM	MER	ERT
1008	+	-	0.38	0.5	4
1018	+	+	0.38	0.25	6
1041	+	-	0.75	0.38	> 32
1042	-	+	1.5	0.25	2
1079	+	+	1	2	3
1082	+	+	0.5	0.38	> 32
1102	+	+	1	1	4

392 IPM: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem (10 $\mu\text{g/mL}$ each).

393 Table 6. Resistance mechanisms and ertapenem minimum inhibitory
 394 concentration detected in isolates.

395

	Microorganism	Resistance mechanism					MIC (µg/mL)		
		ESBLs			Carbapenemase		OMP		
		<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>bla</i> _{KPC}	OmpC	OmpF	
1002	<i>K. pneumoniae</i>	x	x					> 32	
1006		x	x	x				> 32	
1011		x		x	x			12	
1034		x		x	x			1	
1035				x	x			> 32	
1052			x					> 32	
1099		x		x	x			1	
1158		x	x	x				2	
2008		x						4	
2011				x				6	
2010		x						1.5	
2006		x	x					1	
1004		<i>E. cloacae</i>	x						8
1005							x		> 32
1008			x		x	x		x	4
1010						x		> 32	
1014	x		x	x	x	x		6	
1018							x	x	6
1019	x								4
1022						x			3
1041	x						x		> 32
1042						x		x	2
1044						x			> 32
1053	x								> 32
1068	x								1.5
1079							x	x	3
1082							x	x	> 32
1090	x								1
1097	x								4
1102	x						x	x	4
1113	x								3
1128							x		> 32
1129						x		6	
1132						x		8	
1136						x		4	
1138						x		6	
1159						x		> 32	