

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização de carbapenemases do tipo KPC em enterobactérias de origem clínica

Lucia Florêncio Nhambe

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2014

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Universidade de São Paulo

T 22276-F

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Farmácia
Área de Análises Clínicas

Caracterização de carbapenemases do tipo KPC em enterobactérias de origem clínica

Lucia Florêncio Nhambe

Dissertação para obtenção do grau de

MESTRE

Orientador:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

São Paulo

2014

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

Nhambe, Lucia Florêncio
N576c Caracterização de carbapenemases do tipo KPC em enterobactérias
de origem clínica / Lucia Florêncio Nhambe. -- São Paulo, 2014.
64p.

Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas
da Universidade de São Paulo. Departamento de Análises Clínicas
e Toxicológicas.

Orientador: Lincopan, Nilton

1. Infecção hospitalar I. T. II. Lincopan, Nilton, orientador.

615.18h CDD

Lúcia Florêncio Nhambe

Caracterização de Carbapenemases do Tipo KPC em enterobactérias de Origem Clínica

Versão Original

Comissão julgadora

da

Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Orientador/Presidente:

Prof. Dr. Nilton Lincopan

1° Examinador

2° Examinador

3° Examinador

São Paulo, ___ de _____ 2014.

“Direi do Senhor: Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.”

Salmos 91:2

Dedico esta dissertação aos meus pais
e a minha filha Nandy Milena Bahule,
agradeço pelo amor e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. Nilton Lincopan, pela dedicação, paciência, amizade, pelo grande profissionalismo e acima de tudo pela oportunidade de aprendizado;

Aos meus pais Elvira Mucavele e Florêncio Nhambi, pelo apoio, incentivo e paciência.

A minha filha Nandy Milena Bahule, pelo amor, carinho, paciência;

Aos meus irmãos Aires Nhambi, Filipe Nhambi, Gisela Nhambi, Leonel Nhambi e ao Rogério Nhambi pelo apoio, incentivo e carinho;

Aos meus tios Aurora Mucavele, Francisco Mabjaia, Filipe Mucavele, pelo apoio, força, incentivo e carinho;

Aos meus primos Ayrton Magaia, Denilson Magaia, Edison Magaia, Olávio Mucavele e Filipe Shelton Mucavele, pelo apoio, força, incentivo e carinho;

Ao Daniel Sérgio Massinga, pela força, apoio, carinho, incentivo, paciência;

A dona Maria Jacinta de Faria, por ter sido uma segunda mãe para mim, pelo seu coração bom, pelo seu apoio, incentivo, pelas palavras de conforto, pela sua disponibilidade;

A Inês Queme e ao Vicente Manjate pela dedicação, amizade, incentivo, força, apoio no desenvolvimento deste trabalho;

A Patricia Neves, Priscila Martin, Rodrigo Moura e a Elaine Costa pela amizade e apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Aos colegas do laboratório Luacianne Leigge, Luana Mello, Tatiane Nascimento Enyd, Helena, Juan, Livia, Luciana, Quézia da Silva Moura, Rodrigo Cantanessa que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Armando Meque, Julia Zitha, Carlota Fraqueza, Lémia Picardo, Marcia Manuel, Noêmia Nhancupe, pela amizade, força, incentivo;

Ao Amâncio Joaquim pinto de Oliveira pela amizade, incentivo, força, apoio no desenvolvimento deste trabalho;

Ao Elidio Nhamona, Alexandre Tique, Cida Oliveira, Aline Amorim, Edina Mola, Andria de Paula, Aniceto Macie, Awassi Ngomane, Emanuel António, Grazielle Fonseca de Souza, Josué Bila, Maria Regina, Milton Correia, Maira Andrea Valoyes, Odete Macie, Salvador Manjate, Tomé Bambo e a Yolanda Ndwate pela amizade, incentivo e pela força;

A Dra. Doroti Garcia, Dra. Maria Helena Matté e Dr. Jorge Sampaio, pelas sugestões propostas no exame de qualificação;

A Dra. Vanessa Clemente, do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais, pela cedência de cepas que permitiram a execução deste trabalho;

A Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo pela oportunidade de realizar o curso de Pós- graduação;

A Professora Irene Soares, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia - Área de Análises Clínicas;

As secretárias de Pós-graduação e do departamento de Análises Clínicas;

Ao Instituto Fleury;

Ao Instituto de Ciências Biomédicas, pela cedência das instalações;

Ao Ministério da Defesa de Moçambique;

Ao CNPq/MCT-Mz pela oportunidade que me foi concedida para continuar os meus estudos e pelo apoio financeiro (Processo190810/2011-4);

A todos do fundo do coração: MUITO OBRIGADA!

RESUMO

NHAMBE, L. F. **Caracterização de Carbapenemases do Tipo KPC em Enterobactérias de Origem Clínica**. 2014. 64f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Atualmente, no Brasil, a produção de enzimas do tipo KPC constitui o principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae*, contribuindo para a endemicidade hospitalar da espécie. No presente estudo, foi caracterizada a produção de KPC em 38 enterobactérias que foram diferenciadas entre os grupos CESP (enterobactérias com produção induzida da β -lactamase AmpC, ex., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* e *Morganella morganii*) e não CESP (ex., *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*), pertencendo a isolados recuperados de pacientes colonizados e/ou apresentando infecção urinária, pneumonia ou bacteremia, em três centros médicos de três diferentes regiões do Brasil (Amazonas, Mato grosso, Minas Gerais), durante 2008-2013. Os isolados apresentaram resistência para cefalosporinas de amplo espectro (86,8 - 94,7%), cefoxitina (86,8%), ertapenem (89,4%), imipenem (89,4%), meropenem (84,2%), amicacina (86,8%), ciprofloxacina (84,2%), tigeciclina (42,1%, CIM₅₀= 2 μ g/ml), sulfametoxazol/trimetoprim (SXT, 60,5%) e gentamicina (57,8%). Entre bactérias do grupo CESP, os isolados de *S. marcescens* apresentaram sensibilidade para fosfomicina (CIM₅₀= 8 μ g/mL) e sulfametoxazol-trimetoprim (CIM₅₀= 1/19 μ g/mL). A produção de carbapenemase foi confirmada pelo teste de Hodge modificado e por inibição por ácido fenil borônico em 76,31 e 73,68% dos isolados do grupo CESP e não CESP, respectivamente. A presença do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada em 78,9% dos isolados clínicos e variantes do gene *bla*_{CTX-M} foram identificados em 57,89% das cepas. Cepas de *S. marcescens* e *E. aerogenes* clonalmente relacionadas por ERIC-PCR foram associadas a surtos de infecção nosocomial. Resultados do presente estudo confirmam que a produção de KPC no Brasil, ocorre em uma grande variedade de espécies de enterobactérias sendo frequentemente associada com a co-produção de ESBLs do tipo CTX-M, o que poderia favorecer a endemicidade com o subsequente estabelecimento de surtos de infecção. Um dado relevante, foi à alta resistência a fosfomicina (66,66%) associada à presença do gene *fosA2* em cepas de *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* produtores de KPC-2.

PALAVRAS CHAVE: Infecção relacionada à assistência à saúde (IRAS), resistência bacteriana, Carbapenemases, KPC, Enterobacteriaceae.

ABSTRACT

NHAMBE, L. F. **Characterization of KPC-type Carbapenemases in Enterobacteriaceae from Clinical Samples.** 2014. 64f. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Currently, in Brazil, the production of KPC-type enzymes is considered the main mechanism of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*, which has contributed for the nosocomial endemicity of this specie. In this study, the KPC production was characterized in 38 Enterobacteriaceae isolates differenced among CESP (Enterobacteriaceae with inducible production of AmpC-type β -lactamase, i.e., *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens* and *Morganella morganii*) and not CESP (*Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Proteus mirabilis*) groups recovered from colonized patients and/or with urinary tract infection, pneumonia or bacteremia, in three medical centers from different regions of Brazil (Amazonas, Mato Grosso, Minas Gerais) during 2011-2013. The isolates were resistant to broad-spectrum cephalosporins (86.8 - 94.7%), ceftazidime (86.8%), ceftiofur (86.8%), cefepime (89.4%), imipenem (89.4%), meropenem (84.2%), amikacin (86.8%), ciprofloxacin (84.2%), tigecycline (42.1%, MIC₅₀ = 2 μ g/mL), trimethoprim-sulfamethoxazole (SXT, 60.5%) and gentamicin (57.8%). *S. marcescens* isolates exhibited additional susceptibility to fosfomycin (MIC₅₀ = 8 μ g/mL) and sulfamethoxazole-trimethoprim (MIC₅₀ = 1/19 μ g/mL). Carbapenemase production was confirmed by Hodge modified test and inhibition by phenyl boronic acid in 76.31 and 73.68% of CESP and no CESP isolates, respectively. In fact, the presence of the *bla*_{KPC-2} gene was confirmed in 78.9% of enterobacterial isolates, whereas *bla*_{CTX-M} ESBL gene variants were identified in 57.89% of the strains. *S. marcescens* and *E. aerogenes* isolates were clonally related by ERIC-PCR being associated with outbreaks of nosocomial infection. Results of this study confirm that the production of KPC in Brazil occurs in a variety of species of Enterobacteriaceae co-producing CTX-M-type ESBLs, favoring the endemicity and the establishment of outbreaks. A relevant finding was the high resistance to fosfomycin (66.66%) associated with the presence of the *fosA2* gene in KPC-2-producing *E. aerogenes* and *K. pneumoniae* strains.

KEYWORDS: Healthcare associated infections (HAIs), bacterial resistance, carbapenemases, KPC, Enterobacteriaceae.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido clavulânico
AMC	Amoxicilina + Ácido clavulânico
AMI	Amicacina
APB	Ácido fenil borônico
ATB	Antimicrobiano
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CAZ	Ceftazidima
CIP	Ciprofloxacina
Cefal. III	Cefalosporinas da terceira geração
Cefal. IV	Cefalosporinas da quarta geração
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute, 2013
CFO	Cefoxitina
CPM	Cefepima
CRO	Ceftriaxona
CTX	Cefotaxima
DDS	Teste de aproximação de disco Double - Disk Screening
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético,
ERT	Ertapenem
ESBL	Betalactamase de Espectro estendido
FOS	Fosfomicina
GEN	Gentamicina
IMP	Imipenem
IRAS	Infecção relacionada à assistência à Saúde

KPC	<i>Klebsiela pneumoniae</i> carbapenemase
MBL	Metalo-beta-lactamase
MER	Meropenem
MDR	Multidroga resistentes
mg	Miligramas
MG	Minas Gerais
MH	Mueller - Hilton
mL	Mililitros
MR	Multirresistentes
OXA	Oxacilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase, do inglês: Polimease chain reaction.
SUT	Sulfa + Trimetoprima
TIG	Tigeciclina
TZB	Tazobactam
° C	Graus Celsius
µ g	Micrograma

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Enterobactérias do grupo CESP e não CESP	1
1.2 Antibióticos	4
1.3 Antibióticos beta-lactâmicos	4
1.4 Cefalosporinas	5
1.5 Carbapenêmicos	5
1.6 Fosfomicina	6
1.7 Fluoroquinolonas	8
1.8 Tigeciclina	9
1.9 Resistência bacteriana	10
1.10 β -lactamases	10
1.11 Classificação das Beta-lactamases	11
1.12 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)	13
1.13 β -lactamases Cromossômicas	13
1.14 Carbapenemases em <i>Enterobacteriaceae</i>	15
1.15 Metalo- β -lactamases	18
1.16 Disseminação da enzima KPC	18
1.17 Disseminação da enzima KPC no Brasil	18
1.18 β -lactamases na África	19
2. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivos Gerais	23
2.2. Objetivos Específicos	23
3. MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1 Amostras bacterianas e identificação	24

3.2 Condições de Cultivo _____	24
3.3 Preparo dos inóculos bacterianos _____	26
3.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos _____	26
3.4.1 Teste de disco difusão _____	27
3.4.2 Teste de diluição em ágar para determinação da CIM _____	27
3.5 Teste de Hodge modificado _____	28
3.6 Teste do ácido fenil borônico (APB) _____	29
3.8 Extração de DNA total bacteriano _____	30
3.9 Determinação de genes de resistência aos antibióticos por PCR _____	30
3.10 ERIC-PCR _____	31
3.11 Sequenciamento _____	31
4. RESULTADOS _____	33
4.1 Perfil de susceptibilidade _____	33
4.1.1 Antibiograma _____	33
4.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM) _____	38
4.2 Triagens de beta-lactamases _____	40
4.3 Detecção Molecular _____	44
4.4 Tipagem Molecular _____	46
5. DISCUSSÃO _____	48
6. CONCLUSÕES _____	52
7. REFERÊNCIAS _____	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Estrutura química de uma cefalosporina (Ceftazidima).....	5
Figura 2- Estrutura química de um carbapenêmico (Imipenem).....	6
Figura 3- Estrutura química da fosfomicina.....	7
Figura 4- Estrutura química da ciprofloxacina.....	9
Figura 5- Estrutura química da Tigeciclina.....	10
Figura 6- Desenho esquemático do transposon Tn4401.....	17
Figura 7- Mapa do Brasil mostrando a distribuição de bactérias produtoras e KPC.....	19
Figura 8- Esquema representando a disposição dos discos de antimicrobianos.....	29
Figura 9- Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i>	46
Figura 10- Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de <i>S. Marcescens</i>	47
Figura 11. Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de <i>Klebsiella pneumonia</i>	47
Figura 12. Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de <i>E. Coli</i>	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Modelo de classificação de betalactamases.....	12
Tabela 2 - β -lactamases cromossômica e a sua expressão nas enterobactérias.....	15
Tabela 3- Características das Enterobactérias do grupo CESP.....	25
Tabela 4- Características das Enterobactérias do grupo não CESP.....	26
Tabela 5- Iniciadores específicos para determinantes de resistência.....	32
Tabela 6- Perfil de susceptibilidade de bactérias do grupo CESP.....	35
Tabela 7- Perfil de susceptibilidade de bactérias do grupo não CESP.....	36
Tabela 8- Porcentagem de resistência aos antibióticos das cepas estudadas.....	37
Tabela 9a- Concentração inibitória mínima do grupo CESP.....	38
Tabela 9b- Concentração inibitória mínima do grupo CESP.....	39
Tabela 10- Concentração inibitória mínima do grupo não CESP.....	39
Tabela 11- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo CESP.....	40
Tabela 12- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo não CESP.....	41
Tabela 13- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo CESP (ANVISA, 2013).....	42
Tabela 14- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo não CESP (ANVISA, 2013).	43
Tabela 15- Avaliação dos genes de resistência e perfil clonal no grupo CESP.....	44
Tabela 16- Avaliação dos genes de resistência e perfil clonal no grupo não CESP.....	45

1. INTRODUÇÃO

As infecções relacionadas á assistência á saúde (IRAS), constituem um grave problema de saúde pública devido à ocorrência de agentes bacterianos que expressam resistência para uma ampla variedade de antibióticos. Estas infecções podem ser causadas por Enterobactérias resistentes a carbapenêmicos (ERC). Ao nível hospitalar, IRAS tem sido favorecidas pela endemicidade de espécies bacterianas expressando importantes fenótipos de resistência aos antibacterianos (e.x., produção de β -lactamases de amplo espectro e/ou carbapenemases), afetando unidades médicas onde pacientes com fatores predisponentes são suscetíveis a infecção nosocomial (Meyer & Picoli, 2011).

As infecções relacionadas á saúde, conhecidas também como infecções hospitalares, constituem preocupação para o profissional de saúde e o paciente. O aumento da taxa de morbidade, mortalidade e custos causados pelas infecções hospitalares, tem sido demonstrado através de vários estudos a nível mundial. Em países desenvolvidos, as IRAS tem sido reportadas como afectando 5 a 15% de pacientes hospitalizados em enfermarias de atendimento normal e mais de 50% em unidades de tratamento intensivo, enquanto que nos países em desenvolvimento a magnitude do problema permanece largamente subestimado (Scherbaum *et al.*, 2014).

O uso excessivo dos antibióticos acaba gerando uma pressão seletiva, o que contribui para o surgimento de cepas mais resistentes como as carbapenemases KPC ou MBL. Controlar a disseminação de enzimas KPC é difícil, uma vez que os genes que codificam para estas enzimas residem em plasmídeos mobilizáveis. Enterobacteriaceae resistentes aos carbapenêmicos representam um desafio especial, pois causam inúmeras infecções, são difíceis de tratar e têm o potencial de se espalhar dentro de estabelecimentos de saúde. Altas taxas de morbidade e mortalidade estão associadas a estes organismos (Correa *et al.*, 2013).

1.1. Enterobactérias do grupo CESP e não CESP

As enterobactérias, são bacilos gram negativos, pertencentes a família *Enterobacteriaceae*, fermentadores da glicose, anaeróbios facultativos, reduzem o nitrato a nitrito, são catalase-positiva, oxidase-negativa que podem ser encontrados na microbiota dos

humanos e dos animais. Apresentam mobilidade (flagelos peritríqueos) ou podem ser imóveis (O'hara *et al.*, 2005).

As espécies bacterianas *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providência rettgeri*, *Providência stuartii* e *Morganella morganii* são conhecidas como pertencentes ao grupo CESP e são caracterizadas por produzirem β -lactamases cromossômicas induzíveis da classe I ou AmpC que leva a perda da atividade e do espectro de ação das cefalosporinas da terceira geração, monobactâmicos e penicilinas. As bactérias pertencentes ao grupo CESP carregam intrinsecamente um gene que codifica a produção de da enzima AmpC em uma condição de indução ou superexpressão. A indução requer a presença da proteína de ligação de DNA o AmpR, sendo um processo reversível, assim que o agente indutor é removido (Calvo *et al.*, 2011, Kusahara, *et al.*, 2007; Hanson, 2003; Sader *et al.*, 2001). O gene pode permanecer sem atividade, mas quando se expõe a bactéria diante de agentes indutores, que podem ser geralmente os beta-lactâmicos, esta indução torna o gene ativo, o que leva a bactéria a produzir em grande quantidade a enzima, o que vai desencadear a resistência as cefalosporinas da segunda e terceira geração. Os principais agentes indutores são os carbapenêmicos, as cefamicinas (ex., cefoxitina) e as cefalosporinas da terceira geração. Ocorrendo a possibilidade de *in vitro* as bactérias do grupo CESP apresentarem sensibilidade a um dos antibióticos (cefalosporinas da terceira geração, monobactâmicos), o seu uso como alternativa terapêutica não pode ser considerada visto que se está diante de uma resistência intrínseca do próprio grupo (Kusahara *et al.*, 2007; Sader *et al.*, 2001)

A espécie *Serratia marcescens*, foi descrita pela primeira vez em 1819 por Bartolomeo Bizio, e foi por muitos anos considerada inofensiva até a década de 1950 e era utilizada em experimentos escolares devido à capacidade de produção de pigmento avermelhado; sendo também associado a questões históricas (Acar, 1986). A *Serratia marcescens*, é reconhecida atualmente como sendo um importante patógeno que exibe propriedades invasoras e que apresenta resistência a muitos antibióticos, mediado por genes contidos no plasmídeo. É resistente intrinsecamente a ampicilina, macrolídeos e cefalosporinas de primeira geração e a polimixina. Nas infecções relacionadas à saúde, a *Serratia marcescens* é citada como sendo um importante patógeno oportunista, sendo de grande realce as bacteremias que estão relacionadas a cateter, infecções de feridas e infecções do trato urinário. É um agente colonizador do trato gastrointestinal e da pele em recém-nascidos e em pessoas adultas; e também é comumente encontrado no trato respiratório e urinário de adultos hospitalizados. Os pacientes mais susceptíveis, a infecção por *Serratia marcescens*, são aqueles com comorbidades, incluindo

transplantados, neutropênicos, em ventilação mecânica e aqueles internados em UTI, com longos períodos de hospitalização. A evolução das infecções está associada a altas taxas de mortalidade. O diagnóstico deve ser rápido e preciso devido ao risco de disseminação, seu potencial de gravidade e à limitação terapêutica (Carvalho *et al.*, 2010).

A *Serratia marsecens*, difere de outros patógenos produtores de beta-lactamases por apresentar susceptibilidade as cefalosporinas da terceira (ceftazidima) e quarta geração (cefepima), sendo que se mantém resistente a quase todos os antibióticos de espectro estendido (Bush, 2010).

A espécie *Enterobacter aerogenes* é um agente de infecção hospitalar que tem mostrado resistência aos antibióticos beta-lactâmicos durante a terapia. É a terceira principal causa de infecções do trato respiratório a seguir a *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (Thiolas *et al.*, 2005; Bornet *et al.*, 2000).

Enterobactérias do grupo não CESP são representadas por espécies bacterianas que não possuem o gene AmpC cromossomal (ex., *K. pneumoniae*) ou cuja produção não é induzida (ex., *Escherichia coli*) (tabela 2).

A bactéria *Klebsiella pneumoniae*, foi a primeira bactéria a ser descrita como portadora do gene bla_{KPC} , tendo depois sido encontrado em outras espécies de bactérias a nível mundial (Yigit *et al.*, 2001). É um dos principais patógenos responsáveis pelos surtos nosocomiais (infecções do trato urinário, infecções dos tecidos moles, pneumonia e septicemia), devido á dispersão de diferentes clones associados a infecções oportunistas, ocorrendo em pacientes com baixas defesas imunológicas causadas por diabetes, alcoolismo ou pacientes hospitalizados. No ambiente hospitalar, as principais fontes de isolamento de *Klebsiella* são amostras de sangue, equipamento hospitalar contaminado, trato respiratório ou trato gastrointestinal de pacientes. O aumento significativo de casos de infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae*, é consequência do aumento de casos de espécies MDR, principalmente as produtoras de ESBL associado ao uso antibiótico, especialmente de cefalosporinas (Berrazeg *et al.*, 2013; Podschun & Ullmann, 1998).

A bactéria *Escherichia coli* é uma das principais causas de infecções adquiridas em ambiente hospitalar, sendo a segunda espécie mais disseminada que produz a enzima KPC carbapenemase. Esta bactéria esta associada a infecções de trato intestinal e extra intestinal em humanos e animais, onde é frequentemente isolada na urina e no sangue (Jafri *et al.*, 2014; Moghaddam *et al.*, 2014).

1.2 Antibióticos

Do ponto de vista de classificação, os agentes antimicrobianos, são diferenciados como sendo quimioterápicos e antibióticos, sendo que ambos tem atividade bactericida ou bacteriostática em função de seu mecanismo de ação. Agentes antimicrobianos podem inibir a síntese de proteínas, se ligando aos ribossomos, ou unem-se aos alvos celulares provocando a morte celular inibindo, por exemplo, a síntese de parede celular (Madigan et al., 2010).

O mecanismo de ação dos antibacterianos pode ser definido como: inibidores de síntese de parede celular: glicopeptídeos, fosfomicina, bacitracina, beta-lactâmicos; inibidores de síntese proteica: tetraciclina, tigeciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos; inibidores da síntese de DNA: Quinolonas (ácido nalidixico, ciprofloxacina); compostos que alteram o metabolismo celular: sulfas e trimetopim, e; agentes que afetam a integridade da membrana citoplasmática: polimixinas.

1.3 Antibióticos beta-lactâmicos

Antibióticos beta-lactâmicos são caracterizados por apresentar um anel beta-lactâmico na sua estrutura molecular. O uso dos antibióticos beta-lactâmicos é recomendável por possuírem alta eficácia no seu mecanismo de ação e por apresentarem baixa toxicidade. Nesta classe, encontram-se as penicilinas, cefalosporinas de 1ª (cefalotina e cefalexina), 2ª (cefuroxima), 3ª (cefotaxima, ceftriaxona, ceftiofur e ceftazidima) e 4ª geração (cefepime, ceftazidima), cefalosporinas de 5ª geração (ceftobiprole e ceftaroline); monobactâmicos (aztreonam) e os carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem e doripenem). Este grupo de antibióticos inibe a síntese da parede celular bacteriana interferindo na sua integridade, essencial para o crescimento e desenvolvimento bacteriano. O principal mecanismo de ação destes compostos ocorre na atividade da transpeptidase, na fase de biossíntese do peptidoglicano. Estes compostos contêm em sua estrutura um anel beta-lactâmico, que interage com proteínas denominadas PBPs (*Penicillin-Binding Proteins*), inibindo a enzima envolvida na reação de transpeptidação, responsável pela ligação entre as cadeias de tetrapeptídeos do peptidoglicano.

Assim, não é possível a formação das ligações entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes de peptideoglicano, causando perda de rigidez da parede celular (Livermore, 1995; Trabulsi & Alterthum, 2008).

1.4 Cefalosporinas

As cefalosporinas (figura 1) tem um amplo espectro de ação no combate de um grande número de infecções bacterianas, espectro que tem evoluído farmacologicamente caracterizando cefalosporinas de primeira à quinta-geração (Bush & Jacoby, 2010). No grupo dos antibióticos beta-lactâmicos, são os mais usados como alternativa terapêutica, apresentando níveis elevados de resistência.

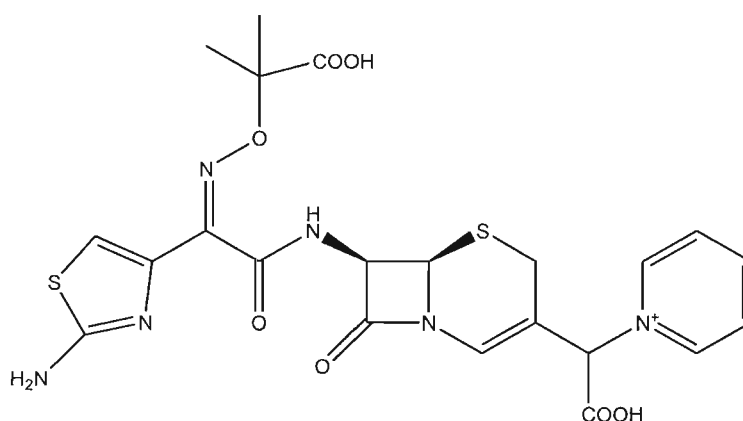


Figura 1- Estrutura química de uma cefalosporina (ceftazidima). Fonte: Papp-Wallace *et al.*, 2013.

1.5 Carbapenêmicos

Em 1976, foi descoberta a tienamicina, a partir de uma bactéria do solo (*Streptomyces cattleya*), anunciando a nova era de agentes beta-lactâmicos, os carbapenêmicos. Foram desenvolvidas pesquisas até que se encontrou um derivado químico estável da tienamicina, o imipenem, um antibiótico beta-lactâmico que possuía grande atividade contra bactérias gram-positivas, bem como contra as *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Bacteroides* (Rapp, 2012). Os antibióticos carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) pertencentes a classe dos beta-lactâmicos, resultam da substituição de um átomo

de enxofre na estrutura central da penicilina, por um átomo de carbono (figura 2.). Devido ao seu amplo espectro de ação, são usadas contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e para tratar infecções graves. Os carbapenêmicos, são de grande eficácia no combate a quase todas bactérias gram-negativas por serem estáveis e eficazes á ação das β -lactamases de amplo espectro (Greenwood, 2003). Tem-se verificado várias formas de resistência a atividade dos carbapenêmicos sendo de salientar a relação entre as β -lactamases cromossômicas (AmpC) ou de amplo espectro (ESBL) com a impermeabilidade da membrana, alteração de porinas ou a produção de bombas de efluxo (Dienstmann *et al.*, 2010; Peloso *et al.*, 2010; Raghunathan *et al.*, 2011; Stranieri *et al.*, 2011).

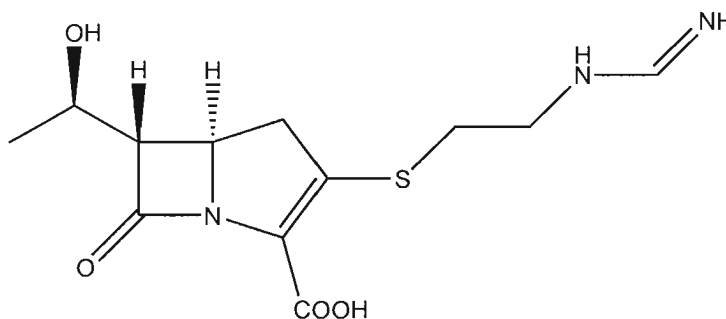


Figura 2- Estrutura química de um carbapenêmico (Imipenem). Fonte: Papp-Wallace *et al.*, 2013.

1.6 Fosfomicina

Vários relatos sobre o aumento da resistência as fluoroquinolonas e a produção de ESBL e/ou carbapenemases constituem uma preocupação a nível mundial, sendo que as alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções causadas pelas bactérias resistentes têm sido muito limitadas. A fosfomicina tem sido citada como uma alternativa terapêutica viável para o combate de patógenos MDR, principalmente para infecções do trato urinário (Hou *et al.*, 2013).

A fosfomicina é um derivado do ácido fosfônico (*cis-1,2-epoxypropylphosphonic acid*), (figura 3) tem a propriedade de agir, contra vários agentes patogênicos gram-positivos e gram-negativos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*, e/ou bactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido. Infelizmente, a resistência à fosfomicina desenvolve-se rapidamente em caso de monoterapia e, portanto, as combinações com outros antimicrobianos

são preferidos na prática clínica para o tratamento de infecções graves (Hou *et al.*, 2013; Souli *et al.*, 2011).

A fosfomicina ($C_3H_7PO_4$), descoberta em 1969, é um metabolito secundário produzido por espécies de *Streptomyces* (figura 3). Ela tem ação bactericida inibindo a biossíntese da parede celular bacteriana, inativando de forma irreversível a enzima MurA. O seu modo de ação é baseado na sua analogia ao fosfoenolpiruvato, ligando-se à UDP-N-acetilglucosamina-3-O-enolpiruvil transferase (MurA), enzima que participa na etapa inicial da síntese do peptideoglicano, no citoplasma, antes da etapa de inibição por glicopeptídeos e beta-lactâmicos, tendo um amplo espectro de atividade. MurA catalisa a reação entre UDP-N-acetilglucosamina e o fosfoenolpiruvato.

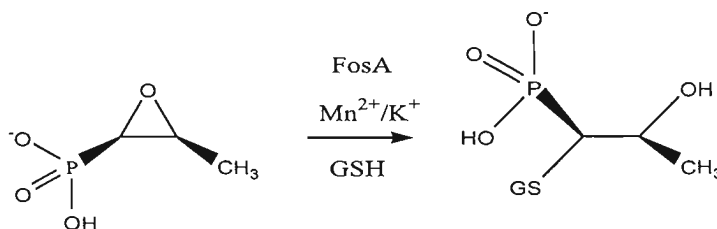


Figura 3. Estrutura química da fosfomicina e modificação enzimática da fosfomicina pela enzima FosA. Fonte: Castañeda-García *et al.*, 2013.

O tratamento, via oral, com a fosfomicina tem sido efetivo contra infecções urinárias causadas por ESBL produzidas por *Escherichia coli*. Embora, já seja administrada em pacientes há muitos anos, continua a apresentar uma baixa taxa de resistência em *Escherichia coli* (1-3%) a nível mundial e não apresenta co-resistência quando prescrito com outro grupo de antibióticos (Hou *et al.*, 2013; Raz, 2012).

Na literatura, existe a descrição de três possíveis mecanismos de resistência relacionados com: i) impermeabilidade decorrente de mutações cromossomais que afetam os mecanismos de transporte da glicosa-6-fosfato ou o glicerol-3-fosfato; ii) modificação do alvo MurA e; iii) resistência adquirida mediada por plasmídeos que codificam a expressão de enzimas que inativam a fosfomicina, enzimas conhecidas como FosA, FosA3, FosB e FosC2. Estas enzimas foram caracterizadas como glutationa-S-transferases (GSH) que na teoria inativam a droga por abertura do anel epóxido através da ligação à cisteína na glutationa (figura 3). A atividade destas enzimas é promovida pela presença de cátions como Fe^{+2} e Mn^{+2} . Por outro lado, enquanto FosA tem sido exclusivamente identificada em bactérias

gram-negativas, FosB tem sido encontrada em gram-positivos, sendo esta uma tiol-transferase dependente de Mg^{+2} . Diferente de FosA, FosB utiliza a cisteína ao invés da glutatona, para inativar a fosfomicina. FosA3 e FosC2 foram identificados em *Escherichia coli* produtoras de CTX-M no Japão. Como mecanismo de resistência, algumas bactérias podem receber plasmídeos ou transposons que codificam resistência a fosfomicina, tendo como exemplo a *Serratia marcescens* (Castañeda-García *et al.*, 2009; Hou *et al.*, 2013; Neu & Gootz, 1996).

1.7 Fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas fazem parte dos agentes antibacterianos sintéticos, de amplo espectro, com funções bactericidas, que inibem as topoisomerasas bacterianas. As fluoroquinolonas tem ação contra patógenos gram-positivos e gram-negativos e apresentando uma boa absorção oral e sistêmica. São usadas no tratamento de infecções do trato respiratório, infecções da pele e tecidos moles, doenças sexualmente transmissíveis, infecções do trato urinário, osteomielite e infecções entéricas (Fàbrega *et al.*, 2009).

O ácido nalidíxico foi o primeiro antimicrobiano da classe das quinolonas descrita, mas com um espectro de ação limitado apenas em bactérias gram-negativas. A estrutura das quinolonas foi modificada molecularmente, como forma de melhorar a suas propriedades antimicrobianas e farmacocinéticas, tendo surgido a ciprofloxacina, pelo acréscimo de um átomo de flúor. A primeira fluoroquinolona foi a norfloxacina que foi sintetizada em 1978, mas só em 1986 é que se tornou clinicamente viável (Fàbrega *et al.*, 2009).

A ciprofloxacina (figura 4), é a primeira fluoroquinolona de amplo espectro introduzida em 1987, tendo surgido entre outras as ofloxacina, levofloxacina, enrofloxacina, gatifloxacina, que também atua contra patógenos gram-negativos e gram-positivos e mostram uma melhor absorção oral e sistêmica (Fàbrega *et al.*, 2009, Zhanel *et al.*, 2002).

Levofloxacina, L-isômero da ofloxacina, tem sido recomendada para o tratamento de pneumonia comunitária e hospitalar, uma vez que tem apresentando uma excelente farmacocinética (PK) e farmacodinâmica (PD), amplo espectro de atividade e tolerância satisfatória (Torres & Liapikou, 2012). A resistência às quinolonas, tem tido como uma das causas o uso descontrolado e abusivo dos antimicrobianos (Acar & Goldstein, 1997; Biedenbach *et al.*, 2006; Chenia *et al.*, 2006; Naheed *et al.*, 2004).

As fluoroquinolonas agem inibindo a síntese de DNA, tendo como alvo duas topoisomerases essenciais do tipo II às enzimas DNA girase e topoisomerase IV — enzimas que regulam o super enrolamento do DNA e mediam a segregação das fitas replicadas de DNA. Mutações cromossômicas na região gênica referente ao sítio ativo destas enzimas constituem o principal mecanismo de resistência às quinolonas (Neu & Gootz, 1996). A atividade antimicrobiana de fluoroquinolonas é baseada na inibição das topoisomerases, enzimas heterotetraméricas compostas por duas subunidades A e B, codificadas pelos genes *gyrA* e *gyrB* na DNA girase, e pelos genes *parC* e *parE* na topoisomerase IV, respectivamente (Guimarães, 2010; Kim, *et al.*, 2010; Nakamura *et al.*, 1989; Pan & Fisher, 1996).

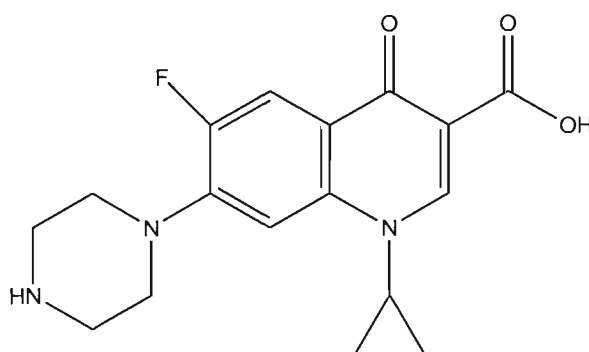


Figura 4- Estrutura química da ciprofloxacina. Fonte: Low *et al.*, 2002.

1.8 Tigeciclina

O aumento da resistência às tetraciclinas levou a que um novo antibiótico da classe das gliciciclinas fosse sintetizado. A tigeciclina uns antibióticos bacteriostáticos, que inibe a síntese proteica, sendo o primeiro da classe das gliciliclinas disponível clinicamente (Pankey, 2005). É um antibiótico de amplo espectro, semissintético, derivado da minociclina, que exhibe elevada atividade *in vitro* contra uma variedade de bactérias gram-negativas e gram-positivas (figura. 5). A tigeciclina apresenta atividade contra bactérias que são resistentes aos beta-lactâmicos e quinolonas (Kelesidis *et al.*, 2008).

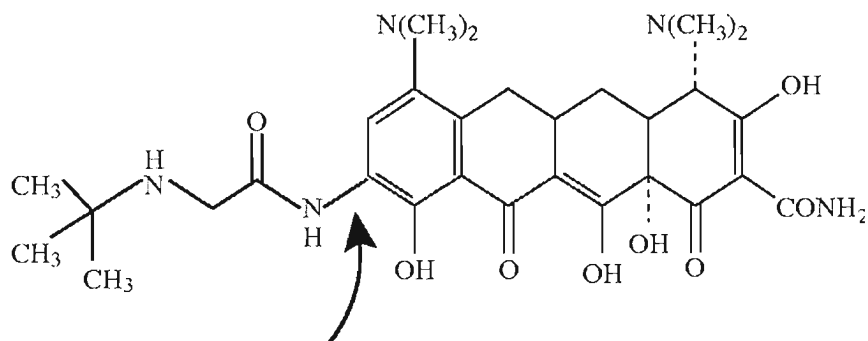


Figura 5- Estrutura química da Tigeciclina. A flecha indica adição da cadeia lateral 9-t-butil-glicil-amidociclina na posição D-9. Fonte: Pankey, 2005.

1.9 Resistência bacteriana

As bactérias podem apresentar mecanismos de defesa contra a ação dos antimicrobianos que podem ser intrínsecos ou adquiridos. No mecanismo de resistência intrínseca, as bactérias têm propriedade natural de resistência. No mecanismo adquirido as bactérias, adquirem propriedades de resistência o que as torna capazes de multiplicar-se mesmo na presença de altas concentrações de antibióticos que podem ser adquiridas por mutações ou transmissão de material genético. Dessa maneira, a resistência bacteriana torna-se um mecanismo adaptativo para a preservação da espécie, onde o uso contínuo de antibióticos tem contribuído de forma preponderante para o aumento da resistência de bactérias geneticamente aptas para adquirir estes determinantes de resistência. Dos diversos mecanismos de resistência destacam-se: alteração na permeabilidade da membrana externa, impedindo a entrada do antibiótico na célula; hiperexpressão das bombas de efluxo que expulsam o antibiótico para fora da célula; produção de enzimas que degradam ou inativam a ação do antibiótico; uma mutação do sítio alvo que impede a ligação do antibiótico (Cotrim *et al.*, 2012; Tenover, 2006).

1.10 β -lactamases

Desde a descoberta da penicilina nos anos 80, as bactérias gram-negativas foram se tornando eficientes, em escapar da ação letal da atividade dos antibióticos beta-lactâmicos,

principalmente através da produção de β -lactamases (Rapp *et al.*,2012). A produção de enzimas, por parte de algumas espécies da família Enterobacteriaceae, constitui um dos principais mecanismos de resistência aos antibióticos. As β -lactamases são enzimas que protegem as bactérias dos efeitos letais dos antibióticos, isto é; que tem a propriedade de conferir resistência aos antibioticos beta-lactâmicos através da hidrólise do atomo 4 do anel beta-lactâmico. As β -lactamases degradam os antimicrobianos beta-lactâmicos, tais como cefalosporinas de amplo espectro (ceftazidima, cefotaxima, cefepima, entre outros) e os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) (Meyer & Picoli, 2011).

1.11 Classificação das Beta-lactamases

De acordo com a localização, os genes que codificam a produção de beta-lactamases podem ser cromossômicos ou plasmidiais. Sendo que podem existir a co-produção de β -lactamases secundárias, quando uma bactéria que expressa uma beta-lactamase cromossômica passa também a expressar outra beta-lactamase codificada por genes inseridos em plasmídeos ou transposons (Livermore, 1995).

Do ponto de vista molecular (Ambler), as beta-lactamases são classificadas com base na sequência de aminoácidos em A, B, C, D (tabela 1). As β -lactamases A, C e D, possuem um aminoácido serina no centro ativo da enzima; sendo que as β -lactamases da classe B são designadas de metalo-beta-lactamases (MBL), porque dependem do zinco como cofator de atividade enzimática (Bush & Jacoby, 2010; Tenover, 2006).

Até o momento, as beta-lactamases de interesse clínico e que apresentam espectro de ação distinto sobre os fármacos beta-lactâmicos são quatro: beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalo-beta-lactamases (MBL), beta-lactamases classe C (AmpC) e beta-lactamases classe D (OXA). As ESBLs hidrolisam a cadeia oximino-beta-lactâmico, degradando penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos, e são alvo de inibidores comerciais de beta-lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Meyer & Picoli, 2011; Jiménez *et al.*, 2014).

Tabela 1- Modelo de classificação das beta-lactamases.

Classe molecular Ambler/ 1980	Grupo funcional Bush-Jacoby-Medeiros/1995	Grupo funcional Bush-Jacoby/2009	Características ¹
C	1	1	Bactérias gram negativas, produzem enzimas cromossômicas e plasmidiais que não são inibidas pelo AC, TZB e EDTA. Inibem os antibióticos β-lactâmicos. Não inibem os carbapenêmicos.
	NI	1e	
A	2a	2a	Enzimas inibidas por AC ou TZB. Conferem resistência as benzilpenicilinas e as cefalosporina. São incluídas neste grupo as TEM-1, SHV-1.
	2b	2b	Enzimas inibidas por AC ou TZB. Conferem resistência aos oximino β-lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima) e aztreonam. Inclui-se neste grupo a CTX-M-15.
	2be	2be	
	2br	2br	
	NI	2ber	Enzimas que hidrolisam oximino β-lactâmicos e são resistentes a AC, TZB e Sulbactam.
	2c	2c	Enzimas inibidas por AC e TZB. Hidrolisam as carbapenincilinas
	NI	2ce	Hidrolisam a cefepima, carbenicilina e são inibidas pelo AC ou TZB.
	2e	2e	Enzimas inibidas pelo AC e hidrolisam cefalosporinas
	2f	2f	Enzimas inibidas pelo AC. Hidrolisam carbapenêmicos, cefamicinas. Inclui-se neste grupo o KPC-2
	D	2d	2d
NI		2de	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina) e aos oximino β-lactâmicos. Moderadamente inibidas pelo AC e TZB
NI		2df	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina) e aos carbapenêmicos. Moderadamente inibidas por AC ou TZB
B	3	3a	Enzimas pertencentes ao grupo das metalo-betalactamases inibidas por EDTA. Responsaveis pela resistência aos carbapenêmicos, β-lactâmicos excepto os monobactâmicos.
	3	3b	
NI	4	NI	NI

Nota: Tabela adaptada da original de Bush & Jacoby, 2010. NI: Não investigado

¹ AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam.

1.12 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

As ESBLs são enzimas produzidas por bactérias gram-negativas e são responsáveis pelo aumento da resistência aos antibióticos, causando inúmeros problemas na terapêutica bacteriana. Em 1983, foi descrita pela primeira vez, o caso de plasmídeos expressando β -lactamases capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro a qual receberam o nome de ESBL em *Serratia marcescens* e *Klebsiella pneumoniae*. Pertencem a classe molecular A de Ambler, grupo 2 de Bush (tabela 1). Atualmente, mais de 200 tipos de ESBL já foram identificados a nível mundial, sendo a maior parte encontrada em espécies da família Enterobacteriaceae (<http://www.lahey.org/Studies/>).

O surgimento da resistência às cefalosporinas de amplo espectro foi associada à presença de β -lactamases codificadas por genes (*bla*) carregados por plasmídeos móveis, que se disseminarão rapidamente entre bactérias de espécie diferente ou entre bactérias da mesma espécie. As ESBLs são enzimas que hidrolisam as penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. A maioria das enzimas ESBLs deriva de variantes TEM (Temoneira), SHV (variante sulfidril) e CTX-M (cefotaximase). CTX-M foi pela primeira vez reportada na Alemanha em 1989 tendo sido encontrada em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* bem como em outras espécies da família Enterobacteriaceae. Muitas bactérias produtoras de ESBL, podem expressar β -lactamases cromossômicas do tipo AmpC e podem co-expressar resistência aos aminoglicosídeos. A relação entre a produção de ESBL e a resistência às fluoroquinolonas também é um fenômeno comum.

Desde a década de 2000 que tem se registado um aumento significativo da disseminação das ESBL do tipo CTX-M em relação às outras enzimas, sendo que a *Escherichia coli* é descrita como a principal produtora de CTX-M (Arnold *et al.*, 2011; Bush & Jacoby 2010; Bradford, 2001; Cantón, 2006; Jiménez *et al.*, 2014; Livermore, 1995; Moghaddam, 2014; Rupp & Fey, 2003).

1.13 β -lactamases Cromossômicas

As β -lactamases cromossômicas do tipo AmpC, conferem resistência as cefalosporinas da terceira geração estão sempre presentes nas enterobactérias, exceto em *Salmonella* spp., variando na quantidade, modo de produção e na sua contribuição para a resistência. A

expressão da enzima pode ser induzível a um alto ou baixo nível, de acordo com a espécie e a cepa (tabela 2). A primeira beta-lactamase cromossômica foi identificada em *Escherichia coli*, anos antes da introdução da penicilina na clínica (Bradford, 2001). Adicionalmente, quando se começou a administrar a penicilina, surgiram casos de resistência da bactéria *Staphylococcus aureus*, a este antibiótico, devido à produção de penicilases codificadas em plasmídeos móveis; tendo se verificado a rápida disseminação desta beta-lactamases entre isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e outras espécies de *Staphylococcus* (Bradford, 2001).

A produção de β -lactamases cromossômicas do tipo AmpC, pode ser constitutiva ou induzível, dependendo dos níveis de expressão do gene AmpC. Quando ocorre a ausência de genes reguladores do tipo *ampD* ou *ampR* (gene se expressa de forma constitutiva), o gene *bla_{AmpC}* se expressa a níveis basais muito baixos, o que confere resistência natural a espécie (resistência intrínseca) ou pode expressar-se a níveis muito elevados devido a mutações ou pela aquisição de promotores fortes que contribuem para a expressão do gene *bla_{AmpC}* (Calvo *et al.*, 2011).

Enterobacterias com cefalosporinases induzíveis como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providência rettgeri*, *Providência stuartii* e *Morganella morganii* podem-se tornar resistentes as cefalosporinas e aos monobactâmicos pela superprodução de beta-lactamases cromossômicas do tipo AmpC. Em *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *Salmonela spp.*, que tem ausência de beta-lactamases cromossômicas, esta resistência é expressa por plasmídeos que codificam cefalosporinases do tipo AmpC.

Escherichia coli, possui genes que codificam beta-lactamases cromossômicas do tipo AmpC não induzíveis, que são regulados por promotores fracos, com atenuadores fortes o que leva a que se produza baixas quantidades cefalosporinases. Plasmídeos expressando cefalosporinases do tipo AmpC, são derivadas de cromossomas que codificam beta-lactamases do tipo AmpC de bactérias como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providência rettgeri*, *Providência stuartii*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei* e *Aerormonas*. Estas enzimas não são inibidas por inibidores comerciais de β -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam, mas são inibidas por ácido borônico e seus derivados (ácido fenil borônico) e cloxacilina. Os genes são codificados em plasmídeos contendo outros genes de resistência a antibióticos adicionais, o que contribui para poucas opções terapêutica (Pitout *et al.*, 2010).

A expressão do gene cromossômico AmpC nestas bactérias (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter spp.*, *Serratia spp.*, *Providência rettgeri*, *Providência stuartii* e *Morganella*

morganii), é induzida por antibióticos beta-lactâmicos como o imipenem e a cefoxitina, mas fracamente induzida pelas cefalosporinas de terceira ou quarta geração (Hanson, 2003; Calvo *et al.*, 2011, Kusahara *et al.*, 2007; Sader *et al.*, 2001).

Tabela 2- β -lactamases cromossômica e a sua expressão nas enterobactérias.

Espécie	β -lactamase	Classe molecular (Ambler)	Grupo funcional (Bush)	Modo de expressão			
				Induzível	Constitutivo		
				Mínima	Média	Alta	
CESP							
<i>Citrobacter freundii</i>	AmpC	C	1	+	Rara	-	Frequente
<i>Enterobacter spp.</i>	AmpC	C	1	+	Rara	-	Frequente
<i>Serratia spp.</i>	AmpC	C	1	+	-	-	Frequente
<i>Providência spp.</i>	AmpC	C	1	+	Rara	-	Rara
<i>Morganella morganii</i>	AmpC	C	1	+	-	-	Frequente
Não CESP							
<i>Escherichia coli</i>	AmpC	C	1	-	+	-	Rara
<i>Shigella spp.</i>	AmpC	C	1	-	+	-	Rara
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	SHV-1	A	2b	-	-	+	Rara
<i>Klebsiella oxytoca</i>	K1	A	2be	-	-	+	Frequente
<i>Proteus vulgaris</i>	Cefuroximase	A	2e	+	-	-	Rara
<i>Proteus penneri</i>	Cefuroximase	A	2e	+	-	-	Rara
<i>Proteus mirabilis</i>		^a	^a	-	+	-	-

Nota: Tabela adaptada da original de Livermore, 1995; (^a) não definida; (+) modo normal de expressão da enzima, típico da espécie; (Freq.) frequentemente encontrada, quantidade varia de 10 a 50% de acordo com local; (rara) menor que 10%.

1.14 Carbapenemases em *Enterobacteriaceae*

O surgimento rápido de penicilases produzidas por bactérias gram-negativas e gram-positivas, levou a que se desenvolvessem os antibióticos beta-lactâmicos, mas a produção de plasmídeos expressando ESBL e ou AmpC, resultou na resistência a estas drogas.

Os antibióticos carbapenêmicos são os únicos agentes beta-lactâmicos ativos contra cepas produtoras de ESBL, e muito provavelmente seu uso excessivo resultou no surgimento de resistência em enterobacteriaceae. Como resultado, dois tipos distintos de carbapenemases foram identificados, as metalo-beta-lactamases e as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (Rapp *et al.*, 2012).

As carbapenemases são enzimas produzidas por bactérias da família Enterobacteriaceae, que podem ter a propriedade de alterar a estrutura da molécula do antibiótico, de modo a torná-lo inativo contra aquele microrganismo (Arnold *et al.*, 2011).

Mundialmente, nas enterobactérias, são encontradas 3 grandes classes de carbapenemases: i) as metalo-beta-lactamases, as mais comuns encontradas em enterobactérias são IMP, VIM e NDM; ii) as oxa-carbapenemases, sendo a mais detectada em enterobactérias a OXA-48; iii) as carbapenemases do tipo KPC (ANVISA, 2013).

As carbapenemases pertencem às classes moleculares de Ambler, denominadas A, B e D. As carbapenemases são também designadas serino-carbapenemases por possuírem no seu centro ativo o aminoácido serina. As do grupo A, incluem membros SME, IMI, NMC, GES e a família das KPCs (tabela 1). As enzimas KPC, pertencem, portanto a classe molecular A e ao grupo 2F de Bush, Jacoby e Medeiros. As carbapenemases KPC são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, e hidrolisam uma grande variedade de beta-lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e os carbapenêmicos. Atualmente, elas são produzidas simultaneamente com outras beta-lactamases, o que torna difícil a identificação da enzima por métodos apenas fenotípicos. As KPCs foram pela primeira vez encontradas em *Klebsiella pneumoniae*, sendo que o gene *bla*_{KPC} pode ser localizado em plasmídeos móveis. Atualmente, o gene *bla*_{KPC} tem sido identificado em outras espécies como *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp, e *Salmonella* (Bush & Jacoby, 2010; Cai *et al* 2008; Dienstmann *et al.*, 2010; Nogueira *et al.*, 2009).

A enzima tipo KPC pertencente à classe A de Ambler, que hidrolisa os carbapenêmicos, foi assim denominada de KPC-1 por ter ocorrido pela primeira vez na bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Mais tarde outras enzimas foram descritas, a KPC-2 e a KPC-3. Posteriormente, estudos moleculares demonstraram que por erros de sequenciamento, a KPC-1 e a KPC-2 eram a mesma variante, sendo assim, eliminada da nomenclatura a variante KPC-1 (Rapp *et al.*, 2012). Inicialmente, a KPC-1 diferenciou-se da KPC-2, porque apresentava na posição 175 um aminoácido que é a serina, sendo que a KPC-2 apresentava na mesma posição um aminoácido que é a glicina. Mais tarde esta diferença foi corrigida confirmando-se que KPC-1 e KPC-2 possuíam a mesma estrutura (Yigit *et al.*, 2008). A KPC-3 difere-se da KPC-2 apresenta na posição 272 a histidina enquanto que a KPC-1 e a KPC-2 apresentam a tirosina. Os genes que codificam essas enzimas podem ser tanto cromossomais assim como plasmidiais (Hossain *et al.*, 2004).

Atualmente, existem 21 variantes de KPC (KPC-2/KPC-22) (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>), sendo que cada variante difere uma da outra pela substituição de 3 aminoácidos (Rapp *et al.*, 2012). A variante KPC-2 tem sido

identificada em *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* spp. KPC-3 tem sido identificada em *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*.

A enzima KPC é codificada pelo gene bla_{KPC} , cuja disseminação geográfica e entre espécies, tem sido favorecida pela sua localização no transposon Tn4401 (figura 6), o qual é frequentemente associado ao Tn1331, um transposon contendo bla_{OXA-9} e bla_{TEM-1} (Correa *et al.*, 2013; Cury *et al.*, 2012; Cuzon *et al.*, 2011; Naas *et al.*, 2008; Rice *et al.*, 2008).

O transposon Tn4401, é um elemento genético que é capaz de se inserir em plasmídeos de bactérias gram-negativas. Plasmídeos portadores de bla_{KPC} são muitas vezes associados com determinantes de resistência para outros antibióticos e mesmo outros genes codificando beta-lactamase de amplo espectro como CTX-M (Arnold *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2008; Dienstmann *et al.*, 2010; Raghunathan *et al.*, 2011; Rossi & Andreazzi, 2005).

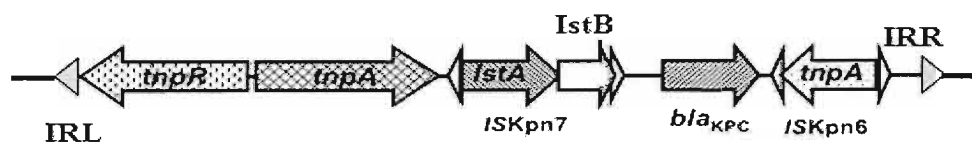


Figura 6- Desenho esquemático do transposon Tn4401. O posicionamento das setas indica a direção da transcrição dos genes, apresentando duas sequências repetidas invertidas esquerda (IRL) e direita (IRR), gene que codifica a resolvase (*tnpR*), gene que codifica a transposase (*tnpA*), *ISKpn7* que é a sequência de inserção montante (*IstA* e *IstB*) do gene bla_{KPC-2} , gene bla_{KPC-2} e *ISKpn6* que é o gene de inserção a jusante do gene bla_{KPC-2} (Adaptado de Cuzon *et al.*, 2011).

A resistência a antibióticos carbapenêmicos mediada pela enzima KPC em enterobactérias tem emergido mundialmente contribuindo para o aumento das infecções hospitalares, sendo o principal mecanismo de resistência aos beta-lactâmicos em espécies como *K. pneumoniae*, e constituindo um dos principais problemas no tratamento de infecções causadas por bactérias gram-negativas. Como resultado, existe atualmente um crescente aumento nas infecções causadas por gram-negativos para os quais não existem opções terapêuticas adequadas (Bratu *et al.*, 2005; Castro *et al.*, 2009; Meyer & Picoli, 2011).

1.15 Metallo- β -lactamases

As Metallo- β -lactamases são carbapenemases que pertencem à classe B de Ambler (tabela 1) e diferem das outras carbapenemases pela utilização do zinco no sítio ativo para facilitar a hidrólise. Estas carbapenemases são encontradas em espécies de *Pseudomonas* e muito raramente ocorrem em enterobactérias. Variantes VIM e IMP são metallo-beta-lactamases mundialmente encontradas em espécies da família Enterobacteriaceae. Degradam todos os beta-lactâmicos, sendo que *in vitro* não degradam o aztreonam, sendo inibidas pelo EDTA e pelo ácido 2-mercapopropiônico (Meyer & Picoli, 2011).

Em 2009, uma nova carbapenemase foi descoberta a NDM (New Deli Metallo beta-lactamase) que foi primeiramente encontrada em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, num paciente na Suíça, que havia recebido cuidados médicos na Índia e não tardou a ser reconhecido como um importante mecanismo de resistência em Enterobacteriaceae no Reino Unido (Yong *et al.*, 2009).

1.16 Disseminação da enzima KPC

A enzima KPC foi identificada pela primeira vez em 1996, em *Klebsiella pneumoniae*, na Carolina do Norte, Costa Leste dos Estados Unidos, daí o nome recebido, mas a descrição da enzima em isolados de *Klebsiella pneumoniae* foi publicado apenas em 2001. Rapidamente essa enzima disseminou-se para vários países a nível mundial, como Israel, China e Grécia. A Colômbia, em 2006, foi o primeiro país do continente sul americano, a registrar a ocorrência de casos de KPC-2, em isolados de *Klebsiella pneumoniae* (Beirão *et al.*, 2011; Tsakris *et al.*, 2009).

1.17 Disseminação da enzima KPC no Brasil

Até ao ano de 2005 a distribuição geográfica da enzima KPC se circunscrevia apenas a costa leste dos Estados Unidos. A enzima KPC carbapenemase disseminou-se rapidamente, a maioria pertencente ao clone ST258 e recentemente, tornou-se umas das preocupações emergentes quanto à saúde pública mundial. No Brasil, a primeira ocorrência de KPC, deu-se em São Paulo em 2005. Em 2007 foram detectados casos em Recife e em 2008 no Rio de

Janeiro tendo-se disseminado rapidamente por quase todo o território brasileiro (Beirão *et al.*, 2011; Cely *et al.*, 2011; Tsakris *et al.*, 2009).

No Brasil, bactérias produtoras de carbapenemases foram registradas pela primeira vez em 2005, mas somente em 2011 elas passaram a causar surtos mais graves no país (figura 1) (Chang *et al.*, 2013; Cotrim *et al.*, 2012; Pavez *et al.*, 2009). O primeiro surto de infecção nosocomial por KPC ocorrido em 2009, descrito num hospital brasileiro foi reportado em 2011 (Cely *et al.*, 2011).

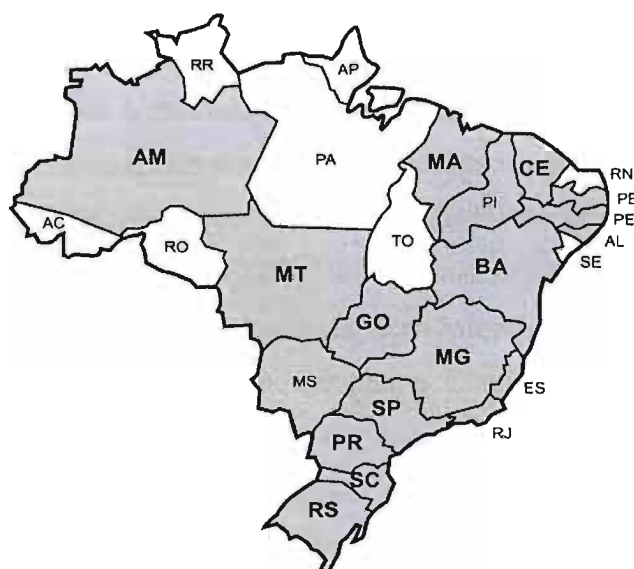


Figura 7- Mapa do Brasil mostrando a distribuição de bactérias produtoras de KPC. Os dados foram extraídos a partir de um levantamento no *SciFinder* (<https://scifinder.cas.org>), *PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) e *Scielo* (<http://www.scielo.org/>) (2005-2013) (Pereira *et al.*, 2013; Menezes *et al.*, 2013; Fehlberg *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2012; Cabral *et al.*, 2012; Jácome *et al.*, 2012; Andrade *et al.*, 2011; Seki *et al.*, 2011; D'Alincourt *et al.*, 2010; Monteiro *et al.*, 2009; Pavez *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2009).

1.18 β -lactamases na África

Espécies da família Enterobacteriaceae, com fenótipo MDR, têm sido identificados em uma grande diversidade de ecossistemas a nível mundial, causando diversos problemas na

medicina humana e veterinária. Genes de resistência podem facilmente se propagar do homem para o animal e vice e versa servindo-se de vários meios de transferência de genes vertical ou horizontal (Albrechtova *et al.*, 2014). Animais domésticos vivendo em países tropicais em desenvolvimento são um indicador de organismos de patógenos microbianos desde que compartilham o ambiente e a fonte de água com as comunidades humanas e, ao mesmo tempo, disputam alimentos em áreas de resíduos humanos, incluindo a defecação zonas livres (Albrechtova *et al.*, 2014).

Infecções causadas por ESBLs têm sido associadas a altas taxas de mortalidade. África é um continente em que os problemas de resistência antimicrobiana não foram profundamente pesquisados, devido aos baixos recursos financeiros disponíveis. A falta de medicamentos em muitos países africanos leva a que muitas doenças sejam negligenciadas e não tenham o tratamento adequado, sendo que, a prevenção de infecções em países africanos, torna-se vital para o melhoramento do sistema de saúde. Tem se observado uma rápida disseminação da resistência aos antibióticos, o que representa uma imensa ameaça para os sistemas de saúde.

O tratamento antibiótico adequado das doenças infecciosas é muitas vezes dificultado por restrições financeiras. Na África este problema é agravado pelo fraco e inadequado controle de infecções, devido a falta de higiene, falta de recursos, constrangimentos estruturais, insuficientes dados sobre o controle da vigilância epidemiológica e a falta de consciência sobre as infecções hospitalares. Uma pesquisa mais aprofundada poderia dar um conhecimento geral, talvez mais completo de casos de bactérias MDR nos países africanos. Esta pesquisa poderia ser útil para o caso de se prevenir as infecções relacionadas aos cuidados de saúde, de modo a que se programem melhorias na prática clínica no que concerne a antibiotecoterapia adequada (Scherbaum *et al.*, 2014; Tansarli *et al.*, 2014).

Em países desenvolvidos, a infecção urinária, constitui uma das principais causas de infecções hospitalares. Enquanto nos países em desenvolvimento, as intervenções cirúrgicas são as principais fontes de infecções hospitalares, numa taxa de 1.2% a 23.6% de todas as intervenções cirúrgicas sendo que *Staphylococcus aureus* (20%), *Escherichia coli* (18%) e outras enterobactérias são agentes patogênicos comuns. Uma proporção crescente de infecções hospitalares podem ser atribuídas a bactérias gram-negativas multi-resistentes. Em um estudo recente na Tanzânia, a infecção de sítio cirúrgico (ISC) foi detectada em 65 (26,0%) pacientes, dos quais 56 (86,2%) e 9 (13,8%) tiveram superficial e profunda SSI respectivamente. Entre 65 pacientes com SSI clínica, 56 (86,2%) teve cultura aeróbica positiva. Isto foi seguido por *Escherichia coli* 14/56 (25%) e *Klebsiella pneumoniae* 10/56

(17,9%). Entre os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* 9 (64,3%) e oito (80%) produziram ESBL respectivamente. Na Nigéria, um estudo publicado descreveu que taxa de infecção hospitalar em pacientes internados colonizados por bactérias produtoras de ESBL atinge 31% .

Estudos feitos por Scherbaum (2014), identificaram 14 cepas de *Escherichia coli* (36%) e 6 cepas de *Klebsiella pneumoniae* (50 %) produtoras de ESBL, sendo que em estudos na Tanzânia, Gana, Camarões e Sudão, foram encontrados resultados similares (Scherbaum *et al.*, 2014).

Outra pesquisa sobre a incidência de ESBL em África foi exaustivamente feita por Tansarli (2014); na qual ele se baseou em 26 trabalhos (409.215 isolados) realizados em 13 países africanos. Os isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, são os isolados bacterianos mais predominantes como produtores de ESBL, em estudos feitos na África. A proporção de casos de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL ainda não atingiu níveis alarmantes, mas não se pode negligenciar. Baseando-se no índice de desenvolvimento humano, países com alto índice (Algéria e Tunísia), 4 estudos foram realizados (1.118 isolados de *enterobacteriaceae*). No Egito, Marrocos e África do Sul, países com um índice de desenvolvimento humano médio, 10 estudos foram reportados 403.737 isolados de *enterobacteriaceae*. Países com baixo índice de desenvolvimento humano (Ruanda, Quênia, Nigéria, República Centro Africana, Benin, Senegal, Malawi e Tanzânia), foram realizados 12 estudos sendo reportados 4360 isolados de *Enterobacteriaceae*.

Albrechtova e colaboradores (2014) pesquisaram pela primeira vez a ocorrência de ESBL num país africano de expressão portuguesa, a Angola. O clima tropical quente e úmido conduz a sobrevivência e a proliferação de bactérias, o que leva a acumulação de genes de resistência dentro da microbiota normal gastrointestinal de animais domésticos (cães). Altas taxas incluindo determinantes de resistência de PMQR ou ESBL foram anteriormente reportadas em *Escherichia coli* obtidas de cães de pastores nômades no nordeste do Quênia (Scherbaum *et al.*, 2014; Tansarli *et al.*, 2014).

Um estudo sobre a produção de carbapenemases do tipo KPC na África do Sul foi feito por Brink e colaboradores, identificando pela primeira vez a presença de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* produtores de KPC-2 (Brink *et al.*, 2012a). Estudos anteriores (Elliott, *et al.*, 2006; Segal & Elicha, 2006) já tinham descrito a *Klebsiella pneumoniae* com reduzida susceptibilidade aos carbapenêmicos devido à presença de CTX-M (ESBL) conjugado com a perda de porinas.

Em Quênia e no Marrocos, foi reportada a produção NDM (New Delhi metallo-beta-lactamase) em *Klebsiella pneumoniae* (Poirel *et al.*, 2011).

É de caráter urgente que se façam pesquisas mais profundas em países africanos, que irão contribuir para que se entenda o mecanismo de resistência bacteriana aos antibióticos, de modo a implementar estratégias para a prevenir as infecções relacionadas aos cuidados de saúde e que se possa programar melhorias na prática clínica no que concerne a antibiotecoterapia adequada (Albrechtova, *et al.*, 2014; Scherbaum *et al.*, 2014; Tansarli *et al.*, 2014).

Assim, além dos objetivos propostos, o presente projeto, visou contribuir com a formação científica e acadêmica, no tema da resistência bacteriana, de uma Profissional de Moçambique para poder desenvolver esta linha de pesquisa no país de origem, estabelecendo uma colaboração com o grupo de pesquisa no Brasil.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos Gerais

Caracterizar a produção carbapenemases do tipo KPC em Enterobactérias de origem clínica, utilizando métodos fenotípicos e moleculares, e investigar a relação clonal dentro das espécies.

2.2. Objetivos Específicos

1. Avaliar o perfil de suscetibilidade aos antibióticos comercialmente disponíveis, contra enterobactérias produtoras de carbapenemases.

2. Caracterizar fenotipicamente a produção de carbapenemases em Enterobactérias do grupo CESP e não CESP.

3. Caracterizar genotipicamente a produção de carbapenemases em Enterobactérias do grupo CESP e não CESP.

4. Identificar variantes gênicas do gene *bla*_{KPC}.

5. Investigar a co-produção de ESBLs em Enterobactérias do grupo CESP e não CESP.

6. Avaliar a atividade, *in vitro*, de fosfomicina e tigeciclina contra Enterobactérias do grupo CESP e não CESP produtoras de KPC.

7. Identificar o mecanismo de resistência a fosfomicina em Enterobactérias do grupo CESP e não CESP produtoras de KPC.

8. Estudar a relação clonal dos isolados produtores de KPC.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Amostras bacterianas e identificação

Foram estudadas 38 isolados clínicos (tabela 3 e 4), recuperados de pacientes colonizados e/ou apresentando infecção urinária, pneumonia e bacteremia, em três centros médicos de três diferentes regiões do Brasil: Amazônia (3), Minas Gerais (32), Mato Grosso (3). É importante enfatizar que o presente estudo não teve uso de pacientes nem animais de experimentação. As cepas bacterianas estudadas correspondem a uma coleção de uma bacterióteca de cepas previamente isoladas e identificadas por laboratórios clínicos que trabalham em colaboração. Assim, a presente pesquisa foi restrita à análise bacteriológica de cepas.

A identificação bacteriana das espécies com suspeita de produção da enzima carbapenemase do tipo KPC, previamente realizada pelos laboratórios colaboradores, foi confirmada por MALDI-TOF (Bruker Daltonics). Como controle para os ensaios fenotípicos, foi utilizada a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922®, e cepas previamente sequenciadas quanto a genes de resistência, pertencentes à coleção do laboratório do nosso grupo de pesquisa.

3.2 Condições de Cultivo

Os isolados e as cepas de referência foram semeadas em 2 ml de caldo BHI (Merck, Darmstadt-Alemanha) e incubadas a 37°C durante 18 a 20 horas, sob agitação constante em agitador rotativo (modelo CT-712 RN, Cientec, Piracicaba, Brasil) a 150 rpm. Em seguida, os isolados foram semeados na superfície de ágar MacConkey® (Merck, Darmstadt-Alemanha), usando o método de esgotamento, para que se obtivessem colônias isoladas e posteriormente submetidas à incubação a 37°C em estufa bacteriológica (modelo 002-CB, Fanem, SP, Brasil) durante 24 horas. As colônias provenientes dessa semeadura foram utilizadas para a extração de DNA total bacteriano e para preservação a -20°C e -80°C em glicerol 20% e soro fetal bovino, e em temperatura ambiente em TSA 1%.

Tabela 3- Características das Enterobactérias do grupo CESP.

Número/Estado ¹	Espécie	Sexo do paciente	Unidade	Amostra clínica	Data de Isolamento
76/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	-	Aspirado traqueal	08/05/2011
77/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	Unidade Coronária	Zaragatoa perineal	12/05/2011
79/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Zaragatoa nasal	18/05/2011
81/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Zaragatoa perineal	21/05/2011
82/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Zaragatoa perineal	02/06/2011
86/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	CTI	Zaragatoa nasal	04/07/2011
91/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Zaragatoa perineal	05/07/2011
93/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	CTI	Zaragatoa perineal	04/07/2011
94/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	Pronto Atendimento	Zaragatoa perineal	08/07/2011
97/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Zaragatoa axilar	08/07/2011
98/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	CTI	Aspirado traqueal	15/07/2011
99/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	M	Unidade Coronária	Líquido pleural	04/08/2011
100/MG	<i>Enterobacter aerogenes</i>	F	-	Secreção abdominal	29/07/2011
50/MG	<i>Enterobacter cloacae</i>	F	-	Urina	06/09/2010
111/MT	<i>Enterobacter cloacae</i>	F	UTI	Fezes	26/02/2013
170/MG	<i>Serratia marcescens</i>	F	Obstetrícia	Hemocultura	21/01/2013
175/MG	<i>Serratia marcescens</i>	F	Cardiovascular	Zaragatoa nasal	18/01/2013
176/MG	<i>Serratia marcescens</i>	-	Urologia	Zaragatoa nasal	18/01/2013
177/MG	<i>Serratia marcescens</i>	F	Unidade Neonatal	Zaragatoa perineal.	18/01/2013
178/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Unidade Neonatal	Hemocultura	02/02/2013
180/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Clinica médica	Urina	07/02/2013
181/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Transplante fígado	Hemocultura	07/02/2013
182/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Clinica médica	Zaragatoa perineal	08/02/2013
184/MG	<i>Serratia marcescens</i>	-	Neonatologia	Hemocultura	15/02/2013
185/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Cardiovascular	Secreção traqueal	16/02/2013
186/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Clinica médica	Urina	18/02/2013
187/MG	<i>Serratia marcescens</i>	M	Hematologia	Hemocultura	23/02/2013
56/MG	<i>Morganella morganii</i>	F	CASAI	Urina	15/09/2010
107/AM	<i>Morganella morganii</i>	M	CASAI	Urina	23/01/2013

¹ MG, Minas Gerais; AM, Manaus; MT, Mato Grosso.

² CASAI, casa de saúde do índio (ambulatório)

Tabela 4- Características das Enterobactérias do grupo não CESP.

Número/Estado ¹	Espécie	Sexo do paciente	Amostra clínica	Data de isolamento
1/MG	<i>Escherichia coli</i>	F	Secreção de ferida operatória	28/11/2008
2/MG	<i>Escherichia coli</i>	F	Secreção de ferida operatória	28/11/2008
22/MG	<i>Escherichia coli</i>	M	Zaragatoa retal	09/01/2010
29/MG	<i>Escherichia coli</i>	F	Urina	11/03/2010
110/AM	<i>Escherichia coli</i>	F	Urina	23/01/2013
113/MG	<i>Proteus mirabilis</i>	F	Hemocultura	23/11/2010
101/MT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F	Aspirado traqueal	14/11/2012
109/MT	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	F	Aspirado traqueal	23/02/2013
106/AM	<i>Klebsiella oxytoca</i>	M	Urina	23/01/2013

¹ MG, Minas Gerais; AM, Manaus; MT, Mato Grosso.

3.3 Preparo dos inóculos bacterianos

Inóculos bacterianos padronizados (1×10^8 UFC/mL) foram preparados a partir do cultivo dos isolados em 2 mL de caldo BHI®, em agitador rotativo a 150 rpm, 37°C, durante 18 a 20 horas. Em seguida, 50 µL desse cultivo foram transferidos para 2 mL de caldo Müeller-Hinton® (Acumedia, Lansing, MI - USA) e incubados a 37°C em agitador rotativo a 150 rpm, durante 4 a 5 horas, fase de crescimento exponencial da bactéria. A turbidez da cultura foi ajustada para a escala 0,5 de McFarland, confirmada através da leitura da absorbância entre 0,08 e 0,1 dos tubos contendo a suspensão bacteriana, em espectrofotômetro (modelo 97980P, Quimis, Brasil), a um comprimento de onda de 625 nm. Este método de cultivo foi utilizado para todos os testes fenotípicos.

3.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

O perfil de resistência aos antibacterianos (quinolonas, beta-lactâmicos, tetraciclina, sulfas, aminoglicosídeos, tigeciclina e fosfomicina) foi caracterizado fenotipicamente por

métodos qualitativos (Kirby-Bauer) e quantitativos (CIM, concentração inibitória mínima) (CLSI, 2012; 2013). Para facilitar à análise dos resultados, valores de resistência intermediária foram considerados resistente.

3.4.1 Teste de disco difusão

O teste de disco difusão consiste em utilizar discos de antimicrobianos específicos para este tipo de análise dispostos em placa de Petri contendo o isolado distribuído de maneira uniforme sobre o ágar Müeller-Hinton, mantendo em estufa de incubação a 37°C por 24 horas. Os parâmetros utilizados para interpretação dos halos de inibição foram obtidos através da padronização do CLSI M100-S23, 2013. Os discos utilizados foram: amoxicilina + ácido clavulânico (30 µg), cefotaxima (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg), cefepima (30µg), cefoxitina (30µg), ampicilina (30µg), gentamicina (10µg), fosfomicina (200µg), sulfametoxazol + trimetoprim 25 (µg), ciprofloxacina (5µg), ertapenem (10µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), e tigeciclina (10µg) da marca Cefar (Cefar diagnóstico do Brasil).

3.4.2 Teste de diluição em ágar para determinação da CIM

Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), os agentes antimicrobianos foram testados em uma faixa de concentração entre 0,03 – 512 µg/ml conforme as especificações do CLSI. Foi estimado o volume da concentração estoque do antibiótico. As diluições seriadas foram realizadas a partir de uma solução estoque em tubos contendo 19 ml de ágar Müeller-Hinton (Merck, Darmstadt- Alemanha) previamente esterilizados e estabilizados a uma temperatura entre 45 – 50° C. Uma vez estabilizados, 1 ml da solução do antimicrobiano com concentração 20 vezes superior para cada diluição testada foi adicionada aos 19 ml de ágar Müeller-Hinton. Após homogeneização, o conteúdo foi depositado em placas de Petri estéreis de 90x15mm.

Para a determinação do CIM para a fosfomicina, fez-se a diluição em ágar Müeller-Hinton suplementado com de glicose-6-fosfato uma concentração de 25 µg/ml que ajuda a absorver a fosfomicina (CLSI, 2013).

Para a determinação da CIM para a tigeciclina, usou-se o ponto de corte para Enterobacteriaceae, recomendada pela *US Food and Drug Administration* (CIM: $S \leq 2$ e $R \geq 8$ mg/L; halo de inibição: $S \geq 19$ e $R \leq 14$ mm) (Brink *et al.*, 2012b), ou utilizando o critério de interpretação do EUCAST (Enterobacteriaceae CIM: $S \leq 1$ e $R > 2$ $\mu\text{g/mL}$; halo de inibição *E. coli*: $S \geq 18$ e $R < 15$ mm) (<http://www.eucast.org/>).

Para cada amostra, 10 μl de cultura crescida 18 a 24 horas foram cultivadas em 2 ml de caldo MH e incubadas a 37° C durante 2-3 horas para atingir uma turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland, na fase de crescimento exponencial da bactéria. A seguir, o inóculo foi diluído 1:10, e 300 μl dessa suspensão foram transferidos para o replicador/inoculador de Steers®. Desse modo, 100 a 300 μl de cada amostra foram inoculados simultaneamente em placas de ágar Müller-Hinton (com e sem antibacteriano) e incubadas por 18-24h. A CIM foi definida pela concentração menor do antimicrobiano que tem a capacidade bloquear ou inibir o crescimento bacteriano e foi interpretada de acordo com os critérios de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI para a família Enterobacteriaceae (CLSI, 2013).

3.5 Teste de Hodge modificado

O Teste de Hodge modificado foi utilizado para a verificação da presença de carbapenemases. A execução do teste foi similar ao antibiograma convencional, realizado em ágar Müller-Hinton. Inicialmente foi feito o preparo de uma suspensão da cepa *Escherichia coli* ATCC 25922 correspondente a 0,5 da escala de McFarland, e posteriormente foi feita uma diluição 1:10 em soro fisiológico estéril. Em seguida, com auxílio de um swab foi inoculada esta diluição na superfície da placa de ágar Müller-Hinton. No centro do meio de cultura, foi colocado um disco de ertapenem (10 μg). Ao redor deste disco foram feitas estrias com as amostras suspeitas até a borda da placa de Petri, com o cuidado para não tocar o disco de beta-lactâmico. Posteriormente, as placas foram incubadas à incubação a 37°C, em estufa bacteriológica, por 18 horas. O teste foi considerado positivo quando houve distorção no halo de inibição da cepa ATCC, decorrente da produção de carbapenemase pela cepa avaliada (CLSI, 2012; 2013).

3.6 Teste do ácido fenil borônico (APB)

O teste do ácido fenil borônico (APB) é utilizado para confirmar a produção de enzimas do tipo KPC carbapenemase, uma vez que o APB é um bloqueador enzimático (Tsakris *et al.*, 2008).

Preparou-se uma suspensão bacteriana e ajustou-se a escala 0,5 McFarland. Após umedecer o swab, com a respectiva suspensão, eliminou-se o excesso, espalhou-se em uma placa de ágar Müeller-Hinton, em forma de estrias uniformes. Depois se impregnaram discos de meropenem (10 µg) e ertapenem (10 µg) com e sem Ácido fenil borônico, EDTA e oxacilina e também com discos de ertapenem sem nenhum aditivo (Figura 8.). Levou-se a placa para a estufa bacteriológica, a incubar por 24 horas. Foram considerados produtores de KPC, os isolados bacterianos com diferença de diâmetro ≥ 5 para um dos substratos (imipenem ou meropenem) apenas com APB (ANVISA, 2013).

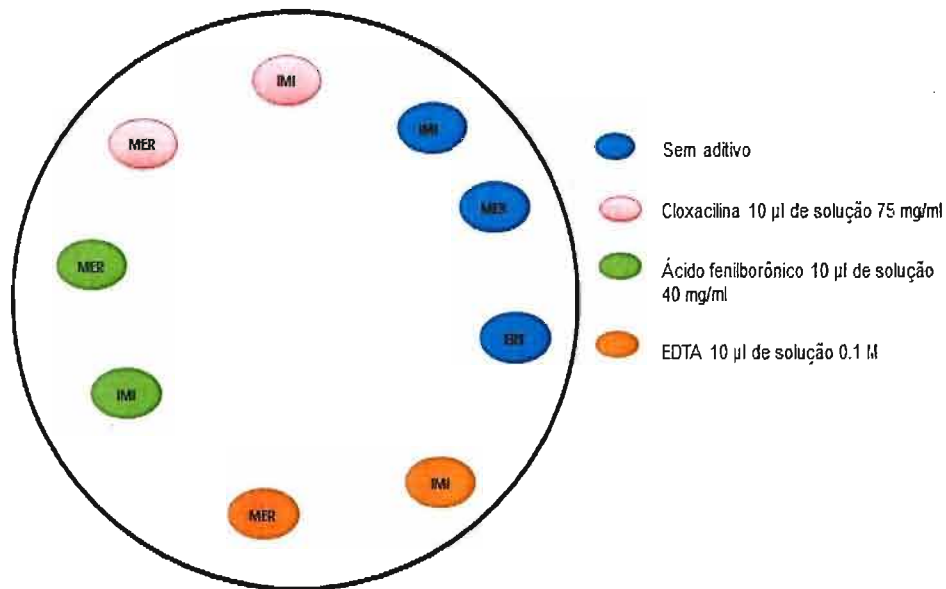


Figura 8- Esquema representando a disposição dos discos de antimicrobianos na placa de ágar Müeller-Hinton para a pesquisa de carbapenemases (Adaptado da ANVISA, 2013).

3.7 Detecção Fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

O teste de disco difusão em ágar foi realizado para pesquisar a presença de enzima ESBL nas enterobactérias. Foram usados os antibióticos ceftriaxona (30 μ g) ceftazidima (30 μ g), cefotaxima (30 μ g), e aztreonam (30 μ g) com o inibidor ácido clavulânico (30 μ g), para verificar a formação de sinergismo ou da zona fantasma entre o disco da amoxicilina mais o ácido clavulânico e o halo dos discos das cefalosporinas e ou aztreonam (Jarlier *et al.*, 1998). Foi também pesquisada a presença da enzima ESBL utilizando como indicador o crescimento no meio seletivo CHROMagarTM ESBL (Probac®) (tabela 3) (Dalmarco *et al.*, 2006).

3.8 Extração de DNA total bacteriano

O DNA de todas as cepas resistentes foi extraído pelo método de fervura (Chapman *et al.*, 2001). A partir de um isolado bacteriano semeado em caldo Mueller-Hinton e mantido por 18 a 24 horas em agitador rotativo a 36°C, alíquotas de 2 ml de cultura bacteriana foram submetidas à centrifugação durante 1 minuto a 14000 rpm a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspendido em 100 μ l de água Milli-Q estéril e submetido à fervura por 10 minutos e posteriormente mantido em banho de gelo por 5 minutos. Finalmente, a suspensão foi centrifugada durante 15 minutos a 9000 rpm a 4°C e 100 μ l do sobrenadante contendo DNA foi transferido para um novo microtubo estéril para armazenamento a -20° C. Para controle interno da extração, as amostras de DNA obtidas foram submetidas à PCR para pesquisa da subunidade de DNA ribossomal 16S.

3.9 Determinação de genes de resistência aos antibióticos por PCR

A confirmação genotípica de β -lactamases do tipo KPC e ESBL foi realizada pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando *primers* específicos para detecção de cada gene (tabela. 5). As reações de amplificação foram realizadas com volume final da reação 50 μ l contendo: 100ng DNA; 10X PCR buffer [Tris-HCl (pH 8,4), 50mM KCl] (Fermentas, USA), 1,5mM MgCl₂ (Fermentas); 200 μ M de cada dNTP (Fermentas); 25pmol de cada iniciador, e 1U de Taq DNA polimerase (Fermentas).

Os experimentos foram realizados no termociclador da marca Mastercycler. A amplificação para cada gene ocorreu nas seguintes condições: desnaturação a 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, anelamento por 1 minuto, obedecendo a temperatura de cada par de primer (tabela 5); e 72°C por 1 minuto para extensão; seguido de um passo de extensão final de 72°C por 5 minutos. Os produtos de PCR foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 1%, utilizando tampão TBE 1x (Tris Base 90 mM, ácido bórico 90mM e EDTA 20mM, pH 8,0). Como referência foi utilizado um marcador de DNA de peso molecular de 100 bp (GeneRuler, #SM0321, Fermentas, Burlington, Canadá). Os controles positivos usados para cada reação de PCR utilizados, fazem parte da coleção do laboratório. Após eletroforese, o gel foi corado com GelRed™ (Biotium, Hayward, USA) e visualizado sob luz ultravioleta.

3.10 ERIC-PCR

A análise de ERIC-PCR é um método de tipagem baseado na amplificação de segmentos conservados presentes no DNA das Enterobactérias. As regiões conservadas do DNA das cepas em estudo foram amplificadas segundo a técnica de PCR. A reação ocorreu nas seguintes condições: etapa de desnaturação inicial a 94° C por 10 min; etapa de amplificação com 30 ciclos de desnaturação à 94° C por 1 min, hibridação à 52°C por 1 min, extensão à 72°C por 8 min; extensão final a 72°C por 16 minutos. A visualização dos segmentos foi obtida por eletroforese em gel de agarose 1,5%. O dendrograma foi gerado com ajustes de comparação do coeficiente de similaridade (Dice). Foi usado o método de análise de *clusters* (UPGMA), em um intervalo de otimização de 0% e tolerância de 1% (Cai *et al.*, 2008; Meacham *et al.*, 2003).

3.11 Sequenciamento

Para cada espécie da família Enterobacteriaceae (*E. coli*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *E. cloacae*, *E. aerogenes* e *P. mirabilis*), o produto de amplificação do gene *bla_{KPC}* e *fosA2*, foi purificado utilizando o kit GFX-TM PCR (Amersham BioSciences UK Ltd.). As amostras foram mandadas sequenciar, no serviço de sequenciamento genoma da Universidade de São Paulo. O resultado obtido, foi analisado no

software Seqman versão 7.2, comparadas com as sequências disponíveis no banco de dados GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>) e depositadas no respectivo banco.

Tabela 5: Iniciadores específicos para determinantes de resistência*

Iniciador	Gene alvo	Sequência do iniciador (5'-3')	Pb	T(°C)	Referência
KPC	<i>bla_{KPC}</i>	F: TATCGCCGTCTAGTTCTGCT R: CGTTGACGCCCAATCC	829	58	Este estudo ²
NDM	<i>bla_{NDM}</i>	F: GGTTTTCGATCTGGTTTTC R: CGGATTGGCTCATCACGATC	54	56	Poirel <i>et al.</i> , 2011
IMP	<i>bla_{IMP}</i>	F: GGAATAGAGTGGCTTAAAYTCTC R: GGTTTAAAYAAAACAACCACC	54	56	Azim <i>et al.</i> , 2010 Henriques <i>et al.</i> , 2006
VIM	<i>bla_{VIM}</i>	F: AGTGGTGAGTATCCGACAG R: GAATGCGCAGCACCAGGAT	54	56	Miriagou <i>et al.</i> , 2003 Wozniak <i>et al.</i> , 2012
ESBL	<i>bla_{TEM}</i>	F: ATGAGTATTCAACATTTCCGG R: TACCAATGCTTAATCAGTGAG	860	56	Hosoglu, <i>et al.</i> , 2007
ESBL	<i>Bla_{SHV}</i>	F: ATGCGTTATATTCGCCTGTG R: GTTAGCGTTGCCAGTGCCG	860	57	Minarini, <i>et al.</i> , 2007
ESBL	<i>bla_{CTX-M}</i>	F: CGCTTTCGCGATGTGCAG R: ACCGCGATA TCGTTGTG	550	56	Bonnet, <i>et al.</i> , 2001
ESBL	<i>bla_{CTX-M-2}</i>	F: ATGATGACTCAGAGCATTCG R: TGGGTTACGATTTTCGCCGC	865	52	Park <i>et al.</i> , 2005
ESBL	<i>bla_{CTX-M-8}</i>	F: CTGGAGAAAAGCAGCGGGGG R: ACCCACGATGTGGGTAGCCC	320	55	Minarini, <i>et al.</i> , 2007
ESBL	<i>bla_{CTX-M-15}</i>	F: CACACGTGGAATTTAGGGACT R: GCCGTCTAAGGCGATAAACA	995	56	Muzaheed, <i>et al.</i> , 2008
FOS A2	<i>fosA2</i>	F: TCAACCATCTGACCCTCGCGGT R: ACCCAGATCGCCGAGGTAA	127	57	Este estudo ³
FOS A	<i>fosA</i>	F: TCAACCATCTGACCCTCGCGGT R: ACCATGCCCGCATAGGGCTTCT	391	57	Este estudo ³
FOS A3	<i>fosA3</i>	F: GTGGCTGTGCTTGTGCTGGAT R: ACCATCCCCTTGTAGGGGCGTT	270	57	Este estudo ³
FOS C2	<i>fosC2</i>	F: TCCGCTGGGATAGTGGGGCATA R: TGGCCGTCAGGATCGAGCAAGT	220	57	Este estudo ³
FOS I	<i>fosI</i>	F: TAGCCGTGTTGACGGTGAGGGT R: TACCGGACAAGGCGCTGCTCTA	102	57	Este estudo ³
FOS C	<i>fosC</i>	F: ACGTACGCTGGGATAACGGTGC R: TAACGAGCCGCTATGCGTTCT	251	57	Este estudo ³
FOS E	<i>fosE</i>	F: ACCTCTCGCGCATGACCACCTT R: AATGTGCCGGTGTGCAGCTCAA	331	57	Este estudo ³
FOS F	<i>fosF</i>	F: TCGCTTTCAGTGTCCGCGAAGG R: CGAGTGGCCAGTGTTCGCAAT	163	57	Este estudo ³
FOS K	<i>fosK</i>	F: AAGCCGGGGTTGAGGAGTGGAA R: GCTCAATGCGATGGCCGTTTGG	84	57	Este estudo ³
ERIC-2	ERIC ¹	AAGTAAGTACTGGGGTGAGCG	-	52	Versalovic <i>et al.</i> , 1991

* *bla*, gene β-lactamase; pb, Pares de bases; T(°C), Temperatura de anelamento em graus Celsius.

¹ *Enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) sequences.*

² Desenhados e cedidos gentilmente pela Doutora Mónica Pavez (FCF-USP; Universidade de la Frontera, Chile).

³ Desenhados e cedidos gentilmente pelo Professor Jorge M. Sampaio (FCF-USP)

4. RESULTADOS

4.1 Perfil de susceptibilidade

4.1.1 Antibiograma

Os isolados estudados foram identificados por MALDI-TOF como enterobactérias pertencentes ao grupo CESP (*Enterobacter aerogenes* n= 13, *Enterobacter cloacae* n=2, *Serratia marcescens* n=12, *Morganella morganii* n=2) e não CESP (*Escherichia coli* n=5, *Klebsiella pneumoniae* n=2, *Klebsiella oxytoca* n =1, *Proteus mirabilis* n=1)

No presente estudo, 27/29 (93%) das cepas pertencentes ao grupo CESP apresentaram perfil de multiresistência, enquanto que 9/9 (100%) das enterobactérias do grupo não CESP foram multirresistentes (Magiarakos *et al.*, 2012).

O perfil de susceptibilidade e a porcentagem de resistência aos antimicrobianos dos isolados clínicos, avaliados através do método de difusão do disco são apresentados nas tabelas 6, 7 e 8.

Todos os isolados estudados apresentaram resistência para cefalosporinas de amplo espectro, isto é: cefotaxima (94,7%); ceftriaxona (86,8%); ceftazidima (89,4%); cefepima (86,8%); cefoxitina (86,8 %); amoxicilina/clavulânico (94,7%); amicacina (86,8%); gentamicina (57,84%); STX (60,5%); ciprofloxacina (84,2%); ertapenem (89,47%); imipenem (89,47%) e meropenem (84,2%).

Para tigeciclina, 24/38 (63,2%) dos isolados apresentaram resistência, quando aplicado o critério interpretativo do FDA para enterobactérias (<http://www.eucast.org/>).

Para fosfomicina, 4/38 (10,5%) dos isolados estudados apresentaram resistência, quando aplicado o critério do CLSI (2013).

Para o grupo CESP (tabela 6), a resistência a amoxicilina/clavulânico foi de 96,6%; Cefotaxima 93,1%, Ceftriaxona 86,2%; Ceftazidima 89,6%; Cefepima 86,2 %; cefoxitina 96,6%, amicacina 93,1%; Gentamicina 62,2%), Ciprofloxacina 89,6; Ertapemem 89,6%; Meropenem 89,6%; Imipenem 93%; fosfomicina 89,6%; tigeciclina 69,0 %. As cepas de *Serratia marcescens*, apresentaram sensibilidade para a sulfametoxazol-trimetoprim, enquanto que 100% de resistencia foi confirmada para as restantes espécies do grupo CESP (tabela 8).

S. marcescens também apresentou sensibilidade para fosfomicina, enquanto que a resistência no restante das espécies do grupo CESP variou entre 7,7 -50% (tabela 6).

Para o grupo não CESP (tabela 7), a resistência a amoxicilina/clavulânico foi de 88,8%; Cefotaxima 100%, Ceftriaxona 88,8%; Ceftazidima 88,8%; Cefepima 88,82 %; Cefoxitina 55,5%; Gentamicina 33,3%; Sulfametoxazol Trimetropima 66,6%; Ciprofloxacina 66,6%; Ertapenem 55,5; Imipenem 66,6%; Meropenem 66,6%; Amicacina 66,6%; fosfomicina 11,1% e Tigeciclina 44%.

Tabela 6 - Perfil de susceptibilidade de bactérias do grupo CESP

Cepa	Espécie	Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos (valores em mm)															
		AMC ≤13	CTX ≤22	CRO ≤19	CAZ ≤17	CPM ≤14	CFO ≤14	AMI ≤14	GEN ≤12	FOS ≤12	SXT ≤10	CIP ≤15	ETP ≤18	IMP ≤19	MER ≤19	TIG ≤14	
50	<i>E. cloacae</i>	6	7	6	10	6	6	12	10	24	6	6	10	12	12	18'	
111	<i>E. cloacae</i>	6	6	6	10	6	6	10	6	12	6	6	6	6	10	14	
56	<i>M. morgani</i>	6	24'	24	20'	24	18'	14	18	20	6	12	12	10	22'	18'	
107	<i>M. morgani</i>	6	24'	24	24	22	16'	16'	10	8	6	6	24	20	24	20	
76	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	7	6	16'	7	20	6	8	8	12	10	20	
77	<i>E. aerogenes</i>	6	7	6	10	6	6	14	7	10	6	6	6	10	10	10	
79	<i>E. aerogenes</i>	6	7	6	14	6	6	16'	6	22	6	10	8	8	10	19	
81	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	6	6	14	6	18	6	0	7	10	10	18'	
82	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	6	6	14	6	20	6	10	7	12	10	20	
86	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	6	6	14	6	20	6	8	6	10	10	20	
91	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	14	6	6	14	6	20	6	10	6	8	10	20	
93	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	6	6	6	12	6	20	6	8	6	10	8	20	
94	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	6	6	6	14	6	24	6	10	7	6	10	18'	
97	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	6	6	6	14	7	20	6	10	7	10	10	18'	
98	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	6	6	16'	6	22	6	10	10	10	12	12	
99	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	6	6	16'	6	20	6	10	10	10	12	12	
100	<i>E. aerogenes</i>	6	6	6	12	7	6	14	6	22	6	10	7	6	12	18'	
170	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	12	6	6	12	14'	20	22	18'	6	6	6	18'	
175	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	6	6	6	12	20	26	18	16'	6	6	6	18'	
176	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	12	6	6	12	16	20	18	18'	6	6	6	18'	
177	<i>S. marcescens</i>	6	8	6	12	6	6	12	18	26	20	18'	6	6	6	20	
178	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	6	6	6	12	18	30	24	18'	6	6	6	18'	
180	<i>S. marcescens</i>	6	8	6	16	6	6	14	18	24	18	14	6	6	6	18'	
181	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	12	6	6	14	16	28	18	18'	6	6	6	18'	
182	<i>S. marcescens</i>	8	30	30	30	34	18'	24	14'	22	28	36	28	24	28	18'	
184	<i>S. marcescens</i>	20	28	24	24	30	24	20	18	24	26	24	24	24	34	18'	
185	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	14	6	6	12	20	30	18	6	6	14	6	6	
186	<i>S. marcescens</i>	6	10	6	18'	6	6	12	18	24	18	18'	6	6	16	18'	
187	<i>S. marcescens</i>	6	6	6	12	6	6	14	16	22	18	24	6	6	6	20	

AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Ceftazidima; CPM: Cefepima; CFO: Cefoxitina; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; FOS: Fosfomicina; SXT: Sulfá + Trimetopim; CIP: Ciprofloxacina; ETP: Ertapenem; IMP: Imipenem; MER: Meropenem; TIG: Tigeciclina. Em negrito são apresentados valores referentes ao critério interpretativo resistente. ' valores referentes ao critério interpretativo intermediário. Para todos os antibacterianos testados foi anexado o valor (mm) referente ao critério de interpretação para resistência seguindo as normas do CLSI (2012), com exceção da tigeciclina, para a qual foi utilizado o critério de interpretação do FDA para Enterobacteriaceae: S ≥ 19; R ≤ 14 (mm) (Brink *et al.*, 2010a). Para fosfomicina foi utilizado o critério interpretativo do CLSI (2013) para *E. coli*.

Tabela 7- Perfil de susceptibilidade de bactérias do grupo não CESP

Cepa	Espécie	Perfil de susceptibilidade aos antibacterianos (valores em mm) ¹														
		AMC ≤13	CTX ≤22	CRO ≤19	CAZ ≤17	CPM ≤14	CFO ≤14	AMI ≤14	GEN ≤12	FOS ≤12	SXT ≤10	CIP ≤15	ETP ≤18	IMP ≤19	MER ≤19	TIG ≤14
1	<i>E. coli</i>	22	16	28	22	28	24	8	18	34	22	24	22	14	30	16'
2	<i>E. coli</i>	14'	18	12	18'	16'	22	18	18	36	18	30	16	16	20'	24
22	<i>E. coli</i>	12	18	12	18'	16'	20	12	24	36	28	30	18	16	14	24
29	<i>E. coli</i>	12	18	16	20'	16'	18'	14	6	36	6	6	16	18	18	22
110	<i>E. coli</i>	16'	10	10	10	16'	20	18	10	30	6	6	22	26	26	22
106	<i>K. oxytoca</i>	16'	10	10	16	16'	18'	16'	16	12	6	6	24	20'	22'	12
113	<i>P. mirabilis</i>	10	8	10	20'	8	12	8	14'	22	6	6	20	6	16	6
101	<i>K. pneumoniae</i>	10	6	6	10	6	14	14	16	22	6	14	14	26	24	22
109	<i>K. pneumoniae</i>	8	8	8	10	12	16'	18	6	26	6	6	12	6	12	18'

¹ AMC: Amoxicilina + Ácido clavulânico; CTX: Cefotaxima; CRO: Ceftriaxona; CAZ: Cefazidima; CPM: Cefepima; CFO: Cefoxitina; AMI: Amicacina; GEN: Gentamicina; FOS: Fosfomicina; SXT: Sulfa + Trimetopim; CIP: Ciprofloxacina; ETP: Ertapenem; IMP: Imipenem; TIG: Tigeciclina. Em negrito são apresentados valores referentes ao critério interpretativo resistente. ' valores referentes ao critério interpretativo intermediário. Para todos os antibacterianos testados foi anexado o valor (mm) referente ao critério de interpretação para resistência seguindo as normas do CLSI (2012), com exceção da tigeciclina, para a qual foi utilizado o critério de interpretação de interpretação do FDA para Enterobacteriaceae: $S \geq 19$ e $R \leq 14$ (mm) (Brink *et al.*, 2010a), sendo que para *E. coli*, adicionalmente foi utilizado o critério de interpretação do EUCAST: $S \geq 18$ e $R < 15$ (mm) (<http://www.eucaast.org/>). Para fosfomicina foi utilizado o critério interpretativo do CLSI (2013) para *E. coli*.

Tabela 8 - Porcentagem de resistência aos antibióticos das cepas estudadas

ANTIBIÓTICOS	Porcentagem de resistência (% Kirby-Bauer/CIM)*							
	CESP			NÃO CESP				
	<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=13)	<i>Enterobacter cloacae</i> (n=2)	<i>Serratia marcescens</i> (n=12)	<i>Morganella morganii</i> (n=2)	<i>Escherichia coli</i> (n=5)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=2)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (n=1)	<i>Proteus mirabilis</i> (n=1)
AMOXACILINA+CLA ^a	100	100	91,6	100	80	100	100	100
CEFOTAXIMA	100	100	83,3	100	100	100	100	100
CEFTRIAXONA	100	100	83,3	0	80	100	100	100
CEFTAZIDIMA	100	100	83,3	50	80	100	100	100
CEFEPIMA	100	100	83,3	0	80	100	100	100
CEFOXITINA	100	100	91,6	100	20	100	100	100
AMICACINA	100	100	83,3	100	60	50	100	100
GENTAMICINA	100	100	16,7/0	50	40	50	0	100
FOSFOMICINA	7,7/100	50/0	0/0	50/50 ^d	0/0	0/100	100/100 ^e	0/100
SXT ^b	100	100	0/0	100	40	100	100	100
CIPROFLOXACINA	100	100	75	100	40	100	100	100
ERTAPENEM	100	100	83,3	50	100	100	0	100
IMPENEM	100	100	83,3	100	80	50	100	100
MEROPENEM	100	100	83,3	50	60	50	100	100
TIGECICLINA ^c	53,8/0	100/50	83,3/100	50/50	20/0	50/50	100/0	100/100

* As porcentagens de resistência foram baseadas no método de difusão do disco. Para fosfomicina, tigeciclina, SXT, gentamicina. Para fosfomicina, o perfil de resistência foi adicionalmente determinado por ágar diluição para obtenção da CIM.

^a CLA, ácido clavulânico.

^b SXT, Sulfametoxazol-trimetopim.

^c Critério interpretativo FDA: ≤ 2 ; ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ (Brink *et al.*, 2012b); critério interpretação EUCAST: ≤ 1 ; $R > 2$ $\mu\text{g/mL}$ (<http://www.eucaast.org/>).

^d 100% resistência utilizando critério EUCAST ($R = > 32$ $\mu\text{g/ml}$) (<http://www.eucaast.org/>) e 50% de resistência utilizando critério CLSI (2012) padronizado para *E. coli* ($R \geq 256$ $\mu\text{g/mL}$).

^e 100% resistência utilizando critério EUCAST ($R = > 32$ $\mu\text{g/ml}$) (<http://www.eucaast.org/>) e resistência intermediária utilizando critério CLSI (2013) padronizado para *E. coli* ($R \geq 256$ $\mu\text{g/mL}$).

4.1.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Para o grupo CESP, como observado na tabela 9a, todos os isolados de *Serratia marcescens* apresentaram sensibilidade para a fosfomicina (CIM₅₀= 8 µg/mL), sulfametoxazol-trimetoprim (CIM₅₀= 1/19 µg/mL) e gentamicina (CIM₅₀= 0,5 µg/mL), sendo resistentes para tigeciclina (CIM₅₀= 8 µg/mL).

Os isolados de *Enterobacter aerogenes* (tabela 9b) apresentaram resistência a fosfomicina (CIM₅₀≥ 512 µg/mL) e sensibilidade a tigeciclina (CIM₅₀=2 µg/mL).

No grupo não CESP (tabela 10), enquanto que as cepas de *E. coli* apresentaram sensibilidade a tigeciclina (CIM₅₀= 0,25 µg/ml), uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (CIM= 4 µg/mL) e uma de *Proteus mirabilis* (CIM= 16 µg/mL) apresentaram resistência.

Com relação à fosfomicina, enquanto as cepas de *E. coli* apresentaram sensibilidade à fosfomicina (CIM= 1-16 µg/mL), as cepas de *P. mirabilis* e *Klebsiella* spp., exibiram resistência (128 - ≥ 512 µg/mL).

Tabela 9a- Concentração inibitória mínima do grupo CESP.

Cepa	Espécie	CIM (µg/mL)*			
		FOS ≥ 256	TIG ≥ 8	GEN ≥ 16	SXT ≥ 4/76
170	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
175	<i>S. marcescens</i>	16	8	0,5	1/19
176	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
177	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
178	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
180	<i>S. marcescens</i>	16	8	0,5	1/19
181	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
182	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
184	<i>S. marcescens</i>	2	8	0,5	1/19
185	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19
186	<i>S. marcescens</i>	4	8	0,5	1/19
187	<i>S. marcescens</i>	8	8	0,5	1/19

* Fosfomicina (FOS); Tigeciclina (TIG); Gentamicina (GEN); Sulfametoxazole + Trimetoprim (SXT). Para GEN e SXT foi utilizado o critério de interpretação do CLSI (2012). Para FOS foi utilizado o critério CLSI (2013) padronizado para *E. coli* (R≥ 256 µg/mL). Para FOS o critério interpretativo EUCAST é: R= > 32 µg/mL (<http://www.eucast.org/>). Para TIG o critério interpretativo FDA é: S≤ 2; R≥ 8 µg/mL (Brink *et al.*, 2012b) e; o critério interpretação EUCAST é: S≤ 1; R> 2 µg/mL (<http://www.eucast.org/>).

Tabela 9b- Concentração inibitória mínima do grupo CESP.

Cepa	Espécie	CIM ($\mu\text{g/mL}$)*	
		FOS ^a	TIG ^b
76	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
77	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	1
79	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
81	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
82	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	1
86	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	1
91	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
93	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
94	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
97	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
98	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
99	<i>E. aerogenes</i>	≥ 512	2
100	<i>E. aerogenes</i>	256	1
50	<i>E. cloacae</i>	16	1
111	<i>E. cloacae</i>	8	4
56	<i>M. morgani</i>	64	2
107	<i>M. morgani</i>	256	4

* Fosfomicina (FOS); Tigeciclina (TIG).

^a Critério CLSI (2013) padronizado para *E. coli* ($R \geq 256 \mu\text{g/mL}$). Critério EUCAST ($R = > 32 \mu\text{g/mL}$) (<http://www.eucast.org/>).

^b Critério interpretativo FDA: $S \leq 2$; $R \geq 8 \mu\text{g/mL}$ (Brink *et al.*, 2012b). Critério interpretação EUCAST: $S \leq 1$; $R > 2 \mu\text{g/mL}$ (<http://www.eucast.org/>).

Tabela 10- Concentração inibitória mínima do grupo não CESP.

Cepa	Espécie	CIM ($\mu\text{g/ml}$)	
		FOS ≥ 256	TIG > 8
1	<i>Escherichia coli</i>	16	0,125
2	<i>Escherichia coli</i>	1	0,25
22	<i>Escherichia coli</i>	1	0,25
29	<i>Escherichia coli</i>	2	0,25
110	<i>Escherichia coli</i>	4	0,25
113	<i>Proteus mirabilis</i>	512	16
101	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	256	2
109	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 512	4
106	<i>Klebsiella oxytoca</i>	128	1

* Fosfomicina (FOS); Tigeciclina (TIG). Para FOS foi utilizado o critério CLSI (2013) padronizado para *E. coli* ($R \geq 256 \mu\text{g/mL}$). Para FOS o critério interpretativo EUCAST é: $R > 32 \mu\text{g/mL}$ (<http://www.eucast.org/>). Para TIG o critério interpretativo FDA é: $S \leq 2$; $R \geq 8 \mu\text{g/mL}$ (Brink *et al.*, 2012b) e; o critério interpretação EUCAST é: $S \leq 1$; $R > 2 \mu\text{g/mL}$ (<http://www.eucast.org/>).

4.2 Triagens de beta-lactamases

Tabela 11- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo CESP.

Cepa	Espécie	Método de triagem de beta-lactamases*	
		Hodge	Crescimento em ChromAgar® KPC/ pigmentação característica da produção de KPC ¹
76	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
77	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
79	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
81	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
82	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
86	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
91	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
93	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
94	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
97	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
98	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
99	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
100	<i>E. aerogenes</i>	+	+/+
50	<i>E. cloacae</i>	+	+/+
111	<i>E. cloacae</i>	-	+/-
170	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
175	<i>S. marcescens</i>	-	+/nd
176	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
177	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
178	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
180	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
181	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
182	<i>S. marcescens</i>	-	+/nd
184	<i>S. marcescens</i>	-	+/nd
185	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
186	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
187	<i>S. marcescens</i>	+	+/nd
56	<i>M. morgani</i>	+	+/nd
107	<i>M. morgani</i>	-	+/nd

* (+) positivo; (-) negativo;¹ ChromAgar Crescimento sugestivo de isolado produtor de KPC: para *Enterobacter* spp., + = colônia azul metálico; nd, características de crescimento não definidas para estas espécies.

No grupo CESP, 24/29 (82,7%) foram sugestivos como cepas produtoras de carbapenemases pelo teste de hodge modificado (tabela 11) e 14/29 (48,2%) dos isolados, identificados como *Enterobacter* spp., apresentaram crescimento positivo em CHROMagar KPC, sugestivo da produção de KPC (Tabela 11).

A triagem de carbapenemases do tipo KPC usando o inibidor enzimático APB, em enterobactérias do grupo CESP (Tabela 13), foi positiva em 24/29 (82,75%) das cepas.

No grupo não CESP (tabela 12), 5/9 (55,5%) dos isolados foram sugestivos como produtores de carbapenemases pelo teste de Hodge modificado, sendo que 6/9 (66,6%) das cepas apresentaram crescimento positivo em CHROMagar KPC sugestivo da produção de KPC. Já, a triagem de carbapenemases do tipo KPC usando APB, foi positiva para 4/9 (44,4%) das cepas (tabela 14).

Tabela 12- Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo não CESP.

Cepa	Espécie	Método de triagem de beta-lactamases*	
		Teste de Hodge	Crescimento em ChromAgar® KPC/igmentação característica da produção de KPC ¹
1	<i>E. coli</i>	-	-/-
2	<i>E. coli</i>	+	+/+
22	<i>E. coli</i>	+	+/+
29	<i>E. coli</i>	+	+/+
110	<i>E. coli</i>	-	-/-
106	<i>K. oxytoca</i>	-	-/-
113	<i>P. mirabilis</i>	+	+/+
101	<i>K. pneumoniae</i>	-	+/+
109	<i>K. pneumoniae</i>	+	+/+

* (+) positivo; (-) negativo;¹ ChromAgar Crescimento sugestivo de isolado produtor de KPC: (para *E. coli*, += colônia cor de rosa; para *Proteus* spp., += colônia cor marrom; para *Klebsiella* spp., += colônia azul metálico).

Tabela 13. Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo CESP (ANVISA, 2013) *

Cepa	Espécie	Método de triagem de carbapenemases por disco difusão (mm) ¹									Interpretação
		Com Inibidor				Sem Inibidor					
		APB		EDTA		CLOXA		IMI	MER	ERT	
IMI	MER	IMI	MER	IMI	MER	IMI	MER	ERT			
76	<i>E. aerogenes</i>	14	16	8	10	6	6	6	6	6	KPC
77	<i>E. aerogenes</i>	14	16	6	10	10	10	6	6	6	KPC
79	<i>E. aerogenes</i>	10	16	6	6	6	6	6	6	6	KPC
81	<i>E. aerogenes</i>	16	18	12	10	6	6	6	6	6	KPC/MBL
82	<i>E. aerogenes</i>	12	16	6	10	6	6	6	6	6	KPC
86	<i>E. aerogenes</i>	14	16	6	10	6	6	6	6	6	KPC
91	<i>E. aerogenes</i>	12	14	6	6	6	6	6	8	6	KPC
93	<i>E. aerogenes</i>	16	18	6	8	14	12	6	10	6	KPC
94	<i>E. aerogenes</i>	14	18	6	10	6	6	6	6	6	KPC
97	<i>E. aerogenes</i>	12	16	6	6	6	6	6	6	6	KPC
98	<i>E. aerogenes</i>	14	18	6	10	6	6	10	10	6	KPC
99	<i>E. aerogenes</i>	14	16	6	10	6	6	10	10	6	KPC
100	<i>E. aerogenes</i>	16	20	6	14	12	16	12	16	16	Negativo
50	<i>E. cloacae</i>	12	26	6	12	6	10	6	6	6	KPC/MBL
111	<i>E. cloacae</i>	24	30	24	30	24	30	28	28	12	Negativo
170	<i>S. marcescens</i>	12	12	6	6	6	6	6	6	6	KPC
175	<i>S. marcescens</i>	12	16	6	6	6	6	6	6	6	KPC
176	<i>S. marcescens</i>	16	12	6	6	6	6	6	6	6	KPC
177	<i>S. marcescens</i>	6	14	6	6	6	6	6	6	6	KPC
178	<i>S. marcescens</i>	6	16	6	8	6	6	6	6	6	KPC
180	<i>S. marcescens</i>	18	32	18	26	28	22	18	14	12	KPC/MBL
181	<i>S. marcescens</i>	16	12	6	6	6	6	12	6	6	KPC
182	<i>S. marcescens</i>	24	30	26	30	24	30	24	30	24	Negativo
184	<i>S. marcescens</i>	24	28	24	28	24	28	26	24	24	Negativo
185	<i>S. marcescens</i>	16	14	6	6	18	6	6	6	6	KPC
186	<i>S. marcescens</i>	22	24	24	28	20	28	18	16	12	KPC/MBL
187	<i>S. marcescens</i>	20	14	6	6	18	20	6	6	6	KPC
56	<i>M. morgani</i>	14	26	6	22	6	22	6	22	14	KPC
107	<i>M. morgani</i>	0	30	0	26	0	30	18	30	24	Negativo

* Triagem baseada na recomendação da ANVISA (NOTA TÉCNICA Nº 01/2013): KPC positivo = APB/IMI – IMI ≥ 5 mm ou APB/MER – MER ≥ 5 mm. MBL positivo = EDTA/IMI – IMI ≥ 5 mm ou EDTA/MER – MER ≥ 5 mm. AmpC (plasmidial) = CLOXA/IMI – IMI e APB/IMI – IMI ≥ 5 mm ou CLOXA/MER – MER e APB/IMI – IMI ≥ 5 mm.

¹ APB, ácido fenilborônico; EDTA, ácido etileno diaminoacético; CLOXA, cloxacilina; IMI, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem.

Tabela 14. Triagem de carbapenemases para enterobactérias do grupo não CESP (ANVISA, 2013)*

Cepa	Espécie	Método de triagem de carbapenemases por disco difusão (mm) ¹									Interpretação
		Com Inibidor						Sem Inibidor			
		APB		EDTA		CLOXA		IMI	MER	ERT	
IMI	MER	IMI	MER	IMI	MER						
1	<i>E. coli</i>	22	28	22	28	22	28	22	28	22	Negativo
2	<i>E. coli</i>	12	24	8	8	6	18	0	14	6	KPC
22	<i>E. coli</i>	18	24	12	22	14	18	12	18	6	KPC
29	<i>E. coli</i>	6	26	6	16	6	16	14	16	6	KPC
110	<i>E. coli</i>	18	30	18	30	16	28	24	30	20	Negativo
113	<i>P. mirabilis</i>	16	24	18	24	16	26	18	24	18	Negativo
106	<i>K. oxytoca</i>	20	26	20	26	18	24	22	22	18	Negativo
101	<i>K. pneumoniae</i>	28	26	20	18	24	24	24	24	12	Negativo
109	<i>K. pneumoniae</i>	12	24	10	16	6	14	12	6	6	KPC/MBL/AmpC

* Triagem baseada na recomendação da ANVISA (NOTA TÉCNICA Nº 01/2013): KPC positivo = APB/IMI – IMI ≥ 5 mm ou APB/MER – MER ≥ 5 mm. MBL positivo = EDTA/IMI – IMI ≥ 5 mm ou EDTA/MER – MER ≥ 5 mm. AmpC (plasmidial) = CLOXA/IMI – IMI e APB/IMI – IMI ≥ 5 mm ou CLOXA/MER – MER e APB/IMI – IMI ≥ 5 mm.

¹ APB, ácido fenilborônico; EDTA, ácido etileno diaminoacético; CLOXA, cloxacilina; IMI, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem.

4.3 Detecção Molecular

Tabela 15- Avaliação dos genes de resistência e perfil clonal no grupo CESP

Cepas	Espécie	β-lactamase		Gene <i>fos</i> ¹	ERIC-PCR
		Carbapenemases	Outras beta-lactamases		
50	<i>E. cloacae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	E
111	<i>E. cloacae</i>	-	<i>bla</i> _{TEM-like}	-	F
76	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	A ₁
77	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	A
79	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	B
81	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M2}	<i>fosA2</i>	D
82	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-like}	<i>fosA2</i>	D
86	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	A
91	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	C
93	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	C
94	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-like}	<i>fosA2</i>	C
97	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	D
98	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	A
99	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	C
100	<i>E. aerogenes</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2}	<i>fosA2</i>	A
170	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	I
175	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	I
176	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	I
177	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	I
178	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	I
180	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	G
181	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	G ₁
182	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	J
184	<i>S. marcescens</i>	-	-	-	K
185	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	H
186	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	G
187	<i>S. marcescens</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	-	-	H
56	<i>M. morgani</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-like}	-	L
107	<i>M. morgani</i>	-	<i>bla</i> _{TEM-like}	-	M

¹ Confere resistência à fosfomicina.

A presença do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada por PCR e por sequenciamento em 78,94% (30/38) dos isolados clínicos estudados (tabela 15 e 16): *Klebsiella pneumoniae* (n= 1); *Serratia marcescens* (n= 10); *Escherichia coli*, (n= 3); *Morganella morganii* (n= 1); *Proteus mirabilis* (n= 1) *Enterobacter cloacae* (n= 1) *Enterobacter aerogenes* (n= 13).

No grupo CESP (tabela 15), a presença do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada em 25/29 (86,20%) dos isolados clínicos, sendo que a presença de genes do tipo *bla*_{CTX-M} foi observada em 15/29 (52%) das cepas, confirmando-se a presença das variantes *bla*_{CTX-M-2} 11/29 (37,9%) e *bla*_{CTX-M-15} (1/29, 3,4%) em cepas de *E. aerogenes*. Curiosamente, em 13/29 (44,8%) dos isolados do grupo CESP, identificados como *E. aerogenes*, foi encontrado o gene *fosA2*, responsável por conferir resistência à fosfomicina.

No grupo não CESP (tabela 16), a presença do gene *bla*_{KPC-2} foi confirmada em 5/9 (55,5%) dos isolados, sendo que genes do tipo *bla*_{CTX-M} foram identificados em 7/9 (77,7%) das cepas. Com relação a isto, o gene *bla*_{CTX-M-2} foi encontrado em 1/9 (11,1%) dos isolados do grupo não CESP (*P. mirabilis*), enquanto que variantes *bla*_{CTX-M-15} foram identificadas em 4/9 (44,4%) dos isolados não CESP (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P.mirabilis*). Já, a presença do gene *fosA2* foi confirmada em 2/9 (22,2%) dos isolados do grupo não CESP, identificados como *K. pneumoniae*.

Tabela 16- Avaliação dos genes de resistência e perfil clonal no grupo não CESP.

Cepas	Espécie	β-lactamase		Gene <i>fos</i> ¹	ERIC-PCR
		Carbapenemases	Outras beta-lactamases		
1	<i>E. coli</i>	-	-	-	Q
2	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-like}	-	N
22	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-like}	-	N
29	<i>E. coli</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{CTX-M-like} , <i>bla</i> _{TEM-like}	-	O
110	<i>E. coli</i>	-	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	P
106	<i>K. oxytoca</i>	-	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-like}	-	U
113	<i>P. mirabilis</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-2} , <i>bla</i> _{CTX-M-15}	-	R
101	<i>K. pneumoniae</i>	-	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{SHV-like}	<i>fosA2</i>	S
109	<i>K. pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{TEM-like} , <i>bla</i> _{CTX-M-15} , <i>bla</i> _{SHV-like}	<i>fosA2</i>	T

¹ Confere resistência à fosfomicina.

4.4 Tipagem Molecular

A técnica de ERIC-PCR revelou que para cepas de *E. aerogenes* e *S. marcescens* produtoras de KPC-2, houve presença de cepas clonalmente relacionadas (figuras 9 e 10).

As cepas de *Enterobacter aerogenes* apresentaram 4 grupos filogenéticos, com 3 clusters predominantes, apresentando relação clonal: cluster A/A1 (cepas 77, 86, 98, 100 e 76), cluster C (cepas 91, 93, 94 e 99) e cluster D (cepas 81, 82 e 97).

As cepas de *Serratia marcescens* apresentaram 5 grupos filogenéticos com predomínio do um cluster I (cepas 170, 175, 176, 177 e 178).

As cepas de *E.coli* apresentaram 4 filogenéticos com 1 cluster, N, agrupando 2 cepas (2 e 22).

As cepas de *Klebsiella pneumoniae* apresentaram não oram clonalmente relacionadas.

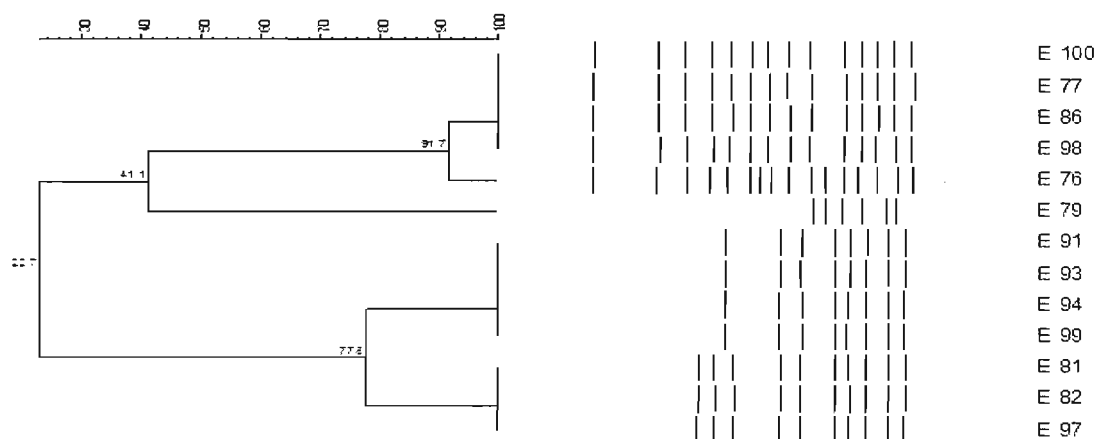


Figura 9- Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de *Enterobacter aerogenes*, a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR. Os padrões gerados por ERIC-PCR foram analisados utilizando o coeficiente de similaridade de Dice (BioNumeric software, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Otimização 0%, tolerância 1%.

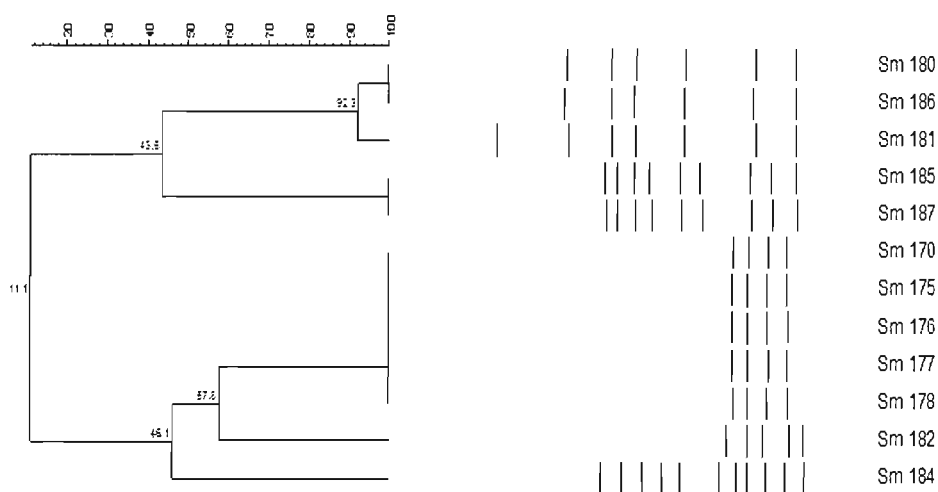


Figura 10- Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de *S. marcescens*, a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR. Os padrões gerados por ERIC-PCR foram analisados utilizando o coeficiente de similaridade de Dice (BioNumeric software, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Otimização 0%, tolerância 1%.



Figura 11. Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de *Klebsiella pneumoniae*, a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR. Os padrões gerados por ERIC-PCR foram analisados utilizando o coeficiente de similaridade de Dice (BioNumeric software, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Otimização 0%, tolerância 1%.

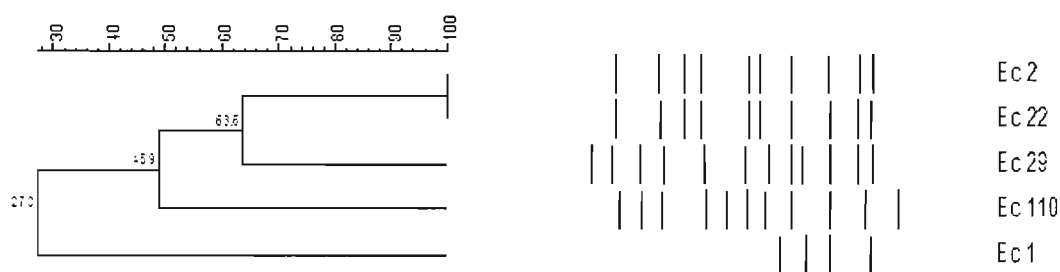


Figura 11. Dendrograma ilustrando a diversidade genética de isolados de *E. coli* a partir dos resultados obtidos por ERIC-PCR. Os padrões gerados por ERIC-PCR foram analisados utilizando o coeficiente de similaridade de Dice (BioNumeric software, Applied Maths, Kortrijk, Belgium). Otimização 0%, tolerância 1%.

5. DISCUSSÃO

Programas de vigilância epidemiológica são necessários para avaliar periodicamente a situação atual da disseminação de bactérias de importância clínica, que adotam um caráter de endemicidade associada com eventos genéticos como a aquisição e expressão de um mecanismo de resistência específico, como é o caso da produção de carbapenemases do tipo KPC em bactérias gram-negativas, cujos genes podem ser carregados por elementos genéticos móveis (ex., plasmídeos) que levam outros determinantes de resistência, o que acaba conferindo um fenótipo de multirresistência.

Atualmente, como fenômeno globalizado, bactérias gram-negativas pertencentes ao grupo CESP e não CESP são um problema para a saúde pública relacionada com IRAs. Ambos os grupos bacterianos tem compartilhado genes de resistência para beta-lactâmicos de amplo espectro, incluindo cefalosporinas e carbapenêmicos, principalmente do tipo ESBL e KPC.

Como alternativas terapêuticas, o uso de antibióticos utilizados no passado, novos antibióticos, ou o uso combinado deles tem sido proposto. Especificamente, para bactérias que produzem carbapenemases do tipo KPC, o uso da fosfomicina e tigeciclina tem sido avaliado como opção terapêutica, principalmente para casos relacionados à infecção do trato urinário, uma das principais causas de infecção em pacientes ambulatoriais e hospitalares (Van *et al.*, 2013).

Resultados do presente estudo confirmam que a produção de KPC no Brasil, não é restrita a *Klebsiella pneumoniae*, sendo que outras espécies de enterobactérias têm adquirido este determinante de resistência, o que tem favorecido a endemicidade e o estabelecimento de surtos de infecção. De salientar que no presente estudo foi encontrada uma diversidade de enterobactérias produtoras de KPC distribuídas pelos diferentes estados do Brasil pertencentes ao grupo CESP: *Enterobacter aerogenes* (n=13); *Serratia marcescens* (n=12); *Morganella morganii* (n=1); *Enterobacter cloacae* (n=1) e ao grupo não CESP: *Escherichia coli* (n=3); *Klebsiella pneumoniae* (n=1) e *Proteus mirabilis* (n=1).

No presente estudo, todas as cepas pertencentes ao grupo CESP (*Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*) e não CESP (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*) apresentaram perfil de multiresistência.

Vale salientar que no Grupo CESP, todos os isolados de *Enterobacter aerogenes* apresentaram resistência à fosfomicina ($CIM_{50} \geq 512 \mu\text{g/ml}$). Já, isolados de *Serratia marcescens* não apresentaram resistência para fosfomicina, porém, foram resistentes à tigeciclina ($CIM_{50} > 8 \mu\text{g/mL}$). Adicionalmente, esta espécie apresentou sensibilidade para gentamicina e sulfametoxazol-trimetoprim. Assim, tanto para fins diagnóstico como instauração de terapias, é importante considerar a espécie que causa infecção, mesmo que sejam agrupadas dentro de um grupo que compartilha características em comum, como o caso do grupo CESP. Por outro lado, quanto mais rápido, preciso e eficiente for o diagnóstico do agente produtor de KPC, mais vantajoso será para o paciente como forma de evitar tratamentos inadequados baseados apenas na sintomatologia, sendo que pode diminuir ou eliminar possível propagação do patógeno principalmente em caso de surtos como foi o que se verificou com a *S. marcescens*.

Para tigeciclina, encontramos dificuldade na interpretação dos resultados, devido à diferença entre os pontos de corte recomendados pelo FDA (Brink *et al.*, 2012b) e pelo EUCAST (<http://www.eucast.org/>), principalmente para valores de CIM entre 2 – 8 $\mu\text{g/mL}$.

No grupo não CESP, a resistência a fosfomicina só observou para isolados de *Klebsiella spp.*, ($128 - \geq 512 \mu\text{g/mL}$) e *Proteus mirabilis* (512 $\mu\text{g/mL}$).

Embora, para avaliar a suscetibilidade tenha sido usado tanto o método de difusão do disco como a determinação da CIM por ágar diluição, observamos diferenças nos resultados. Assim, confirmamos que a realização da CIM é mais confiável. De fato, todos os isolados que carregaram o gene *fosA2* foram resistentes à fosfomicina quando testado pelo método de diluição em ágar e, contrariamente, isolados sensíveis pelo método de difusão do disco foram positivos para a presença do gene *fosA2*.

Embora, o objetivo do trabalho foi restrito à análise bacteriológica, é importante comentar que as cepas de *Serratia marcescens* produtora de KPC-2 foram isoladas de pacientes durante um surto de infecção nosocomial, dois quais 4 foram para óbito.

Como triagem para a produção de carbapenemases, foi utilizada a recomendação da ANVISA (2013). Para o teste de Hodge, foi usado o disco de ertapenem, mas seria interessante avaliar o uso adicional de meropenem, como recomendado pelo CLSI (2013), como forma de evitar falsos negativos, como observado para a cepa de *S. marcescens* 175. O uso de discos contendo imipenem não é recomendado para detectar a presença de carbapenemases (Cotrim *et al.*, 2012). Alguns estudos relatam que cepas com resultado de Hodge negativo, indiciando a não

presença de carbapenemases, podem expressar β -lactamases cromossômicas do tipo AmpC e ou ESBL associadas também a alterações de permeabilidade nos canais de porinas que modificam a ação e a penetração dos antibiótico (Sood, *et al.*,2014; Carvalhaes *et al.*, 2010; Dienstmann *et al.*,2010). Meyer & Picoli (2011), demonstraram também nos seus estudos que o teste de Hodge não é específico para detecção da carbapenemase do tipo KPC. O teste apenas é preditivo da presença ou ausência de carbapenemases no geral.

Dos isolados do grupo CESP testados no meio de cultura CHROMagar KPC as cepas de *Enterobacter* spp., produtoras de KPC (confirmadas por PCR e sequenciamento) apresentaram colônias com cor característica da sua produção (Cor azul metálico). Para as cepas de *S. marcescens* produtoras de KPC, não houve aparecimento de colônias com cor característica. Contrariamente, no grupo não CESP, só as cepas produtoras de KPC apresentaram crescimento com produção de pigmento sugestivo da sua produção. Estudos anteriores, comprovaram que a sensibilidade e especificidade do meio CHROMagar KPC é de 100% e 98,4%, respectivamente, sendo um método de rápida detecção de cepas produtoras de KPC em espécies bacterianas recomendadas (*E. coli*, *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp, *P. mirabilis*) (Nordmann *et al.*, 2012; Samra *et al.*, 2008).

Na pesquisa fenotípica de carbapenemase do tipo KPC usando o inibidor APB, no grupo não CESP das 9 cepas estudadas, 4 foram positivas (44,4%). Uma cepa de *P. mirabilis* (cepa 113) apresentando resistência ao imipenem e meropenem apresentou resultado falso negativo. Segundo as recomendações da ANVISA (2013), esta cepa poderia ser sugestiva da presença de outras carbapenemases (ex., OXA-48) ou pode ser mutante com deficiência em porinas, porém, a presença de KPC-2 foi confirmada.

No grupo CESP, das 29 cepas positivas para o gene *bla*_{KPC}, 24 (82,75%) foram positivas para a presença de carbapenemase do tipo KPC utilizando o método de triagem com o inibidor APB. Uma cepa de *E. aerogenes* (cepa 100) apresentou resultado falso negativo para esta triagem. Muito provavelmente, o inóculo bacteriano utilizado foi demasiado denso.

Dentre os produtores de KPC, o sequenciamento confirmou a presença da variante *bla*_{KPC-2}, confirmando a sua disseminação no Brasil (Andrade *et al* 2012; Seki *et al.*, 2011; Castro *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2009).

A presença de genes ESBL do tipo CTX-M foi mais prevalente em *Enterobacter aerogenes*. A semelhança de estudos anteriores (Arnold *et al.*, 2011; Cai *et al.*, 2008; Dienstmann *et al.*, 2010; Raghunathan *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2005), na presente pesquisa,

foi possível confirmar por estudos moleculares, que algumas bactérias que carregam genes *bla*_{KPC-2}, apresentam também outros genes de resistência para outros antibióticos, tais como genes que codificam para β-lactamases de espectro estendido (CTX-M); apresentando resistência para fluoroquinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos, tornando-se deste modo necessário o uso da antibiotecoterapia combinada. Uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* (cepa 109) apresentou a co-produção de KPC-2, FosA2 e CTX-M-15 confirmando que algumas enterobactérias tem a capacidade de adquirir vários mecanismos de resistência.

O papel da tigeciclina no tratamento de infecções causadas por enterobactérias MDR ainda não foi profundamente estudado. No presente estudo, tanto cepas de *S. marcescens* como uma cepa de *Proteus mirabilis* (cepa 113), e mostraram resistentes à ação da tigeciclina. O que segundo a literatura (Kelesidis *et al.*, 2008), pode ser justificado pelo fato da tigeciclina ter uma baixa atividade contra este patógeno.

A presença de genes *fos*, responsáveis pela resistência a fosfomicina, foi pesquisada em todos os isolados. Interessantemente, o gene *fosA2* foi confirmado (Genbank accession number FO203355.1) em cepas de *Enterobacter aerogenes* e *Klebsiella pneumoniae* resistentes à fosfomicina.

Finalmente, a tipagem molecular por ERIC-PCR, permitiu a análise da diversidade genética entre as espécies estudadas, pertencentes ao grupo CESP e não CESP. No grupo CESP, os isolados de *Enterobacter aerogenes* apresentaram 4 grupos filogenéticos, com 3 *clusters* predominantes, apresentando relação clonal. Os isolados de *Serratia marcescens* apresentaram 5 grupos filogenéticos com predomínio do um cluster. É válido salientar que se tratou de dois casos de surto de infecção hospitalar (dados não apresentados).

6. CONCLUSÕES

Frente aos resultados obtidos, podemos concluir que a avaliação do efeito sinérgico decorrente do uso combinado de antibacterianos é de extrema importância, uma vez que genes *bla_{KPC}* têm sido adquiridos por uma ampla diversidade de enterobactérias de importância médica que apresentam um perfil de multirresistência associada.

Foi possível concluir que para *S. marcescens* produtora de KPC-2, a fosfomicina, gentamicina e STX, podem constituir alternativas terapêuticas para o tratamento de infecções associadas.

A tigeciclina pode constituir uma alternativa terapêutica para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de KPC-2, principalmente *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae* e *Morganella morganii*.

O teste de Hodge, embora só confirme a presença de carbapenemases, foi útil na triagem de carbapenemases, assim como o CHROMagar KPC, o qual é mais específico para produtores da enzima KPC.

O uso do inibidor enzimático APB como método de triagem de carbapenemases do tipo KPC é mais abrangente para as espécies (CESP e não CESP).

Confirmou-se a presença do gene *bla_{KPC-2}* em enterobactérias do grupo CESP e não CESP.

Foi confirmada a co-produção de ESBLs do tipo CTXM em cepas de enterobactérias, do grupo CESP e não CESP, produtoras de KPC-2.

Foi identificado o gene *fosA2* como o principal gene de resistência à fosfomicina em enterobactérias pertencentes ao grupo CESP (*Enterobacter aerogenes*) e não CESP (*Klebsiella pneumoniae*).

Fosfomicina apresentou atividade, *in vitro*, contra todas as cepas produtoras de KPC-2, com exceção de cepas de *Klebsiella oxytoca* e *Proteus mirabilis*, assim também como para as cepas produtoras de FosA2 (*Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae*).

Isolados de *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes* produtores de KPC-2 apresentam relação de clonal, sendo associados a surto de infecção nosocomial.

7. REFERÊNCIAS

- Abboud, CS, Bergamasco MD, Doi AM, Zandonadi EC, Barbosa V, Cortez D, Saraiva CR, Doy C, Garcia DO. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community. *J Infect Prev* 2011 July; 12 (4): 150-153.
- Acar, JF *Serratia marcescens* infections. *Infect Control*. 1986 May; 7 (5): 273-8.
- Acar JF, Goldstein FW. Trends in bacterial resistance to fluoroquinolones. *Clin. Infect. Dis.* 1997 Jan; 24 Suppl 1: S67-73.
- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multirresistentes. Nota técnica N° 01/2013.
- Albrechtova, K.; Kubelova, M; Mazancova J, Dolejska M, Literak I, Cizek A. High prevalence and variability of CTX-M-15-producing and fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* observed in stray dogs in rural Angola. *Microb Drug Resist.* 2014 Feb; 20 (4): 372-5.
- Almeida, A.C.; Vilela, M.A.; Cavalcanti, F.L.; Martins, W.M.; Morais Jr, M.A.; Morais, M.M. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Abr; 56 (4): 2205-6.
- Almeida AC, de Sá Cavalcanti FL, Vilela MA, Gales AC, de Morais MA Jr, Camargo de Morais MM. *Escherichia coli* ST502 and *Klebsiella pneumoniae* ST11 sharing na IncW plasmid harbouring the *bla*(KPC-2) gene in an Intensive Care Unit patient. *Int J Antimicrob Agents.* 2012 Oct; 40 (4): 374-6.
- Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug; 45 (8): 2723-5.
- Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Jul; 55 (7): 3579-83.

- Arnold RS, Thom KA, Sharma S, Phillips M, Kristie Johnson J, Morgan DJ. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *South Med J*. 2011 Jan; 104 (1): 40-5.
- Azim A, Dwivedi M, Rao PB, Baronia AK, Singh RK, Prasad KN, Poddar B, Mishra A, Gurjar M, Dhole TN. Epidemiology of bacterial colonization at intensive care unit admission with emphasis on extended-spectrum beta-lactamase- and metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria--an Indian experience. *J Med Microbiol*. 2010 Aug; 59 (Pt 8): 955-60.
- Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am J Clin Pathol*. 1966 Apr; 45 (4): 493-6.
- Beirão EM, Furtado JJ, Girardello R, Ferreira Filho H, Gales AC. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. *Braz J Infect Dis*. 2011 Jan-Feb; 15 (1): 69-73.
- Berrazeg M, Diene SM, Drissi M, Kempf M, Richet H, Landraud L, Rolain JM. Biotyping of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates from France and Algeria using MALDI-TOF MS. *PLoS One*. 2013 Apr 19; 8 (4): e61428.
- Biedenbach DJ, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Characterization of fluoroquinolone-resistant beta-hemolytic *Streptococcus* spp. isolated in North America and Europe including the first report of fluoroquinolone-resistant *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2004).
- Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol*. 2000 Mar; 38 (3): 1048-52.
- Bonnet R, Dutour C, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, Labia R, De Champs C, Sirot J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Aug; 45 (8): 2269-75.
- Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B, Karumudi U, Tolaney P, Quale J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul; 49 (7): 3018-20.

- Bradford PA. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin Microbiol Rev.* 2001 Oct; 14 (4): 933-51.
- Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, Nordmann P. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol.* 2012a Feb; 50 (2): 525-7.
- Brink AJ, Bizos D, Boffard KD, Feldman C, Grolman DC, Pretorius J, Richards GA, Steyn E. Guideline summary: appropriate use of tigecycline. *S Afr J Surg.* 2012b Feb 14; 50 (1): 20-1.
- Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar; 54 (3): 969-76.
- Cabral AB, Melo Rde C, Maciel MA, Lopes AC. Multidrug resistance genes, including bla(KPC) and bla(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2012 Oct; 45 (5): 572-8.
- Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Jun; 52 (6): 2014-8.
- Calvo J, Cantón R, Cuenca FF, Mirelis B, Navarro F. Detección fenotípica de mecanismos de resistencia en gram negativos - SEIMC. 2011. Capitulo 38.
- Cantón R, Coque TM. The CTX-M beta-lactamase pandemic. *Curr Opin Microbiol.* 2006 Oct; 9 (5): 466-75.
- Carvalho RGC, Carneiro ICRS, Pinheiro MS, Pinheiro SC, Azevedo PSR, Santos SD, Costa ARF, Ramos FLP, Lima KVB. Caracterização fenotípica e genotípica de *Serratia marcescens* provenientes de Unidade Neonatal de Referência em Belém, Pará, Brasil. *Rev Pan-Amaz Saúde.* 2010 Mar; 1 (1): 101-106.
- Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Feb; 65 (2): 249-51.
- Castro MV, Santos B HC, Melo DM, Costa AC, Filho LS. Isolamento de Amostras Hospitalares de *Klebsiella pneumoniae*, Produtoras de KPC na Cidade de João Pessoa, PB - Brasil. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia. Resumo ID: 619-1 2009.

- Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR, Blázquez J. The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 2009 Nov; 191 (22): 6968-74.
- Castañeda-García A, Blázquez J, Rodríguez-Rojas A. Molecular Mechanisms and Clinical Impact of Acquired and Intrinsic Fosfomycin Resistance. J. Antibiotics. 2013; 2 (2): 217-236.
- Chang MR, Biberg CA, Lopes FA, Tetila AF, Pignatari AC. The first report of infection with *Klebsiella pneumoniae* carrying the bla(kpc) gene in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev Soc Bras Med Trop. 2013 Jan-Feb; 46 (1): 114-5.
- Chapman PA, Ellin M, Ashton R, Shafique W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. Int J Food Microbiol. 2001 Aug 15; 68 (1-2): 11-20.
- Chenia HY, Pillay B, Pillay D. Analysis of the mechanisms of fluoroquinolone resistance in urinary tract pathogens. J Antimicrob Chemother. 2006 Dec; 58 (6): 1274-8.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard-ninth edition, M7-A9 CLSI, USA, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement, CLSI M100-S22, USA, 2012.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement, M100-S23 CLSI, USA, 2013.
- Correa Silva CV, Camargo TZ, Scherer PF, Marra AR. A hospital-based matched case-control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. BMC Infect Dis. 2013 Feb; 11; 13:80.
- Cotrim ER., Rocha R.DR., Ferreira M.FR. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase –KPC em Enterobacteriaceae: o desafio das bactérias multirresistentes. Pós em Revista. Edição 5, 2012.
- Cury AP, Andreatzi D, Maffucci M, Caiaffa-Junior HH, Rossi F. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Clinics (Sao Paulo). 2012 Dec; 67 (12): 1427-31.

- Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in blaKPC gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov; 55(11): 5370-3.
- Dalmarco E M., Blatt S L, Córdova CMM. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)- Revisão. *RBAC.* 2006; 38 (3): 171-177,
- D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leão RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, Marques EA. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010 Nov; 68 (3): 337-8.
- Dienstmann R., Picoli S, Meyer G, Schenkel T, Steyer J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2010 Feb; 46 (1): 23-27.
- Elliott E, Brink AJ, van Greune J, Els Z, Woodford N, Turton J, Warner M, Livermore DM. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin Infect Dis.* 2006 Jun 1; 42 (11): e95-8.
- Endimiani A, Patel G, Hujer KM, Swaminathan M, Perez F, Rice LB, Jacobs MR, Bonomo RA. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Jan; 54 (1): 526-9.
- Fàbrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J. Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microb Biotechnol.* 2009 Jan; 2 (1): 40-61.
- Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis.* 2012 Nov-Dec; 16 (6): 577-80.
- Guimarães DO, Momesso L da Silva, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova.* 2010; 33 (10).
- Hanson ND. AmpC beta-lactamases: what do we need to know for the future? *J Antimicrob Chemother.* 2003 Jul; 52 (1): 2-4.

- Henriques I, Moura A, Alves A, Saavedra MJ, Correia A. Analysing diversity among beta-lactamase encoding genes in aquatic environments. *FEMS Microbiol Ecol.* 2006 Jun; 56 (3): 418-29.
- Hossain A, Ferraro MJ, Pino RM, Dew RB 3rd, Moland ES, Lockhart TJ, Thomson KS, Goering RV, Hanson ND. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004 Nov; 48 (11): 4438-40.
- Hoşoğlu S, Gündes S, Kolaylı F, Karadenizli A, Demirdağ K, Günaydin M, Altindis M, Caylan R, Ucmak H. Extended-spectrum beta-lactamases in ceftazidime-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in Turkish hospitals. *Indian J Med Microbiol.* 2007 Oct; 25 (4): 346-50.
- Hou J, Yang X, Zeng Z, Lv L, Yang T, Lin D, Liu JH. Detection of the plasmid-encoded fosfomicin resistance gene *fosA3* in *Escherichia coli* of food-animal origin. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Apr; 68 (4): 766-70.
- Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Sep; 56 (9): 4990.
- Jafri SA, Qasim M, Masoud MS, Rahman MU, Izhar M, Kazmi S. Antibiotic resistance of *E. coli* isolates from urine samples of Urinary Tract Infection (UTI) patients in Pakistan. *Bio information.* 2014 Jul 22; 10 (7): 419-22.
- Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis.* 1988 Jul-Aug; 10 (4): 867-78.
- Jiménez A, Alvarado A, Gómez F, Carrero G, Fajardo C. [Risk factors associated with the isolation of extended spectrum betalactamases producing *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary care hospital in Colombia]. *Biomedica.* 2014 Apr; 34 Suppl 1: 16-22.
- Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant Enterobacteriaceae: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Nov; 62 (5): 895-904.

- Kim MS, Jun LJ, Shin SB, Park MA, Jung SH, Kim K, Moon KH, Jeong HD. Mutations in the *gyrB*, *parC*, and *parE* genes of quinolone-resistant isolates and mutants of *Edwardsiella tarda*. *J Microbiol Biotechnol*. 2010 Dec; 20 (12): 1735-43.
- Kusahara DM, Peterlini MAS, Pedreira MLG. Colonização orofaríngea de crianças à admissão em uma unidade de cuidados intensivos. *Acta Paul. Enferm*. 2007 Oct-dec; 20 (4): 421-7.
- Le J, McKee B, Srisupha-Olarn W, Burgess DS. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Med Res*. 2011 May 19; 3 (3): 106-10.
- Livermore DM. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1995 Oct; 8 (4): 557-84.
- Low DE, Muller M, Duncan CL, Willey BM, de Azavedo JC, McGeer A, Kreiswirth BN, Pong-Porter S, Bast DJ. Activity of BMS-284756, a novel des-fluoro (6) quinolone, against *Staphylococcus aureus*, including contributions of mutations to quinolone resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002 Apr; 46 (4): 1119-21.
- Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 12.ed. Porto Alegre: ArtMed, 2010.
- Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Mar; 18 (3): 268-81.
- Meacham KJ, Zhang L, Foxman B, Bauer RJ, Marrs CF. Evaluation of genotyping large numbers of *Escherichia coli* isolates by enterobacterial repetitive intergenic consensus-PCR. *J Clin Microbiol*. 2003 Nov; 41 (11): 5224-6.
- Menezes APO, Lobo MM, Barberino MG, Reis JN. Prevalência de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemase em Hospitais de Salvador, Bahia. 27º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2013 Natal, Resumo ID: 1480-1.
- Meyer G, Picoli S. U. Fenótipos de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre, *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 2011 Fev; 47 (1): 24-31.
- Minarini LA, Gales AC, Palazzo IC, Darini AL. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. *Curr Microbiol*. 2007 May; 54 (5): 335-41.

- Miriagou V, Tzelepi E, Gianneli D, Tzouvelekis LS. *Escherichia coli* with a self-transferable, multiresistant plasmid coding for metallo-beta-lactamase VIM-1. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003 Jan; 47 (1): 395-7.
- Moghaddam MN, Beidokhti MH, Jamehdar SA, Ghahraman M. Genetic properties of blaCTX-M and blaPER β -lactamase genes in clinical isolates of Enterobacteriaceae by polymerase chain reaction. *Iran J Basic Med Sci.* 2014 May; 17 (5): 378-83.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jan; 53 (1): 333-4.
- Muzaheed, Doi Y, Adams-Haduch JM, Endimiani A, Sidjabat HE, Gaddad SM, Paterson DL. High prevalence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* among inpatients and outpatients with urinary tract infection in Southern India. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun; 61 (6): 1393-4.
- Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008 Apr; 52 (4): 1257-63.
- Naheed A, Kalluri P, Talukder KA, Faruque AS, Khatun F, Nair GB, Mintz ED, Breiman RF. Fluoroquinolone-resistant *Shigella dysenteriae* type 1 in northeastern Bangladesh. *Lancet Infect Dis.* 2004 Oct; 4 (10): 607-8.
- Nakamura S, Nakamura M, Kojima T, Yoshida H. gyrA and gyrB mutations in quinolone-resistant strains of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1989 Feb; 33 (2): 254-5.
- Neu HC, Gootz TD. Antimicrobial Chemotherapy. In: Baron S. *Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 11.
- Nogueira K S, Daur AV, Cogo LL, Monteiro CLB, Costa L MD. Resistência a Carbapenemicos em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* Produtoras de Beta-Lactamase de Espectro Estendido. 25° Congresso Brasileiro de Microbiologia, Resumo ID: 2412-2 2009.
- Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol.* 2012 Aug; 50 (8): 2761-6.
- O'hara CM. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. *Clin Microbiol Rev.* 2005 Jan; 18 (1): 147-62.

- Pan XS, Fisher LM. Cloning and characterization of the *parC* and *parE* genes of *Streptococcus pneumoniae* encoding DNA topoisomerase IV: role in fluoroquinolone resistance. *J Bacteriol.* 1996 Jul; 178 (14): 4060-9.
- Pankey GA. Tigecycline. *J Antimicrob Chemother.* 2005 Sep; 56 (3): 470-80.
- Papp-Wallace KM, Taracila MA, Gatta JA, Ohuchi N, Bonomo RA, Nukaga M. Insights into β -lactamases from *Burkholderia* species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants. *J Biol Chem.* 2013 Jun 28; 288 (26): 19090-102.
- Park YJ, Lee S, Kim YR, Oh EJ, Woo GJ, Lee K. Occurrence of extended-spectrum (beta)-lactamases and plasmid-mediated AmpC (beta)-lactamases among Korean isolates of *Proteus mirabilis*. *J Antimicrob Chemother.* 2006 Jan; 57 (1): 156-8.
- Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jun; 53 (6): 2702.
- Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009 Feb; 63 (2): 265-8.
- Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb; 68 (2): 312-6.
- Pitout JD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2010 Feb; 16 (2): 165-70.
- Poirel L, Dortet L, Bernabeu S, Nordmann P. Genetic features of blaNDM-1-positive Enterobacteriaceae. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Nov; 55 (11): 5403-7.
- Poirel L, Revathi G, Bernabeu S, Nordmann P. Detection of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Kenya. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011 Feb; 55 (2): 934-6.
- Poirel L, Benouda A, Hays C, Nordmann P. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Morocco. *J Antimicrob Chemother.* 2011 Dec; 66 (12): 2781-3.
- Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev.* 1998 Oct; 11 (4): 589-603.

- Queiroz GM, Silva LM, Pietro RLR, Salgado HRN. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. *Revista Brasileira de Clínica Médica*. 2012 Mar/Abr; 10 (2): 132-8.
- Raghunathan A, Samuel L, Tibbetts RJ. Evaluation of a real-time PCR assay for the detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes in microbiological samples in comparison with the modified Hodge test. *Am J Clin Pathol*. 2011Apr; 135 (4): 566-71.
- Raz R. Fosfomicin: an old--new antibiotic. *Clin Microbiol Infect*. 2012 Jan; 18 (1): 4-7.
- Rapp RP, Urban C. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases in Enterobacteriaceae: history, evolution, and microbiology concerns. *Pharmacotherapy*. 2012 May; 32 (5): 399-407.
- Rice LB, Carias LL, Hutton RA, Rudin SD, Endimiani A, Bonomo RA. The KQ element, a complex genetic region conferring transferable resistance to carbapenems, aminoglycosides, and fluoroquinolones in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Sep; 52 (9): 3427-9.
- Rossi F, Andreazzi DB. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma. São Paulo. Atheneu. 2005.
- Rupp ME, Fey PD. Extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing Enterobacteriaceae: considerations for diagnosis, prevention and drug treatment. *Drugs*. 2003; 63 (4): 353-65.
- Sader HS, Mendes RE, Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Zocco C L, Sampaio J. Perfil de sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas do trato respiratório baixo de pacientes com pneumonia internados em hospitais brasileiros – Resultados do Programa SENTRY, 1997 e 1998. *J Pneumol*. 2001 mar/abr; 27, (2): 59-67.
- Samra Z, Bahar J, Madar-Shapiro L, Aziz N, Israel S, Bishara J. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2008 Sep; 46 (9): 3110-1.
- Segal H, Elisha BG. 2006. Resistance to β -lactams, and reduced susceptibility to carbapenems, in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* due to interplay between CTX-M 15 and altered outer membrane permeability. *Southern African Journal of Epidemiology and Infection*. 2006; 21 (2): 41– 44.
- Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves Cde F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen Ø, Asensi MD. Molecular epidemiology of

- KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Jun; 70 (2): 274-7.
- Scherbaum M, Kösters K, Mürbeth RE, Ngoa UA, Kremsner PG, Lell B, Alabi A. Incidence, pathogens and resistance patterns of nosocomial infections at a rural hospital in Gabon. *BMC Infect Dis*. 2014 Mar 4; 14:124.
- Sneath, P. H. ; Sokal, R. R. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classifications. San Francisco: W. H. freeman. 1973; p.573.
- Sood S. Identification and differentiation of carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae*: a phenotypic test evaluation study from jaipur, India. *J Clin Diagn Res*. 2014 Jul; 8 (7): DC01-3.
- Souli M, Galani I, Boukovalas S, Gourgoulis MG, Chryssouli Z, Kanellakopoulou K, Panagea T, Giamarellou H. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 May; 55 (5): 2395-7.
- Stock I. [Infectious diseases caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae--a particular challenge for antibacterial therapy]. *Med Monatsschr Pharm*. 2014 May; 37 (5):162-72; quiz 173-4. Review.
- Tansarli GS, Poulidakos P, Kapaskelis A, Falagas ME. Proportion of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence--systematic review. *J Antimicrob Chemother*. 2014 May; 69 (5): 1177-84.
- Tenover FC. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am J Med*. 2006 Jun; 119 (6 Suppl 1): S3-10; discussion S62-70.
- Thiolas A, Bollet C, La Scola B, Raoult D, Pagès JM. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Apr; 49 (4): 1354-8.
- Torres A, Liapikou A. Levofloxacin for the treatment of respiratory tract infections. *Expert Opin Pharmacother*. 2012 Jun; 13 (8): 1203-12.
- Trabulsi L R, Alterthum F. *Microbiologia*. 5 ed. Atheneu, São Paulo, 2008.
- Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother*. 2008 Dec; 62 (6): 1257-60.

- Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Voulgari E, Pittaras T, Sofianou D, Pournaras S, Petropoulou D. Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2009 Nov; 47 (11): 3420-6.
- Van Duin D, Kaye KS, Neuner EA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a review of treatment and outcomes. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Feb; 75 (2): 115-20.
- Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, Román JC, Mora GC, García P. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol*. 2012 Sep; 61 (Pt 9): 1270-9.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr; 45 (4): 1151-61.
- Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2001 Apr; 45 (4): 1151-61.
- Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Dec; 53 (12): 5046-54.
- Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberknecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2009 Sep; 34 (3): 286-8.
- Zhanel GG, Ennis K, Vercaigne L, Walkty A, Gin AS, Embil J, Smith H, Hoban DJ. A critical review of the fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Drugs*. 2002; 62 (1): 13-59.