

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA MICROBIANA  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Título:

**Caracterização de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenems  
isoladas no Distrito Federal.**

CELIO DE FARIA JUNIOR

Orientador: Professor Dr. Alex Leite Pereira

Brasília-DF 2014

CELIO DE FARIA JUNIOR

**Caracterização de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenems  
isoladas no Distrito Federal.**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Biologia Microbiana  
do Instituto de Biologia da Universidade  
de Brasília, para obtenção do título de  
Mestre.

Orientador: Prof. Alex Leite Pereira

Brasília-DF 2014

CELIO DE FARIA JUNIOR

**Caracterização de cepas de *Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenems  
isoladas no Distrito Federal.**

BANCA EXAMINADORA

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cynthia Maria Kyaw

Instituição: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia,  
Universidade de Brasília.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Larissa Fernandes Matos

Instituição: Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília.

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Marlene Teixeira De-Souza (Suplente)

Instituição: Departamento de Biologia Celular, Instituto de Biologia,  
Universidade de Brasília.

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Celio e Maria, que me conduziram até aqui, exemplos de dignidade, honradez e amor.

À minha esposa, Emilly Carneiro da Costa de Faria, que me compreendeu nos momentos de ausência e me apoiou nas minhas escolhas.

Aos meus irmãos, Ludimila, Sacha, Arael e Juan, que são minha inspiração.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus que me deu uma nova vida e todas as oportunidades necessárias para concretização deste objetivo.

Ao professor doutor Alex Leite Pereira, não só pela orientação e paciência ao longo deste estudo, mas também pelas oportunidades de aprendizado oferecidas. Minha gratidão e admiração, pelo exemplo profissional e pelo crédito que me foi dado.

Aos profissionais que me apoiaram auxiliando na concretização desse trabalho e também me ofereceram sua amizade. Em especial Lilian de Oliveira Rodrigues, Danielly Rocha Nery e James Oki de Carvalho.

A todos os meus colegas de trabalho que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desta pesquisa, em especial à Ataiza Cesar Vieira, Rejane Soares do Nascimento, Lucia de Fátima Mendes Pereira, Angela Rosa Andre, Fernanda Mendes Pereira Muller, Lisandra Rodighero, Lilian Haddad Succi Candido, Osvaldo Ferreira da Silva, Grasiela Araújo da Silva, Octavio Franco e Simoni Campos Dias.

Aos funcionários e professores do programa de pós-graduação em biologia microbiana do instituto de biologia da Universidade de Brasília que possibilitaram a realização deste sonho.

## Resumo

A emergência global de cepas de enterobactérias resistentes aos carbapenens (ERC) tornou-se um problema de saúde pública em virtude do limitado arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções causadas por estes organismos multirresistentes. Em Brasília, hospitais públicos e privados relatam a presença de cepas produtoras da carbapenemase de *Klebsiella pneumoniae* - KPC - desde 2010. Além de KPC, as carbapenemases NDM, IMP, VIM e OXA-48 vêm ganhando destaque no contexto mundial. Este trabalho avaliou o perfil de susceptibilidade, bem como a produção de carbapenemase, em 524 cepas de ERC isoladas em hospitais de Brasília entre os anos de 2011 e 2013. As cepas de ERC foram caracterizadas quanto à presença dos genes  $bla_{KPC}$ ,  $bla_{VIM}$ ,  $bla_{IMP}$ ,  $bla_{OXA}$  e  $bla_{NDM}$ . *Klebsiella pneumoniae* respondeu por 74% das cepas de ERC isoladas, seguida por *Enterobacter aerogenes* com 9,4% dos isolamentos. As cepas apresentaram alta frequência de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos testados. Com relação aos carbapenens, a frequência de resistência ao imipenem foi a menor detectada, com 87% das cepas resistentes. Diante dos aminoglicosídeos, a frequência de resistência a tobramicina, gentamicina e amicacina foi de 60%, 42% e 8%, respectivamente. Para algumas classes de antibióticos foi detectada uma baixa frequência de resistência em função da espécie analisada. Apenas 8% das cepas de ERC da espécie *Proteus mirabilis* apresentaram resistência ao sulfametoxazol, e na espécie *E. aerogenes* apenas 2% dos isolados foram resistentes à tetraciclina. O gene  $bla_{KPC}$  foi predominantemente detectado nas cepas de ERC analisadas com positividade de 77%, seguido de  $bla_{NDM}$  (1,9%) e  $bla_{IMP}$  (0,4%). Em 2013, o gene  $bla_{NDM}$  foi, pela primeira vez, detectado nos hospitais de Brasília em isolados das espécies *Providencia rettigeri* (n = 1), *K. pneumoniae* (n = 2) e *P. mirabilis* (n = 1). Em 2014, cepas adicionais de *K. pneumoniae* positivas para  $bla_{NDM}$  foram detectadas em diferentes hospitais. Ensaios de RAPD confirmaram a dispersão clonal de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de NDM entre hospitais de Brasília. Este estudo alerta para a dispersão do gene  $bla_{NDM}$ , detectado em diferentes espécies, e para a emergência de um clone de *K. pneumoniae* produtor de NDM entre hospitais de Brasília.

## Abstract

The global emergence of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) strains has become a public health problem due to the limited therapeutic options available to treat infections caused by these multidrug-resistant organisms. In Brasilia, public and private hospitals have reported the presence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing strains since 2010. In addition to KPC, the NDM, IMP, VIM and OXA-48 carbapenemases have attracted the global attention. This study evaluated the susceptibility profile as well as the production of carbapenemase in 524 CRE strains isolated in hospitals in Brasília between the years of 2011 and 2013. CRE strains were characterized for the presence of *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>NDM</sub> and *bla*<sub>OXA</sub> genes. *Klebsiella pneumoniae* accounted for 74% of the isolated CRE strains, followed by *Enterobacter aerogenes* with 9.4% of the isolates. Strains showed a high frequency of resistance to the tested  $\beta$ -lactams. With regard to carbapenems, the frequency of resistance to imipenem was the lowest detected, with 87% of the strains displaying resistance. Regarding aminoglycosides, the frequency of resistance to tobramycin, amikacin and gentamicin was of 60%, 42% and 8%, respectively. For some antibiotics, a low frequency of resistance was detected depending on the species examined. Only 8% of the CRE strains belonging to the *Proteus mirabilis* species were resistant to sulfamethoxazole, and in the species of *E. aerogenes* only 2% of the isolates were resistant to tetracycline. The gene *bla*<sub>KPC</sub> was predominant in the studied CRE strains, with positivity of 77%, followed by *bla*<sub>NDM</sub> (1.9%) and *bla*<sub>IMP</sub> (0.4%). In 2013, the gene *bla*<sub>NDM</sub> started to be detected in isolates of *Providencia rettigeri* (n = 1), *K. pneumoniae* (n = 2), and *P. mirabilis* (n = 1) recovered in Brasília hospitals. Early in 2014, additional strains of *K. pneumoniae* positive for *bla*<sub>NDM</sub> were detected in different hospitals. RAPD assays confirmed the spread of a *K. pneumoniae* clone producing NDM among hospitals in Brasilia. This study warns about the spread of the gene *bla*<sub>NDM</sub>, detected in different species, and about the emergence of a single clone of NDM-producing *K. pneumoniae* among hospitals in Brasília.

**Sumário:**

1-Introdução .....	12
2- Justificativa .....	34
3- Objetivos .....	34
3.1- Geral: .....	34
3.2- Específicos:.....	34
4- Material e métodos .....	35
4.1- Isolados bacterianos .....	35
4.2- Teste de suscetibilidade a antimicrobianos. ....	36
4.3- Teste de Hodge modificado.....	36
4.4- Testes fenotípicos para a discriminação da carbapenemases.....	38
4.5- Detecção molecular de genes <i>bla</i> por meio da reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> - PCR).....	39
4.7- Perfil plasmidial.....	41
4.8- Padrão de fragmentos polimórficos de DNA amplificados randomicamente (RAPD - <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i> ).....	42
4.9- Análise do perfil de RAPD.....	43
4.10- Análise estatística.....	43
5- Resultados e Discussão .....	44
5.1- Composição etária dos pacientes colonizados por cepas de ERC.....	44
5.2- Composição de espécies na coleção de cepas de ERC analisada.....	45
5.3- Distribuição de espécies de ERC em unidades de atendimento à saúde no Distrito Federal.....	46
5.4- Evolução temporal na frequência de isolamento de espécies de ERC ao longo dos anos de 2011 e 2013.....	50
5.5- Associação estatística de espécies de ERC com determinados sítios de infecção.....	51
5.6- Perfil de susceptibilidade das cepas de ERC.....	52
5.7- Detecção fenotípica da produção de carbapenemase (Teste de Hodge Modificado – THM) e genótipo <i>bla</i> associado.....	56
5.8- Caracterização genética e fenotípica das cepas de ERC positivas para <i>bla</i> <sub>NDM</sub> inicialmente detectadas em Brasília.....	62
5.9- Perfil de RAPD das cepas de <i>K. pneumoniae</i> positivas para genes <i>bla</i> <sub>NDM</sub> isoladas em hospitais do Distrito Federal.....	66
6- Conclusão .....	69
7- Perspectivas .....	71
8- Referências bibliográficas.....	73



## Lista de abreviaturas

ATCC - <i>American Type Culture Collection</i>	THM+ <i>bla</i> - - THM positivo e ausência de genes <i>bla</i>
CIM - Concentrações Inibitórias Mínimas	THM+ <i>bla</i> + - THM positivo e presença de genes <i>bla</i>
CLSI - <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>	THM- <i>bla</i> - - THM negativo e ausência de genes <i>bla</i>
EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético;	THM- <i>bla</i> + - THM negativo e presença de genes <i>bla</i>
ERC - Enterobactérias resistentes aos carbapenens	UTI - Unidade de Terapia Intensiva
ESBL - <i>Extended-Spectrum <math>\beta</math>-Lactamases</i>	VIM - <i>Verona integron–encoded metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i>
GLCNAC - N-acetilglucosamina	
ICARE - <i>Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology</i>	
IICS - Infecções de Corrente Sanguínea	
IMI - <i>Imipenem-hydrolyzing <math>\beta</math>-lactamase</i>	
IMP - <i>Imipenemase</i>	
IRAS - Infecções relacionadas à assistência à saúde	
ITU - Infecções do trato urinário	
KPC - <i>Klebsiella pneumoniae carbapenemases</i>	
MURNAC - Ácido N-acetilmurâmico	
NDM - <i>New Delhi metallo-<math>\beta</math>-lactamase</i>	
OXA - <i>Oxacillin-hydrolyzing</i>	
PBP - <i>Penicillin-binding proteins</i>	
PCR - <i>Polymerase Chain Reaction</i>	
RAPD - <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>	
SME - <i>Serratia marcescens enzyme</i>	
ST – <i>Sequence type</i>	
TAE - Tris-acetato-EDTA	
THM - Teste de Hodge Modificado	

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Estrutura dos principais grupos dos $\beta$ -lactâmicos. ....	14
<b>Tabela 2.</b> Classificação atual de $\beta$ -lactamases, características e enzimas representantes.....	20
<b>Tabela 3.</b> Descrição de carbapenemases atualmente relevantes, de acordo com o ano de detecção, espécie primeiramente identificada e localização genética. ....	23
<b>Tabela 4.</b> Perfil de hidrólise e de inibição das carbapenemases.....	38
<b>Tabela 5.</b> Lista de iniciadores utilizados, loci genéticos detectados e condições de reação. ....	41
<b>Tabela 6.</b> Distribuição dos isolados de ERC reportados ao LACEN por instituições de saúde do Distrito Federal entre os anos de 2011 a 2013. ....	49
<b>Tabela 7.</b> Distribuição de espécies de ERC por sítios de isolamento. ....	52
<b>Tabela 8.</b> Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos geral e individual por espécie. ....	56
<b>Tabela 9.</b> Detecção fenotípica da produção de carbapenemase pelo Teste de Hodge Modificado (THM) em cepas de ERC.....	57
<b>Tabela 10.</b> Frequência de genes para carbapenemase em cepas de ERC. ....	58
<b>Tabela 11.</b> Frequência de genes para carbapenemase em cepas de ERC isolada entre 2011 - 2013. ....	59
<b>Tabela 12.</b> Correlação entre resultados dos ensaios fenotípicos para a produção de carbapenemase (THM) e a presença de genes associados a carbapenemases.....	60
<b>Tabela 13.</b> Perfil de susceptibilidade a $\beta$ -lactâmicos em diferentes grupos de ERC definidos em virtude do ensaio de THM e da presença de genes <i>bla</i> . ....	62
<b>Tabela 14.</b> Cepas de <i>K. pneumoniae</i> positivas para <i>bla</i> usadas em ensaio de RAPD. ....	67

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Classes de antimicrobianos e o ano em esse foi introduzido na clínica.....	13
<b>Figura 2.</b> Esquema da estrutura primária do peptidoglicano bacteriano. ....	15
<b>Figura 3.</b> Catálise de transpeptidação.....	16
<b>Figura 4.</b> Similariedade estrutural entre e o substrato natural das PBP e um $\beta$ -lactâmico. ....	17
<b>Figura 5.</b> Mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias. ....	18
<b>Figura 6.</b> Mecanismos de hidrólise das PBP e $\beta$ -lactamase.....	19
<b>Figura 7.</b> Distribuição mundial de bactérias produtoras de KPC.....	26
<b>Figura 8.</b> Ocorrência e caracterização molecular de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras KPC no Brasil, 2012.....	28
<b>Figura 9.</b> Ocorrência de cepas de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de VIM ou IMP no mundo (A) e na Europa (B). ....	29
<b>Figura 10.</b> Distribuição geográfica de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de OXA-48. ....	30
<b>Figura 11.</b> Distribuição geográfica de <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de NDM.....	32
<b>Figura 12.</b> Demonstração de leitura do THM.....	37
<b>Figura 13.</b> Demonstração do teste de bloqueio enzimático com EDTA.. ....	39
<b>Figura 14.</b> Frequência de isolamento de ERC por faixa etária. ....	45
<b>Figura 15.</b> Composição de espécies da coleção de cepas de ERC (n = 573) isoladas em hospitais do Distrito Federal.....	46
<b>Figura 16.</b> Frequência de isolamento de espécies de ERC entre os anos de 2011 a 2013. ....	51
<b>Figura 17.</b> Detecção da produção de metalo- $\beta$ -lactamase em cepa de <i>P. rettigeri</i> .....	63
<b>Figura 18.</b> Perfil plasmidial da cepa de <i>P. rettigeri</i> positiva para <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> .....	64
<b>Figura 19.</b> Perfil de RAPD das cepas de <i>K. pneumoniae</i> isoladas principalmente do hospital HFA.. ....	69

## 1-Introdução

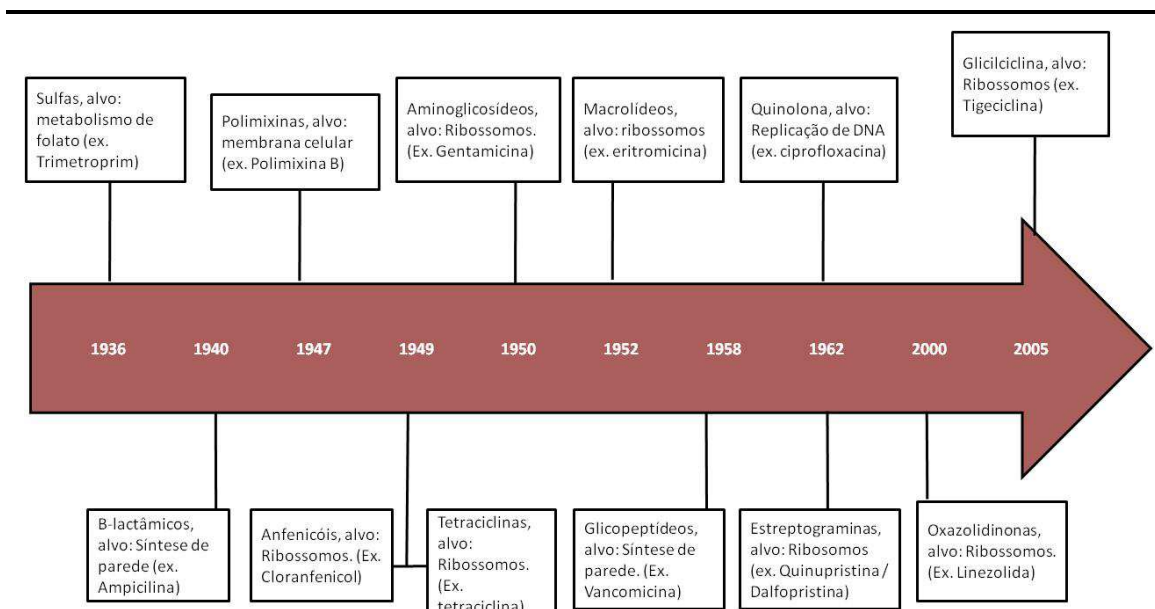
*Enterobacteriaceae* é a família de bactérias compostas por bacilos Gram negativos capazes de fermentar glicose, de reduzir nitrato a nitrito e que apresentam reação de citocromo-oxidase negativa. Esses microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza e são encontrados em solo, água, vegetais e, como indica o nome da família, no trato intestinal de seres humanos e animais vertebrados (WINN et al., 2008).

Membros da família *Enterobacteriaceae* são importantes agentes etiológicos comumente associados a infecções humanas e podem ser isolados de uma grande variedade de amostras biológicas. Pacientes imunocomprometidos e os debilitados são altamente susceptíveis às infecções hospitalares por enterobactérias que decorrem, geralmente, da colonização por cepas ambientais ou endógenas após a realização de procedimentos invasivos nos quais as mucosas são traumatizadas ou transeccionadas (PITOUT, 2008; WINN et al., 2008).

A importância das enterobactérias como agente etiológico de infecções humanas é indiscutível. Na Europa, um estudo epidemiológico realizado em 24 hospitais de 14 países determinou a frequência de espécies de enterobactérias isoladas de infecções de corrente sanguínea (ICS), de pele, de tecidos, do trato urinário (ITU), bem como de pneumonias nosocomiais. Um total de 15.704 cepas foi avaliado e a espécie *Escherichia coli* figurou como o agente etiológico mais isolado em infecções sanguíneas, com frequência de isolamento de 20,8%; e em ITU, com isolamento de 49,3%. Quando somados os gêneros mais frequentemente isolados (*Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, e *Salmonella*), a frequência de isolamento de enterobactérias foi de 37,7%, 31,7%, 26,1% e 73,5% nas ICS, pneumonias nosocomiais, infecções de pele e tecido, e ITU, respectivamente (FLUIT et al., 2001).

Considerando dados epidemiológicos do continente americano, um estudo avaliou 4.267 isolados bacterianos de ICS; pneumonia hospitalar e comunitária; infecção de ferida e de trato urinário em 30 centros médicos dos Estados Unidos, 8 do Canadá e 10 da América Latina, incluindo o Brasil. Dentre as bactérias Gram negativas, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram as espécies mais frequentemente isoladas em ICS em todos os centros médicos estudados, apresentando frequência de isolamento de 58,9%. Quando considerados outros sítios de infecção, a frequência de isolamento de enterobactérias também foi significativa (DIEKEMA et al., 1999).

Desde meados da década de 1940, muitos antibióticos com ação em diferentes alvos celulares foram descobertos e introduzidos na prática clínica para controle de infecções bacterianas (Figura 1) (WALSH, 2003; NOSKIN, 2005; GUPTA et al., 2009). Antibióticos são caracterizados em virtude de seu mecanismo de ação, dentre os quais citam-se (1) a interferência na síntese de parede celular, (2) a inibição da síntese de proteína, (3) a interferência na síntese de ácido nucleico e (4) a inibição de vias metabólicas (TENOVER, 2006).



**Figura 1.** Classes de antimicrobianos e ano de introdução na prática clínica-

Dentre os principais antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias estão os  $\beta$ -lactâmicos. O primeiro antibiótico  $\beta$ -lactâmico foi acidentalmente descoberto por Alexander Fleming, em 1928, como uma substância secretada pelo fungo *Penicillium notatum*, sendo então nomeada "penicilina" (FLEMING, 1929). Desde a descoberta da penicilina, vários outros  $\beta$ -lactâmicos foram descritos e são atualmente divididos em quatro principais grupos em função da estrutura química apresentada: penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenens (Tabela 1) (ESSACK, 2001).

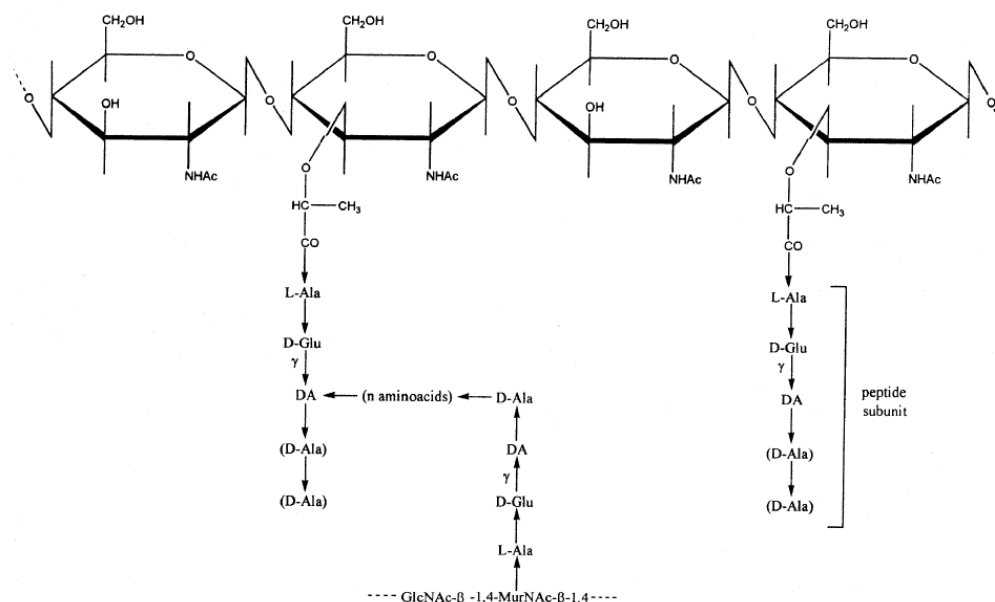
**Tabela 1.** Estrutura dos principais grupos dos  $\beta$ -lactâmicos (ESSACK, 2001).

Classe	Estrutura	Nota
Penicilinas		<p>Consistem de um anel de tiazolidina fundido com o anel de <math>\beta</math>-lactâmico em que as diferentes cadeias laterais de grupos acilas estão ligadas a radicais.</p> <p>(Ex. Ampicilina, amoxicilina, piperacilina).</p>
Cefalosporinas		<p>Possui um anel de di-hidrotiazina fundido ao anel <math>\beta</math>-lactâmico.</p> <p>(Ex. Cefalotina, cefuroxima, cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima, cefotetam e cefepima).</p>
Monobactams		<p>Molécula de <math>\beta</math>-lactâmico monocíclica, inicialmente isolada a partir de <i>Chromobacterium violaceum</i>.</p> <p>(Ex. Aztreonam)</p>
Carbapenens		<p>Assemelha-se às penicilinas, com exceção do anel de cinco elementos em que o átomo de enxofre foi substituído por um átomo de carbono e tem uma ligação dupla entre o carbono 2 e 3.</p> <p>(Ex. Imipenem, meropenem e ertapenem).</p>

$\beta$ -lactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados no mundo, respondendo por mais de 65% das prescrições de antibióticos utilizados na prática médica

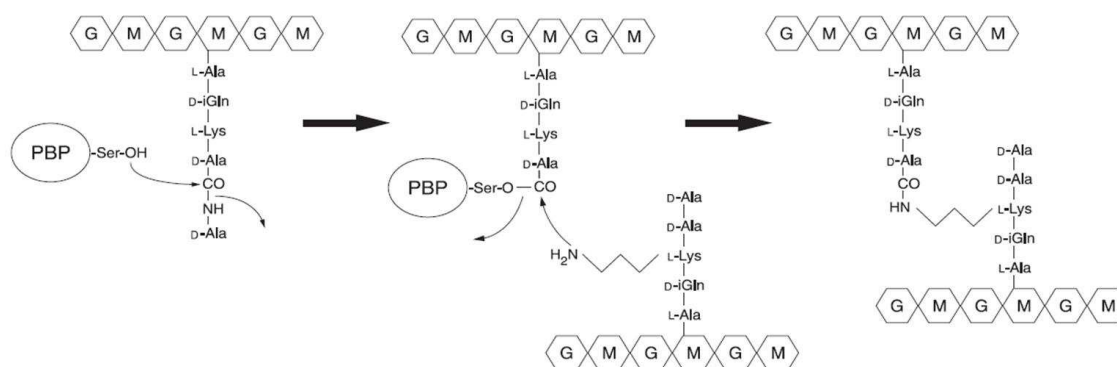
(ANDERSSON et al., 2001; ELANDER, 2003; BUSH, 2012; MELETIS; BAGKERI, 2014). Eles são preferidos por causa de sua eficácia e segurança clínica, em virtude de sua alta toxicidade seletiva (CHANT et al., 2013). Além do mais, a atividade de  $\beta$ -lactâmicos pode ser estendida ou restaurada por manipulações em sua estrutura química. Nenhuma outra classe de antimicrobiano apresenta tal maleabilidade química e versatilidade (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

$\beta$ -lactâmicos agem inibindo o ultimo passo da síntese do peptidoglicano, por meio da acetilação das proteínas ligadoras de penicilina (no inglês *penicillin-binding proteins* - PBP). A principal característica estrutural do peptidoglicano são as cadeias de glicano dispostas de forma linear e interligadas por cadeias curtas de peptídeo (figura 2) (HEIJENOORT, VAN, 2001). As reações de interligação (ligações cruzadas) entre as subunidades peptídicas são catalisadas pelas PBP que atuam como transpeptidases ou carboxipeptidases na síntese do peptidoglicano (VOLLMER et al., 2008).



**Figura 2.** Esquema da estrutura primária do peptidoglicano bacteriano. Abreviaturas: GlcNac, N-acetilglucosamina; MurNac, ácido N-acetilmurâmico; DA, ácido diamínico; n, numero de aminoácidos da ponte peptídica (de 0 a 5 dependendo do organismo). O D-Ala é muitas vezes perdido após o estabelecimento da ligação entre os peptídeos (HEIJENOORT, VAN, 2001).

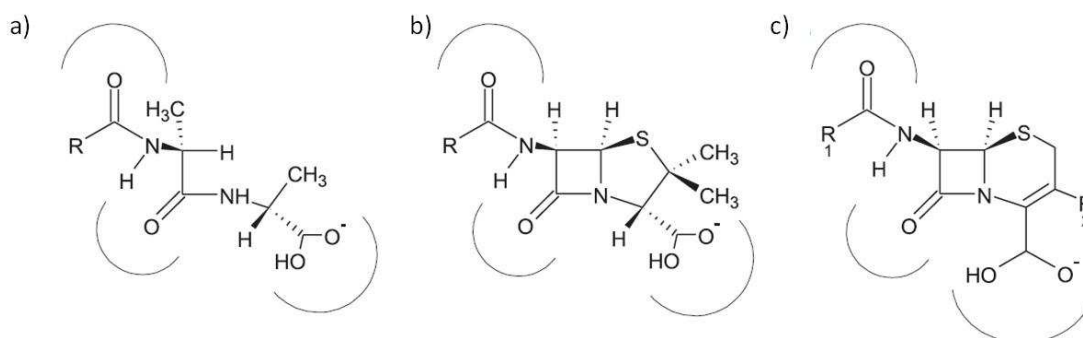
Durante a reação de síntese das ligações cruzadas, o resíduo de serina, integrante do sítio catalítico da transpeptidase, ataca o carbonil do penúltimo aminoácido D-Ala da cadeia peptídica, que perde o último aminoácido D-Ala do peptídeo doador e forma um complexo covalente acil-enzima. Na transpeptidase, o carbonil do aminoácido D-Ala, agora formando uma ligação éster com o sítio ativo de serina, sofre um ataque a partir de uma amina primária ligada de várias maneiras ao terceiro resíduo de um segundo peptídeo "receptor". A ponte peptídica é então criada entre as duas cadeias peptídicas, formando uma ligação cruzada entre cadeias de glicano (figura 3) (WALSH, 2000; ZAPUN et al., 2008).



**Figura 3.** Catálise de transpeptidação. Fragmentos de glicanos são representados por cadeias de hexágonos correspondendo às hexoses N-acetilglucosamina (G) e ácido N-acetilmurâmico (M). O peptídeo doador é representado na vertente de glicanos superior, enquanto o receptor é representado na vertente inferior (ZAPUN et al., 2008).

A estrutura química dos  $\beta$ -lactâmicos mimetiza o dipeptídeo D-Ala-D-Ala em sua conformação alongada, particularmente em relação à distribuição de três campos eletrostáticos negativos (Figura 4), agindo como um substrato suicida para a PBP. O sítio ativo de serina da PBP ataca o carbonil do anel  $\beta$ -lactâmico, resultando na abertura do anel e formando um complexo acil-enzima covalente. Esse complexo é hidrolisado muito lentamente, impedindo efetivamente que novas reações sejam catalisadas pela transpeptidase (WALSH, 2000; ZAPUN et al., 2008).





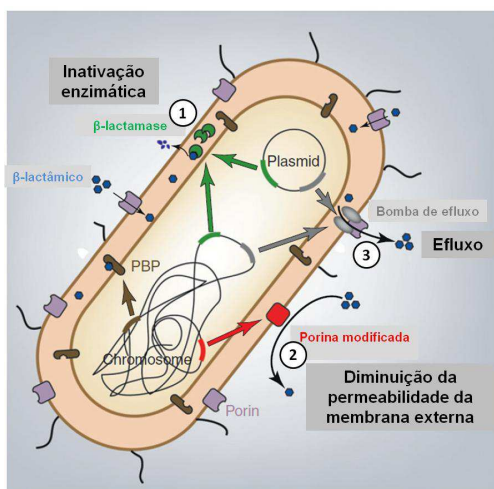
**Figura 4.** Similaridade estrutural entre o substrato natural das PBP e um  $\beta$ -lactâmico. (a) Peptídeo N-acil-D-Alanil-D-Alanina. (b) Estrutura da penicilina. (c) Estrutura da cefalosporina. As regiões de potencial eletrostático negativo estão indicadas por arcos (ZAPUN et al., 2008).

Carbapenens são os antimicrobianos mais eficazes da classe dos  $\beta$ -lactâmicos e são reservados para o tratamento de infecções hospitalares graves causadas, muitas vezes, por bactérias multirresistentes. Além do mais, são fármacos cruciais na prevenção e tratamento de infecções potencialmente fatais que são geralmente associadas a técnicas executadas na medicina moderna, tais como, transplantes de órgãos, hospitalizações em unidade de terapia intensiva (UTI) e procedimentos cirúrgicos complexos (NORDMANN; NAAS; et al., 2011; NORDMANN; DORTET; et al., 2012). Carbapenens possuem um espectro de ação ampliado, demonstrando atividade contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, incluindo espécies bacterianas anaeróbias. Devido a sua estabilidade frente às  $\beta$ -lactamases, enzimas frequentemente detectadas em enterobactérias, os carbapenens apresentam alta eficácia no controle de infecções causadas por enterobactérias quando comparados a outros  $\beta$ -lactâmicos (NICOLAU, 2008).

No curso da evolução, bactérias desenvolveram várias estratégias para evitar a ação de antibióticos que conduziram eventualmente à resistência (figura 5) (NORDMANN; DORTET; et al., 2012). Em enterobactérias, a inativação enzimática dos antimicrobianos é o mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos mais frequentemente detectado (BUSH; FISHER, 2011). Já em 1940, Abraham e Chain

isolaram cepas de *E. coli* que produziam enzimas capazes de hidrolisar a penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940).

Diferente das bactérias Gram positivas, que secretam ou mantêm  $\beta$ -lactamases ligadas à membrana citoplasmática, nas Gram negativas, as  $\beta$ -lactamases são acumuladas estrategicamente no espaço periplasmático (WALSH, 2000; FISHER et al., 2005).



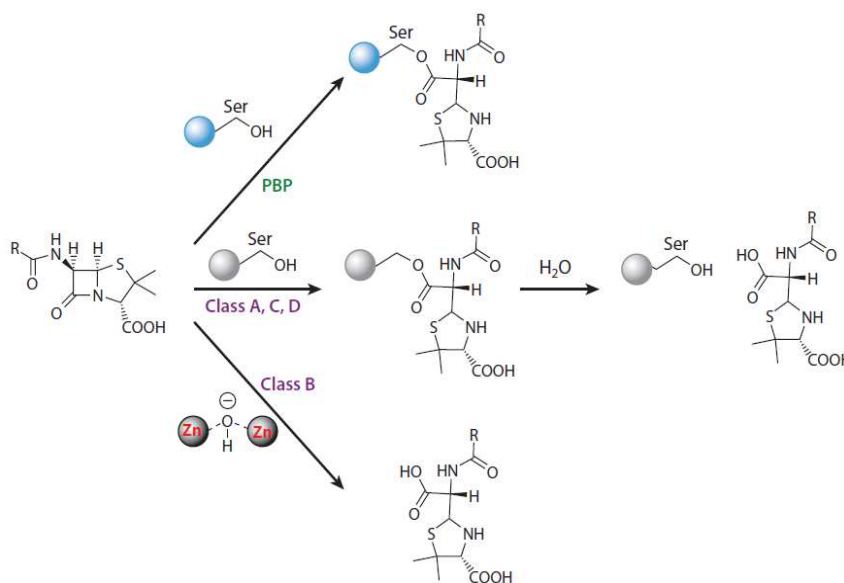
**Figura 5.** Mecanismos de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em enterobactérias. 1 - Inativação enzimática do antibiótico por enzimas codificadas por plasmídeo ou cromossomo. 2 - Diminuição da permeabilidade da membrana externa por modificação das porinas, por onde os  $\beta$ -lactâmicos entram na célula bacteriana, perda de expressão de porina ou substituição do tipo de porinas. 3 - Efluxo do antimicrobiano para fora da célula bacteriana (NORDMANN; DORTET; et al., 2012).

A caracterização das  $\beta$ -lactamases é tradicionalmente baseada em características funcionais e estruturais apresentadas pelas enzimas. A classificação mais simples, proposta por Ambler, é baseada na conservação de resíduos de aminoácidos da sequência primária das  $\beta$ -lactamases e na presença de cofatores metálicos (HALL; BARLOW, 2005). As enzimas das classes A, C e D contêm no seu sítio catalítico um resíduo de serina, enquanto que aquelas da classe B são metaloenzimas e utilizam íons de zinco como cofator para hidrolisar os  $\beta$ -lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; FISHER, 2011).

O mecanismo catalítico das serino- $\beta$ -lactamases (classes A, C e D) envolve a abertura sequencial do anel  $\beta$ -lactâmico pela serina do sítio ativo resultando em um intermediário acil-enzima, assim como ocorre no mecanismo de hidrólise das PBP. A

hidrólise dessa estrutura intermediária liberará a enzima, que poderá hidrolisar outras moléculas do  $\beta$ -lactâmico (ZAPUN et al., 2008; MORAR; WRIGHT, 2010; BUSH; FISHER, 2011; CHANT et al., 2013). Já nas metalo

$\beta$ -lactamases (classe B), a hidrólise é dependente de um ou dois íons de zinco (Figura 6) (WALSH, 2005; MORAR; WRIGHT, 2010).



**Figura 6.** Mecanismos de hidrólise das PBP e  $\beta$ -lactamase. São reconhecidos, de forma geral, dois mecanismos de hidrólise de  $\beta$ -lactâmico. No primeiro, o nucleófilo de serina ataca a carbonila do anel  $\beta$ -lactâmico, resultando em uma enzima covalente intermediária, assim como ocorre na inativação das PBP. Em seguida o complexo é hidrolisado. No segundo mecanismo, a inativação é dependente de  $Zn^{2+}$ , que utiliza molécula de água para hidrolisar o  $\beta$ -lactâmico (MORAR; WRIGHT, 2010).

Alternativamente, Bush e Jacoby propuseram uma classificação expandida, que distribuiu as enzimas em grupos (1, 2 e 3) e em subgrupos (representados por vogais), considerando características tanto estruturais quanto funcionais das enzimas (tabela 2). As enzimas com espectro para carbapenems estão nos grupos 2df, 2f, 3a e 3b (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; FISHER, 2011).

**Tabela 2.** Classificação atual de  $\beta$ -lactamases, características e enzimas representantes (BUSH; JACOBY, 2010; BUSH; FISHER, 2011).

Grupo Bush-Jacoby (Ambler "molecular").	Substrato	Inibição		Características	Enzimas representantes
		CLAV ou TZB	EDTA		
1 (C)	Cefalosporinas	NÃO	NÃO	Hidrolisa cefalosporinas, cefamicinas e também penicilinas.	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1 e MIR-1.
1e (C)	Cefalosporinas	NÃO	NÃO	Hidrolise ampliada para cefalosporinas até a 3ª geração.	GC1 e CMY-37
2a (A)	Penicilinas	SIM	NÃO	Melhor hidrolise para penicilina em relação à cefalosporinas.	PC1
2b (A)	Penicilinas e Cefalosporinas (1ª e 2ª)	SIM	NÃO	Hidrolise similar para penicilina e cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be (A)	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactams e penicilinas	SIM	NÃO	Hidrolise ampliada para todas as cefalosporinas e aztreonam	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br (A)	Penicilinas	NÃO	NÃO	Resistente a IBL	TEM-30, SHV-10
2ber (A)	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactams	NÃO	NÃO	Hidrolise ampliada para todas as cefalosporinas, aztreonam, associado a resistente a IBL	TEM-50
2c, 2ce* (A)	Carbecilina, Cefepime*	SIM	NÃO	Hidrolise ampliada para Carbecilina	PSE-1, CARB-3 e RTG-4*
2d (D)	Cloxacilina	Variável	NÃO	Hidrolise ampliada para Cloxacilina ou oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de (D)	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	NÃO	Hidrolise ampliada para Cloxacilina ou oxacilina e todas as cefalosporinas.	OXA-11, OXA-15
2df (D)	Carbapenens	Variável	NÃO	Hidrolise ampliada para cloxacilina ou oxacilina e carbapenens	OXA-23, OXA-48
2e (A)	Cefalosporinas de espectro estendido	SIM	NÃO	Hidrolisa cefalosporinas, mas não monobactams	CepA
2f (A)	Carbapenens	Variável	NÃO	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, inclusive carbapenens	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a (B)	Carbapenens	NÃO	SIM	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, inclusive carbapenens, com exceção de monobactam	IMP-1, L1, VIM-1, CcrA, IND-1, NDM-1
3b (B)	Carbapenens	NÃO	SIM	Hidrolisa todos $\beta$ -lactâmicos, inclusive carbapenens, com exceção de monobactam	CphA, Sfh-1 (preferência por carbapenens)

Abreviações: CLAV, ácido clavulânico; TZV, Tazobactam; a, não consta na tabela original; IBL, Inibidores de  $\beta$ -lactamases.

Durante a década de 80, com a introdução no mercado das cefalosporinas de 3ª geração (oxiamino-cafalosporinas), cepas com um espectro de resistência estendido frente aos  $\beta$ -lactâmicos emergiram em virtude da expressão de enzimas do tipo ESBL (do inglês, *Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases*) ou AmpC (PITOUT et al., 2005; LIVERMORE; WOODFORD, 2006). Cepas de enterobactérias produtoras de ESBL comumente apresentam co-resistência a outras classes de antimicrobianos tais como as fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, inibidores da síntese de folatos, tetraciclina e cloranfenicol (PITOUT; LAUPLAND, 2008). Em consequência deste ampliado perfil de resistência, o uso de carbapenems, que são  $\beta$ -lactâmicos resistentes à ação de ESBL, aumentou significativamente, promovendo uma nova pressão seletiva e a consequente emergência de cepas resistentes aos carbapenems (DESHPANDE et al., 2006). Atualmente um grupo de  $\beta$ -lactamases que tem notadamente atraído a atenção mundial são as carbapenemases, em grande parte, devido a sua capacidade para hidrolisar uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos, incluindo os carbapenems (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN et al., 2009; NORDMANN; NAAS; et al., 2011; NORDMANN; DORTET; et al., 2012; POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010).

As carbapenemases representam a família mais versátil de  $\beta$ -lactamases, com uma amplitude de espectro de ação superior ao de outras enzimas que hidrolisam  $\beta$ -lactâmicos (GALLENI et al., 2001; QUEENAN; BUSH, 2007). As primeiras carbapenemases descritas (BclI, CphA e L1) eram codificadas por genes cromossômicos de bactérias ambientais ou de patógenos oportunistas como *Bacillus cereus* (KUWABARA; ABRAHAM, 1967), *Aeromonas* spp. (IACONIS; SANDERS, 1990), e *Stenotrophomonas maltophilia* (SAINO et al., 1982). Contudo, com exceção da *S. maltophilia*, essas espécies não são frequentemente associadas às infecções nosocomiais sérias, e a dispersão genética era atenuada devido à localização cromossômica dos genes de resistência (QUEENAN; BUSH, 2007).

Em enterobactérias, as primeiras carbapenemases descritas foram SME-1 (do inglês, *Serratia marcescens enzyme*), detectada em 1982 em cepas de *Serratia marcescens* isoladas de pacientes internados em um hospital de Londres, UK (YANG et al., 1990); e IMI-1 (do inglês, *imipenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase*), detectada em 1984 em uma cepa de *E. cloacae* recuperada de infecção de ferida de um paciente internado na Califórnia, USA (RASMUSSEN et al., 1996). Interessantemente, essas cepas foram isoladas antes mesmo da introdução dos carbapenens na prática clínica naqueles países (YANG et al., 1990; RASMUSSEN et al., 1996; QUEENAN; BUSH, 2007).

Até 1990 todas as carbapenemases foram descritas como espécie-específicas, codificadas por genes cromossomais. No entanto, carbapenemases codificadas por genes plasmidiais passaram a emergir daquela época em diante mudando o padrão de disseminação das carbapenemases. O que era um problema de âmbito local, devido à dispersão de clones resistentes, tornou-se um problema de dispersão genética global entre diferentes espécies de Gram negativos incluindo enterobactérias (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; FISHER, 2011).

Atualmente são conhecidas diversas carbapenemases pertencentes a diferentes classes (classe A, B ou D), sendo algumas codificadas por genes cromossomais e outras por genes plasmidiais (tabela 3) (QUEENAN; BUSH, 2007; BUSH; FISHER, 2011). As carbapenemases tais como KPC (do inglês, *Klebsiella pneumoniae carbapenemases*), NDM (*New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase*), OXA (*oxacillin-hydrolyzing*) e IMP (*Imipenemase*) estão ganhando atenção em virtude da dispersão mundial apresentada e da associação com surtos hospitalares (WALSH et al., 2005; QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN; NAAS; et al., 2011; NORDMANN; DORTET; et al., 2012; MUNOZ-PRICE et al., 2013)

**Tabela 3.** Descrição de carbapenemases atualmente relevantes, de acordo com o ano de detecção, espécie primeiramente identificada e localização genética.

Classe	$\beta$ -Lactamase	Ano de detecção	Local de isolamento	Espécie primeiramente detectada	Localização genética	Referência
<b>A</b>	SME-1	1982	Londres, UK	<i>S. marcescens</i>	Cromossomo	(NAAS; VANDEL, 1994)
	IMI	1984	Illinois, US	<i>E. cloacae</i>	Cromossomo	(RASMUSSEN et al., 1996)
	NMC-A	1990	Paris, França	<i>E. cloacae</i>	Cromossomo	(NAAS; NORDMANN, 1994)
	KPC-1	1996	Carolina do Norte, US	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmídio	(YIGIT et al., 2001)
	GES-2	2000	África do Sul	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Plasmídio	(POIREL et al., 2001)
	BIC-1	2009	Paris, França	<i>P. fluorescens</i>	Cromossomo	(GIRLICH et al., 2010)
<b>B</b>	IMP-1	1988	Japão	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídio	(WATANABE et al., 1991)
	VIM-1	1997	Verona, It	<i>P. aeruginosa</i>	Cromossomo	(LAURETTI et al., 1999)
	KHM	1997	Tokio, Japão	<i>C. freundii</i>	Plasmídio	(SEKIGUCHI et al., 2008)
	SPM-1	2001	São Paulo, BR	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídio	(TOLEMAN et al., 2002)
	GIM-1	2002	Alemanha	<i>P. aeruginosa</i>	Plasmídio	(CASTANHEIRA; TOLEMAN, 2004)
	AIM-1	2002	Australia	<i>P. aeruginosa</i>	Cromossomo	(YONG et al., 2012)
	SIM-1	2003	Seul, Coreia	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Cromossomo	(LEE et al., 2005)
	DIM-1	2007	Holanda	<i>P. stutzeri</i>	Plasmídio	(POIREL; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ; et al., 2010)
<b>D</b>	NDM-1	2008	Nova Deli, Índia (ou Orebro, Suécia)	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmídio	(YONG et al., 2009)
	OXA-23	1985	Edimburgo, Escócia	<i>A. baumannii</i>	Plasmídio	(SCAIFE et al., 1995; DONALD et al., 2000)
	OXA-48	2001	Turquia	<i>K. pneumoniae</i>	Plasmídio	(POIREL et al., 2004)

O primeiro relato sobre KPC foi feito por YIGIT e colaboradores em 2001, após o isolamento de uma cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenens na Carolina do Norte (EUA) durante a execução de um projeto de vigilância epidemiológica (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology* – ICARE, 1996) para monitoramento da resistência a antibióticos em UTIs. A cepa de *K. pneumoniae* produtora de KPC apresentava resistência aos  $\beta$ -lactâmicos cefalosporinas, aztreonam, imipenem e meropenem, bem como, a outras classes de antibióticos tais como aminoglicosídeos, sulfametoxazol-trimetoprima e clorafenicol (YIGIT et al., 2001).

O gene  $bla_{KPC-1}$ , responsável pela expressão da enzima KPC, estava localizado em um plasmídio não conjugativo de aproximadamente 50 quilobases. Além de KPC, a cepa também produzia as enzimas SHV (do inglês, *Sulphydryl-inhibitor Variable*) e TEM (de Temonera), codificadas por um elemento genético diferente daquele que portava  $bla_{KPC}$ . Além do mais, a cepa em questão também não expressava a porina OmpK35, o que contribuía para a elevação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) de meropenem, ceftazidima e cefotaxima (YIGIT et al., 2001).

Em 2003, foram isoladas quatro cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC no nordeste dos EUA. A carbapenemase destas cepas apresentava uma mutação pontual no gene  $bla_{KPC}$  e foi denominada de KPC-2. A enzima KPC-2 apresentou uma menor atividade de hidrólise frente à imipenem e meropenem em contraste a KPC-1 isolada na Carolina do Norte (SMITH MOLAND et al., 2003). Também em 2003 foi reportado um isolado de *Salmonella enterica* sorotipo Cubana, recuperado de uma criança de 4 anos de idade com gastroenterite, portando um plasmídio conjugativo que codificava o gene  $bla_{KPC-2}$  (MIRIAGOU et al., 2003). O primeiro surto associado a bactérias produtoras de KPC-2 foi reportado em Nova York em 2004 envolvendo vários hospitais e um mesmo clone bacteriano. Após a rápida expansão das carbapenemases do tipo KPC ao longo da costa leste dos Estados Unidos, relatos similares passaram a ocorrer em todo o mundo (figura 7) (QUEENAN; BUSH, 2007).

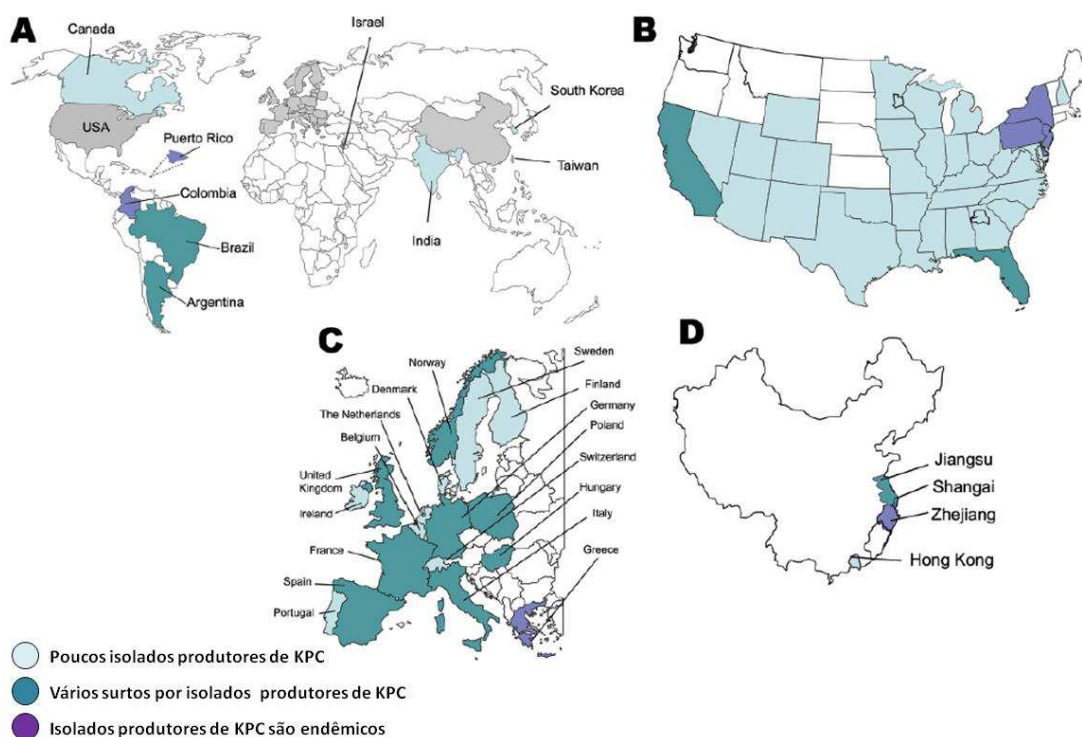


Em 2005 foi isolada pela primeira vez uma cepa produtora de KPC fora dos EUA. Um paciente, atendido na França, relatou que recebera tratamento cirúrgico em dezembro de 2004 em um hospital de Nova York (EUA). Com base neste trabalho, foi demonstrado que possivelmente a presença da bactéria produtora de KPC na França tenha sido resultado da transferência intercontinental de um clone a partir dos EUA (NAAS et al., 2005).

Além da preocupação diante dessa nova geração de  $\beta$ -lactamases, outro dado alarmante veio à tona com a descoberta em Nova York de um isolado de *K. pneumoniae* portando pelo menos 8 tipos diferentes de  $\beta$ -lactamases: SHV-1, SHV-12 (ESBL), KPC, FOX (AmpC), PSE-1, OXA, TEM-1, TEM-30 (MOLAND et al., 2007). O isolamento de cepas portando mais de um tipo de carbapenemase como KPC e VIM também tem sido reportado (GIAKKOUPHI et al., 2009; ZIOGA et al., 2010). O acúmulo de diferentes genes codificadores de  $\beta$ -lactamases pode tanto dificultar a detecção laboratorial dos mecanismos de resistência como também diminuir a eficácia dos inibidores de  $\beta$ -lactamases frente a estas cepas (ENDIMIANI et al., 2009; GIAKKOUPHI et al., 2009).

No intuito de compreender o padrão de transmissão e para ajudar no controle das infecções hospitalares, vários métodos de tipagem bacteriana, entre eles RAPD (do inglês, *Random Amplified Polymorphic DNA*), PFGE (do inglês, *Pulsed Field Gel Electrophoresis*) e MLST (do inglês, *Multilocus Sequence Typing*), estão sendo utilizados para distinguir isolados clínicos de *K. pneumoniae*, além de outras espécies também envolvidas em surtos hospitalares e dispersão mundial (SINGH et al., 2006; VIMONT et al., 2008; ASHAYERI-PANAH et al., 2013). A técnica MLST compara as sequências de nucleotídeos de uma série de genes de manutenção (do inglês, *housekeeping genes*), que em conjunto formam um perfil alélico ou tipo de sequência (do inglês *Sequence Type*, ST). Assim, isolados com o mesmo perfil de alelos são designados como membros do mesmo clone ou ST (SINGH et al., 2006).

A localização dos genes *bla*<sub>KPC</sub> em plasmídios portados por cepas altamente adaptadas, tal como o clone ST258 de *K. pneumoniae*, tem possibilitado a dispersão mundial dessa carbapenemase (NORDMANN; NAAS; et al., 2011; NORDMANN; DORTET; et al., 2012). Além do mais, o isolamento de cepas de *K. pneumoniae* ST258 com reduzida sensibilidade à clorexidina, um desinfetante amplamente utilizado em hospitais, tem sido relatado. A resistência à clorexidina contribui para a persistência desta linhagem em ambientes hospitalares, bem como, pode proporcionar uma vantagem seletiva para este clone pandêmico de *K. pneumoniae* (NAPARSTEK et al., 2012). O difícil controle sobre a dispersão dessas cepas aliado às altas taxas de mortalidade das infecções decorrentes configura-se um grande problema para a saúde pública (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).



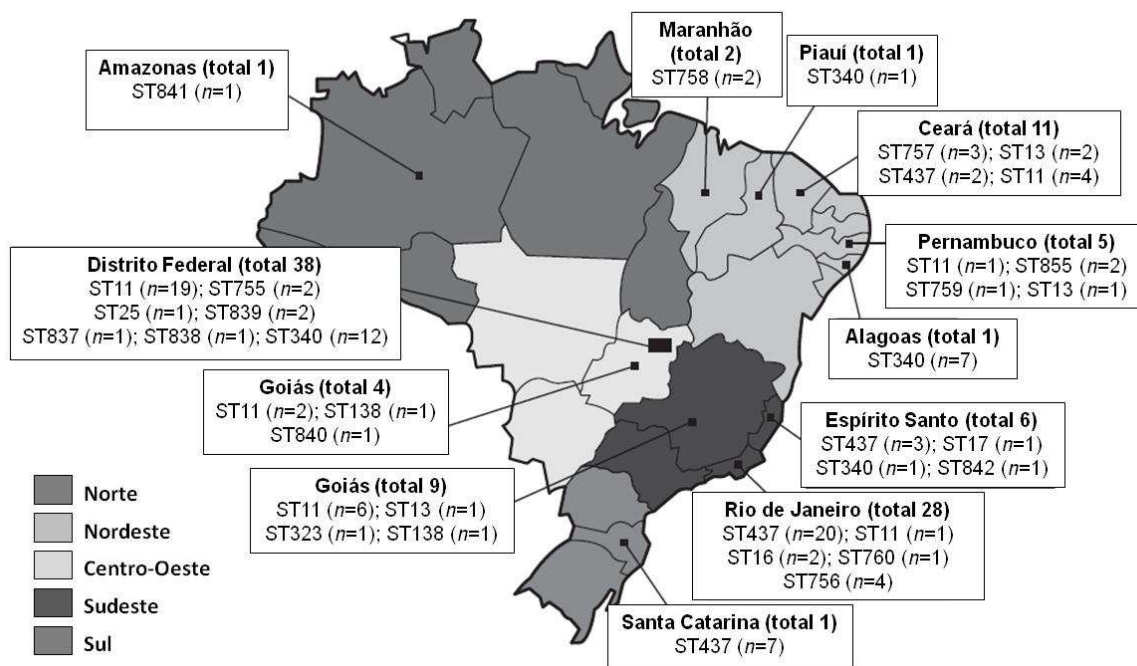
**Figura 7.** A - Distribuição mundial de bactérias produtoras de KPC. - As áreas em cinza estão demonstradas separadamente; B – Distribuição nos Estados Unidos; C – Distribuição na Europa; Distribuição da China (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

No Brasil, o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtora de KPC foi publicado em 2009, descrevendo quatro cepas recuperadas em 2006 de pacientes

hospitalizados em UTI de um hospital em Recife. Além de KPC as cepas produziam outras  $\beta$ -lactamases tais como CTX-M-2, SHV e TEM. Além da resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos testados, as cepas apresentavam resistência a outras classes de antimicrobianos, como por exemplo, às fluoroquinolonas, o que restringia as opções terapêuticas à gentamicina, tigeciclina e polimixina (MONTEIRO et al., 2009). Embora os primeiros relatos brasileiros de cepas produtoras de KPC datem desta época, há evidências de que *K. pneumoniae* produtoras de KPC foram inicialmente isoladas no Brasil em 2005, em São Paulo, como sugere um relatório de vigilância de bactérias Gram negativas resistentes aos carbapenens realizada na região sudeste do Brasil (PAVEZ et al., 2009).

Em 2007, seis cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC foram detectadas em dois hospitais do Rio de Janeiro apresentando um perfil de resistência ainda mais amplo quando comparado às cepas isoladas em Recife, com resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, fluoquinolonas e amicoglicosídeos (PEIRANO et al., 2009). Em 2008, outros relatos de KPC ocorreram na cidade de São Paulo (PAVEZ et al., 2009). Desde então, o isolamento de cepas de enterobactérias expressando KPC tem sido relatado em vários estados abrangendo todas as regiões brasileiras (figura 8) (PEREIRA et al., 2013).

Cepas de *K. pneumoniae* pertencentes ao complexo clonal 258 (ST 258, ST11 e ST 437) têm sido frequentemente isoladas em hospitais brasileiros suscitando grande preocupação ao cenário epidemiológico nacional (figura 8) (CUZON et al., 2010; SEKI et al., 2011; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2013). O complexo 258 tem sido responsável causar surtos em vários hospitais, cidades e países, isso devido a alta capacidade de adaptação e disseminação apresentadas por esse complexo clonal (OSTERBLAD et al., 2009; SAMUELSEN et al., 2009; KITCHEL et al., 2009; ZACHARCZUK et al., 2011).

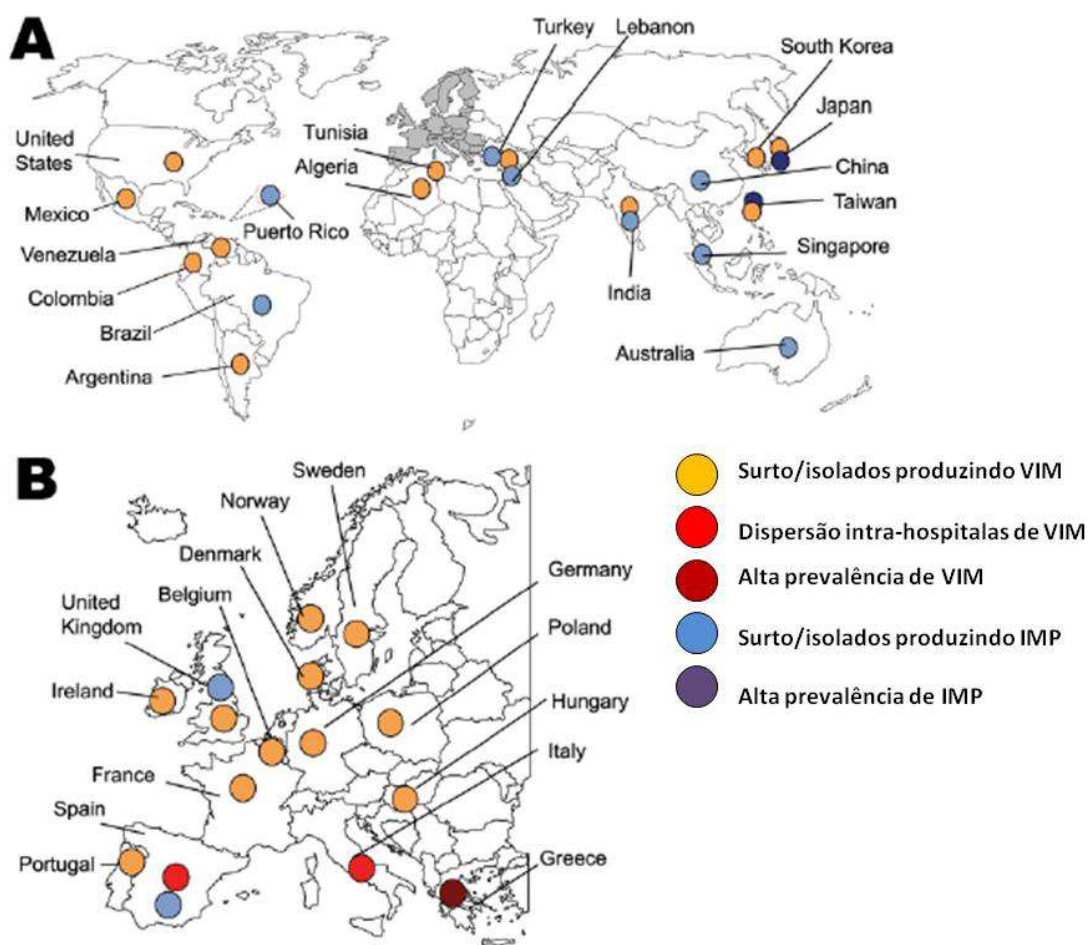


**Figura 8.** Ocorrência e caracterização molecular de cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras KPC no Brasil, 2012. Abreviações: n – número de isolados; ST – tipo de sequência (do inglês *sequence type*) (PEREIRA et al., 2013).

Além da enzima KPC, as carbapenemases do tipo IMP e VIM, que são frequentes em bacilos Gram negativos não fermentadores, tiveram sua transferência para enterobactérias facilitada em virtude da frequente associação dos respectivos genes com elementos genéticos móveis tais como plasmídios conjugativos e transposons (QUEENAN; BUSH, 2007). Os primeiros relatos de cepas de enterobactérias produtoras de IMP e VIM ocorreram em 1991 no Japão e em 2000 na Coreia do Sul (ITO et al., 1995; JEONG et al., 2003). Desde então, cepas produtoras de VIM ou IMP, e até mesmo coproduzindo as duas carbapenemases, têm sido relatadas em muitos países (figura 09) (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

No Brasil, isolados produtores de IMP-1 eram encontrados somente nas espécies de não fermentadores *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp (MENDES et al., 2007). Contudo em 2003, foi relatado primeiro caso de enterobactéria produtora de IMP com o isolamento, na cidade de São Paulo, de uma cepa de *K. pneumoniae*

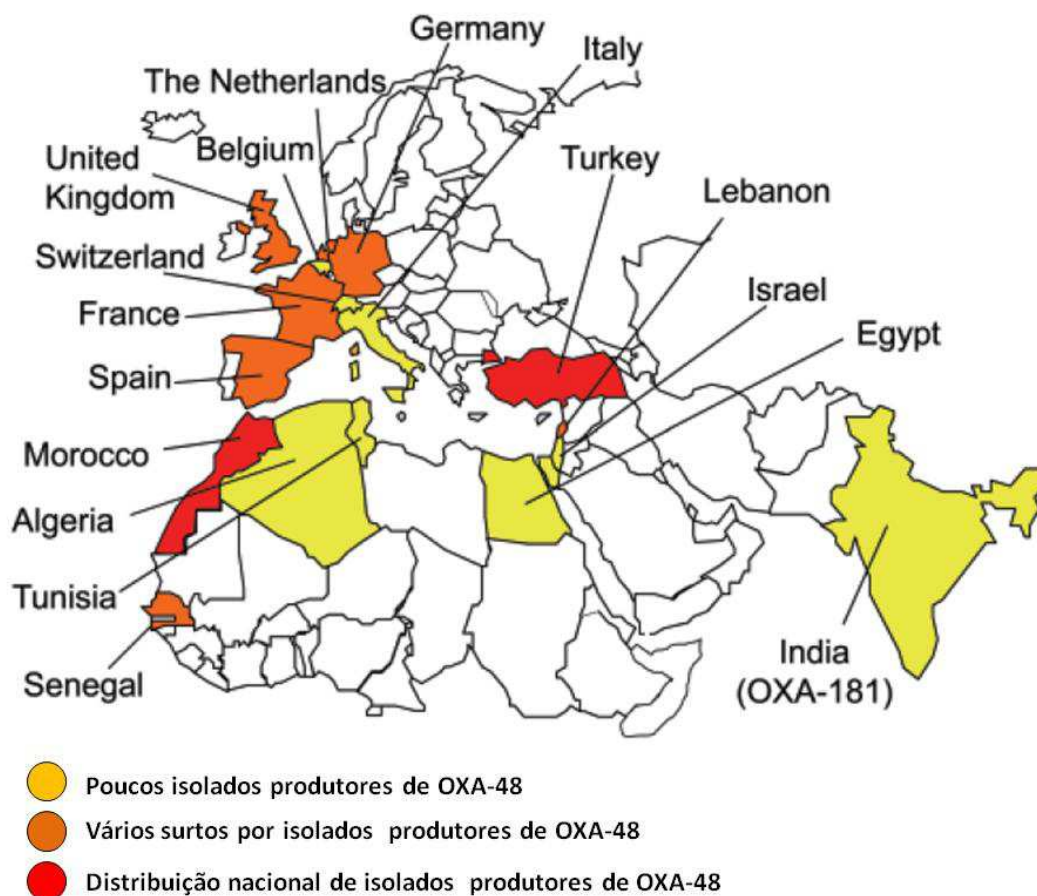
portando o gene *bla*<sub>IMP</sub> (LINCOPAN et al., 2005). Desde então alguns outros casos enterobactérias portando o gene *bla*<sub>IMP</sub> foram reportados (PENTEADO et al., 2009).



**Figura 9.** Ocorrência de cepas de *Enterobacteriaceae* produtoras de VIM ou IMP no mundo (A) e na Europa (B) (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

Mais recentemente, tem-se observado a dispersão rápida, e em escala mundial, de carbapenemases que emergiram de regiões geográficas específicas. A carbapenemase OXA-48 foi inicialmente identificada em cepas de enterobactérias isoladas na Turquia em 2003 (POIREL et al., 2004). Embora extensivamente reportadas causando surtos hospitalares, cepas produtoras de OXA-48 estavam restritas à Turquia. Atualmente, a detecção destas cepas é reportada em vários países da Europa e Ásia (figura 10) (NORDMANN; NAAS; et al., 2011). Uma característica peculiar desta carbapenemase é a sua fraca hidrólise tanto de carbapenems como de

cefalosporinas, sendo então uma das carbapenemases mais difíceis de serem identificadas fenotipicamente (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).



**Figura 10.** Distribuição geográfica de *Enterobacteriaceae* produtoras de OXA-48 (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

Recentemente, em 2014, o primeiro relato de OXA-48 foi reportado no Brasil, especificamente em Porto Alegre. Cepas produtoras de OXA-48 foram isoladas numa frequência de 3%, ou seja, vinte e uma cepas produtoras de OXA-48 em 701 isolados de ERC. Entre essas, treze eram *Klebsiella* spp., seis *E. cloacae* e um *C. freundii* isoladas em 4 hospitais terciários (PINTO et al., 2014).

A  $\beta$ -lactamase denominada NDM é a mais nova carbapenemase identificada da classe B com genes associados a elementos genéticos móveis. NDM foi identificada em 2008 na Suécia em cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* recuperadas de um paciente indiano, que havia sido, previamente, hospitalizado em Nova Deli, Índia (YONG et al.,

2009). Semelhante às enzimas IMP e VIM, NDM pode hidrolisar todas as penicilinas, cefalosporinas e carbapenens, com exceção do aztreonam (WALSH et al., 2005).

Depois dos primeiros relatos, a carbapenemase NDM-1 passou a ser detectada em muitas espécies, predominantemente *K. pneumoniae* e *E. coli*, como demonstrou uma investigação extensa em países do Reino Unido, na Índia, no Paquistão e em Bangladesh entre os anos de 2008 e 2009. A maioria dos casos identificados no Reino Unido apresentava histórico de viagem para a Índia ou Paquistão, demonstrando que estes países são um importante reservatório de cepas produtoras de NDM (KUMARASAMY et al., 2010).

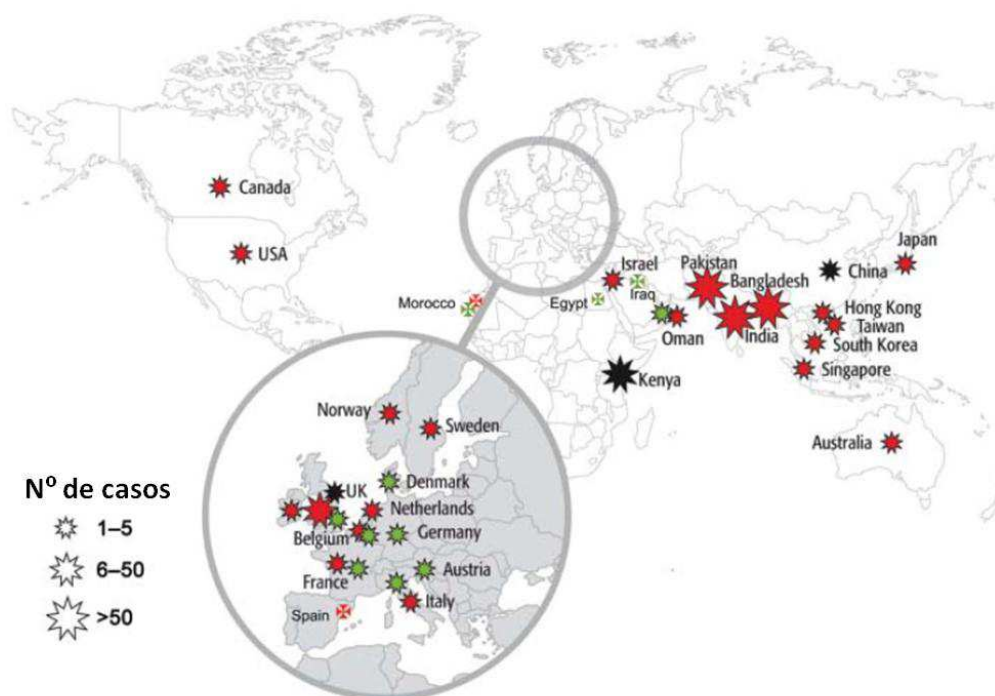
Outro aspecto preocupante foi o isolamento, na França em 2009, de uma cepa de *E. coli* de genótipo ST131 e produtora de NDM recuperada de uma paciente vinda da Índia (POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010). O genótipo ST131 tem sido responsável pela disseminação mundial de outros determinantes de resistência a antibióticos como as  $\beta$ -lactamases do tipo ESBL pertencentes à família CTX-M (COQUE et al., 2008)(POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010). Além do mais, uma vez que a paciente não apresentava histórico de hospitalizações prévias na Índia, a infecção foi caracterizada como infecção comunitária, o que alertou para o fato de que cepas produtoras de NDM poderiam ser prevalentes em ambientes comunitários daquele país (POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010).

Devido a relatos de pacientes colonizados por isolados produtores de NDM após viagens de férias para Índia, em que não tiveram nenhum contato com serviços de saúde naquele país (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2010), investigações foram motivadas com o intuito de esclarecer a prevalência de cepas produtoras de NDM em áreas urbanas de Nova Deli. O trabalho de Walsh e colaboradores demonstrou que cepas produtoras de NDM estão amplamente disseminadas em ambientes comunitários de Nova Deli e que estas foram detectadas tanto em amostras de água coletadas do ambiente como em água de consumo humano, utilizada para beber,



preparação de comida e lavagem de roupas. O gene *bla<sub>NDM</sub>* foi encontrado em várias espécies de enterobactérias e não fermentadores e, inclusive, em importantes patógenos causadores de gastroenterites como *Shigella boydii*, *Vibrio cholerae* e *Aeromonas caviae* (WALSH et al., 2011).

Diferentemente de outros genes de carbapenemase, *bla<sub>NDM</sub>* (gene codificador de NDM) não está associado a um único clone e tem sido detectado em isolados e espécies geneticamente não relacionadas (NORDMANN; POIREL; TOLEMAN; et al., 2011). A dispersão de cepas de enterobactérias produtoras de NDM é a mais recente preocupação mundial em virtude da alta capacidade conjugativa dos plasmídios que portam genes *bla<sub>NDM</sub>* (figura 11). Além disto, estes plasmídios são diversos e frequentemente albergam determinantes genéticos que conferem resistência a várias outras classes de antibióticos. Por tudo isso cepas produtoras de NDM são o foco de atenção mundial (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).



**Figura 11.** Distribuição geográfica de *Enterobacteriaceae* produtoras de NDM. Estrelas vermelhas indicam cepas originadas da Índia, Paquistão ou Bangladesh, estrelas verdes indicam cepas originadas de Balcãs ou no Oriente Médio estrelas pretas indicam origens desconhecidas (NORDMANN; NAAS; et al., 2011).



Recentemente e pela primeira vez, uma cepa de *Providencia rettgeri* produtora de NDM, foi isolada no Brasil de um paciente atendido em hospital no Rio Grande do Sul. Informações sobre histórico de viagem para algum país endêmico para NDM não foi relatado (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Desde então, a ANVISA vem alertando as Coordenações de Controle de Infecção para as medidas de vigilância e de investigação, junto aos profissionais que atuam em serviços de saúde e aos laboratórios, e também destacando a importância da detecção laboratorial precoce, o correto tratamento e a adoção de medidas de prevenção e controle de cepas portadoras de *bla*<sub>NDM</sub>, a fim de evitar a dispersão dessas cepas no Brasil (ANVISA, 2013).

No Distrito Federal (DF), a Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos nos Serviços de Saúde/DIVEP/SVS-DF foi notificada em maio de 2010 por um hospital universitário a respeito de um surto em UTI envolvendo cepas de enterobactérias resistentes a carbapenens (ERC). Em poucos meses surtos foram detectados em vários hospitais, públicos e privados, sendo a maioria identificada em UTIs e associada a cepas de *K. pneumoniae*. De janeiro de 2010 a dezembro de 2011, 1.141 pacientes com cultura positiva para ERC foram detectados em 32 hospitais do DF. Entre estes, 818 pacientes apresentaram colonização assintomática e 323 pacientes tiveram sintomas de infecção, 62 mortes foram atribuídas por infecções causadas por ERC. Em 2010 vários casos de cepas produtoras de KPC foram identificadas no DF, além da carbapenemase do tipo KPC, até o momento, nenhuma outra carbapenemase, entre elas NDM, IMP, VIM ou OXA-48, foi detectada em cepas isoladas em hospitais do DF.

## **2- Justificativa**

Com a crescente dispersão de cepas de ERC e o envolvimento destes agentes em infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), faz-se necessário o conhecimento do perfil de susceptibilidade, da caracterização molecular das espécies isoladas e da possível presença de populações clonais, a fim de melhorar a terapêutica empírica de pacientes oriundos de hospitais com alta prevalência de isolamento destes patógenos e definir os determinantes genéticos envolvidos na resistência aos carbapenens, verificando se os mecanismos de resistência correspondem àqueles globalmente disseminados ou atualmente emergentes.

## **3- Objetivos**

### **3.1- Geral:**

Determinar o perfil de susceptibilidade a antibióticos, bem como os genótipos associados à resistência a carbapenem em cepas de enterobactérias isoladas em hospitais públicos e privados do Distrito Federal.

### **3.2- Específicos:**

- Determinar a composição etária dos pacientes portadores de cepas de ERC;
- Determinar a prevalência de espécies entre as cepas de ERC isoladas em hospitais do Distrito Federal;
- Determinar a distribuição de espécies de ERC em instituições de assistência à saúde analisadas no Distrito Federal;
- Analisar mudanças na frequência de isolamento de espécies de ERC entre os anos de 2011 e 2013;
- Determinar os sítios de infecção frequentemente associados a espécies de ERC;

- Analisar o perfil de susceptibilidade das cepas de ERC e possíveis diferenças nos percentuais de resistência a determinados antibióticos entre as espécies isoladas;
- Determinar a produção *in vitro* de carbapenemases nas espécies de ERC isoladas;
- Determinar a prevalência dos genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub> nas cepas de ERC;
- Avaliar a existência de populações clonais entre as cepas de ERC portando alguns genes *bla* emergentes.

#### **4- Material e métodos**

##### **4.1- Isolados bacterianos**

Foram analisadas cepas de enterobactérias isoladas de pacientes para fins de diagnóstico de infecções ou de vigilância epidemiológica e encaminhadas ao Laboratório de Saúde Pública do Distrito Federal (LACEN-DF) para a confirmação da resistência aos carbapenens por 30 instituições de assistência à saúde, incluindo laboratórios de análises clínicas, hospitais públicos e privados do Distrito Federal, no período de janeiro de 2011 a dezembro de 2013. Para este estudo um total de 573 cepas apresentando CIM maior ou igual a 2 mg/mL para pelo menos um dos carbapenens testados (ertapenem, imipenem ou meropenem) foram analisadas. Adicionalmente a esta coleção, duas cepas de ERC positivas para *bla*<sub>NDM</sub> e isoladas no início de 2014 em dois hospitais de Brasília foram incluídas nos ensaios de amplificação randômica para determinação de padrões de DNA polimórfico e vínculo genético.

As cepas foram cultivadas em ágar Mueller Hinton, meio não seletivo/diferencial, e incubadas por 18 a 24 horas em estufa a 36±1 °C. As espécies bacterianas foram identificadas usando-se o sistema automatizado de identificação

MicroscanWalkAway, (*Siemens Healthcare*) conforme instruções do fabricante. Os isolados que apresentaram probabilidade  $\leq 80\%$  para identificação presuntiva de espécie foram reanalisados. Testes bioquímicos padronizados também foram utilizados para confirmar a identificação da espécie bacteriana. Para preservação das cepas bacterianas, os isolados foram preservados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Para o controle de qualidade dos painéis de identificação bacteriana, foram utilizadas as cepas de *E. coli* ATCC (*American Type Culture Collection*) 25922 e de *P. aeruginosa* ATCC 27583 a cada novo lote ou aquisição do produto.

Esta pesquisa foi dispensada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Secretaria de Estado de Saúde do Distrito Federal (CEP/SES-DF) por não envolver seres humanos.

#### **4.2- Teste de suscetibilidade a antimicrobianos.**

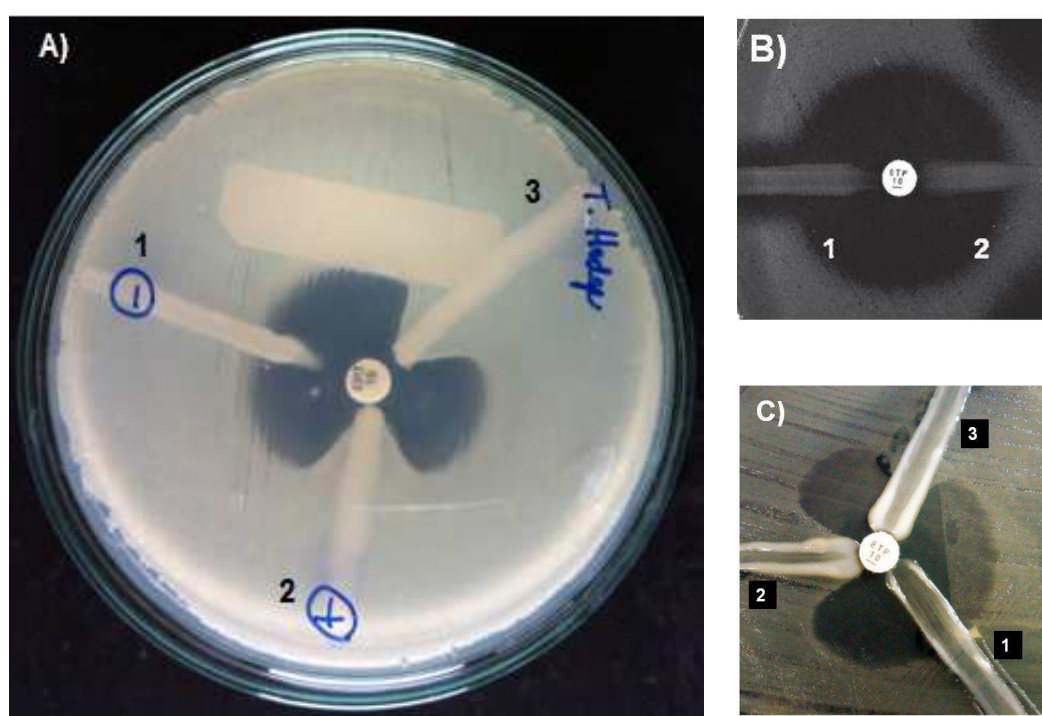
Junto com os procedimentos para identificação bacteriana foram realizados os procedimentos para determinar o perfil de susceptibilidade frente aos antimicrobianos utilizando o sistema automatizado MicroscanWalkAway (*Siemens Healthcare*). Os resultados da CIM foram interpretados como sensível, intermediário ou resistente baseados nos pontos de corte do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) documento M100-S23 (2013, vol. 31, nº 1). As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27583 foram utilizadas para o controle de qualidade dos ensaios automatizados de susceptibilidade a cada novo lote ou aquisição do produto.

#### **4.3- Teste de Hodge modificado.**

O teste de Hodge modificado (THM) foi realizado seguindo o documento normativo M100-S23 CLSI. Foi preparada uma suspensão da cepa de *E. coli* ATCC 25923 (cepa indicadora da produção de carbapenemase) em solução salina com a turbidez ajustada para a escala 0,5 de McFarland e posteriormente diluída em solução salina (1:10). Utilizando uma zaragatoa inoculou-se a diluição na superfície de ágar

Mueller-Hinton e após 10 minutos um disco de ertapenem (10 µg) foi posicionado no centro da placa. Com um zaragatoa, coletou-se 3 a 5 colônias da cepa teste, ou da cepa controle, crescidas em ágar sangue, e inoculou-se em linha reta da borda do disco para a periferia da placa.

Para o controle negativo do THM foi utilizado a cepa de *K. pneumoniae* ATCC700603 e para o controle positivo *K. pneumoniae* IOC 4955 (cepa da coleção Instituto Adolf Lutz produtora de KPC). O teste foi considerado positivo quando observada uma invasão considerável da *E. coli* ATCC 25923 no halo. O teste negativo é caracterizado pela não invasão da cepa indicadora, ou ainda é considerado indeterminado quando houve uma fraca invasão do halo ou lise da cepa indicadora pela cepa teste. Os exemplos de leitura do THM podem ser visualizados na figura 12.



**Figura 12.** Demonstração de leitura do THM. (A) isolado 1, *K. pneumoniae* ATCC700603 (controle negativo para a produção de carbapenemase); isolado 2, *K. pneumoniae* IOC4955 (controle positivo para a produção de carbapenemase); e isolado 3 isolada em teste (apresentando teste positivo). (B) isolado 1, Teste indeterminado pois houve lise da cepa indicadora (*E. coli* ATCC25923). (C) Isolado 3, Teste indeterminado pois houve fraca invasão do halo pela indicadora.

#### 4.4- Testes fenotípicos para a discriminação da carbapenemases.

Embora carbapenemases compartilhem a capacidade de hidrolisar carbapenens, elas apresentam diferenças quanto ao perfil de hidrólise frente a outros  $\beta$ -lactâmicos e quanto ao perfil de inibição da hidrólise frente a inibidores de  $\beta$ -lactamases, tais como o ácido clavulânico e o ácido etileno diamino tetra-acético (EDTA) (Tabela 4) (QUEENAN; BUSH, 2007; MIRIAGOU et al., 2010; NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

**Tabela 4.** Perfil de hidrólise e de inibição das carbapenemases.

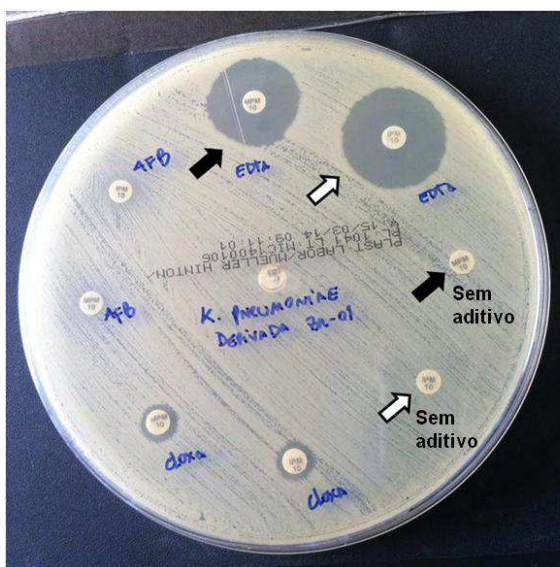
Classe molecular	Grupo funcional	Enzima	Perfil de hidrólise			Perfil de inibição	
			Cloxacilina	Aztreonam	Carbapenem	EDTA	Ác. clav.
A	2f	KPC	+	+	+	-	+
		IMP	+	-	+	+	-
B1	3	VIM	+	-	+	+	-
		NDM	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	-	±	-	±

Abreviações: EDTA, ácido etilendiamino tetra-acético; Ác. clav., Ácido clavulânico. (QUEENAN; BUSH, 2007; GISKE et al., 2011; NORDMANN; POIREL; WALSH; et al., 2011)

Para a triagem de cepas produtoras de metalo- $\beta$ -lactamases (IMP, VIM e NDM) utilizou-se o teste de bloqueio enzimático com EDTA que se baseia na inibição da hidrólise na presença de EDTA. O teste de bloqueio enzimático com EDTA foi realizado seguindo o proposto por Giske et al. 2011. Resumidamente, realizou-se uma suspensão bacteriana em solução salina ajustada para o valor de 0,5 da escala de McFarland da cepa teste e, posteriormente, espalhou-se a suspensão de forma homogênea em placa de ágar Mueller-Hinton de 15 x 150 mm. Os discos de imipenem e meropenem, adsorvidos ou não com EDTA (10  $\mu$ L de uma solução de EDTA 0,1 M), foram colocados na placa que foi incubada por 18 a 24 horas a  $36 \pm 1$  °C. Para

controle positivo nos ensaios de caracterização de metalo- $\beta$ -lactamases utilizou-se a cepa *Enterobacter cloacae* CCBH10892 (cepa produtora de NDM).

Esse teste é positivo quando visualizado uma sinergia entre o EDTA e o imipenem e meropenem (diferença de  $\geq 5$ mm nos halos dos discos de imipenem e/ou meropenem adicionado com EDTA e os disco de imipenem e meropenem sem a adição de EDTA), figura 13 (GISKE et al., 2011).



**Figura 13.** Demonstração do teste de bloqueio enzimático com EDTA. Nítida diferença ( $\geq 5$  mm) entre os halos de inibição formados pelos discos de meropenem com e sem EDTA (setas preenchidas) e de imipenem com e sem EDTA (setas vazias).

#### 4.5- Detecção molecular de genes *bla* por meio da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction* - PCR).

Um total de 205 cepas de ERC foram selecionadas para a pesquisa dos genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>. As cepas de *K. pneumoniae* foram selecionadas seguindo a ordem de isolamento por semestre sendo escolhida uma cepa a cada duas da sequencia temporal. Foram selecionadas cepas isoladas tanto de amostras clínicas como de vigilância. Da mesma forma foram selecionadas as cepas das outras espécies, porém realizando o intervalo de apenas um isolado a cada cepa escolhida.

Para extração do DNA, 1 mL de cultura bacteriana (amostra cultivada em meio Luria-Bertani, LB, por 18 a 24 horas) foi centrifugado a 3.000 g por 3 minutos, o sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 500  $\mu$ L de água

deionizada, e em seguida, a amostra foi novamente centrifugada (3.000 g/3 min.) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuspensão em 500 µL de água deionizada e essa suspensão foi colocada em banho-maria a 100 °C por 15 minutos e, em seguida, centrifugou-a (4.600 g/2 min.). O sobrenadante foi utilizado como fonte de DNA total para as reações de amplificação.

Para o procedimento de PCR e conseqüentemente a detecção dos genes listados na tabela 5, foi utilizado o seguinte protocolo. O volume total de cada reação de PCR foi 30 µl (23 µL do mix e 7 µL de DNA), contendo 0,5 µM de cada iniciador, 0,2 mM de desoxinucleotídeos trifosfatos (dNTP), 1,5 mM cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) e 1 U de Taq DNA polimerase em tampão de reação 1X fornecido pelo Instituto Ludwig Biotec. As reações foram submetidas a seguinte programação de ciclos de temperatura: 1 minuto a 94 °C, seguido por 30 ciclos compostos pelos passos de desnaturação a 92 °C por 1 minuto, de anelamento por 1 minuto com temperatura específica de cada iniciador (conforme citado na tabela 6) e de extensão a 72 °C por 1 min. Por fim, a reação de PCR foi encerrada por um ciclo de extensão final a 72 °C por 2 minutos.

Após a amplificação dos produtos, foi realizada eletroforese em gel de agarose a 1%, preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1 X, seguido da coloração do gel em solução de brometo de etídio [10 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100mL de água] e os fragmentos amplificados (*amplicons*) foram observados pela transiluminação de luz ultravioleta (UV). Em reações sem qualquer amplificação inespecífica, a visualização de um *amplicon* de tamanho esperado, conforme descrito na tabela 6, foi determinado como resultado positivo para a presença do gene pesquisado.



**Tabela 5.** Lista de iniciadores utilizados, alelos genéticos detectados e condições de reação.

Iniciadores	Sequência	Tamanho do amplicon (pb)	Alelos detectáveis	Temperatura de Anelamento	Controles positivos
KPC F	5' TGTCAGTGTATCGCCGTC	1011	<i>bla</i> <sub>KPC</sub> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13	55 °C	<i>K. pneumoniae</i> IOC4955
KPC R	5' CTCAGTGTCTACAGAAAACC				
NDM F	5' GGTTTGGCGATCTGGTTTTTC	512	<i>bla</i> <sub>NDM</sub> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8.	59 °C	<i>E. cloacae</i> CCBH10892
NDM R	5' GGCCTTGCTGTCCTTGATC				
OXA F	5' GCGTGGTTAAGGATGAACAC	440	<i>bla</i> <sub>OXA</sub> -48, 54, 181, 162, 163, 199	58 °C	<i>K. pneumoniae</i> CCBH9976
OXA R1	5' ATCATCAAGTTCAACCCAACC				
VIM F	5' GATGGTGTGGTTCGCATATC	332	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> -1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 23, 24, 25, 27, 28, 31, 33, 34.	55 °C	<i>P. aeruginosa</i> CCBH11808
VIM R2	5' CTCGATGAGAGTCCTTCTAGAG				
IMP F1	5'CATTTCATAGCGACAGCAC	309	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> -2, 5, 8, 13,19, 20, 24, 33, 37	59 °C	<i>K. pneumonia</i> BR01
IMP F2	5'AACACGGTTTGGTGGTTCTT	440	<i>bla</i> <sub>IMP</sub> -1, 2, 8, 14, 14a, 19, 20, 24		
IMP R	5'GGACTTTGGCCAAGCTTCTA				

#### 4.6- Sequenciamento genético.

O sequenciamento do gene *bla*<sub>NDM</sub> foi realizado com os iniciadores NDM-F e NDM-R usando o kit BigDye terminator cycle sequencing v3.1 (Applied Biosystems) pre-amplificado em termociclador. O mix de reação de sequenciamento foi purificado com etanol e, posteriormente, analisado com ABI 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems®). Os dois produtos de PCR independentes foram sequenciadas. As sequencias de DNA foram identificadas pelo programa BLAST do site *National Center for Biotechnology Information* - NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>).

#### 4.7- Perfil plasmidial.

Para determinar o perfil plasmidial empregou-se o procedimento descrito por Eckhardt T. 1978 que é baseado na liberação de moléculas intactas de DNA plasmidial em decorrência da lise branda das células bacterianas executada diretamente em poços de gel de agarose. Resumidamente, 500 µL de cultura bacteriana incubada por 18 h a 37 °C foi centrifugada a 3.000 g por 3 min e o sedimento bacteriano

resuspenso em 20 µL de tampão de amostra (0,025M base Trizma<sup>®</sup>, 25% sacarose, 0,250M EDTA, 7% Ficoll 400 em solução aquosa com pH ajustado para 8,0). Então, 20 µL de tampão de lise (750 U/mL de lisozima e 0,3 U/mL de ribonuclease A em tampão de amostra) foi adicionado à suspensão bacteriana, homogeneizado e imediatamente aplicado (20 µL) em poços de gel de agarose [0,85% de agarose, 0,5% de dodecil sulfato de sódio -SDS- em tampão borato [0,089 M de base Trizma<sup>®</sup> (Triz-2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol), 0,089 M de ácido bórico, 0,0025 M de EDTA em solução aquosa com pH ajustado para 8,4]. Após uma hora de espera em temperatura ambiente, a eletroforese foi iniciada e mantida por 18 h e ajustada para os seguintes parâmetros: 90 V, 300 mA. Ao final da eletroforese, o gel foi corado em banho de brometo de etídio [10 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100mL de água] e visualizado por transiluminação em luz ultravioleta.

#### **4.8- Padrão de fragmentos polimórficos de DNA amplificados randomicamente (*Random Amplified Polymorphic DNA - RAPD*).**

Para avaliar a presença de populações clonais entre as cepas de ERC foi utilizado ensaios de RAPD para determinar padrões de DNA polimórficos utilizando o iniciador OPA 2 (5'-TGCCGAGCTG-3') (Operon Biotechnology, Inc., Alameda, CA). O DNA das cepas selecionadas foram novamente extraídos conforme o **item 4.5**. O volume total de cada reação de PCR foi de 30 µL (23 µL do mix e 7 µL de DNA), contendo 0,8 µM do iniciador, 0,2 mM de dNTP, 2,25 mM de MgCl<sub>2</sub> e 5 U de Taq DNA polimerase (Taq Platinum<sup>®</sup>) em tampão de reação 1X fornecido pelo fabricante Invitrogen.

As reações foram submetidas a seguinte programação de ciclos de temperatura: 2 minutos a 94°C, seguido por 30 ciclos compostos pelos passos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, de anelamento por 1 minuto a 25°C e de extensão a 72°C por 2 min. Por fim, A reação de PCR foi encerrada por com ciclo de extensão final a 72 ° C por 2 minutos.

Após a reação de amplificação, os fragmentos polimórficos de DNA foram separados por meio de eletroforese em gel de agarose a 2%, preparado em tampão TAE (Tris-acetato-EDTA) 1 X, seguido da coloração do gel em solução de brometo de etídio [10 µL de brometo de etídio (10 mg/mL) em 100mL de água], e observação dos fragmentos amplificados (*amplicons*) pela transiluminação de luz ultravioleta (UV).

#### **4.9- Análise do perfil de RAPD.**

Os padrões polimórficos de DNA amplificados nos ensaios de RAPD foram convertidos em sequências binárias com o algarismo “1” indicando a presença de banda e o “0” indicando a ausência. Diferenças na intensidade das bandas amplificadas não foram consideradas. Para a análise e construção dos dendogramas a matriz binária foi convertida em matriz de distância utilizando programa RESTDIST para separar as amostras pela semelhança dos padrões de fragmentos. A matriz de distância gerada foi utilizada para a construção de dendogramas utilizando o programa de agrupamento KITSCH (método Fitsh-Margoliash). Os programas utilizados fazem parte do pacote de programas PHYLIP, versão 3.69, disponível em <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/getme.html>. Dendogramas foram construídos no programa TreeView.

#### **4.10- Análise estatística.**

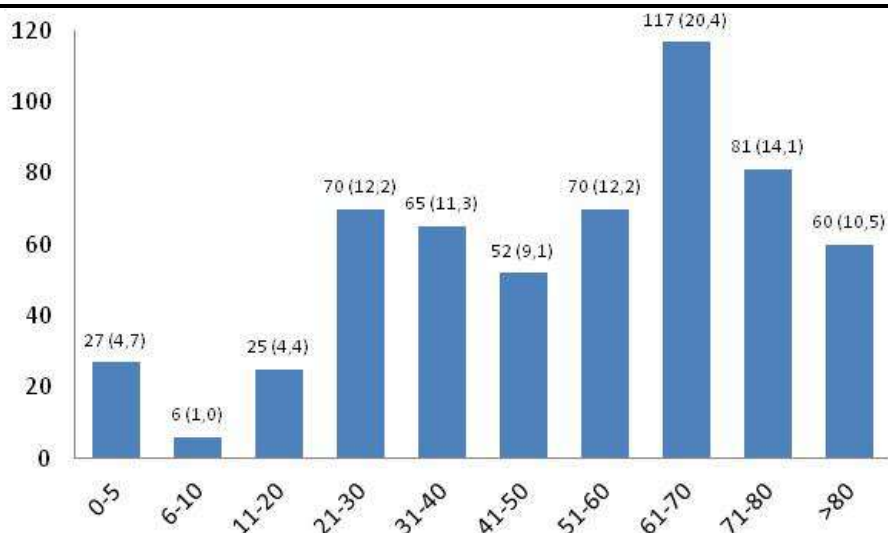
Os resultados foram analisados utilizando o teste exato de Fisher. Para definição de diferenças estatisticamente significantes foi adotado um valor de  $p < 0,05$ .

## 5- Resultados e Discussão

### 5.1- Composição etária dos pacientes colonizados por cepas de ERC.

Infecções nosocomiais tipicamente afetam pacientes com idade situada nos extremos de faixa etária, em virtude da imaturidade imunológica e situações envolvendo fragilidade no *status* geral de saúde ou imuno-incompetência, doença de base, tratamentos médicos ou cirúrgicos. (WEINSTEIN, 1998) A idade avançada, entre outros, é fator de risco para a ocorrência de infecções por cepas de ERC, e está associada com o aumento da taxa de mortalidade em pacientes infectados (GUPTA et al., 2011).

Neste estudo, a maioria das cepas de ERC isoladas (57,2%, 388/573) foi recuperada de pacientes com idade superior a 51 anos (Figura 14). Neste grupo de pacientes, o isolamento de cepas de ERC concentrou-se na faixa etária de 61 a 70 anos respondendo por 20,4% (117/573) do total dos casos. No grupo de 0 a 5 anos, 62,9% dos isolados foram isolados de neonatos ( $\leq 0$  anos). A incidência de ERC em UTI neonatal e infantil vem aumentando ao longo dos anos [em países em desenvolvimento as taxas de infecção chega a ser 3 a 20 vezes maior (ZAIDI et al.)] e esse fato é preocupante pois ERC está associado à alta frequência de mortalidade e morbidade em UTI neonatal. A imaturidade do sistema imune em neonatos, principalmente em prematuros, predispõe estes a infecções nosocomiais e dificuldade em se obter um clearance microbiológico, isso devido poucas ou nenhuma opção terapêutica para combater ERC, pode levá-los morte (ZAIDI et al.; SALEEM et al., 2013).



**Figura 14.** Frequência de isolamento de ERC por faixa etária (%).

## 5.2- Composição de espécies na coleção de cepas de ERC analisada.

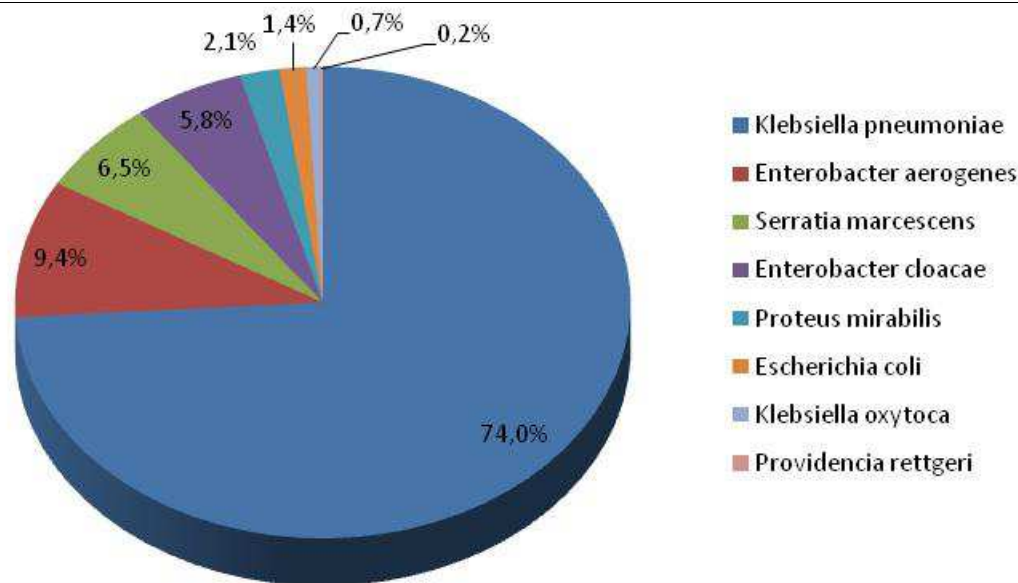
Entre as cepas de ERC reportadas ao LACEN, *K. pneumoniae* foi a espécie com maior frequência de isolamento (74,0%), totalizando 424 cepas. As espécies do gênero *Enterobacter* responderam por 15,2% dos isolados de ERC, sendo em sua maioria da espécie *E. aerogenes* com 54 cepas reportadas (figura 15). Entre as cepas de ERC, *K. pneumoniae* é a espécie mais frequentemente isolada seguida por *Enterobacter* spp.. Estas duas bactérias estão envolvidas na dispersão das cinco mais prevalentes carbapenemase, KPC, VIM, IMP, NDM e OXA-48, no mundo (NORDMANN; NAAS; et al., 2011; DORTET et al., 2014).

As espécies *E. coli* e *K. oxytoca* somaram apenas 2,1% dos isolados de ERC. O isolamento de *E. coli* resistentes aos carbapenens é preocupante devido a essa bactéria ser o um importante patógeno comunitário, principalmente em ITU, e a disseminação dessas cepas na comunidade tem ocorrido (POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010; NORDMANN; POIREL; WALSH; et al., 2011; DORTET et al., 2014).

É importante frisar que isolados de espécies intrinsecamente resistentes à polimixina (*S. marcescens*, *P. mirabilis* e *P. rettgeri*) responderam por 8,8% dos

isolados de ERC, totalizando 50 cepas recuperadas de 45 pacientes. A emergência das cepas de ERC tem impulsionado a retomada do uso de polimixina, antibiótico que teve o uso abandonado há 50 anos em virtude da nefrotoxicidade e neurotoxicidade apresentadas (ZAVASCKI et al., 2007; GUPTA et al., 2009). Atualmente, polimixinas figuram como um dos últimos recursos para tratamento de infecções provocadas por bacilos Gram negativos multirresistentes incluindo cepas de ERC (BALAJI et al.; ZAVASCKI et al., 2007; HIRSCH; TAM, 2010).

Em 2011, Kontopidou e colaboradores analisaram 445 isolados de Gram negativos de 150 pacientes dos quais 51 (34%) estavam colonizados por espécies intrinsecamente resistentes à polimixina. Nesse estudo, o principal fator de risco para colonização/infecção por espécies intrinsecamente resistentes à polimixina foi o tratamento com polimixina B, colistina (KONTOPIDOU et al., 2011).



**Figura 15.** Composição de espécies da coleção de cepas de ERC (n = 573) isoladas em hospitais do Distrito Federal.

### 5.3- Distribuição de espécies de ERC em unidades de atendimento à saúde no Distrito Federal.

Desde a detecção inicial da enzima KPC em 2001 nos EUA, estudos epidemiológicos têm comprovado o protagonismo da espécie *K. pneumoniae* na

dispersão intra- e inter-hospitalar, bem como na dispersão mundial, da resistência a carbapenens (YIGIT et al., 2001; KITCHEL et al., 2009; NORDMANN; NAAS; et al., 2011).

Inicialmente, a distribuição dos isolados por instituição de assistência à saúde (tabela 6) mostrou que das cepas de ERC encaminhadas ao LACEN-DF, 58,6% (336 isolados) foram reportadas por apenas dois hospitais (A e B do Plano piloto) do Distrito Federal. Esses dois hospitais são categorizados, de acordo com o ministério da saúde, como hospitais de alta complexidade (terciários).

Cepas de ERC da espécie *K. pneumoniae* foram reportadas por todos os hospitais analisados do Distrito Federal, com exceção do hospital AB-Sudoeste. Embora *K. pneumoniae* tenha sido a espécie mais frequentemente isolada na maioria dos hospitais, algumas instituições mostraram um perfil, claramente, diferente no isolamento de cepas de ERC. No hospital E-Plano piloto a espécie mais prevalente foi *E. aerogenes* que respondeu por 51,6% dos isolados de ERC reportados por aquela instituição.

Diante da emergência da resistência aos carbapenens, o uso de velhos antibióticos como polimixina tem sido retomado na prática clínica para controle de infecções provocadas por cepas de ERC (ZAVASCKI et al., 2007). Neste cenário, a polimixina tem sido utilizada como droga de última opção terapêutica. Contudo, a demanda crescente por este antibiótico tem suscitado preocupações quanto à seleção de cepas expressando mecanismos de resistência adaptativos ou de espécies intrinsecamente resistentes à polimixina (KONTOPIDOU et al., 2011).

Em consonância com os resultados obtidos, estudos sugerem que a demanda universal e crescente por polimixina tem ocasionado a seleção e o aumento no isolamento de cepas de enterobactérias intrinsecamente resistentes a esses

antimicrobianos tais como, *Proteus*, *Serratia*, *Morganella* e *Providencia* (KONTOPIDOU et al., 2011).

O isolamento de cepas de ERC intrinsecamente resistentes a polimixina (*S. marcescens*, *P. mirabilis* e *P. rettgeri*) foi reportado por sete das 19 instituições consideradas neste estudo. Em relação a *S. marcescens*, 78,3% (29/37) dos isolados concentraram-se em dois hospitais (A e B do Plano piloto). No entanto, a proporção de casos associados a *S. marcescens* reportados pelo hospital B-Plano piloto (15/113) foi estatisticamente maior quando comparada com a distribuição no hospital A-Plano piloto (14/223) ( $p < 0,05$ ), tabela 6.



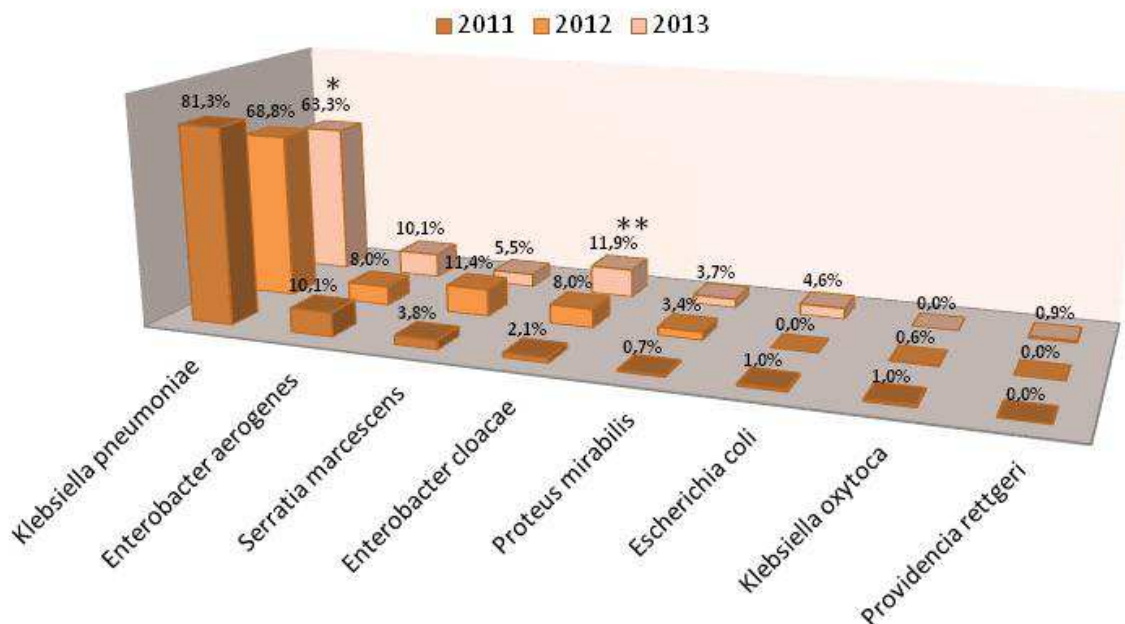
**Tabela 6.** Distribuição dos isolados de ERC reportados ao LACEN por instituições de saúde do Distrito Federal entre os anos de 2011 a 2013.

INSTITUIÇÃO	Número de isolados por espécie (% ocorrência de isolamento por Instituição)								TOTAL
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Serratia marcescens</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella oxytoca</i>	<i>Providencia rettgeri</i>	
A-Plano piloto	184	10	14	3	8	1	3	0	<b>223</b>
B-Plano piloto	82	0	15	14	0	1	1	0	<b>113</b>
C-Plano piloto	31	8	0	1	0	1	0	0	<b>41</b>
D-Cruzeiro	24	4	0	4	1	1	0	0	<b>34</b>
E-Plano piloto	10	16	0	4	0	1	0	0	<b>31</b>
F-Santa Maria	21	6	0	1	1	1	0	0	<b>30</b>
G-Taguatinga	11	0	2	3	0	0	0	0	<b>16</b>
H-Plano piloto	9	0	0	2	1	1	0	0	<b>13</b>
I-Samambaia	11	0	0	1	0	0	0	0	<b>12</b>
J-Ceilândia	4	0	4	0	0	0	0	0	<b>8</b>
K-Plano piloto	7	0	0	0	0	0	0	0	<b>7</b>
L-Lago Sul	1	6	0	0	0	0	0	0	<b>7</b>
M-Lago Sul	2	3	0	0	0	0	0	0	<b>5</b>
N-Brazlândia	4	0	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
O-Planaltina	3	0	0	0	0	1	0	0	<b>4</b>
P-Guara	4	0	0	0	0	0	0	0	<b>4</b>
Q-Plano piloto	1	0	1	0	1	0	0	1	<b>4</b>
R-Sobradinho	3	0	0	0	0	0	0	0	<b>3</b>
S-Plano piloto	1	0	1	0	0	0	0	0	<b>2</b>
T-Cruzeiro	2	0	0	0	0	0	0	0	<b>2</b>
Outras (10), somente 01 caso reportado.	9	1	0	0	0	0	0	0	<b>10</b>
<b>TOTAL</b>	<b>424</b>	<b>54</b>	<b>37</b>	<b>33</b>	<b>12</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>1</b>	<b>573</b>

#### 5.4- Evolução temporal na frequência de isolamento de espécies de ERC ao longo dos anos de 2011 e 2013.

A distribuição percentual das cepas de ERC demonstrou tendências de aumento, bem como de declínio, na frequência de isolamento de algumas espécies ao longo dos anos analisados. Com relação a *K. pneumoniae*, houve um declínio significativo ( $p = 0,0002$ ) na frequência de isolamento quando comparando os três anos do estudo (81,3% em 2011; 68,8% em 2012; e 63,3% em 2013). De forma contrária, um aumento significativo ( $p = 0,00001$ ) na frequência de isolamento foi detectado para a espécie *E. cloacae* (2,1% em 2011; 8,0% em 2012; e 11,9% em 2013). Para as demais espécies isoladas não houve qualquer variação significativa na frequência de isolamento ao longo dos anos analisados (figura 16).

No Reino Unido, a introdução e dispersão do gene *bla<sub>KPC</sub>*, carregado por plasmídios, proporcionou uma mudança abrupta do padrão etiológico das infecções por enterobactérias, alterando a frequência de isolamento de *K. pneumoniae* e várias outras espécies, entre elas *E. coli* e *Enterobacter* spp., que agora são detectadas causando surtos associados à cepas produtoras de KPC (MUNOZ-PRICE et al., 2013).



**Figura 16.** Frequência de isolamento de espécies de ERC entre os anos de 2011 a 2013. \* $p = 0,0002$ ; \*\* $p = 0,00001$ .

### 5.5- Associação estatística de espécies de ERC com determinados sítios de infecção.

Cepas de ERC foram isoladas de uma variedade de amostras biológicas com algumas espécies sendo estatisticamente associadas a diferentes amostras clínicas. O isolamento de *K. pneumoniae* foi estatisticamente associado ( $p = 0,0003$ ) a amostras de urina, com 23,6% dos isolados recuperados deste tipo de amostra clínica. Os isolados do gênero *Enterobacter* foram recuperados com uma frequência maior (28,7%) de amostras de corrente sanguínea quando comparada com a frequência de isolamento nas outras amostras clínicas analisadas ( $p = 0,0171$ ). Entre as espécies de ERC intrinsecamente resistentes à polimixina, a espécie *S. marcescens* foi estatisticamente associada a casos de bacteremia ( $p = 0,0007$ ). Das cepas isoladas *S. marcescens*, 56,7% (21/37) foram recuperadas de amostras de sangue (10/37 isolados) ou de catéter venoso central (11/37 isolados), tabela 7.

**Tabela 7.** Distribuição de espécies de ERC por sítios de isolamento.

Espécie (nº de isolados)		Amostras					
		Urina	Sangue	Trato respiratório	Cateter	Líquidos estéreis	Outros
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (424)	n	100	72	55	41	16	140
	(p)	(0,0003)					
	%	23,6%	17,0%	13,0%	9,7%	3,8%	33,0%
<i>Enterobacter aerogenes</i> (54)	n	6	14	13	8	1	12
	(p)		(0,0171)				
	%	11,1%	25,9%	24,1%	14,8%	1,9%	22,2%
<i>Serratia marcescens</i> (37)	n	1	10	5	11	1	9
	(p)		(0,0007)		(0,0007)		
	%	2,7%	27,0%	13,5%	29,7%	2,7%	24,3%
<i>Enterobacter cloacae</i> (33)	n	4	11	6	2	0	10
	(p)		(0,0171)				
	%	12,1%	33,3%	18,2%	6,1%	0,0%	30,3%
<i>Proteus mirabilis</i> (12)	n	1	0	1	4	3	3
	(p)				(0,0390)		
	%	8,3%	0,0%	8,3%	33,3%	25,0%	25,0%
Outras (13)	n	3	2	1	0	0	7
Total (573)	n	115	109	81	66	21	181
	%	20,1%	19,0%	14,1%	11,5%	3,7%	31,6%

### 5.6- Perfil de susceptibilidade das cepas de ERC.

Em geral as cepas de ERC apresentaram alta frequência de resistência aos 15 tipos de  $\beta$ -lactâmicos testados (tabela 8). A frequência de resistência foi superior a 90% diante de todas as penicilinas (ampicilina, ampicilina/sulbactam, piperacilina e piperacilina/tazobactam); monobactam; e cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações, com exceção da ceftazidima para a qual 75% das cepas de ERC testadas apresentaram resistência. Em relação à cefepime, uma cefalosporina de 4<sup>a</sup> geração, a frequência de resistência foi de 85%. Dentre os  $\beta$ -lactâmicos testados, a menor frequência de resistência foi detectada para o antibiótico cefotetan, uma cefamicina. Diante deste antibiótico, 54% das cepas de ERC mostraram resistência. Com relação aos

carbapenens testados (ertapenem, imipenem e meropenem), a frequência de resistência a imipenem foi a menor, sendo detectada em 87% das cepas de ERC.

Em virtude da resistência mediada por carbapenemases, os aminoglicosídeos têm sido empregados, geralmente combinados a outros antibióticos, como uma das alternativas empíricas para o tratamento de infecções por ERC (HIRSCH; TAM, 2010; LEE; BURGESS, 2012). Assim, quando a susceptibilidade a aminoglicosídeos é identificada, estes antibióticos figuram como importantes opções terapêuticas para controle das infecções associadas a cepas de ERC, principalmente quando se trata de infecção urinária (SATLIN et al., 2011). No entanto, estudos epidemiológicos mostram que as cepas de ERC frequentemente apresentam resistência aos aminoglicosídeos, uma vez que plasmídios portando genes *bla* usualmente também carregam determinantes genéticos para a expressão de enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (LIVERMORE et al., 2011; HUANG et al., 2012). Diante dos aminoglicosídeos, a frequência de resistência entre as cepas de ERC variou significativamente em virtude do antibiótico testado. Para tobramicina e gentamicina a resistência foi detectada em 60% e 42% das cepas de ERC, respectivamente. Em contrapartida, a resistência a amicacina foi detectada em apenas 8% das cepas. A baixa frequência de resistência à amicacina é provavelmente devido ao efeito refratário desse antimicrobiano frente as enzimas inativadoras de aminoglicosídeos, que são comuns em enterobactérias (PRICE et al., 1976; LIVERMORE et al., 2001; SARNO et al., 2003).

É importante ressaltar o considerável número de cepas resistentes a tigeciclina, um antibiótico representante da mais nova subclasse de tetraciclinas (glicilciclinas) e que foi desenvolvido para persistir ao principal mecanismo de resistência a tetraciclinas e expresso por enterobactérias: a bomba de efluxo TET (LIVERMORE, 2005; GREER, 2006). A resistência a tigeciclina foi detectada em 15%, ou seja, em 85 das cepas de ERC avaliadas neste estudo.

Uma vez que espécies de enterobactérias apresentam diferentes padrões de resistência em virtude da propensão para acumular elementos genéticos móveis, além da existência de diferentes mecanismos intrínsecos de resistência espécie-específicos (CARATTOLI, 2009; LECLERCQ et al., 2013), a análise de susceptibilidade foi realizada por espécies para os grupos nos quais a amostragem permitia análise estatística. Todas as espécies apresentaram uma alta frequência de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos que foi detectada acima de 73% para as classes das penicilinas, cefalosporinas e cefotetan com algumas significativas exceções. As cepas de *P. mirabilis* apresentaram uma baixa frequência de resistência para ceftazidima (25%), quando comparado aos demais isolados de ERC ( $p = 0,0004$ ). As espécies de *K. pneumoniae* e *S. marcescens* tiveram uma frequência de resistência ao cefotetan menor (50% e 41% respectivamente) do que aquela apresentada pelas espécies do gênero *Enterobacter* (*E. aerogenes*, 74% e *E. cloacae* 94%) ( $p < 0,05$ ).

A resistência a amicacina, comumente utilizada em terapias combinadas com a polimixina para controle de infecções por ERC, foi detectada em baixa frequência na espécie *K. pneumoniae* (com 4% dos isolados resistentes) e no gênero *Enterobacter* (com 13% dos isolados resistentes em *E. aerogenes* e 18% em *E. cloacae*). Em contrapartida, as espécies de *S. marcescens* e *P. mirabilis* apresentaram frequência de resistência a amicacina significativamente superior àquela detectada na população formada pelos demais isolados de ERC (30% vs. 6% com  $p < 0,0001$ ; e 33% vs. 6% com  $p = 0,0042$ , respectivamente).

Curiosamente, na espécie *P. mirabilis* a frequência de resistência a tobramicina, o antibiótico da classe dos aminoglicosídeos mais susceptível a inativação por enzimas modificadoras, foi significativamente menor (8%;  $p < 0,01$ ) quando comparada com a frequência de resistência nas espécies *K. pneumoniae* (67%), *S. marcescens* (54%) e *E. cloacae* (70%). Além do mais, quando comparada às demais espécies de ERC isoladas, as cepas de *P. mirabilis* notadamente

apresentaram baixa frequência de resistência a outras classes de antibióticos analisadas, como para fluoroquinolonas (8%), ciprofloxacina (25%) e sulfametaxazol/trimetroprima (8%) ( $p < 0,01$ ).

Além da elevada resistência à tetraciclina (59%), *K. pneumoniae* obteve a maior frequência de resistência a tigeciclina (17%). A resistência a tigeciclina em cepas de *K. pneumoniae* tem sido frequentemente reportada. Em alguns países da Europa a resistência atinge até 50% das cepas de *K. pneumoniae*, enquanto que no continente americano, a frequência de cepas resistentes a tigeciclina não alcança 10% (WOODFORD et al., 2007; GARCÍA C et al., 2009; SUN et al., 2013). A espécie *E. aerogenes* apresentou baixa frequência de resistência para tetraciclina (2%) quando comparada com as demais espécies isoladas ( $p < 0,0001$ ).

**Tabela 8.** Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos geral e individual por espécie.

Antimicrobianos	Geral (n)				Espécie (n)				
	ERC (573)				<i>Klebsiella pneumoniae</i> (424)	<i>Enterobacter aerogenes</i> (54)	<i>Serratia marcescens</i> (37)	<i>Enterobacter cloacae</i> (33)	<i>Proteus mirabilis</i> (12)
	S	I	R	% R	% R	% R	% R	% R	% R
Tobramicina	170	57	346	60%	67%	19%	54%	70%	8% <sup>b</sup>
Gentamicina	317	16	240	42%	42%	20%	41%	61%	67%
Amicacina	396	133	44	8%	4%	13%	30% <sup>a</sup>	18%	33% <sup>c</sup>
Ampicilina	2	0	571	100%	100%	100%	100%	100%	83%
Ampicilina/Sulbactam	2	3	568	99%	100%	100%	92%	100%	83%
Piperacilina	4	3	566	99%	100%	100%	89%	100%	83%
Piperacilina/Tazobactam	10	40	523	91%	92%	100%	73%	97%	75%
Cefalotina	2	0	571	100%	100%	100%	100%	100%	83%
Cefuroxima	2	1	570	99%	100%	98%	100%	100%	83%
Cefotaxima	0	0	563	98%	99%	98%	95%	100%	75%
Ceftriaxoma	0	0	561	98%	99%	98%	86%	100%	75%
Ceftazidima	61	83	429	75%	76%	69%	81%	85%	25% <sup>a</sup>
Cefotetan	183	80	310	54%	50% <sup>c</sup>	74%	41% <sup>c</sup>	94%	67%
Cefepime	63	23	487	85%	87%	89%	59%	91%	75%
Aztreonam	0	0	554	97%	97%	98%	86%	100%	83%
Ertapenem	6	0	565	99%	100%	100%	81%	100%	92%
Imipenem	29	44	500	87%	87%	98%	81%	73%	100%
Meropenem	25	18	530	92%	95%	96%	76%	79%	83%
Ciprofloxacina	74	14	485	85%	91%	96%	62%	58%	8% <sup>b</sup>
Levofloxacina	106	13	454	79%	86%	87%	59%	39%	8% <sup>b</sup>
Nitrofurantoina	45	71	457	80%	87%	52%	97%	33%	100%
Tetraciclina	194	75	304	53%	59%	2%	38%	61%	100%
Tigeciclina	392	96	85	15%	17%	2%	0%	0%	100%*
Sulfametoxazol/Trimetoprima	119	0	454	79%	87%	61%	59%	70%	8% <sup>b</sup>

a, indica um  $p < 0,001$  para a comparação de dois grupos.

b, indica um  $p < 0,01$  para a comparação de dois grupos

c, indica um  $p < 0,05$  para a comparação de dois grupos

\**P. mirabilis* são intrinsecamente resistente a Tigeciclina.

### 5.7- Detecção fenotípica da produção de carbapenemase (Teste de Hodge Modificado – THM) e genótipo *bla* associado.

O THM foi realizado em 566 cepas de ERC para verificar a produção fenotípica de carbapenemase e apontar grupos de cepas ou espécies que pudessem expressar mecanismos alternativos de resistência aos carbapenens. A produção de carbapenemase foi detectada em 89,8% das cepas de ERC testadas (THM positivo). Os resultados demonstraram que a positividade do THM em isolados resistentes a



carbapenem varia em função da espécie isolada (tabela 9). Em *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* a positividade do THM foi superior a 93%, ao passo que em *P. mirabilis* a positividade alcançou apenas 45,5%. As espécies da tribo *Proteeae*, sendo o *P. mirabilis* a principal espécie, apresentam susceptibilidade intrinsecamente reduzida para imipenem (é não para os outros carbapenens). Essa insusceptibilidade não está relacionada à produção de carbapenemase e sim por perda de afinidade da PBP2 para o imipenem em espécies dessa tribo (VILLAR et al., 1997).

**Tabela 9.** Detecção fenotípica da produção de carbapenemase pelo Teste de Hodge Modificado (THM) em cepas de ERC.

Espécie	n %	THM			TOTAL
		Neg	Pos	Ind	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	n	12	396	15	423
	%	2,8%	93,6%	3,5%	100%
<i>Enterobacter aerogenes</i>	n	2	51	1	54
	%	3,7%	94,4%	1,9%	100%
<i>Serratia marcescens</i>	n	2	19	11	32
	%	6,3%	59,4%	34,4%	100%
<i>Enterobacter cloacae</i>	n	4	26	3	33
	%	12,1%	78,8%	9,1%	100%
<i>Proteus mirabilis</i>	n	3	5	3	11
	%	27,3%	45,5%	27,3%	100%
<i>Escherichia coli</i>	n	1	7	0	8
	%	12,5%	87,5%	0,0%	100%
<i>Klebsiella oxytoca</i>	n	0	4	0	4
	%	0,0%	100,0%	0,0%	100%
<i>Providencia rettgeri</i>	n	1	0	0	1
	%	100,0%	0,0%	0,0%	100%
<b>TOTAL</b>	<b>n</b>	<b>25</b>	<b>508</b>	<b>33</b>	<b>566</b>
	<b>%</b>	<b>4,4%</b>	<b>89,8%</b>	<b>5,8%</b>	<b>100%</b>

Abreviaturas: THM, teste de Hodge modificado; Neg, negativo no THM, Pos, positivo no THM ;Ind, Indeterminado no THM.

Das 573 cepas analisadas nesse estudo, 205 cepas (35,7% da coleção) foram caracterizadas quanto à presença dos genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>NDM</sub>*, *bla<sub>IMP</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>OXA-48</sub>*, que codificam carbapenemases. O gene predominantemente detectado nas cepas de ERC foi *bla<sub>KPC</sub>*, encontrado em 77,0% de todos os isolados testados (Tabela 10).

Além de *bla*<sub>KPC</sub>, o gene *bla*<sub>NDM</sub> foi detectado em 4 cepas (1,9% dos isolados testados) e *bla*<sub>IMP</sub> foi detectado em uma cepa (0,4% dos isolados testados). Cepas de *P. mirabilis* apresentaram a maior variabilidade quanto à detecção de genes *bla*. De seis cepas analisadas cinco foram positivas para a presença de *bla*<sub>KPC</sub> e uma das cepas portava tanto o gene *bla*<sub>NDM</sub> como o *bla*<sub>IMP</sub>. Os genes *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> não foram detectados em nenhuma das cepas testadas. De forma semelhante, Pinto e colaboradores, ao avaliarem cepas de ERC recuperadas em quatro hospitais de Porto Alegre, demonstraram que havia uma prevalência de *bla*<sub>KPC</sub> entre os isolados testados. O gene *bla*<sub>NDM</sub> foi encontrado em quatro diferentes espécies (sendo 9 isolados de *E. cloacae*, 1 isolado de *Morganella morganii*, 1 isolado de *E. coli* e 1 de *Klebsiella* spp.). Diferentemente dos resultados deste estudo, o gene *bla*<sub>OXA-48</sub>, foi detectado em 21 isolados de ERC sendo, esse gene, o segundo mais prevalente (PINTO et al., 2014).

**Tabela 10.** Frequência de genes para carbapenemase em cepas de ERC.

Espécie	Isolados	Carbapenemase					TOTAL
		KPC	NDM	IMP	VIM	OXA48	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	134	119	2	0	0	0	121
<i>Enterobacter aerogenes</i>	24	21	0	0	0	0	21
<i>Serratia marcescens</i>	18	3	0	0	0	0	3
<i>Enterobacter cloacae</i>	16	5	0	0	0	0	5
<i>Proteus mirabilis</i>	6	5	1	1	0	0	7
<i>Escherichia coli</i>	4	3	0	0	0	0	3
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2	2	0	0	0	0	2
<i>Providencia rettgeri</i>	1	0	1	0	0	0	1
<b>Total (%)</b>	<b>205</b>	<b>158 (77,0)</b>	<b>4 (1,9)</b>	<b>1 (0,4)</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>163 (79,5)</b>

O gene *bla*<sub>KPC</sub> foi detectado regularmente ao longo dos 3 anos do estudo, embora sua positividade nas cepas de ERC tenha apresentado uma redução significativa ao longo do período do estudo (86,2% em 2011; 73,5% em 2012 e 66% em 2013) ( $p = 0,03$ ) (tabela 11). As hipóteses para a redução da positividade do gene *bla*<sub>KPC</sub> ao longo dos anos analisados podem ser: A participação de novas carbapenemase, não pesquisadas neste trabalho, assim como ocorrido no UK onde o

advento de cepas produtoras de NDM chegaram a sobrepor a quantidade de cepas produtoras de KPC (KUMARASAMY et al., 2010); Ou ainda o aumento da sensibilidade (com respectiva diminuição da especificidade) após a diminuição dos pontos de corte para os carbapenens no CLSI de 2011 (ENDIMIANI et al., 2010). Com essa mudança cepas produtoras de ESBL com perda de porina (que muitas vezes apresentam MIC  $\geq 2$   $\mu\text{g/mL}$  para ertapenem) podem apresentar-se resistentes aos carbapenens, principalmente ao ertapenem (ENDIMIANI et al., 2010).

As cepas portando  $bla_{\text{NDM}}$  ou  $bla_{\text{IMP}}$  foram detectadas apenas no ano 2013. Cepas produtoras de NDM estão dispersando pelo mundo (NORDMANN; NAAS; et al., 2011). Inicialmente todos os casos estavam ligados com o subcontinente indiano ou Paquistão (NORDMANN; POIREL; WALSH; et al., 2011). No entanto, casos autóctones comeram a ser relatados (NORDMANN; COUARD; et al., 2012; ARPIN et al., 2012). O primeiro relato de ERC produtora de NDM no Brasil ocorreu também em 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

**Tabela 11.** Frequência de genes para carbapenemase em cepas de ERC isolada entre 2011 - 2013.

Gene ( <i>bla</i> )	Nº de cepas de ERC positivas para os genes de carbapenemase testados			
	2011 n = 87 (%)	2012 n = 68 (%)	2013 n = 50 (%)	Total n = 205 (%)
KPC	75 (86,2)	50 (73,5)	33 (66,0)	158 (77,0)
NDM	0	0	4 (8,0)	4 (1,9)
IMP	0	0	1 (2,0)	1 (0,4)
VIM	0	0	0	0
OXA48	0	0	0	0

A sensibilidade do teste THM, que detecta a produção de carbapenemase, foi determinada na população de cepas portando genes de carbapenemase. Das 176 cepas positivas no teste THM, 154 apresentaram resultados positivos para  $bla_{\text{KPC}}$  (sensibilidade de 87,5%). Com relação às cepas positivas para  $bla_{\text{NDM}}$ , nenhuma das quatro cepas testadas apresentou resultado positivo para THM (tabela 12). Embora tenhamos testado um número pequeno de cepas positivas para  $bla_{\text{NDM}}$  (n = 4), a baixa

positividade de THM para a detecção de produção da carbapenemase NDM também tem sido verificada por outros autores (CASTANHEIRA et al., 2011).

**Tabela 12.** Correlação entre resultados dos ensaios fenotípicos para a produção de carbapenemase (THM) e a presença de genes associados a carbapenemases (*bla*) ( $n = 200$ ).

THM	GENES <i>bla</i>							
	KPC		NDM		IMP		Total (KPC, NDM ou IMP)	
	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	Pos
Neg	9	0	6	3	8	1	6	3
Pos	22	154	176	0	176	0	22	154
Ind	12	3	14	1	15	0	11	4

É importante observar que seis cepas de ERC foram negativas para os genes testados bem como para o THM (Tabela 12), o que pode indicar a existência de mecanismos alternativos de resistência à carbapenem. Para avaliar se esse grupo apresentava um perfil de resistência diferente, comparamos diferentes populações de ERC, definidas em função do resultado do THM e da presença dos genes *bla*, sendo estas definidas como população THM-*bla*- (THM negativo e ausência de genes *bla*), população THM+*bla*- (THM positivo e ausência de genes *bla*), população THM+*bla*+ (THM positivo e presença de genes *bla*) e população THM-*bla*+ (THM negativo e presença de genes *bla*), conforme visualizadas na tabela 13.

A população de cepas com resultados positivos no THM (TMH+) e/ou positivos para os genes *bla* (*bla*+) apresentou frequência de resistência superior a 90% para todos os carbapenens testados (Tabela 13). Diferentemente, as cepas pertencentes à população TMH-*bla*- mostraram uma frequência de resistência significativamente ( $p < 0,05$ ) menor ao imipenem e meropenem (16,7%), indicando a presença de mecanismos alternativos de resistência a carbapenem, possivelmente, baseados na hiperexpressão de  $\beta$ -lactamases, não pertencentes à classe das carbapenemases, associados, ou não, à perda de porinas. Esta população, TMH-*bla*-, respondeu por 3,2% das cepas analisadas (Tabela 13). A resistência a ertapenem

associada à expressão de  $\beta$ -lactamases do tipo ESBL ou AmpC e ou perda de porina tem sido descrita na literatura (NORDMANN et al., 2009; SHIN et al., 2012). Na França, a frequência de cepas de resistentes aos carbapenens por outros mecanismos diferentes da produção de carbapenemase foi de 76,4%. A produção de ESBL associada à impermeabilidade de parede bacteriana foi principalmente encontrada em *K. pneumoniae* (75,2%) e *E. coli* (66,7%); enquanto que a expressão da  $\beta$ -lactamase AmpC aliada à impermeabilidade de parede bacteriana foi o mecanismo alternativo de resistência a carbapenem mais frequente no gênero *Enterobacter* (68,2%) (DORTET et al., 2014).

Por fim, é importante notar que das cepas positivas para a expressão de carbapenemase (teste THM positivo) 12,5% (22/176) foram negativas para todos os cinco genes *bla* pesquisados (Tabela 13). Este fato aponta para a presença de outros determinantes genéticos associados à resistência a carbapenens em nossa coleção e possivelmente em cepas de ERC que circulam nos hospitais do Distrito Federal. Uma outra carbapenemase com dispersão mundial, e que não foi pesquisada neste trabalho, é a GES (do inglês, *Guiana extended spectrum*) e que recentemente foi relatada em uma cepa *Serratia marcescens* isolada em uma hospital de Porto Alegre (QUEENAN; BUSH, 2007; PINTO et al., 2014).

É importante relatar que cepas resistentes aos carbapenens em virtude da expressão de mecanismos alternativos que não envolvam a produção de carbapenemases (como perda de porina associado à hiperexpressão de ESBL ou AmpC) também podem apresentar resultados falso-positivos para a produção de carbapenemase quando testadas pelo THM (CARVALHAES et al., 2010).

**Tabela 13.** Perfil de susceptibilidade a  $\beta$ -lactâmicos em diferentes grupos de ERC definidos em virtude do ensaio de THM e da presença de genes *bla*.

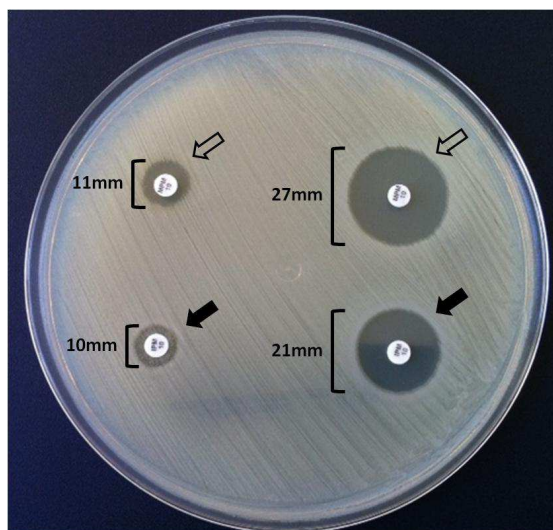
Genes <i>bla</i> detectado (n)	População (n)							
	THM- <i>bla</i> - (6)		THM+ <i>bla</i> - (22)		THM+ <i>bla</i> + (154)		THM- <i>bla</i> + (3)	
	-		-		KPC (154)		NDM (3), IMP (1)	
ATB	R	%	R	%	R	%	R	%
Piperacilina	6	100,0%	22	100,0%	154	100,0%	3	100,0%
Piperacilina/Tazobactam	6	100,0%	20	90,9%	144	93,5%	3	100,0%
Ceftazidima	6	100,0%	15	68,2%	116	75,3%	3	100,0%
Cefepime	5	83,3%	20	90,9%	135	87,7%	3	100,0%
Cefotetan	3	50,0%	17	77,3%	80	51,9%	1	33,3%
Aztreonam	6	100,0%	22	100,0%	153	99,4%	2	66,7%
Ertapenem	6	100,0%	22	100,0%	154	100,0%	3	100,0%
Imipenem	1	16,7%	20	90,9%	142	92,2%	3	100,0%
Meropenem	1	16,7%	20	90,9%	149	96,8%	3	100,0%
Composição da população (n)	<i>E. cloacae</i> (3), <i>E. coli</i> (1), <i>K. pneumoniae</i> (2)		<i>E. aerogenes</i> (3), <i>E. cloacae</i> (7), <i>K. pneumoniae</i> (8), <i>S. marcescens</i> (4)		<i>E. aerogenes</i> (21), <i>E. cloacae</i> (5), <i>E. coli</i> (3), <i>K. oxytoca</i> (2), <i>K. pneumoniae</i> (117), <i>P. mirabilis</i> (3), <i>S. marcescens</i> (3)		<i>K. pneumoniae</i> (1), <i>P. mirabilis</i> (1), <i>P. rettgeri</i> (1)	

### 5.8- Caracterização genética e fenotípica das cepas de ERC positivas para *bla*<sub>NDM</sub> inicialmente detectadas em Brasília.

As primeiras cepas de ERC portando *bla*<sub>NDM</sub> começaram a ser detectadas em Brasília a partir de julho de 2013. O primeiro relato ocorreu na espécie *P. rettgeri* recuperada de uma úlcera necrótica no pé de um paciente diabético do sexo masculino com, 75 anos de idade. O paciente não apresentava história recente de viagem para o exterior, com o último relato datado de seis anos anteriores ao isolamento do microrganismo. O paciente foi atendido em pelo menos dois hospitais em Brasília, primeiramente no hospital J-Ceilândia e posteriormente no hospital Q-Plano piloto, onde foi submetido a amputação dos dedos do pé.

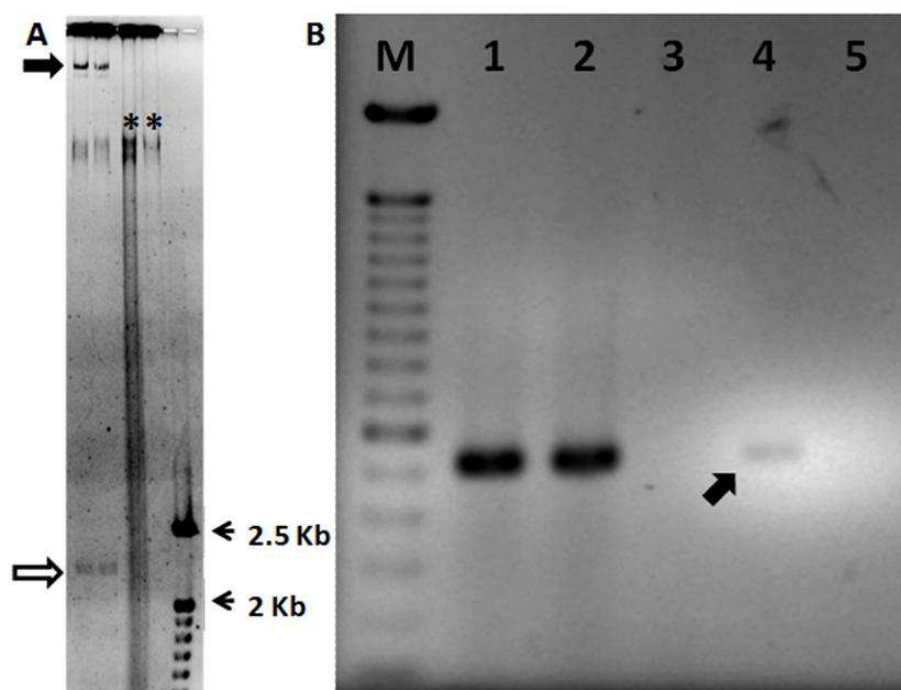
A cepa de *P. rettgeri* isolada foi positiva para a detecção de *bla*<sub>NDM</sub> gerando um *amplicon* de tamanho esperado (512 pb). Para confirmar a identidade genética do *amplicon* e consequentemente do alelo NDM detectado, o *amplicon* foi submetido a sequenciamento genético revelando identidade de 100% ao longo dos 435 pares de

base sequenciados com as sequências de alelos *bla*<sub>NDM-1</sub> depositados em banco de dados (Número de acesso no GenBank: KC539432.1 - *K. pneumoniae*; AB769140.1 - *E. coli*; KC539431.1 - *E. aerogenes*). Embora resistente a ertapenem e positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>, a cepa de *P. rettigeri* apresentou resultados negativos nos ensaios de THM. A expressão de metallo- $\beta$ -lactamase foi confirmada por meio do "teste do EDTA", que demonstrou um aumento do halo de inibição produzido pelos antibióticos meropenem e imipenem quando na presença de EDTA (figura 17). Além da pesquisa do gene *bla*<sub>NDM</sub>, outros quatro genes para carbapenemase foram pesquisados: *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>. A cepa de *P. rettigeri* apresentou resultados negativos para a presença destes genes. Com relação ao perfil de susceptibilidade, a cepa de *P. rettigeri* apresentou um perfil de resistência muito amplo, demonstrando resistência *in vitro* a todos os antimicrobianos testados, com exceção de gentamicina.



**Figura 17.** Detecção da produção de metallo- $\beta$ -lactamase em cepa de *P. rettigeri*. À esquerda e acima visualiza-se um disco de meropenem (seta vazia) sem EDTA produzindo um halo de inibição com 11mm. Em contrapartida, à direita e acima visualiza-se um disco de ertapenem impregnado com EDTA (inibidor de metallo- $\beta$ -lactamases) produzindo um halo de inibição aumentado com 27mm. Uma diferença  $\geq 5$ mm entre os diâmetros dos halos de inibição confirma a expressão de carbapenemases do tipo metallo- $\beta$ -lactamase. Seguindo a mesma disposição vemos o ensaio realizado com imipenem (seta preenchida) apresentando o mesmo padrão de resposta.

Os plasmídios são importantes meios de transferência genética em bactérias e tem colaborado com a dispersão global dos genes produtores de carbapenemase incluindo *bla*<sub>NDM</sub>. O perfil plasmidial da cepa de *P. rettigeri* demonstrou a presença de duas bandas de DNA, que sugerem plasmídeos: uma banda apresentando baixa massa molecular, situada entre 2 a 2,5 Kb, e outra banda com massa molecular superior a 50 Kb (figura 18). Reações de PCR realizadas com DNA purificado das bandas plasmidiais levaram a conclusão de que o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> era carregado pelo plasmídio de alta massa molecular (Figura 18B).



**Figura 18.** Perfil plasmidial da cepa de *P. rettigeri* positiva para *bla*<sub>NDM-1</sub>. (A), Perfil plasmidial demonstrando duas bandas de DNA plasmidial distintas em *P. rettigeri*. A seta sólida e a vazada apontam, respectivamente, uma banda de DNA plasmidial de alta massa molecular (> 50 Kb) e uma banda de baixa massa molecular. Amostras: linhas 1 e 2, DNA total de *P. rettigeri* portadora do gene *bla*<sub>NDM</sub>; linha 3 e 4 DNA total de *E. coli* DH5- $\alpha$ ; linha 5, marcador de massa molecular. Símbolos: Asterisco indica o domínio cromossomal (~50 Kb) de *E. coli* DH5- $\alpha$ . (B), Detecção do gene *bla*<sub>NDM</sub> por PCR. Amostras: linha 1, DNA total do controle positivo (*E. cloacae* CCBH 10982); linha 2 DNA total de *P. rettigeri* portadora do gene *bla*<sub>NDM</sub>; linha 3, DNA total do controle negativo (*K. pneumoniae* IOC4955); linha 4, DNA purificado do plasmídio de maior massa molecular purificado; e linha 5, DNA purificado do plasmídio de menor massa molecular purificado. Símbolos: Seta preenchida demonstrando o resultado positivo para o ensaio de PCR para o gene *bla*<sub>NDM</sub> realizado com o DNA do plasmídio de maior massa molecular purificado.



Posteriormente ao isolamento da cepa de *P. rettigeri* positiva para  $bla_{NDM}$ , outras espécies de enterobactérias portando o gene  $bla_{NDM}$  foram isoladas em outros dois hospitais em Brasília totalizando 3 cepas. O hospital D-Cruzeiro contribui com 1 cepa de *K. pneumoniae* e 1 de *P. mirabilis*, enquanto que o terceiro isolado, uma cepa de *K. pneumoniae*, foi detectado no Hospital G-Taguatinga.

O isolamento inicial de uma cepa portando NDM no Distrito Federal se deu simultaneamente ao primeiro relato científico sobre a detecção de NDM no Brasil (estado do Rio Grande do Sul) publicado por Carvalho-Assef e colaboradores (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). É interessante notar que estes dois achados apresentam-se semelhantes em vários aspectos. O isolado NDM de Assef também foi uma cepa de *P. rettigeri* e, seguindo as semelhanças com o primeiro caso de Brasília, a cepa também foi isolada causando infecção de uma úlcera necrótica de membro inferior que afligia um paciente diabético. De forma semelhante ao caso relatado aqui, no histórico clínico exposto por Assef o paciente foi submetido à amputação do membro afetado em virtude da infecção pela cepa de *P. rettigeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Em meio a tantas semelhanças entre os dois casos, a localização do gene  $bla_{NDM}$  se mostrou diferente. No relato de Assef, o gene  $bla_{NDM}$  estava localizado no cromossomo da cepa de *P. rettigeri*, enquanto que neste estudo mostramos que  $bla_{NDM}$  era carregado por plasmídios de alta massa molecular. Estudos têm demonstrado que genes  $bla_{NDM}$  podem ser carregados por plasmídios de tamanhos discrepantes e de diferentes grupos de incompatibilidade bem como, podem estar presentes no cromossomo bacteriano (KUMARASAMY et al., 2010; POIREL; HOMBROUCK-ALET; et al., 2010; NORDMANN; POIREL; WALSH; et al., 2011; DARLEY et al., 2012; VOULGARI et al., 2014). Destoando dos genes  $bla_{KPC}$ , que majoritariamente são carregados por plasmídios (QUEENAN; BUSH, 2007), genes  $bla_{NDM}$  tem sido identificado tanto em cromossomos como em plasmídios, e por vezes

encontra-se de forma redundante posicionado tanto no cromossomo como em plasmídios do mesmo isolado (DARLEY et al., 2012).

#### **5.9- Perfil de RAPD das cepas de *K. pneumoniae* positivas para genes $bla_{NDM}$ isoladas em hospitais do Distrito Federal.**

A espécie *K. pneumoniae* tem liderado a dispersão mundial de genes  $bla_{KPC}$  que ocorre em grande parte impulsionada pela expansão de linhagens clonais (KITCHEL et al., 2009; CUZON et al., 2010; NORDMANN; DORTET; et al., 2012). Diante da detecção de cepas produtoras de NDM em Brasília, o perfil de RAPD de cepas de *K. pneumoniae* positivas para  $bla_{NDM}$  foi determinado com o intuito de verificar a existência de clones envolvidos na dispersão de NDM entre os hospitais do Distrito Federal. Para esta análise, foram incluídas duas outras cepas de *K. pneumoniae* positivas para  $bla_{NDM}$  isoladas em dois hospitais do Distrito Federal (hospitais D-Cruzeiro e Z-Lago Sul) no início de 2014. Para averiguar o poder discriminatório do ensaio de RAPD, 12 cepas positivas para  $bla_{KPC}$  isoladas no hospital D-Cruzeiro, entre os anos de 2011 e 2013, complementaram a análise (tabela 14).

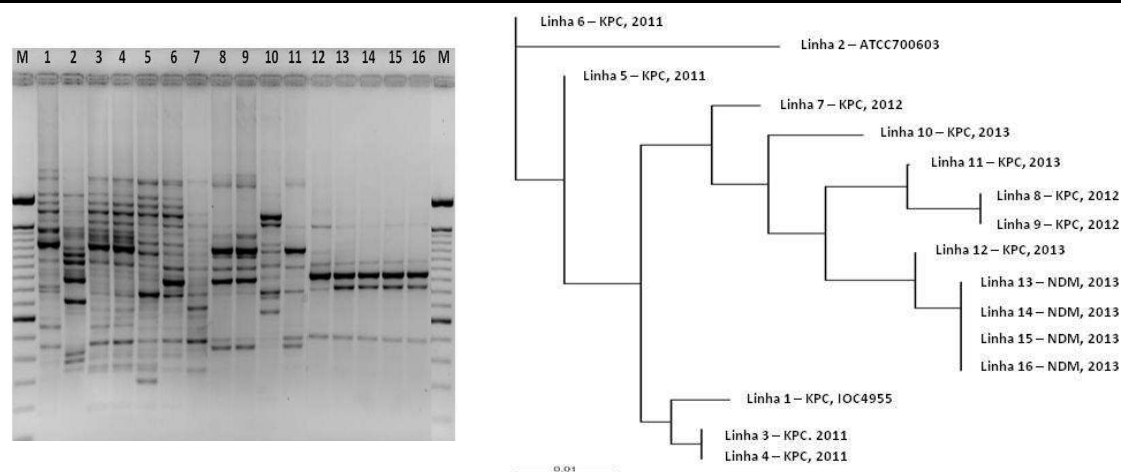
**Tabela 14.** Cepas de *K. pneumoniae* positivas para *bla* usadas em ensaio de RAPD.

Cepa	Referência (amostra)	Gene	ano	Hospital
1	IOC4599	KPC	-	-
2	ATCC700603	SHV18	-	-
3	Isolado clínico (frag. tecido)	KPC	2011	D-Cruzeiro
4	Isolado clínico (cateter venoso)	KPC	2011	D-Cruzeiro
5	Isolado clínico (urina)	KPC	2011	D-Cruzeiro
6	Isolado clínico (urina)	KPC	2012	D-Cruzeiro
7	Isolado clínico (sec. traqueal)	KPC	2012	D-Cruzeiro
8	Isolado clínico (cateter venoso)	KPC	2012	D-Cruzeiro
9	Isolado clínico (sangue)	KPC	2012	D-Cruzeiro
10	Isolado clínico (sangue)	KPC	2013	D-Cruzeiro
11	Isolado clínico (sec. traqueal)	KPC	2013	D-Cruzeiro
12	Isolado clínico (sec. traqueal)	KPC	2013	D-Cruzeiro
13	Isolado clínico (urina)	NDM	2013	D-Cruzeiro
14	Isolado clínico (urina)	NDM	2014	D-Cruzeiro
15	Isolado clínico (secreção)	NDM	2013	G-Taguatinga
16	Isolado clínico (urina)	NDM	2014	Z-Lago Sul

Com a técnica de RAPD é possível analisar o vínculo genético entre os isolados bacterianos, definindo as cepas como geneticamente indistinguíveis - "clones"-, ou como cepas geneticamente diferentes. A tipagem molecular também possibilita vincular, geneticamente, diferentes isolados envolvidos em um mesmo surto. Ao estabelecer a clonalidade dos isolados bacterianos, é possível definir se a dispersão bacteriana se deu pela mesma fonte de contaminação (ambiental ou humana); e em alguns casos, é possível até mesmo identificar a fonte responsável pela dispersão; e distinguir cepas epidêmicas de cepas endêmicas (TENOVER et al., 1997; SINGH et al., 2006). O RAPD tem sido utilizado em estudos epidemiológicos por apresentar bom desempenho e por ser um método rápido e de baixo custo (SINGH et al., 2006; PATERSON, 2006).

Inicialmente, o ensaio detectou a existência de 11 padrões de RAPD em meio às 16 cepas analisadas, demonstrando que subgrupos de cepas apresentavam padrões indistinguíveis de RAPD. As cepas positivas para *bla<sub>KPC</sub>* demonstraram uma maior variabilidade de padrões de RAPD (10 cepas analisadas e 8 padrões distintos detectados), ao passo que as cepas *bla<sub>NDM</sub>* apresentaram uma uniformidade de padrão de RAPD (4 cepas analisadas e 1 padrão detectado). Com reação as cepas positivas para *bla<sub>NDM</sub>*, é importante ressaltar que, embora tenham sido recuperadas em três hospitais diferentes, elas demonstraram o mesmo padrão de RAPD (Figura 19). Além do mais, uma das cepas positivas para *bla<sub>KPC</sub>*, isolada no hospital D-Cruzeiro em 2013, apresentou um padrão de RAPD muito semelhante àquele detectado nas cepas *bla<sub>NDM</sub>* de estrutura clonal, sendo a distinção entre elas definida pela existência de uma única banda adicional de RAPD na cepa *bla<sub>KPC</sub>* (Figura 19B; linhas 12 e 13).

A emergência de populações clonais após a aquisição de elementos genéticos móveis conferindo vantagens adaptativas ou multirresistência tem sido reportada pela literatura científica (KITCHEL et al., 2009; CHMELNITSKY et al., 2013). O complexo clonal 258 (composto por ST258, ST11 e ST437), embora já fosse reconhecido como população endêmica em muitas regiões, teve sua expansão epidêmica e prevalência mundial consolidadas em virtude da aquisição do gene *bla<sub>KPC</sub>* (NORDMANN et al., 2009; KITCHEL et al., 2009). O sucesso desse complexo clonal se deu em virtude de outras vantagens adaptativas além do fenótipo de resistência, como a capacidade de adquirir e manter mecanismos de resistência, bem como a presença de diferentes proteínas envolvidas na motilidade, secreção, adesão, e replicação, recombinação e reparo do DNA (CHMELNITSKY et al., 2013). Esse complexo também tem sido responsável por disseminar o gene *bla<sub>NDM</sub>* em alguns países (VOULGARI et al., 2014).



**Figura 19.** Perfil de RAPD das cepas de *K. pneumoniae* isoladas principalmente do hospital D-Cruzeiro. Amostras: linha 1, cepa controle (*K. pneumoniae* IOC4955 produtora de KPC); linha 2, *K. pneumoniae* ATCC700603; linhas 3 a 5, cepas produtoras de KPC isoladas no hospital D-Cruzeiro em 2011; linhas 6 a 9, cepas de produtoras de KPC isoladas no hospital D-Cruzeiro em 2012; linhas 10 a 16 cepas isoladas em 2013 (linhas 10 a 12, cepas de produtoras de KPC isoladas no hospital D-Cruzeiro; linhas 13 e 15, cepas de produtoras de NDM isoladas no hospital D-Cruzeiro; linha 14, cepa produtora de NDM isolada no hospital G-Taguatinga e linha 16, cepa produtora de NDM isolada no Hospital Z-Lago Sul).

## 6- Conclusão

A análise do perfil de susceptibilidade das cepas de ERC isoladas em Brasília revelou uma baixa frequência de resistência à amicacina, sobretudo na espécie *K. pneumoniae* (4%). Para alguns antibióticos notadamente em desuso para o controle de enterobactérias também foi mostrado uma baixa frequência de cepas resistentes em algumas espécies de ERC analisadas. A frequência de resistência à tetraciclina em cepas de ERC da espécie *E. aerogenes* foi de apenas 2%. Em relação à sulfonamida (sulfametaxazol/trimetroprima), a frequência de cepas resistentes na espécie *P. mirabilis* foi de 8%. Embora a resistência a estes dois antibióticos seja evento frequente entre as cepas de enterobactérias, mesmo considerando isolados de ambientes comunitários, este dado aponta para a importância da análise criteriosa do perfil de susceptibilidade mesmo entre cepas multirresistentes ao passo que desmerece a adoção de tratamento empírico.

Nesse estudo a frequência de isolamento de cepas de *K. pneumoniae* diminuiu significativamente entre os anos de 2011 e 2013. Em contrapartida, a

frequência de isolamento de cepas de ERC intrinsecamente resistentes a polimixina (*P. mirabilis*, *S. marcescens* e *P. rettgeri*) vem mostrando um incremento considerável embora este aumento ainda não seja, ao rigor da análise estatística, significativo ( $p = 0,0561$ ).

A resistência a carbapenems em cepas isoladas no Distrito Federal está predominantemente associada à presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> detectado em 77% das cepas analisadas. Além deste gene, foi detectado *bla*<sub>NDM</sub> em quatro cepas (1,9%) e *bla*<sub>IMP</sub> em um isolado (0,4%). Apesar destes resultados, em 15% ( $n = 28$ ) das cepas analisadas não foi possível detectar nenhum dos genes de carbapenemase testados. Além do mais, seis destas cepas ainda apresentaram resultados negativos para a produção *in vitro* de carbapenemase, com cinco delas mostrando resistência apenas ao ertapenem.

Neste estudo, além da cepa de *P. rettgeri*, outras cepas positivas para *bla*<sub>NDM</sub> ( $n = 3$ ), envolvendo espécies diferentes, foram isoladas em 3 hospitais do Distrito Federal no ano de 2013. Com relação à espécie *K. pneumoniae*, os resultados mostraram que as cepas positivas para *bla*<sub>NDM</sub> isoladas em três hospitais diferentes apresentavam um padrão clonal indicando a dispersão intra e inter-hospitalar e a prevalência de uma única linhagem clonal de *K. pneumoniae* produtora de NDM nos hospitais de Brasília.

A detecção do primeiro caso de infecção humana associada a cepa produtora de NDM no DF foi rapidamente seguida pela identificação de casos secundários envolvendo diferentes espécies como também pela detecção de uma população clonal de *K. pneumoniae* portando *bla*<sub>NDM</sub>. Estes achados ratificam a importância da adoção de ações e medidas de controle que visem o rastreamento destas cepas e impeçam a transferência inter-hospitalar e o estabelecimento destas cepas em novas unidades de assistência à saúde do Distrito Federal.

## 7- Perspectivas

Com esta pesquisa foi possível implantar a rotina para detecção molecular de carbapenemase no LACEN-DF. O que culminou na seleção dessa instituição como laboratório de referência para resistência bactéria, para região centro-oeste, na Sub-Rede Analítica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde. Está sub-rede é coordenada pela ANVISA e foi normatizada pela portaria nº 3.120, de 17 de dezembro de 2013.

As cepas produtoras de NDM detectadas por esta pesquisa foram imediatamente notificadas para Gerência de Investigação e Prevenção a Infecção e Eventos Adversos em Serviços de Saúde - GEPEAS, subordinada Subsecretaria de Vigilância à Saúde do DF, e também a Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde - GVIMS, ANVISA. Várias ações foram desencadeadas tais como:

- 1 - O monitoramento do paciente envolvido no primeiro caso;
- 2 - Produção da NOTA TÉCNICA Nº01/2013, "Prevenção e controle de Enterobactérias produtoras de carbapenemase da classe metalo-betalactamase do tipo "NDM" nos hospitais do Distrito Federal";
- 3 - Reuniões junto as CCIHs dos hospitais privados e públicos do DF;
- 4 - Realização de uma investigação laboratorial "Tipagem molecular das cepas de *Klebsiella pneumoniae* portadoras dos genes *bla*<sub>NDM</sub> isoladas nos hospitais de Brasília/DF.

Todas essas ações estão colaborando na tentativa de impedir a dispersão de cepas produtoras de NDM nos hospitais do DF assim como vivenciado com emergência de cepas produtoras de KPC.

Diante do momento inicial na emergência de cepas produtoras de NDM no Distrito Federal, temos a perspectiva de iniciar um estudo que vise analisar a estrutura

plasmidial de cepas portando *bla*<sub>NDM</sub> determinando o espectro de plasmídios carreadores de *bla*<sub>NDM</sub> em diferentes espécies de enterobactérias isoladas em hospitais do Distrito Federal. Este estudo denominado agora de “Epidemiologia Molecular Plasmidial” poderá fornecer informações não apenas sobre cepas endêmicas ou epidêmicas mas também sobre plasmídios NDM de dispersão endêmica ou epidêmica no Distrito Federal.



## 8- Referências Bibliográficas

ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. **Nature**, v. 146, n. 3713, p. 837–837, 1940.

ANDERSSON, I.; SCHELTINGA, A. C. VAN; VALEGÅRD, K. Towards new  $\beta$ -lactam antibiotics. **Cellular and molecular life sciences**, v. 58, n. 12-13, p. 1897–1906, 2001.

ANDRADE, L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–83, 2011.

ANVISA. COMUNICAÇÃO DE RISCO N. 001/2013 -GVIMS/GGTES/ANVISA. Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado “New Delhi Metalobetalactamase” ou NDM no Brasil. .

ARPIN, C.; NOURY, P.; BORAUD, D.; et al. NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* resistant to colistin in a French community patient without history of foreign travel. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 3432–4, 2012.

ASHAYERI-PANAH, M.; EFTEKHAR, F.; GHAMSARI, M. M.; PARVIN, M.; FEIZABADI, M. M. Genetic profiling of *Klebsiella pneumoniae*: comparison of pulsed field gel electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. **Brazilian journal of microbiology**, v. 44, n. 3, p. 823–8, 2013.

BALAJI, V.; JEREMIAH, S. S.; BALIGA, P. R. Polymyxins: Antimicrobial susceptibility concerns and therapeutic options. **Indian journal of medical microbiology**, v. 29, n. 3, p. 230–42.

BUSH, K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. **Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)**, v. 31, n. 1, p. 43–56, 2012.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new  $\beta$ -lactamases from gram-negative bacteria. **Annual review of microbiology**, v. 65, p. 455–78, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969–76, 2010.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2227–38, 2009.

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. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 249–51, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–7, 2013.

CASTANHEIRA, M.; DESHPANDE, L. M.; MATHAI, D.; et al. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 3, p. 1274–8, 2011.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. Molecular characterization of a  $\beta$ -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 12, p. 4654–4661, 2004.

CHANT, C.; LEUNG, A.; FRIEDRICH, J. O. Optimal dosing of antibiotics in critically ill patients by using continuous/extended infusions: a systematic review and meta-analysis. **Critical care (London, England)**, v. 17, n. 6, p. R279, 2013.

CHMELNITSKY, I.; SHKLYAR, M.; HERMESH, O.; et al. Unique genes identified in the epidemic extremely drug-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 1, p. 74–83, 2013.

COQUE, T. M.; NOVAIS, A.; CARATTOLI, A.; et al. Dissemination of clonally related *Escherichia coli* strains expressing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15. **Emerging infectious diseases**, v. 14, n. 2, p. 195–200, 2008.

CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 9, p. 1349–56, 2010.

DARLEY, E.; WEEKS, J.; JONES, L.; et al. NDM-1 polymicrobial infections including *Vibrio cholerae*. **Lancet**, v. 380, n. 9850, p. 1358, 2012.

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**, v. 12, n. 4, 2006.

DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; JONES, R. N.; et al. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. **Clinical infectious diseases**, v. 29, n. 3, p. 595–607, 1999.

DONALD, H. M.; SCAIFE, W.; AMYES, S. G.; YOUNG, H. K. Sequence analysis of ARI-1, a novel OXA beta-lactamase, responsible for imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii* 6B92. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 1, p. 196–9, 2000.

DORTET, L.; CUZON, G.; NORDMANN, P. Dissemination of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in France, 2012. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 623–7, 2014.

ECKHARDT, T. A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. **Plasmid**, v. 1, n. 4, p. 584–8, 1978.

ELANDER, R. P. Industrial production of beta-lactam antibiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 61, n. 5-6, p. 385–92, 2003.

ENDIMIANI, A.; HUJER, A. M.; PEREZ, F.; et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 3, p. 427–37, 2009.

ENDIMIANI, A.; PEREZ, F.; BAJAKSOUZIAN, S.; et al. Evaluation of updated interpretative criteria for categorizing *Klebsiella pneumoniae* with reduced carbapenem susceptibility. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 12, p. 4417–25, 2010.

ESSACK, S. Y. The development of beta-lactam antibiotics in response to the evolution of beta-lactamases. **Pharmaceutical research**, v. 18, n. 10, p. 1391–9, 2001.

FISHER, J. F.; MEROUEH, S. O.; MOBASHERY, S. Bacterial resistance to beta-lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. **Chemical reviews**, v. 105, n. 2, p. 395–424, 2005.

FLEMING, A. On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. **British journal of experimental pathology**, v. 10, n. 3, p. 226–236, 1929.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; PARTICIPANT, S. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 20, n. 3, p. 188–91, 2001.

GALLENI, M.; LAMOTTE-BRASSEUR, J.; ROSSOLINI, G. M.; et al. Standard numbering scheme for class B beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 3, p. 660–3, 2001.

GARCÍA C, P.; JULIET L, C.; FERNÁNDEZ V, A.; et al. Multicenter study on the monitoring of in vitro susceptibility to tigecycline in Santiago, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 26, n. 3, p. 220–6, 2009.

GIAKKOUI, P.; PAPPA, O.; POLEMIS, M.; et al. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 4048–50, 2009.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Novel ambler class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase from a *Pseudomonas fluorescens* isolate from the Seine River, Paris, France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 328–32, 2010.

GISKE, C. G.; GEZELIUS, L.; SAMUELSEN, Ø.; et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 4, p. 552–6, 2011.

GREER, N. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. **Proceedings (Baylor University. Medical Center)**, v. 19, n. 2, p. 155–161, 2006.

GUPTA, N.; LIMBAGO, B. M.; PATEL, J. B.; KALLEN, A. J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clinical infectious diseases**, v. 53, n. 1, p. 60–7, 2011.

GUPTA, S.; GOVIL, D.; KAKAR, P. N.; et al. Colistin and polymyxin B: a re-emergence. **Indian journal of critical care medicine : peer-reviewed, official publication of Indian Society of Critical Care Medicine**, v. 13, n. 2, p. 49–53, 2009.

HALL, B. G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 55, n. 6, p. 1050–1, 2005.

HEIJENOORT, J. VAN. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. **Glycobiology**, v. 11, n. 3, p. 25R–36R, 2001.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119–25, 2010.

HUANG, S.; DAI, W.; SUN, S.; ZHANG, X.; ZHANG, L. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and aminoglycoside resistance determinants among carbapenem non-susceptible Enterobacter cloacae. **PloS one**, v. 7, n. 10, p. e47636, 2012.

IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible beta-lactamases in Aeromonas spp. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 1, p. 44–51, 1990.

ITO, H.; ARAKAWA, Y.; OHSUKA, S.; et al. Plasmid-mediated dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP among clinically isolated strains of Serratia marcescens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 4, p. 824–9, 1995.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **The new england journal of medicine**, v. 352, n. 4, p. 380–91, 2005.

JEONG, S. H.; LEE, K.; CHONG, Y.; et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo- beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of

Enterobacter cloacae. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 397–400, 2003.

KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; PATEL, J. B.; et al. Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3365–70, 2009.

KONTOPIDOU, F.; PLACHOURAS, D.; PAPADOMICHELAKIS, E.; et al. Colonization and infection by colistin-resistant Gram-negative bacteria in a cohort of critically ill patients. **Clinical microbiology and infection**, v. 17, n. 11, p. E9–E11, 2011.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 9, p. 597–602, 2010.

KUWABARA, S.; ABRAHAM, E. Some properties of two extracellular beta-lactamases from Bacillus cereus 569/H. **Biochem. J**, v. 103, n. 3, p. 1963–1966, 1967.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A; et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a Pseudomonas aeruginosa clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584–90, 1999.

LECLERCQ, R.; CANTÓN, R.; BROWN, D. F. J.; et al. EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. **Clinical microbiology and infection**, v. 19, n. 2, p. 141–60, 2013.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 11, p. 32, 2012.

LEE, K.; YUM, J.; YONG, D.; LEE, H. Novel acquired metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaSIM-1, in a class 1 integron from Acinetobacter baumannii clinical isolates from Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4485–4491, 2005.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A.; STUART, J. C.; VOETS, G. M.; et al. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 830–1, 2010.

LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J. A.; REINERT, C.; et al. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 516–9, 2005.

LIVERMORE, D. M. Tigecycline: what is it, and where should it be used? **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 611–4, 2005.

LIVERMORE, D. M.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; et al. Activity of aminoglycosides, including ACHN-490, against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 1, p. 48–53, 2011.

LIVERMORE, D. M.; WINSTANLEY, T. G.; SHANNON, K. P. Interpretative reading: recognizing the unusual and inferring resistance mechanisms from resistance phenotypes. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 48 Suppl 1, p. 87–102, 2001.

LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in microbiology**, v. 14, n. 9, p. 413–20, 2006.

MELETIS, G.; BAGKERI, M. Beta-Lactamase and Carbapenemase Detection Methods: An Overview of Recent Patents. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, 2014.

MENDES, R. E.; CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M. A.; et al. Characterization of an integron carrying bla<sub>IMP</sub>-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 7, p. 2611–4, 2007.

MIRIAGOU, V.; CORNAGLIA, G.; EDELSTEIN, M.; et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clinical microbiology and infection**, v. 16, n. 2, p. 112–22, 2010.

MIRIAGOU, V.; TZOUVELEKIS, L. S.; ROSSITER, S.; et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1297–300, 2003.

MOLAND, E. S.; HONG, S. G.; THOMSON, K. S.; LARONE, D. H.; HANSON, N. D. *Klebsiella pneumoniae* isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 51, n. 2, p. 800–1, 2007.

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**, v. 53, n. 1, p. 333–4, 2009.

MORAR, M.; WRIGHT, G. D. The genomic enzymology of antibiotic resistance. **Annual review of genetics**, v. 44, p. 25–51, 2010.

MUNOZ-PRICE, L. S.; POIREL, L.; BONOMO, R. A.; et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–96, 2013.

NAAS, T.; NORDMANN, P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 16, p. 7693–7, 1994.

NAAS, T.; NORDMANN, P.; VEDEL, G.; POYART, C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 10, p. 4423–4, 2005.

NAAS, T.; VANDEL, L. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial agents ...**, v. 38, n. 6, p. 1262–1270, 1994.

NAPARSTEK, L.; CARMELI, Y.; CHMELNITSKY, I.; BANIN, E.; NAVON-VENEZIA, S. Reduced susceptibility to chlorhexidine among extremely-drug-resistant strains of *Klebsiella pneumoniae*. **The Journal of hospital infection**, v. 81, n. 1, p. 15–9, 2012.

NICOLAU, D. P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert opinion on pharmacotherapy**, v. 9, n. 1, p. 23–37, 2008.



NORDMANN, P.; COUARD, J.-P.; SANSOT, D.; POIREL, L. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. **Clinical infectious diseases**, v. 54, n. 1, p. 150–1, 2012.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, 2009. Elsevier Ltd.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! **Trends in molecular medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–72, 2012. Elsevier Ltd.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–8, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R. Does broad-spectrum beta-lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 66, n. 4, p. 689–92, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T. R.; LIVERMORE, D. M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 12, p. 588–95, 2011.

NOSKIN, G. A. Tigecycline: a new glycylicycline for treatment of serious infections. **Clinical infectious diseases**, v. 41 Suppl 5, p. S303–14, 2005.

OSTERBLAD, M.; KIRVESKARI, J.; KOSKELA, S.; et al. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. **Euro surveillance**, v. 14, n. 40, 2009.

PATERSON, D. L. The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Clinical infectious diseases**, v. 43 Suppl 2, p. S43–8, 2006.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–8, 2009.

PENTEADO, A. P.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A. C. C.; et al. Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 63, n. 1, p. 87–91, 2009.

PEREIRA, P. S.; ARAUJO, C. F. M. DE; SEKI, L. M.; et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–6, 2013.

PINTO, F. DE M.; SIMAS, D. M.; BALDIN, C. P.; et al. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clinical and Biomedical Research**, v. 34, n. 1, p. 47–52, 2014.

PITOUT, J. D. D. Multiresistant Enterobacteriaceae: new threat of an old problem. **Expert Reviews**, v. 6, n. 5, p. 657–669, 2008.

PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **The Lancet infectious diseases**, v. 8, n. 3, p. 159–66, 2008.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; LAUPLAND, K. B.; POIREL, L. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 52–9, 2005.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POIREL, L.; HOMBROUCK-ALET, C.; FRENEAUX, C.; BERNABEU, S.; NORDMANN, P. Global spread of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase 1. **The lancet infectious diseases**, v. 10, n. 12, p. 832, 2010.

POIREL, L.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, J.-M.; NAIEMI, N. AL; DEBETS-OSSenkOPP, Y. J.; NORDMANN, P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 6, p. 2420–4, 2010.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G. F.; NAAS, T.; et al. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598–603, 2001.

PRICE, K. E.; DEFURIA, M. D.; PURSIANO, T. A. Amikacin, an Aminoglycoside with Marked Activity against Antibiotic-Resistant Clinical Isolates. **Journal of Infectious Diseases**, v. 134, n. Supplement 2, p. S249–S261, 1976.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical microbiology reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–58, 2007.

RASMUSSEN, B. A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 40, n. 9, p. 2080–6, 1996.

SAINO, Y.; KOBAYASHI, F.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 564–70, 1982.

SALEEM, A. F.; QAMAR, F. N.; SHAHZAD, H.; QADIR, M.; ZAIDI, A. K. M. Trends in antibiotic susceptibility and incidence of late-onset *Klebsiella pneumoniae* neonatal sepsis over a six-year period in a neonatal intensive care unit in Karachi, Pakistan. **International journal of infectious diseases**, v. 17, n. 11, p. e961–5, 2013.

SAMUELSEN, Ø.; NASEER, U.; TOFTELAND, S.; et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 654–8, 2009.

SARNO, R.; HA, H.; WEINSETEL, N.; TOLMASKY, M. E. Inhibition of aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase type Ib-mediated amikacin resistance by antisense oligodeoxynucleotides. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 10, p. 3296–304, 2003.

SATLIN, M. J.; KUBIN, C. J.; BLUMENTHAL, J. S.; et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 12, p. 5893–9, 2011.

SCAIFE, W.; YOUNG, H. K.; PATON, R. H.; AMYES, S. G. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 36, n. 3, p. 585–6, 1995.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; SOUZA, M. D. P. A H. DE; et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 70, n. 2, p. 274–7, 2011. Elsevier Inc.

SEKIGUCHI, J.; MORITA, K.; KITAO, T.; et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4194–7, 2008.

SHIN, S. Y.; BAE, I. K.; KIM, J.; et al. Resistance to carbapenems in sequence type 11 *Klebsiella pneumoniae* is related to DHA-1 and loss of OmpK35 and/or OmpK36. **Journal of medical microbiology**, v. 61, n. Pt 2, p. 239–45, 2012.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 3, p. 512–30, 2006.

SMITH MOLAND, E.; HANSON, N. D.; HERRERA, V. L.; et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711–4, 2003.

SUN, Y.; CAI, Y.; LIU, X.; et al. The emergence of clinical resistance to tigecycline. **International journal of antimicrobial agents**, v. 41, n. 2, p. 110–6, 2013.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American journal of infection control**, v. 34, n. 5 Suppl 1, p. S3–10; discussion S64–73, 2006.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Molecular Typing Working Group of the Society

for Healthcare Epidemiology of America. **Infection control and hospital epidemiology**, v. 18, n. 6, p. 426–39, 1997.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673–9, 2002.

VILLAR, H. E.; DANIEL, F.; LIVERMORE, D. M. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 365–70, 1997.

VIMONT, S.; MNIF, B.; FEVRE, C.; BRISSE, S. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of medical microbiology**, v. 57, n. Pt 10, p. 1308–10, 2008.

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; PEDRO, M. A. DE. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 149–67, 2008.

VOULGARI, E.; GARTZONIKA, C.; VRIONI, G.; et al. The Balkan region: NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 clonal strain causing outbreaks in Greece. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, 2014.

WALSH, C. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 775–81, 2000.

WALSH, C. Where will new antibiotics come from? **Nature reviews. Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 65–70, 2003.

WALSH, T. R. The emergence and implications of metallo-beta-lactamases in Gram-negative bacteria. **Clinical microbiology and infection**, v. 11 Suppl 6, p. 2–9, 2005.

WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 2, p. 306–25, 2005.

WALSH, T. R.; WEEKS, J.; LIVERMORE, D. M.; TOLEMAN, M. A. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human

health: an environmental point prevalence study. **The Lancet infectious diseases**, v. 11, n. 5, p. 355–62, 2011.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147–51, 1991.

WEINSTEIN, R. A. Nosocomial infection update. **Emerging infectious diseases**, v. 4, n. 3, p. 416–20, 1998.

WINN, W. C.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; et al. **Koneman, Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas colorido**. 6<sup>o</sup> ed. São Paulo: Guanabara-Koogan, 2008.

WOODFORD, N.; HILL, R. L. R.; LIVERMORE, D. M. In vitro activity of tigecycline against carbapenem-susceptible and -resistant isolates of *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 582–3, 2007.

YANG, Y. J.; WU, P. J.; LIVERMORE, D. M. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 5, p. 755–8, 1990.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–61, 2001.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; BELL, J.; et al. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaAIM-1, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 12, p. 6154–9, 2012.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–54, 2009.

ZACHARCZUK, K.; PIEKARSKA, K.; SZYCH, J.; et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* coproducing KPC-2 and 16S rRNA methylase ArmA in Poland. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 443–6, 2011.

ZAIDI, A. K. M.; HUSKINS, W. C.; THAYER, D.; et al. Hospital-acquired neonatal infections in developing countries. **Lancet**, v. 365, n. 9465, p. 1175–88.

ZAPUN, A.; CONTRERAS-MARTEL, C.; VERNET, T. Penicillin-binding proteins and beta-lactam resistance. **FEMS microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. 361–85, 2008.

ZAVASCKI, A. P.; GOLDANI, L. Z.; LI, J.; NATION, R. L. Polymyxin B for the treatment of multidrug-resistant pathogens: a critical review. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 1206–15, 2007.

ZIOGA, A.; MIRIAGOU, V.; TZELEPI, E.; et al. The ongoing challenge of acquired carbapenemases: a hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* simultaneously producing VIM-1 and KPC-2. **International journal of antimicrobial agents**, v. 36, n. 2, p. 190–1, 2010.