ANA PAULA CURY

Avaliação de método molecular para detecção de colonização por carbapenemases comparado com a cultura de vigilância diretamente do *swab* retal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profª. Drª. Flávia Rossi

São Paulo
2021

ANA PAULA CURY

Avaliação de método molecular para detecção de colonização por carbapenemases comparado com a cultura de vigilância diretamente do *swab* retal

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências

Programa de Fisiopatologia Experimental
Orientadora: Profª. Drª. Flávia Rossi

São Paulo
2021

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cury, Ana Paula
Avaliação de método molecular para detecção de colonização por carbapenemases comparado com a cultura de vigilância diretamente do swab retal / Ana Paula Cury. -- São Paulo, 2020.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Fisiopatologia Experimental.
Orientadora: Flávia Rossi.

Descritores: 1.Bactérias aeróbias gram-negativas 2.Resistência microbiana a medicamentos 3.Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos 4.Genes de carbapenemases 5.Cultura de vigilância 6.Testes de sensibilidade microbiana 7.Klebsiella pneumoniae carbapenemase 8.Técnicas de diagnóstico molecular

USP/FM/DBD-309/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

A meus pais, Guilherme e Zoraide, pelo amor incondicional, por serem meu porto seguro e mentores.

Ao meu marido, Márcio e filhos, Kauê e Mariana, pelas suas existências, pelo amor que nos nutre, pelo sentido da minha vida.

Ao meu irmão, Daniel e minha cunhada, Maíra pelo incentivo, torcida e apoio.

Aos meus sobrinhos, Ana Luiza e Guilherme pelas suas existências e amor que nos une.

Aos meus sogros, Roberto e Marisa, pela torcida, amor e orações.

Aos meus amigos por completarem o sentido da minha vida

Dedico esta tese a vocês, minha família e amigos, minha gratidão, meu tudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço infinitamente a Deus pela minha vida e por me guiar nos desafios pessoais e profissionais colocando em meu caminho pessoas maravilhosamente especiais as quais seguem os meus agradecimentos;

A minha orientora, Dra Flávia Rossi, pela dedicação e orientação neste trabalho com a criticidade e incentivo a reflexão, discussão e arguição dos conteúdos técnico-científicos. Agradeço pela motivação inicial em microbiologia que se deu, antes mesmo de nos conhecer, e portanto sem saber, a sua orientação iniciou-se em minha vida muito antes de um projeto científico. Profissionalmente, agradeço os ensinamentos sob o olhar administrativo, gerencial, preventivo, de riscos e oportunidades, por tratar serviço público como privado, respeitando os recursos financeiros e os pacientes indistintivamente. Acima de tudo, agradeço pelo últimos 20 anos a versatilidade da nossa relação possibilitando discutir planejamento estratégico e gerencial ou científico e em momento seguinte, filosofar sobre espiritualidade e evolução humana compartilhando ensinamentos de vida, conselhos pessoais e profissionais. Quanta gratidão e carinho me ligam a você!

A Dra Silvia Costa por sua generosidade, apoio, torcida e acolhimento no LIM 49, bem como a sua equipe, em especial Lauro, Ana Paula, Roberta e Lucas que dedicaram seus tempos na execução e discussão dos resultados de PFGE e SCG. Muito obrigada

Ao Acram, Cecilia pela ajuda no sequenciamento do DNA e a Marcia Mafucci pelos ensinamentos da PCR *in house* e seus fins de semana comigo confeccionando infindáveis reações. Obrigada por tanto.

Ao Lauro Perdigão, pelo incentivo, pelo apoio no *response of reviewers* mais desafiador, pelo aprendizado, pela luz nas resoluções, pela conectividade de almas.

Ao Dr Alberto Duarte pelo apoio na publicação dos artigos, incentivo dos estudos e valorização desta trajetória.

Aos participantes da minha banca de qualificação João Nóbrega, Ìcaro Boszczowski e Marcelo Buratini que contribuíram para a objetividade deste estudo.

Aos colaboradores da Microbiologia DLC-HCFMUSP em especial, Marlene, Eliane, Abdo, Ivone, Sandro, Tania, Maria Janilma, Vera, Alessandra e Lindissy pela paciência, apoio e competência ao lidar com suas atividades tornando a minha supervisão mais leve e eficiente no momento da confecção deste trabalho.

As minhas parceiras de coordenação Adriana, Luciana, Maria Renata, Rosenilda e Thaís pela amizade, compreensão, competência e torcida para o sucesso deste trabalho.

Aos colaboradores da Microbiologia do HSP em especial os meus parceiros de supervisão Natalya e Thomás, assim como Dra Toninha, que torceram e apoiaram com muito carinho, compreensão e parceria os meus momentos de ausência e dedicação a este estudo. Nunca esquecerei.

A minha amiga, irmã, Fabiana por me ajudar na formatação da tese e juntamente com a Silvia, igualmente irmã de alma, me apoiarem e estarem ao meu lado nas horas mais felizes e difíceis dos últimos 35 anos da minha vida. Como seria sem vocês?

Aos meus amigos Silvia, Vanderlei, Fabiana, Marcelo, Fernanda, Fabricio, Amaury, Cinthia, Carlos, Bel, Thomás, Lauro e Adriana pelos momentos de alegrias, festas, músicas e boas risadas que me energizaram no período deste estudo.

Aos meus pais, Guilherme e Zoraide, pelo exemplo de luta, perseverança e postura diante das adversidades e vitórias. Me orgulho das suas trajetórias e superação. Da capacidade de inteligência emocional e firmeza diante dos obstáculos. Obrigada por tanto amor que transbordou de seus braços ou simplesmente no silêncio acolhedor de seus olhares. Nunca me senti só! Nunca achei que ia dar errado! Se cai, levantei! Levantando, corri! Fui para onde quis! Sempre com vocês! Sempre juntos! -Viu pai; sempre juntos! Sei que esta comigo! Sou vocês! E amo-os profundamente.

A meu irmão, Daniel, pela parceria da vida toda, pelas conversas, conselhos, torcida e orgulho que sinto de ti desde a nossa feliz e amada infância. Sei que esta por mim, e eu por você, assim como o pai e a mãe sempre estiveram por nós.

Ao meu marido, Márcio, por sonharmos juntos, por errarmos e reerguermos, pelos tantos desafios que nos fortalecem e nos mantém na trilha da vida, lado a lado, seguindo com projetos futuros recheados sobretudo de amor e manutenção de uma família tão feliz como a que nos recebeu neste mundo.

Ao meu filho Kauê, por me ensinar, sem imaginar, que as diferenças engrandecem e que sou capaz de muito mais! Sou capaz de aprender teorias espaciais para estudar com você, sou capaz de aprender box para te defender, capaz de refletir sobre o quanto minha vida ganhou sentido por você. Obrigada pelo homem que esta se tornando, tenho orgulho e amor profundo por você.

A minha filha, por me ensinar a ser destemida, autêntica, ousada e a não ser o espelho da sombra do outro, tendo coragem em discordar de questões contra seus princípios, mesmo que isso te custe a solidão. Parece profundo demais para uma criança de 12 anos, eu sei! mas esta é a Mariana, minha filha! Sei o quanto a minha ausência foi difícil pra você e agradeço por cada cobrança pois me reforça a cada dia o endereço aonde devo atracar o meu navio após essa viagem.

Aos meus sogros, Roberto e Marisa, por tudo que foram em minha vida desde que os conheci, pelos avós impecáveis, pela presença, pelo apoio, torcida e por tudo que representam a mim. Só eu sei a importância e gratidão de seus atos. Obrigada por tudo. Saudades eternas.

A Rebeca, Eva, Moana e Aurora, filhas de pêlos, por todos os dias transformar minhas energias em leveza, inocência e amor genuíno.

“O navio está seguro quando esta no porto, mas não é para isso que se fazem navios”

(William G.T. Shedd)

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

1 Introdução 23
1.1 Resistência antimicrobiana no âmbito mundial: ameaça global 24
1.2 Impacto de infecções causadas por Enterobacterales resistente a carbapenêmicos 28
1.3 Importância da detecção de pacientes colonizados 31
1.4 Mecanismo de resistência a carbapenêmicos 33
1.5 Limitações da detecção fenotípica de carbapenemases 42
1.5.1 Teste de sensibilidade 42
1.5.2 Teste de Hodge modificado 45
1.5.3 Testes baseados em inibidores 46
1.5.4 Método da inativação do carbapenêmico 48
1.5.5 Métodos bioquímicos colorimétricos 49
1.6 Métodos para detecção de colonizados por ERC e/ou produtores de carbapenemase 50

2 Objetivos 54

3 Métodos 56
3.1 Tipo do estudo 57
3.2 Local do estudo 57
3.3 Espécimes clínicos, população e período 57
3.4 Critério de inclusão e exclusão 57
3.5 Coleta das amostras 58
3.6 Aspectos Éticos 59
3.7 Método de referência: PCR *in house* realizado a partir da CV-ERC em caldo de enriquecimento tioglicolato sem antibiótico 59
3.7.1 Cultura de vigilância 59
3.7.2 Identificação bacteriana 61
3.7.3 Teste de sensibilidade 62
3.7.4 Testes fenotípicos para detecção de carbapenemases 62
3.7.4.1 Teste de Hodge modificado quantitativo 62
3.7.4.2 EDTA 63
3.7.5. Reação em Cadeia da Polimerase *in house* 64
3.8 Sistema Gene Xpert® 67
3.9 Etapas do processamento das amostras 71
3.10 Interpretação, resultados discrepantes e testes investigacionais 72
3.10.1 Xpert Carba-R® e método de referência 72
3.10.2 Xpert Carba-R® e cultura de vigilância 74
3.11 Testes investigacionais 77
3.11.1 Reavaliação e repetição da cultura de vigilância, PCR *in* 77
house e Xpert Carba-R® 77
3.11.2 Applied Biosystems 7500® *Fast Real-Time* PCR 77

3.11.3 Sequenciamento de DNA 79
3.11.4 Sequenciamento do genoma total bacteriano 80
3.12 Pulsed field gel electrophoresis (PFGE)..... 83
3.13 Análise do *threshold cycle* (Ct)..... 85
3.14 Limite de detecçao do ensaio Xpert Carba-R® e cultura de..... 87
vigilância..... 87
3.15 Critérios para mensurar indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases 89
3.16 Análise Estatística..... 90

4 Resultados 91
4.1 Xpert Carba-R® versus método de referência 92
4.1.1 Detecção de genes alvos..... 92
4.1.2 Desempenho diagnóstico do Xpert Carba-R® 93
4.1.3 Resultados discrepantes..... 97
4.1.4 Xpert Carba-R®: análise do threshold cycle (Ct) para o gene *bla*$_{KPC}$ 100
4.1.5 Xpert Carba-R®: análise do limite de detecção 101
4.2 Correlação do Xpert Carba-R® com a cultura de vigilância 103
4.2.1 Cultura de vigilância: limite de detecção, microrganismos, testes fenotípicos e perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos 103
4.2.2 Xpert Carba-R® versus cultura de vigilância 106
4.3 Mensurar as indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases a partir de método genotípico em comparação ao fenotípico.....114

5 Discussão 118

6 Conclusão 133

7 Anexos 135

8 Referências Bibliográficas.....160

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	-	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN	-	Bacilo Gram-Negativo
BGN-MDR	-	Bacilo Gram-Negativo resistente a múltiplas drogas
CAPpesq	-	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CC	-	Complexo Clonal
CDC	-	*Centers for Disease Control and Prevention*
CIM	-	Concentração inibitória mínima
CLSI	-	*Clinical and Laboratory Standards Institute*
CONEP	-	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
Ct	-	*Threshold cycle*
DLC	-	Divisão de Laboratório Central
ERC	-	Enterobacterales Resistente a Carbapenêmicos
EPC	-	Enterobacterales Produtora de Carbapenemase
EUCAST	-	*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
FDA	-	*Food and Drug Administration*
GCIH	-	Grupo de Controle de Infecção Hospitalar
HCFMUSP	-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
ICHC	-	Instituto Central do Hospital da Clínicas
ID	-	Identificação
IRAS	-	Infecções relacionadas a assistência á saúde
Kp-KPC	-	*Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC
LD	-	Limite de Detecção
MIC	-	*Minimal Inhibitory Concentration*
MLST	-	*Multilocus Sequence Typing*
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
OPC	-	Organismos Produtores de Carbapenemase
PBA	-	Ácido Fenil Borônico

PCR	-	*Polymerase Chain Reaction*
PFGE	-	*Pulsed-field Gel Electrophoresis*
PS	-	Pronto Socorro
PCC	-	*Probe Check Control*
SGC	-	Sequenciamento de Genoma Completo
SPC	-	*Sample Processing Control*
ST	-	*Sequence Type*
SUS	-	Sistema Único de Saúde
TCLE	-	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TDR	-	Testes de Diagnóstico Rápido
TSA	-	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos
UFC	-	Unidade Formadora de Colônia
USP	-	Universidade de São Paulo
UTI	-	Unidade de Terapia Intensiva
UT	-	Unidade de Transplante
WGS	-	*Whole Genome Sequencing*
WHO	-	*World Health Organization*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação das β-lactamases 40

Quadro 2 - Principais carbapenemaneses em Enterobacterales 41

Quadro 3 - Variação da CIM dos carbapenêmicos em Enterobacterales, *Acinetobacter spp* e *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases adquiridas 42

Quadro 4 - Ponto de corte para carbapenêmicos de acordo com CLSI e EUCAST[127,128] 43

Quadro 5 - Método de referência: PCR *in house* a partir da CV-ERC 65

Quadro 6 - Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento. 66

Quadro 7 - Interpretação e investigação de resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e método de referência. 73

Quadro 8 - Possíveis fenótipos associados a métodos genotípicos e CV-ERC74

Quadro 9 - Interpretação e investigação de resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e a CV-ERC. 75

Quadro 10 - Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento[203] 79

Quadro 11 - Isolados bacterianos usados como controle positivo 87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes alvos detectados pelo Xpert Carba-R® e método de referência 92

Tabela 2 - Genes alvos detectados pelo Xpert Carba-R® e método de 93
referência por unidade de internação 93

Tabela 3 - Performance diagnóstica do Xpert Carba-R® versus método de referência (continuação) 95

Tabela 4 - Resultados discrepantes: Xpert Carba-R® postivo e método de referência negativo, resultados dos testes investigacionais e desfecho 98

Tabela 5 - Resultados discrepantes: Xpert Carba-R® negativo e PCR *in house* positivo.....99

Tabela 6 - Limite de detecção do ensaio Xpert Carba-R® 102

Tabela 7 - Resultados do Xpert Carba-R® versus CV-ERC (N-921).....107

Tabela 8 - Análise dos resultados discrepantes (Xpert Carba R® positivo e CV-ERC negativa) após aplicação dos testes investigacionais (continuação).....109

Tabela 9 - Diferença entre o "t*urnaround time"* (TAT) obtido pelo Xpert Carba-R® e culturas de vigilância conforme crescimento no caldo tioglicolato e placas primárias 113

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fluxo de aquisição da resistência antimicrobiana e as principais intervenções em pontos-chave específicos para evitar esta ameaça 27

Figura 2 - Processamento da cultura de vigilância 61

Figura 3 - Medição e interpretação do Q-MHT 63

Figura 4 - Teste de EDTA positivo em cepa produtora de NDM 64

Figura 5 - Sistema Gene Xpert® 67

Figura 6 - Estrutura do cartucho Gene Xpert® 68

Figura 7 - Etapas do processamento do *swab* retal no Xpert Carba-R® 69

Figura 8 - Curva mostrando Ct e fluorescência em amostra positiva para o gene *bla*$_{VIM}$ 70

Figura 9 - Processamento das amostras quando coletado um único *swab* 71

Figura 10 - Processamento de amostras quando coletado um par de *swab* 72

Figura 11 - Fluxo de análise e interpretação dos resultados obtidos pelo Xpert Carba-R®, CV-ERC, PCR in house e testes investigacionais. 76

Figura 12 - Equipamento ABI 7500® *Fast real-time PCR instrument* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 78

Figura 13 - Curva de monitoramento de fluorescência ilustrando a amplificação em tempo real 86

Figura 14 - Relação do Ct com o número de cópias de DNA 86

Figura 15 - Diluições seriadas para determinação do LD 88

Figura 16. Representação gráfica dos valores de *threshold cycle* (Ct) obtidos com 87 amostras usando Xpert Carba-R® comparado com a positividade do PCR *in house*. 100

Figura 17 – Limite de detecção da CV-ERC. A: Caldo tioglicolato com incubação *overnight* sob inóculos variando de 10^8 a 10^1 UFC/*swab* de *K. pneumoniae* BAA-1705. B: ágar MacConkey com discos de carbapenêmicos semeado a partir do caldo tioglicolato após incubação por 16-18 horas. 103

Figura 18. Representação gráfica da ocorrência de microrganismos provindos da CV-ERC (N-87) 104

Figura 19. Representação gráfica do percentual de resistência aos carbapenêmicos em ERC produtoras de carbapenemases (N-67).....105

Figura 20. Representação gráfica do percentual de resistência aos carbapenêmicos em ERC não produtoras de carbapenemases (N-20).....105

Figura 21. Representação gráfica da distribuição das CIM (µg/mL) em ERC produtoras (N-67) e não produtoras de carbapenemases (N-20) 106

Figura 22 - Placas A e B demonstrando a presença de colônias dentro do halo não sensível para ertapenem não observados na avaliação primária 107

Figura 23 - Placa C: ausência de colônias resistentes e presença de ESC-PC; placa D: ressemeadura a partir do tioglicolato com presença de ERC-PC. ...108

Figura 24 - Resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e CV-ERC após aplicação dos testes investigacionais.....111

Figura 25 - Dendrograma de avaliação da variabilidade genética para os 19 isolados de *K.pneumoniae* destacando os 10 selecionados para SCG (seta azul). 112

Figura 26 - Prevalência de colonização por microrganismo resistente a carbapenêmicos e/ou produtores de carbapenemase e quantidade de pacientes identificados a partir dos métodos genotípicos e fenotípicos.....114

Figura 27 - Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes identificados pelo Xpert Carba-R® (conjunto A) e cultura (conjunto B) 115

Figura 28 - Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes colonizados com ERC não detectados pelo Xpert Carba-R® e cultura 116

Figura 29: Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes portadores de microrganismos com genes codificadores de carbapenemases não detectados pela cultura 117

Resumo

Cury AP. *Avaliação de método molecular para detecção de colonização por carbapenemases comparado com a cultura de vigilância diretamente do swab retal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

A disseminação global de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos é uma preocupação crítica de saúde pública. Novas plataformas moleculares podem detectar genes de carbapenemase em menor tempo que a cultura de vigilância, mas uma avaliação local é essencial. Os objetivos desse estudo foram avaliar o desempenho diagnóstico de uma plataforma automatizada de PCR em tempo real para detecção de genes codificadores de carbapenemases diretamente de *swabs* retais, correlacionar os resultados moleculares com a cultura de vigilância caracterizando os microrganismos com resutados discrepantes e mensurar as indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases a partir de método genotípico e fenotípico. Foi realizado estudo prospectivo de desempenho diagnóstico da plataforma automatizada Gene Xpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA) usando o ensaio Xpert-Carba-R® diretamente de *swabs* retais de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva e Transplantados (alto risco) e Pronto Socorro (baixo risco) entre abril e julho de 2016 no Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Os resultados foram comparados com a PCR *in house* realizada a partir do caldo tioglicolato sem antibiótico provindo da cultura de vigilância de Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos (método de referência). O limite de detecção foi analisado na cultura de vigilância e no Xpert Carba-R® e os valores do *threshold cycle* foram correlacionados com o PCR *in house*. Do total de 921 *swabs* retais, 21% (196) foram do grupo alto risco e 79% (725) do grupo baixo risco. A PCR *in house* detectou 9,1% (84) de amostras positivas sendo, 77 bla_{KPC} (8,4%), 5 bla_{VIM} (0,5%) e 2 bla_{NDM} (0,2%). O Xpert Carba-R® detectou 9,9% (91) de amostras positivas, sendo 87 bla_{KPC} (9,5%) e 4 bla_{NDM} (0,4%) em até 50 minutos. Doze amostras, 1,3% (10 bla_{KPC}, 2 bla_{NDM}) foram positivas somente no Xpert Carba-R® e apresentaram *Threshold cycle* >30. Cinco amostras (0,5%), foram positivas para bla_{VIM} apenas pelo PCR *in house* e confirmados como bla_{VIM-2} por sequenciamento de DNA. A acurácia do Xpert Carba-R® foi de 98,2%, sensibilidade de 94%, especificidade de 98,6%, valor preditivo positivo de 86,8% e negativo de 99,4% e coeficiente Kappa de 0,893. O desempenho diagnóstico foi similar nos dois grupos. A cultura de vigilância foi positiva em 9,3% (86/921) e destas, 23% (20/86) foram negativas para carbapenemases confirmadas por sequenciamento completo do genoma como produtoras de β-lactamases de espectro estendido com alteração de permeabilidade. Dentre as 835 culturas negativas, 3% (25) foram positivas para carbapenemases. As culturas foram obtidas em até 120 horas. O limite de detecção para bla_{KPC} foi de 10^1 UFC/*swab* nos dois métodos. Do total de 859

pacientes, 111 (13%) estavam colonizados, determinados a partir do método genotípico (n=91) ou fenotípico (n=86). Os resultados positivos concordaram em 59%. O Xpert Carba-R® não detectou 23% das Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e a cultura não detectou 27% dos organismos produtores de carbapenemase. Concluiu-se que o Xpert Carba-R® é um método acurado com um tempo de resposta significantemente menor comparado com a cultura de vigilância e que as duas metodologias são complementares para identificar os pacientes colonizados e otimizar as precauções de contato minimizando possível disseminação horizontal.

Descritores: Bactérias aeróbias gram-negativas; Resistência microbiana a medicamentos; Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos; Genes de carbapenemases; Cultura de vigilância; Testes de sensibilidade microbiana; *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*; Técnicas de diagnóstico molecular.

Abstract

Cury AP. *Evaluation of a molecular method for the detection of colonization by carbapenemases compared to surveillance culture directly from the rectal swab* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2020.

The global spread of carbapenemase-producing organisms has been a critical public health concern. New molecular platforms can detect carbapenemase genes in less time than surveillance culture, but a local evaluation is essential. The objectives of this study were to evaluate the diagnostic performance of an automated real-time PCR platform for the detection of genes encoding carbapenemases directly from rectal swabs, to correlate the molecular results with the surveillance culture characterizing the microorganisms with discrepant results, and to measure the contact precautions indications related to multidrug-resistant gram-negative producers of carbapenemases using a genotypic and phenotypic method. A prospective diagnostic performance study of the automated Gene Xpert™ platform (Cepheid, Sunnyvale, CA) using the Xpert-Carba-R™ assay was performed directly of rectal swabs from patients admitted into the Intensive Care and Transplant Units (high-risk), and into the Emergency Department (low-risk) between April and July 2016 at Hospital das Clínicas, Faculty of Medicine, University of São Paulo. The results were compared with the in-house PCR performed after antibiotic-free broth enrichment from surveillance culture of carbapenem-resistant Enterobacterales (reference method). The limit of detection for the surveillance culture and the Xpert Carba-R™ assay was performed and the threshold cycle values were correlated with the in-house PCR. A total of 921 rectal swabs was collected: 21% (196) were in the high-risk group and 79% (725) in the low-risk group. In-house PCR detected 9.1% (84) of positive samples, 77 bla_{KPC} (8.4%), 5 bla_{VIM} (0.5%), and 2 bla_{NDM} (0.2%). Xpert Carba-R™ detected 9.9% (91) of positive samples, 87 bla_{KPC} (9.5%), and 4 bla_{NDM} (0.4%) within 50 minutes. Twelve samples, 1.3% (10 bla_{KPC}, 2 bla_{NDM}) were positive only by Xpert Carba-R™, and showed Threshold cycle >30. Five samples (0.5%) were positive for bla_{VIM} only by in-house PCR and confirmed to be bla_{VIM-2} using DNA sequencing. The accuracy of Xpert Carba-R™ was 98.2%, sensitivity 94%, specificity 98.6%, positive predictive value of 86.8%, and negative predictive value of 99.4%; Kappa coefficient of 0.893. The diagnostic performance was similar in the two groups. The surveillance culture was positive in 9.3% (86/921) of the samples and of these, 23% (20/86) were negative for carbapenemases confirmed by whole genome sequencing as producers of extended-spectrum β-lactamases with permeability-related mutations. Among the 835 negative cultures, 3% (25) was positive for carbapenemases. The culture results were obtained within 120 hours. The limit of detection for the bla_{KPC} was 10^1 UFC/swab in both methods. Among the 859 patients, 111 (13%) were colonized, determined using the genotypic (n = 91) or phenotypic (n = 86) method. The positive results agreed with 59%. Xpert Carba-

R™ did not detect 23% of the carbapenem-resistant Enterobacterales and the culture did not detect 27% of the carbapenemase-producing organisms. It was concluded that Xpert Carba-R™ is an accurate method with a significant lower turnaround time when compared to the surveillance culture and that the two methodologies are complementary to identify colonized patients and optimize contact precautions while minimizing possible horizontal spread.

Descriptors: Gram-negative aerobic bacteria; Drug resistance, microbial; Carbapenem-resistant enterobacterales; Carbapenemase genes; Surveillance Culture; Microbial susceptibility test; *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*; Molecular diagnostic techniques.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resistência antimicrobiana no âmbito mundial: ameaça global

A resistência antimicrobiana é uma série ameaça para a saúde pública, desafiando a medicina moderna e a sustentabilidade de uma resposta efetiva e global do risco persistente de doenças infecciosas. A crescente resistência antimicrobiana tem recebido destaque no âmbito médico, social, econômico e governamental[1]. Define-se como resistência antimicrobiana a capacidade de um microrganismo para resistir à ação de um ou mais agentes antimicrobianos e se desenvolve quando as bactérias se adaptam e crescem na presença de antibióticos. O seu desenvolvimento está relacionado à freqüência com que os antibióticos são usados. Como muitos antibióticos pertencem à mesma classe de medicamentos, a resistência a um antibiótico específico pode levar à resistência a uma classe relacionada[2].

As bactérias resistentes podem circular em populações de seres humanos e animais, através de alimentos, água e meio ambiente, e a transmissão é influenciada pelo comércio, viagens, migração humana e animal[1]. Embora o surgimento destes microrganismos, seja por mutações ou pela aquisição de elementos genéticos móveis portadores de genes de resistência, ocorra independentemente da presença de agentes antibacterianos, a exposição a esses medicamentos é que fornece a pressão seletiva necessária para o aumento e a sua disseminação[3]. Portanto, a força motriz das crescentes taxas de resistência pode ser encontrada no abuso e no uso indevido de agentes antibacterianos. Nesse sentido, a medicina humana teve um papel fundamental através da prescrição inadequada e disponibilidade de antibióticos vendidos sem receita e automedicação[4].

O uso generalizado de antimicrobianos em animais e na cadeia alimentar também constitui uma fonte importante de resistência antimicrobiana, quantidades maciças de antibióticos têm sido utilizados como promotores de crescimento, profilaxia e tratamento de infecções em animais de criação e na aquicultura, aumentando a pressão seletiva sobre microrganismos comensais e patogênicos que podem se espalhar para os seres humanos por

meio de contato direto, através da cadeia alimentar, ou indiretamente pela poluição ambiental dos efluentes agrícolas[2,5]. O uso excessivo de antimicrobianos para tratar humanos e animais também causou o acúmulo desses compostos no ambiente, e o impacto desse acúmulo no surgimento de resistência a antibióticos não deve ser subestimado[6]. Agentes antibacterianos têm diferentes vias de entrada no meio ambiente, como esgoto da comunidade ou hospitais através de esterco e lençóis d'água, transformando o ambiente em um grande reservatório para genes de resistência que se alimentam da crescente poluição ambiental tornando-se assim um ambiente ideal para a transferência horizontal de genes e a seleção de determinantes genéticos que fornecem resistência a antibióticos[7,8].

No ambiente de saúde o alto consumo de antibióticos, a presença de pacientes críticos com tempo de internação prolongado e a permanência constante de espécies patogênicas alimenta o desenvolvimento de resistência e fornece mais um cenário ideal para a disseminação de microrganismos resistentes e a transferência horizontal de genes de resistência[9]. Ainda dentro deste contexto, destaca-se o uso de antibióticos em países de baixa renda, onde existem fatores adicionais que contribuem para o surgimento de resistência, incluindo atividade menos potente de alguns agentes antibacterianos (incluindo medicamentos falsificados), contra disponibilidade, dosagens insuficientes, falta de laboratórios de diagnóstico e baixo nível de saneamento, facilitando a disseminação hospitalar e comunitária destes organismos[10,11]. Pequenas infecções poderão ter novamente custo de vida e as vitórias conquistadas contra doenças infecciosas nos últimos cinquenta anos serão prejudicadas, como pneumonia e disenteria que são doenças da infância mais comuns nos países em desenvolvimento, além cirúrgias e quimioterapia contra o câncer que tornar-se-ão menos seguras sem antibióticos efetivos para proteger contra infecções[1,5].

O impacto indireto da resistência antimicrobiana, no entanto, estende-se além do aumento dos riscos para a saúde e tem muitas consequências para a saúde pública com amplas implicações, por exemplo, no Índice de Desenvolvimento Humano, sendo um dreno na economia global com perdas

econômicas devido à redução da produtividade causada pela doença (de seres humanos e animais) e maiores custos de tratamento[12]. O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) alertou sobre o risco de morbidade e mortalidade relacionado às infecções causadas por bactérias multiresistentes estimando 23 000 mortes com custo adicional de 20 bilhões de doláres por ano nos Estados Unidos[13]. A Organização Mundial de Saúde (OMS) advertiu que a resistência antimicrobiana coloca em risco os ganhos dos *Objetivos de Desenvolvimento do Milênio* e em perigo a realização dos *Objetivos de Desenvolvimento Sustentável* e que somente na União Européia, um subconjunto de bactérias resistentes aos medicamentos é responsável anualmente por cerca de 25 000 óbitos, com custos adicionais de cuidados de saúde e perda de produtividade no valor de pelo menos 1 500 milhões de euros[5]. No Fórum Econômico Mundial de Davos, em 2013, a resistência microbiana foi considerada como uma das ameaças que coloca em risco a existência da raça humana e no Plano de Ação Global, publicado em 2016, foi demonstrado, através de uma modelagem econômica rápida que quantifica o fardo humano e econômico global desencadeado por um aumento não controlado até 2050, uma estimativa de que cepas resistentes à drogas para tuberculose, malária e infecções bacterianas poderiam custar 10 milhões de vidas por ano. Isso chegaria a um custo econômico de 100 trilhões de dólares[1].

Diante da contextualização do problema, Roca e colaboradores (2015)[14] reuniram as opiniões debatidas por especialistas (formuladores de políticas, autoridades de saúde pública, agências regulatórias, empresas farmacêuticas e a comunidade científica em geral) ao combate da resistência antimicrobiana resumindo as principais medidas para prevenir o surgimento e sua disseminação em todo o mundo: (a) uso racional de antibióticos em todos os ambientes, (b) implementação de medidas de controle de infecção em ambientes de saúde, (c) desenvolvimento de estratégias para mitigar os riscos de exposição ambiental, (d) desenvolvimento de testes de diagnóstico rápidos e acessíveis, (e) promoção de pesquisas sobre prevenção e vigilância da resistência antimicrobiana, (f) promoção de pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas e agentes antibacterianos e (g) melhoria

geral da consciência do uso de antibióticos e risco de aumento da resistência (Figura 1).

FONTE: Adaptação de Roca e colaboradores (2015)[14]

Figura 1 - Fluxo de aquisição da resistência antimicrobiana e as principais intervenções em pontos-chave específicos para evitar esta ameaça

A resistência antimicrobiana afetará todos, independentemente de onde moram, sua saúde, circunstâncias econômicas, estilo de vida ou comportamento. Afetará setores além da saúde humana, como saúde animal, agricultura, segurança alimentar e desenvolvimento econômico. Isso não é mais um problema médico, tornou-se uma ameaça à saúde global que exigirá a ação coordenada de diferentes partes interessadas para combatê-la em sua raiz. Portanto, todos os setores e disciplinas devem se envolver nos esforços para preservar a eficácia dos medicamentos antimicrobianos através de programas de conservação e manutenção buscando uma abordagem coerente, abrangente e integrada em nível global, nacional e regional, denominada "*One Health*", envolvendo diferentes atores e setores como medicina humana e veterinária, agricultura, finanças, meio ambiente e consumidores.

1.2 Impacto de infecções causadas por Enterobacterales resistente a carbapenêmicos

Embora Enterobacterales inclua mais de 70 gêneros, *Escherichia coli*, *Klebsiella spp* e *Enterobacter spp* são as mais comumente relatadas ao sistema de vigilância da Rede Nacional de Segurança de Saúde do CDC[15]. No primeiro relatório da OMS sobre o status global da resistência antimicrobiana, foram selecionados nove combinações de bactérias e antimicrobiano de interesse internacional os quais encontram-se *E. coli* resistente a fluoroquinolonas, *E. coli* resistente às cefalosporinas de terceira geração, *Klebsiella. pneumoniae* resistente às cefalosporinas de terceira geração e *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos[5].

E. coli é a causa mais frequente de infecções comunitárias e hospitalares no trato urinário, incluindo pielonefrite e esta associada a infecções intra-abdominais, como peritonite, infecções de pele e tecido mole, meningite em neonatos e é um dos principais agentes causadores de infecções transmitidas por alimentos em todo o mundo.

As infecções por *K. pneumoniae* são particularmente comuns no ambiente hospitalar entre recém-nascidos prematuros, pacientes imunossuprimidos e aqueles sob cuidados médicos avançados como agente de infecções urinárias, do trato respiratório e infecções de corrente sanguínea[16].

E. coli e *K. pneumoniae* adquirem resistência aos antibióticos β-lactâmicos principalmente por meio de transferência de elementos genéticos móveis que carregam genes produtores de β-lactamase de espectro estendido (ESBL). A resistência a outros antimicrobianos orais amplamente utilizados, como cotrimoxazol e fluoroquinolonas, também emergiu e se espalhou globalmente restando poucas opções para tratamento oral em muitas partes do mundo[17]. Uma revisão sobre sepse neonatal e infantil adquirida na comunidade demonstrou que, devido à resistência, uma proporção significativa não era tratável pelo regime recomendado de primeira linha e nem pelo alternativo, com cefalosporinas, mantendo os carbapenêmicos como a principal opção em infecções graves[18,19].

Desde o início dos anos 80, os carbapenêmicos têm sido utilizados com sucesso como última linha de defesa contra bacilos Gram-negativos resistentes a múltiplas drogas (BGN-MDR). A resistência aos carbapenêmicos em Enterobacterales foi desconhecida até o início dos anos 2 000 e desde então, surgiram como agentes patogênicos associados aos cuidados de saúde epidemiologicamente importantes em todo o mundo, inclusive no Brasil[20].

Organismos resistentes a carbapenêmicos (ORC) expressam resistência aos carbapenêmicos através de diferentes mecanismos, por sua vez, organismos produtores de carbapenemase (OPC) podem ser resistentes ou sensíveis aos carbapenêmicos. Se estes organismos forem pertencentes a ordem Enterobacterales, então são definidos como Enterobacterales resistente a carbapenêmicos (ERC) e Enterobacterales produtora de carbapenemase (EPC).

A definição de ERC determinada pelo CDC em 2012 (não sensibilidade a imipenem, meropenem ou doripenem e resistência a todas cefalosporinas de terceira geração) foi projetada para ser mais específica para ERC produtoras de carbapenemase (ERC-PC). No entanto, essa definição não contemplou parte dos isolados produtores de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e OXA-48, que permaneciam sensíveis às cefalosporinas de terceira geração ou só demonstravam resistência ao ertapenem. Na tentativa de simplificar e aumentar a capacidade de identificar ERC-PC o CDC definiu, em 2015, que ERC são enterobacterias resistente a qualquer carbapenêmico ou produtor de carbapenemases. Além disso, para bactérias que possuem não-sensibilidade intrínseca a imipenem (*Morganella morgannii, Proteus spp., Providencia spp*.), é necessária resistência aos outros carbapenêmicos que não o imipenem[21].

Os motivos que tornam as infecções causadas por ERC e EPC um grave problema de saúde incluem; (I) infecções invasivas associadas a taxas de mortalidade superiores a 40%[13], (II) a presença de mecanismos de resistência adicionais que as tornam resistentes a maioria dos antimicrobianos podendo até se manifestarem como pan-resistentes[22], (III) alto potencial de disseminação em serviços de cuidados da saúde[3,4] e (IV) Enterobacterales são

causa comum de infecções comunitárias, e portanto, as ERC apresentam o potencial de se deslocar do seu nicho atual, entre os pacientes expostos à saúde, para a comunidade[23].

O risco de morte durante a hospitalização de pacientes com infecções causadas por bactérias produtoras de KPC são até 4 vezes maiores do que aquelas observadas em pacientes com infecções por Enterobacterales multi-sensíveis[6,7]. Particularmente, para pacientes transplantados, que tiveram a expectativa e a qualidade de vida significativamente melhoradas nas duas últimas décadas devido ao desenvolvimento de drogas imunossupressoras mais potentes e seguras, o aumento progressivo da incidência de complicações infecciosas pós-transplante devido a BGN-MDR com um papel especial desempenhado pela *K. pneumoniae,* representa uma grande ameaça a estes avanços[5,24-26]. Altas taxas de mortalidade são observadas em pacientes transplantados e infectados com *K. pneumoniae* produtora de KPC (Kp-KPC) sendo superior a 78% nos transplantados de fígado[27], 56% nos transplantados de medula óssea[28] e 41,9% nos transplantados renais[29].

Dentre os pacientes com neoplasias, *K. pneumoniae* é o segundo agente de bacteremia[30,31] com 73% de taxa de mortalidade em 30 dias[32] com o agravante de apresentarem poucos sintomas confundindo o perfil clínico da infecção com o progresso da doença e os fatores de risco da mortalidade estarem mais frequentemente relacionados com infecção aguda do que doença de base[33].

As EPC são propensas a gerar custos mais elevados do que outros BGN resistentes, como as produtoras de ESBL, porque são mais difíceis de tratar e promovem atividades de prevenção e controle mais extensas[8,34]. O custo envolvido nas Infecções relacionadas à assistencia a saúde (IRAS) e nas tentativas de controlar os surtos são difíceis de mensurar, mas comumente estão associados ao período prolongado de permanência hospitalar, a receita perdida (que pode estar diretamente ligada ao período de permanência), o tempo da equipe, medicamentos, diagnóstico e custos relacionados à intervenção, tais como o fechamento de alas, bloqueios de leitos, precauções de contato adicionais e intervenções ambientais[35,36]. Durante um surto por *K.*

pneumoniae produtora de carbapenemase *New-Delhi* metallo-β-lactamase (NDM) em 2015, que afetou cerca de 40 pacientes internados em cinco hospitais na cidade de Londres, foram gastos cerca de um milhão de libras em 10 meses para controlar a sua disseminação. Deste gasto, 75% foram provindos de "custos de oportunidade" (tempo da equipe, receita perdida em cirurgias, dias de internação prolongados e bloqueio de leitos) e 25% provindos de "despesas reais", que afetaria a linha de fundo financeira do hospital como custos com antimicrobianos, triagem microbiológica e precauções de contato. O maior custo individual foi a receita cirúrgica perdida eletiva (300 000 libras), seguida do tempo da equipe (200 000 libras). A maior "despesa real" foi com a triagem microbiológica (80 000 libras)[37].

1.3 Importância da detecção de pacientes colonizados

A identificação de pacientes portadores de BGN-MDR, ditas "colonizadas", pode servir tanto para o direcionamento da antibioticoterapia empírica em infecções que acomentem pacientes sabidamente colonizados como para identificar potenciais transmissores.

A atual recomendação do CDC para controlar a transmissão de BGN-MDR nos serviços de saúde incluem; (I) reconhecer esses patógenos como epidemiologicamente importantes, (II) quantificar a magnitude deste agentes dentro dos serviços e regionalmente, (III) identificar pacientes colonizados e infectados nos estabelecimentos de saúde e (IV) implantar intervenções destinadas a impedir a transmissão cruzada desses patógenos[21].

A transmissão cruzada de agentes de resistência em uma unidade é dependente de dois fatores; (a) existência de "reservatórios", em especial pacientes colonizados e superfícies contaminadas no ambiente a volta do paciente e (b) "uma via de transmissão" representada principalmente pelas mãos dos profissionais de saúde. A detecção de pacientes colonizados permite o estabelecimento de medidas de precaução de contato visando o controle da

transmissão de agentes resistentes presentes de forma silenciosa em indivíduos geralmente assintomáticos. A sua não identificação pode impactar num alto potencial de disseminação ocasionado pela contaminação das mãos, de equipamentos compartilhados e do ambiente hospitalar, particularmente agravado em unidades com superlotação[38,39]. Além disso, o transporte intestinal de genes de resistência alocados em elementos móveis, como plasmídeos e transposon, é uma importante fonte de transmissão interespécie e tanto Enterobacterales como BGN não fermentadores são capazes de servir como reservatórios e vetores.

A colonização comumente é o primeiro passo para o desenvolvimento de uma infecção nosocomial e sua identificação evita o atraso da terapia antimicrobiana apropriada, preditor independente modificável mais forte para mortalidade na sepse grave especificamente nas infecções por ERC[27,28]. O percentual de desenvolvimento de infecções em pacientes previamente colonizados por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmico varia de 9% a 32,5%, com maior percentual em transplantados hematológico[40,41]. Pacientes colonizados têm, em média, 1,79 vezes maior risco de morrer em terapia intensiva do que os pacientes não colonizados, principalmente ligados ao desenvolvimento de infecções e um aumento do tempo de permanência hospitalar[42].

Pacientes colonizados tem a mesma importância epidemiológica dos clinicamente infectados e a vigilância ativa pode estimar melhor a pressão de colonização do que as culturas obtidas apenas a partir de amostras clínicas infectadas[8,19].

A duração da colonização por um agente multirresistente é bastante variável e depende de fatores, como o uso de antibióticos, e pode se prolongar por mais de 6 meses[43-45]. Tanto o CDC quanto a Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas (ESCMID) apóiam políticas de investigação periódica para ERC em pacientes hospitalizados em unidades de alto risco (por exemplo, UTI) e o “guideline” da *Society for Healthcare Epidemiology of America* (SHEA) também sugere seu uso associado a outras medidas de controle[46].

1.4 Mecanismo de resistência a carbapenêmicos

As três maiores estratégias de resistência relatadas para os carbapenêmicos em Enterobacterales são: I) produção de cefalosporinases do tipo AmpC ou ESBL em associação com a redução ou perda de expressão das proteínas de membrana externa (OMP); II) degradação do antibiótico por meio de enzimas hidrolisadoras como a produção de carbapenemases do tipo serino e metalo-β-lactamases (MBL) e III) hiperexpressão de sistemas de efluxo[48].

Um dos principais mecanismos para tornar-se resistente aos antimicrobianos é através da redução do acesso dos antibióticos aos seus alvos, impedindo a sua ação. A redução das OMP que atuam como canal de entrada de nutrientes e excreção de produtos do metabolismo bacteriano confere uma elevação nos valores da concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos. A resistência a carbapenêmicos por perda ou diminuição de expressão da porina tem sido relatada em diversas regiões do mundo e em diferentes espécies de Enterobacterales, principalmente em *K. pneumoniae*, *Enterobacter spp*. e *E. coli*[49]. As três principais porinas com importância na resistência bacteriana são: OmpC e suas homólogas OmpK36, presente em *K. pneumoniae* e *Enterobacter spp* e Omp1 em *Serratia marcescens,* OmpF e suas homólogas OmpK35 em *K. pneumoniae* e *Enterobacter spp* e Omp2 em *S. marcescens* e, uma terceira proteína, denominada OmpA que atua fracamente na resistência bacteriana. Estas porinas são caracterizadas como canais de natureza não específica com leve preferência a cargas positivas[50,51]. A resistência aos antimicrobianos está relacionada com modificações no perfil das OMP tanto no tamanho como na redução dos níveis de expressão ou à presença de porinas com mutação. Estas mudanças têm sido relacionadas à presença de sequências de inserção no gene que codifica a OMP, o qual leva à produção de proteínas com atividade funcional diminuída, uma conformação diferente da porina ou uma deleção que restringe a entrada do antibiótico, diminuindo assim a sua concentração interna[51,52].

Além disso, a hiperexpressão de sistemas de efluxo também contribui com a impermeabilidade de membrana, pois ejetam as moléculas de antimicrobianos para fora da célula bacteriana através das proteínas de membrana externa[53]. O sistema de efluxo é expresso em todas as células com a função de protegê-las de componentes tóxicos. O aumento da expressão desse mecanismo tem sido associado a bactérias multirresistentes. O sistema de expulsão necessita de gasto de energia pela bactéria, porém, não ocasiona nenhuma alteração ou degradação da droga. Os sistemas de efluxo são normalmente formados por três proteínas de membrana: i) bomba de efluxo presente na membrana citoplasmática ii) canal expulsador presente na membrana externa e iii) proteína de fusão que liga os outros dois componentes[54]. Alto nível de resistência podem ser observados quando a impermeabilidade de membrana se associa a produção de β-lactamases.

As β-lactamases constituem um amplo grupo de enzimas com diferentes espectros de ação contra os antibióticos β-lactâmicos. Estas constituem o principal mecanismo de resistência frente a estes antibióticos em BGN. Alguns esquemas foram propostos para a classificação das β-lactamases, mas as classificações de Ambler em 1980 e Bush em 1995 são as mais utilizadas[55]. A classificação de Ambler se baseia na sequência de aminoácidos e divide as β-lactamases em 4 classes moleculares; A, B, C e D. A classificação de Bush, Jacoby e Medeiros leva em consideração os substratos preferenciais e vulnerabilidade aos inibidores de β-lactamases sendo divididas em 4 grupos funcionais; 1, 2, 3 e 4. Em 2010, esta classificação foi atualizada devido ao aumento expressivo da quantidade de β-lactamases descritas criando subgrupos dentro dos grupos funcionais e até o momento, é a classificação mais utilizada[56] (Quadro 1).

As β-lactamases do grupo funcional 1 e classe C de Ambler, são descritas como cefalosporinases que não são inibidas por inibidores de β-lactamases comercialmente disponíveis como o ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam, porém são inativadas por oxacilinas e inibidas de forma reversível pelo ácido borônico. Originalmente, essas enzimas, denominadas β-lactamases AmpC, ocorrem naturalmente, através da codificação

cromossômica em espécies pertencentes à ordem Enterobacterales, incluindo *E. cloacae*, *K. aerogenes*, *Citrobacter freundii*, *M. morganii*, *S. marcescens*, *Hafnia alvei* e *E. coli*, sendo essa última espécie produtora de baixos níveis basais. Os genes que codificam essas enzimas, encontradas no cromossomo, são indutíveis por certos antibióticos β-lactâmicos e podem sofrer mutação apresentando altos níveis de resistência devido a desrepressão gênica mantendo assim somente sensibilidade as cefamicinas, cefalosporinas de 4ª geração e carbapenêmicos. Nos últimos anos, alguns desses genes encontraram caminho para os plasmídeos e estão sendo expressos constitutivamente em níveis elevados por *K. pneumoniae* e *E. coli*. Considerando que nestes organismos as ESBL são as enzimas mais frequentemente encontradas, as enzimas do tipo AmpC mediadas por plasmídeo também podem conferir resistência às cefamicinas e as cefalosporinas de 4ª geração (cefepime)[57].

As ESBL, grupo funcional 2, classe A, representam um grande grupo de importância clínica e epidemiológica pela capacidade de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, inclusive cefepime. Por estarem alocadas em elemento genético móvel ganham importância pela facilidade de disseminação agravada pela facilidade de carrear outros genes de resistência pertecentes a difetentes classes de antimicrobianos como quinolonas, aminoglicosídeos, cloranfenicol e sulfametoxazol-trimetroprim. As ESBL originaram-se de β-lactamases de espectro restrito, TEM-1, TEM-2 e SHV-1, diferindo-se pela substituição de apenas um ou dois aminoácidos em sua sequência. O primeiro relato de ESBL ocorreu no ano 1982 na Inglaterra, em uma amostra de *Klebsiella oxytoca*[58]. Atualmente estão descritas mais de 200 ESBL *(http://www.lahey.org/Studies)* e a alta prevalência é decorrente de expansão clonal, de localização plasmidial e de repetidos eventos mutacionais. As cefotaximases (CTX-M), que aumentaram de forma considerável nos últimos anos, vêm contribuindo com a epidemiologia das ESBL. Estas enzimas apresentam como substrato preferêncial a cefotaxima e a ceftriaxona e são codificadas pelo gene $bla_{CTX\text{-}M}$, também localizado em plasmídeos[59]. De um

modo geral, a produção de cefalosporinases isoladamente não confere resistência aos carbapenêmicos.

Dentre as diferentes classes de β-lactamases, as carbapenemases pertencem à família mais versátil dada a ampla atividade hidrolítica frente a maioria dos antibióticos β-lactâmicos. São denominadas carbapenemases pois apresentam capacidade de hidrolisar principalmente os carbapenêmicos.

Estas enzimas são divididas em três classes de Ambler: serino-carbapenemases pertencentes a classe A, metalo-β-lactamases pertencentes a classe B e serino-carbapenemases da classe D (oxacilinases), estas classes pertencem a 3 subgrupos da classificação funcional descritas por Bush (2010)[56]; 2f, 2df e 3. As principais carbapenemases descritas em Enterobacterales estão relacionadas no Quadro 2.

Classe A: incluem *Serratia marcescens enzyme* (SME), *imipenem-hydrolyzing β-lactamases* (IMI-1), *imipenemase not metalloenzyme carbapenemase* (NmcA), e *Serratia fonticola carbapenemas* (SFC-1), localizadas no cromossomo e KPC, IMI-2 e variantes do tipo *Guiana extended spectrum* (GES) codificadas por genes localizados em plasmídeos. Todas essas carbapenemases apresentam um aminoácido serina no sítio ativo e hidrolisam efetivamente os carbapenêmicos, sendo parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico[56]. Dentre as serino-carbapenemases, a KPC é a mais comum, inicialmente detectada em um isolado clínico em 1996 na Carolina do Norte[60]. Desde então, 55 tipos de alelos variantes foram descobertas (*http://www.lahey.org/Studies*) sendo que as KPC-2 e KPC-3 são as mais comumente isoladas. Estas enzimas têm como característica a hidrólise de todos os β-lactâmicos em diferentes níveis. Carbapenêmicos, cefotaxima e aztreonam são hidrolisadas menos eficientemente do que as penicilinas e as cefalosporinas de amplo espectro. As cefamicinas e ceftazidima são fracamente hidrolisadas e o clavulanato e tazobactam apresentam fraca inibição. Quando sozinha, a KPC apresenta redução da sensibilidade aos carbapenêmicos, contudo a associação com alteração da permeabilidade da membrana externa pode expressar alta resistência[56]. No Brasil, o primeiro isolado de Kp-KPC foi registrado no Recife, em 2006[62]. Entretanto, Pavez e

colaboradores (2009)[63], ao estudarem isolados recuperados entre os anos de 2003 e 2008, em São Paulo, observou a presença do gene *bla*$_{KPC}$ em uma amostra isolada em 2005. Desde então, houve uma rápida disseminação que elevou as taxas de resistência a carbapenêmicos em isolados de *K.pneumoniae* no Brasil. Embora o complexo clonal 258 (CC258) seja ainda o mais frequente, o gene *bla*$_{KPC}$ passou a ser adquirido por outros *sequences types* (ST) em *K. pneumoniae* em todo o país[61,64]. Estudos epidemiológicos sugerem que os isolados de Kp-KPC pertencentes ao ST258 são de dois clones distintos e que o comportamento clínico dos isolados com gene *bla*$_{KPC-2}$ é diferente dos isolados portadores de *bla*$_{KPC-3}$ em relação a resistência aos aminoglicosídeos e a capacidade de formar biofilmes[65]. Embora exista um predomínio de Kp-KPC, a transferência deste gene para outras bactérias Gram-negativas foi observada, incluindo *K. oxytoca*, *E. coli*, *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Morganella spp*, *S. marcescens*, *Raoultella spp*, *Kluyvera spp* e *Salmonella spp*, *Aeromonas spp*, *Pseudomonas spp* e *A. baumannii*[66-70]. As serino-carbapenemases cromossomais ficaram restritas, até o momento, em regiões específicas onde a SME, exclusiva de *S. marcescens*, foi descrita no Canadá e EUA[71], a família IMI-1/NMC-A encontrada esporadicamente em isolados de *E. cloacae* e *E. asburiae* nos EUA, França, Argentina, China, Singapura e Irlanda[71-73] e a SFC-1 reportada em Portugal a partir da *Serratia fonticola*[71].

Classe B: as MBL hidrolizam uma ampla gama de β-lactamases, incluindo carbapenêmicos. São compostas por enzimas que em comum necessitam da molécula zinco para interagir no seu sítio ativo e exercer uma atividade hidrolítica sobre todos os β-lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos (por exemplo, aztreonam). Por utilizarem o íon zinco sua atividade é inibida por agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA)[56]. As MBL não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam ou avibactam. Muito importante clinicamente, as variantes de MBL adquiridas podem estar associadas a elementos genéticos móveis, plasmídeos e *tranposons*, sendo facilmente transferidos entre diferentes cepas da mesma espécie e de espécies diferentes. A primeira MBL foi detectada no Japão em

1991 e denominada *imipenemase metallo-β-lactamases* (IMP)[76], a segunda família foi identificada em Verona, Itália e denominada *Verona integron-encoded metallo-B-lactamases* (VIM)[77]. Posteriormente surgiram suas variantes e no início do século outras famílias foram identificadas como São Paulo metalo-carbapenemase (SPM) no Brasil[78] e *German imipenemase* (GIM) na Alemanha[79], *Seoul imipenemase* (SIM) em Seoul[80], *Australia imipenemase* (AIM) na Austrália[81], *Kyorin health science MBL* (KHM) isolada de um *C. freundii* no Japão[82], NDM em *New Delhi*, Índia[83], DIM-1 (isolada na Holanda)[84] e TMB-1 isolada na Líbia em *Achromobacter xylosoxidans* e TMB-2 em *Acinetobacter sp*[85].

As MBL adquiridas mais importantes compreendem os tipos NDM, IMP e VIM, pertencentes a subclasse B1[86]. A NDM-1 emergiu como uma das principais causas de preocupação devido a sua disseminação generalizada[87] e foi detectada inicialmente em um paciente de origem indiana na Suécia em 2008[83]. Posteriormente, disseminou-se no subcontinente indiano, inclusive em amostras ambientais, e relatada em mais de 15 países[88,89]. No Reino Unido, 52% dos 101 pacientes com isolados produtores de NDM coletados entre 2008 e 2013 relataram exposição de cuidados de saúde ou viajaram para a India[90]. A disseminação horizontal também foi descrita no cenário clínico[91] assim como o aparecimento em diferentes espécies, incluindo *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *E. coli, Salmonella spp, P. aeruginosa e Acinetobacter spp*[92-94]. Até o momento, a NDM é a MBL mais prevalente em Enterobacterales e *A. baumannii* sendo descritas 29 variantes[95]. Atualmente Enterobacterales com enzimas NDM são endêmicas no Brasil, com surtos relatados[105]. Igualmente importante, as bactérias produtoras de IMP e VIM também foram encontradas nos Estados Unidos, na Europa (principalmente Grécia, Itália e no sul da França), no Oriente Médio, India, Japão e na China[96]. Desde os primeiros relatos, IMP em 1991 e VIM em 1997, foram descritas 85 e 69 variantes, respectivamente[95].

Classe D: outra importante carbapenemase em Enterobacterales são as serino-carbapenemases da classe D, grupo OXA-48, às vezes referida como "ameaça fantasma", inicialmente identificada num paciente turco em 2001[97] e que nos 5 anos subsequentes não foi isolada em nenhum outro país. No

entanto, em 2008 se espalhou fora da Turquia e tornou-se prevalente em isolados clínicos da Europa Continental, Oriente Médio e do norte da África[98]. Desde então, surtos foram relatados em toda a Europa[99]. Mais recentemente, sendo detectada nos Estados Unidos, Canadá e África do Sul a partir de pacientes previamente tratados em países do Oriente Médio e Norte da África[100-103]. Surto não vinculado a regiões conhecidas de endemicidade também foi relatado na Inglaterra envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de OXA-48[104]. Desde então, disseminou-se para uma grande variedade de espécies, incluindo *Klebsiella spp, E. coli, Citrobacter spp, S. marcescens*, *Enterobacter spp, M. morganii, R. planticola*, *P. stuartii*, e *Salmonella enterica*[103,106-109]. A OXA-48 está contida num plasmídeo Inc L auto-conjugado de 61,8 kb, o que provavelmente contribui para a sua capacidade de propagação[96,110,111]. Outras enzimas semelhantes a OXA-48 com atividade de carbapenemase que podem provocar surtos em Enterobacterales incluem OXA-181, OXA-204, OXA-232 e OXA-162[112-114].

Outras carbapenemases de classe D de importância clínica são OXA-23 e OXA-24/40 que são encontradas principalmente em *A. baumannii* conferindo resistência aos carbapenêmicos[115]. Recentemente, algumas carbapenemases do tipo OXA foram reclassificadas com base em sua atividade hidrolítica e seu perfil cinético[114]. O primeiro grupo de oxacilinases identificado em *A. baumannii* foi o grupo OXA-23, no Reino Unido em 1985. A produção da enzima conferia resistência a carbapenêmicos e não necessitava de outros mecanismos de resistência para elevação da CIM[116-118]. O maior grupo de oxacilinase identificado até o momento é o grupo OXA-51, a enzima OXA-51, que nomeia o grupo, foi determinada em 1996 em isolados provenientes da Argentina, e são encontradas no cromossomo de *A. baumannii* [119-121]. Outros grupos de oxacilinases encontrados em isolados de *A. baumannii* é o grupo OXA-58, identificado na França em 2003[122], e o grupo OXA-143 em isolados multirresistentes de pacientes brasileiros[123], esse grupo inicialmente restrito ao Brasil também já foi identificado na Coréia do Sul[124]. A OXA-48 em *A. baumannii* mostra uma maior atividade contra imipenem do que contra meropenem[125].

Quadro 1 - Classificação das β-lactamases

Classificação de Bush, Jacoby e Medeiros		Classificação de Ambler	Substrato preferencial	Inibida por		Características
Grupo Funcional (2009)	Grupo Funcional (1995)	Molecular (1980)		AC ou TZB	EDTA	
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Enzimas cromossômicas e plasmidiais. Inclui AmpC. Confere resistência a todos os β-lactâmicos, exceto os carbapenemicos
1e	NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Aumento da hidrólise a ceftazidima
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Penicilinases de *Staphylococcus* spp. e *Enterococcus* spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina
2b	2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas de 1ªgeração	Sim	Não	β-lactamases de Gram-negativos. TEM-1, TEM-2 e SHV-1
2be	2be	A	Penicilinas e Cefalosporinas de espectro estendido e monobactamicos	Sim	Não	ESBL que conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	β-lactamases resistentes aos inibidores derivadas de TEM
2ber	NI	A	Penicilinas e Cefalosporinas de espectro estendido e monobactamicos	Não	Não	Aumento da hidrólise a oxymino-β-lactâmicos e tazobactam
2c	2c	A	Carbenicilina	Não	Não	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina
2ce	NI	A	Carbenicilina e Cefepime	Sim	Não	Aumento da hidrólise a carbenicilina e cefepime
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina, levemente inibidas por AC
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Não	Enzimas que hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e cefalosporinas de espectro estendido
2df	NI	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e carbapenem
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido	Sim	Não	Enzimas que hidrolisam cefalosporinases
2f	2f	A	Carbapenêmicos	Sim	Não	Serino-enzimas que hidrolisam carbapenêmicos
3a	3	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	MBL que hidrolisam carbapenêmicos, mas não monobactâmicos.
3b	3	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	MBL que hidrolisam preferencialmente carbapenêmicos.
NI	4	Desconhecido				

FONTE: Adaptação de Bush e colaboradores (2010)[56]

AC: ácido clavulânico; ESBL: β-lactamases de espectro estendido; MBL: metalo-β-lactamases; NI: não informado; TZB: tazobactam

Quadro 2 - Principais carbapenemaneses em Enterobacterales

Classe	Grupo de enzima	Localização	Espécies encontradas
A	SME	Cromossomo	*S. marcescens*
	IMI	Cromossomo e Plasmídeo	*E. cloacae, E. asburiae*
	NMC-A	Cromossomo	*E. cloacae*
	KPC	Cromossomo e Plasmídeo	Enterobacterales, *Aeromonas spp, P. aeruginosa, Acinetobacter spp*
	BKC	Plasmídeo	*K. pneumoniae*
	GES	Cromossomo e Plasmídeo	*K. pneumoniae, E. coli, P. aeruginosa*
B	IMP	Cromossomo e Plasmídeo	Enterobacterales, *A. caviae, P. aeruginosa, P. putida, Acinetobacter spp*
	VIM	Cromossomo e Plasmídeo	Enterobacterales, *A.hydrophila, P.aeruginosa, P.putida, Acinetobacter spp*
	SPM	Cromossomo e Plasmídeo	*P. aeruginosa*
	GIM	Plasmídeo	Enterobacterales, *P. aeruginosa*
	SIM	Plasmídeo	Enterobacterales, *Acinetobacter spp*
	KHM	Plasmídeo	*C. freundii*
	NDM	Cromossomo e Plasmídeo	Enterobacterales, *Acinetobacter spp*
D	OXA-23 like	Cromossomo e Plasmídeo	*K. pneumoniae, P. mirabilis, Acinetobacter spp*
	OXA-40 like	Cromossomo e Plasmídeo	*K. pneumoniae, Acinetobacter spp, P. aeruginosa*
	OXA-51 like	Cromossomo e Plasmídeo	*K. pneumoniae, Acinetobacter spp, E. cloacae, E. coli*
	OXA-58 like	Cromossomo e Plasmídeo	*K. pneumoniae, E. coli, Acinetobacter spp*
	OXA-48 like	Cromossomo e Plasmídeo	Enterobacterales, *Acinetobacter spp*

FONTE: Adaptado de Cornaglia e col[74], Walther-Rasmussen & Hoiby[71], Nordmann e col[75], Evans & Amyes[60] e *http://www.lahey.org/Studies.*

1.5 Limitações da detecção fenotípica de carbapenemases

1.5.1 Teste de sensibilidade

A produção de carbapenemase pode conferir distintos fenótipos de resistência aos β-lactâmicos, dependendo da espécie bacteriana, do nível de expressão, do tipo ou variante da enzima e da presença de mecanismos de resistência adicionais, como redução da permeabilidade, bombas de efluxo e/ou atividade de outras β-lactamases[66,126] (Quadro 3). Uma CIM significativamente elevada ou uma zona de inibição diminuída para um carbapenêmico torna um isolado clínico elegível para testes adicionais quanto a produção de carbapenemases. No entanto, as CIM de carbapenêmicos para os produtores de carbapenemase podem variar dentro de uma ampla gama de valores, e até mesmo situar-se dentro da faixa de sensibilidade, conforme pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)[127] e pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST)[128] (Quadro 4). Baixos níveis de resistência a carbapenêmicos têm sido freqüentemente observados em EPC[129-131], *Acinetobacter spp* produtores de MBL[132] e OXA[133], e entre *P. aeruginosa* produtoras de MBL[134].

Quadro 3 - Variação da CIM dos carbapenêmicos em Enterobacterales, *Acinetobacter spp* e *P. aeruginosa* produtoras de carbapenemases adquiridas

Organismo	Enzima	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
		Imipenem	Meropenem	Ertapenem
Enterobacterales	AmpC neg/MBL	0,5 a >64	0,25 a >64	0,5 a 4
	AmpC pos/MBL	1,0 a >64	1,0 a >32	SD
	AmpC neg/KPC	0,5 a >64	1,0 a >32	0,5 a >64
	AmpC pos/KPC	8,0 a >64	4,0 a 64	8,0 a >64
	AmpC neg/MBL	1,0 a >64	0,5 a >64	4,0 a >64
Acinetobacter spp	MBL	2,0 a >64	2,0 a >64	NA
	OXA	1,0 a >64	1,0 a >64	NA
P. aeruginosa	MBL	2,0 a >64	2,0 a >64	NA
	KPC	>64	>32	NA

MBL: metalo-β-lactamase; NA: não avaliado; neg: negativo; pos: positivo; SD: sem dados sufientes

Quadro 4 - Ponto de corte para carbapenêmicos de acordo com CLSI e EUCAST[127,128]

Organismo	Carbapenêmico	Ponto de corte (CIM) (µg/mL)			
		CLSI (2020)		EUCAST (2020)	
		S (≤)	R (≥)	S (≤)	R (>)
Enterobacterales	Ertapenem	0,5	2	0,5	0,5
	Meropenem	1	4	2	8
	Imipenem	1	4	2*	4
Acinetobacter spp	Ertapenem	ND	ND	ND	ND
	Meropenem	2	8	2	8
	Imipenem	2	8	2	4
P. aeruginosa	Ertapenem	ND	ND	ND	ND
	Meropenem	2	8	2	8
	Imipenem	2	8	0,001	4

ND: não definido; R: resistente; S: sensível
*exceto para *M. morganii*, *Proteus spp* e *Providencia spp* (S ≤ 0,001 µg/mL)

Para Enterobacterales, sugere-se que os testes fenotípicos para detecção de carbapenemase sejam realizados em isolados que exibem pontos de corte clínicos não sensível aos carbapenêmicos, incluindo o ertapenem, que é o marcador mais sensível[135]. O CLSI recomenda valores de CIM ≥ 1 µg/mL para ertapenem e/ou CIM ≥ 2 µg/mL para meropenem ou imipenem[127] e o EUCAST recomenda valores de CIM ≥ 1 µg/mL para ertapenem e/ou CIM ≥ 4 µg/mL para meropenem sugerindo ainda a utilização do ponto de corte epidemiológico (*ECOFF: epidemiologic cutoff value)* > 0,125 µg/mL para ertapenem e meropenem, afim de detectar isolados sensíveis produtores de carbapenemase[128]. Espera-se uma maior sensibilidade com a aplicação de critérios menos rigorosos, embora possam ser obtidos resultados falso positivos, especialmente com ertapenem[136,137].

As carbapenemases, quando não acompanhadas de outras β-lactamases, podem conferir um baixo nível de resistência aos carbapenêmicos (CIM ≤ 0,5 µg/mL) que não tornam-se evidentes até serem combinados com outro mecanismo de resistência. Por outro lado, a produção de cefalosporinases AmpC ou ESBL associada a mutações ou perdas de porinas podem aumentar a CIM de um carbapenêmico na ausência de carbapenemases[138].

Além das características peculiares a expressão das carbapenemases relatadas anteriormente, deve-se ressaltar as limitações inerentes aos métodos de susceptibilidade disponíveis até o momento. A determinação da CIM em isolados produtores de KPC ou MBL pode apresentar baixa reprodutibilidade para a maioria dos métodos convencionais, bem como resultados discrepantes entre os métodos[139-140]. Percentuais não sensíveis a meropenem (CIM ≥ 2 µg/mL) em isolados produtores de KPC variaram de 93% ao sistema Microscan® (Beckman Coulter, Brea, CA, EUA) a 20% com Sensititre® AutoReader (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA), em comparação com 100% para microdiluição em caldo e difusão do disco[141]. Embora tenha havido melhoria usando os pontos de corte revisados em 2010 pelo CLSI, erros muito graves (falsa sensibilidade) ainda foram observados pelo sistema automatizado Vitek 2® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) para Meropenem (23.9%)[142,143]. O uso de critérios mais rigorosos e “regras de especialistas” (*expert rules*) presentes em alguns sistemas automatizados aumentou a sensibilidade da detecção de EPC, mas com um declínio significativo na especificidade[143]. Pelo menos em parte, problemas de reprodutibilidade entre métodos podem ser devido a um efeito de inóculo e portanto, cuidados especiais devem ser aplicados na preparação de inóculos bacterianos ao teste de sensibilidade, principalmente quando sistemas automatizados são utilizados. A subinoculação é a principal causa de resultados falso-negativos na detecção de KPC[145-147]. Inconsistências também foram relatadas para as metodologias de gradiente de difusão, usando E-test® (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) em organismos produtores de KPC, devido ao seu crescimento heterogêneo dificultando sua interpretação[143,148]. Os métodos de microdiluição em caldo e disco difusão são considerados mais confiáveis para a detecção de todos os tipos de resistência mediada por carbapenemases.

1.5.2 Teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado (MHT) foi o primeiro teste de triagem recomendado pelo CLSI para detecção de Enterobacterales produtoras de carbapenemase. O teste basea-se na inativação de um carbapenêmico por uma cepa produtora de carbapenemase sob investigação. Nos últimos 10 anos publicações demonstraram que o MHT apresentou boa acurácia diagnóstica para detecção de Enterobacterales produtoras de KPC, sendo um método suficientemente sensível e específico para regiões endêmicas[149]. No entanto, resultados falso-positivos, são observados em linhagens produtoras de CTX-M com redução de permeabilidade da membrana externa[150], e resultados falso negativos em isolados produtores de NDM (particularmente os produtores de baixo nível), outras MBL e oxacilinases. Para melhorar o desempenho do MHT na detecção de NDM, foi sugerido a adição de Triton X-100 no ágar Mueller Hinton apresentando sensibilidade > 97%[151].

Outra limitação consiste na falta de padronização na interpretação do resultado, dada pela visualização, muitas vezes subjetiva, do crescimento da cepa indicadora em direção ao disco do carbapenêmico, sobretudo naquelas com pequeno crescimento, situação comum entre as produtoras de cefalosporinases com alteração de porina. Com o intuito de minimizar esta limitação foi conduzido um estudo envolvendo 3 077 ERC em um hospital universitário brasileiro com cenário endêmico para KPC, propondo um teste de hodge modificado quantitativo (Q-MHT) através da medição em milímetros do crescimento da cepa indicadora (*E.coli* ATCC® 25922) em direção ao disco de ertapenem obtendo sensibilidade de 98,6% e especificidade de 93,7% (AUC: 0,996, IC 95%: 0,994-0,997, $p < 0,0001$) podendo chegar a 100% de sensibilidade, 99,7% de especificidade e valor preditivo negativo de 100% no subgrupo de isolados produtores de KPC[152,153].

O MHT requer culturas com crescimento bacteriano puro e não consegue distinguir e detectar o tipo de carbapenemase envolvido

apresentando-se como uma opção de baixo custo e acessível aos laboratórios de rotina situados em regiões endêmicas para KPC.

1.5.3 Testes baseados em inibidores

Esses testes são baseados no uso de inibidores de β-lactamase e exibem especificidade em seu efeito hidrolítico, permitindo, portanto, a caracterização da enzima em relação à classe das carbapenemases. A detecção de produtores de MBL por meio de testes de sinergia ou potencialização no formato de disco de difusão ou diluição em caldo foi baseada no uso de compostos como EDTA, compostos de tiol e ácido dipicolínico (DPA) associado a um composto β-lactâmico, geralmente na forma de um carbapenêmico e/ou uma oximino-cefalosporina[154-156].

Os testes baseados em EDTA inibem a hidrólise do β-lactâmico, explorando a dependência metaloenzimática dos íons zinco. Na tentativa de otimizar a eficiência, diferentes métodos têm sido propostos variando em relação à quantidade de inibidor utilizado, as diferentes distâncias entre os discos e o substrato β-lactâmico usado. Em resumo, o teste de sinergia de duplo disco (DDST) realizado em conjunto com o teste de disco imipenem combinado com e sem adição de EDTA 0,1 M em uma única placa de ágar, conforme proposto por Franklin e colaboradores (2006)[157], exibiram alta sensibilidade e especificidade (100 e 96%, respectivamente). A avaliação subsequente de diferentes testes fenotípicos para a detecção de MBL em Enterobacterales descobriu que o teste de disco combinado (que usou imipenem / imipenem com 0,5 M EDTA ou ceftazidima / ceftazidima com 0,2 M EDTA) e o DDST (com um disco de imipenem a uma distância de 10 mm de um disco EDTA 0,5 M) foram os métodos mais eficazes[158]. A fita Etest® MBL (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) também foi estabelecida como método diagnóstico aceitável para a detecção de MBL; no entanto, sua sensibilidade é comprometida em isolados com baixo CIM de imipenem (≤ 4

µg/mL)[159] podendo tornar-se mais promissor o uso da fita Etest® MBL com baixas concentrações de meropenem[160]. Avaliação inicial de DPA em testes baseados em disco usando imipenem, meropenem e ceftazidima como substratos em *Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp* exibiram especificidade e sensibilidade superiores ou comparáveis aos métodos de triagem fenotípica baseados em EDTA[161].

Compostos de ácido borônico têm sido usados como inibidores para a detecção e caracterização de carbapenemases do tipo KPC. Na tentativa de definir e ajustar o método de triagem ideal, diferentes substratos β-lactâmicos, compostos de ácido borônico, concentrações de inibidores e distâncias entre os discos foram empregados culminando em definições distintas nos critérios interpretativos. No método proposto por Doi e colaboradores (2008)[162], isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC foram identificados e diferenciados com sucesso dos produtores de AmpC usando meropenem com 300 µg de ácido aminofenilborônico (APBA) e um aumento ≥ 5 mm na zona de inibição. Tsakris e colaboradores (2009)[163], em um estudo comparativo, usou 400µg de PBA como inibidor encontrando no imipenem, meropenem e cefepime uma sensibilidade e especificidade de 100% . Pasteran e colaboradores (2009)[164] avaliaram APBA em DDST e testes de disco combinado usando imipenem, meropenem e ertapenem como substratos, sugerindo que imipenem/APBA com um aumento ≥ 4 mm no diâmetro da zona de inibição foi mais eficaz em distinguir KPC, GES, SME, IMI e NMC-A de outras β-lactamases (ESBL, AmpC e MBL). Uma avaliação comparativa de diferentes compostos de ácido borônico em diferentes concentrações (APBA 300 µg, APBA 600 µg e PBA 400 µg) para detecção de Enterobacterales produtoras de KPC considerou o PBA 400 µg o inibidor mais eficaz, apresentando resultados mais fáceis de interpretar[165].

Giske e colaboradores (2011)[166] avaliaram isolados de *K. pneumoniae* abrigando KPC, VIM, IMP ou OXA-48 e Enterobacterales resistentes aos carbapenêmicos devido à perda de porina em combinação com hiperprodução de ESBL ou AmpC, em um teste de detecção de carbapenemases baseado em cinco discos com o uso de meropenem sozinho e suplementado com EDTA,

DPA, APBA e cloxacilina. APBA foi capaz de detectar enzimas KPC quando uma diferença de ≥ 4 mm nos diâmetros das zonas foi considerada como indicativo de produção de KPC. Os hiperprodutores de AmpC com perda de porina também foram positivos no teste APBA, mas, ao contrário dos produtores KPC, mostraram sinergia com a cloxacilina e o DPA teve um desempenho melhor do que o EDTA no que diz respeito à especificidade em isolados produtores de MBL. Além disso, com o objetivo de simplificar a diferenciação das enzimas KPC e MBL, um algoritmo fenotípico empregando meropenem sozinho e com PBA ou EDTA ou ambos foi projetado[167,168]. O aumento da zona de inibição em ≥ 5 mm foi considerado um resultado positivo e esse algoritmo possibilitou não só a diferenciação de MBL dos produtores de KPC, mas também a detecção daqueles isolados com coprodução dessas enzimas. A sensibilidade para cepas produtoras de MBL ou KPC foi de 100% em comparação com 96,8% para ambos os produtores de KPC e MBL. A especificidade para detecção de KPC foi de 98,8%.

1.5.4 Método da inativação do carbapenêmico

O método da inativação do carbapenêmico, descrito pela primeira vez em 2015[169] é realizado usando um disco de meropenem incubado por 2 horas em uma suspensão aquosa de um microrganismo com suspeita de produção de carbapenemase. O disco de meropenem é degradado na presença de carbapenemase, e na ausência retém sua atividade antimicrobiana. Após ser removido da suspensão bacteriana é colocado em uma placa de àgar Mueller-Hinton semeada com um organismo indicador sensível a carbapenêmicos. Após a incubação *overnight*, mede-se a zona de inibição para determinar se o meropenem foi hidrolisado (crescimento do organismo indicador próximo do disco), ou ainda está ativo (zona de inibição em torno do disco). A sua descrição inicial relatou resultados muito promissores, demonstrando excelente sensibilidade e especificidade para a detecção de uma variedade de

carbapenemases[169]. No entanto, estudos posteriores relataram taxas de detecção menores para as carbapenemases do tipo OXA-48, com sensibilidade variando entre 50% a 91%[170,171]. O CLSI validou o desempenho do teste e propôs modificações denominando de método modificado de inativação do carbapenêmico (mCIM) em uma avaliação multilaboratorial. Foi sugerido o uso do caldo tríptico de soja (TSB) na preparação da suspensão bacteriana e a extensão do tempo de incubação para 4 horas a fim de melhorar a detecção de algumas carbapenemases. Posteriormente, também validou o desempenho do eCIM realizando a técnica do mCIM acrescido de EDTA[127]. A interpretaçao do mCIM e do eCIM deve ocorrer no mesmo momento pois o eCIM só deverá ser interpretado quando o mCIM for positivo, ou seja, isolado produtor de carbapenemase. Recentemente também foi descrito um método simplificado de inativação do carbapenêmico (sCIM) para detectar bacilos Gram-negativos produtores de carbapenemase de maneira mais simples. Este método é baseado no mCIM com o aprimoramento de procedimentos experimentais, em vez de incubar o disco de meropenem no meio de cultura líquido, o organismo a ser testado é espalhado diretamente sob o disco antimicrobiano. Os resultados apresentaram alta concordância com a PCR (100%) e com o mCIM (99,4%), com exceção de um isolado de *P.aeruginosa* que expressou o gene bla_{VIM-4}[172]. Estes testes requerem culturas com crescimento bacteriano puro, requerem incubação *overnight* e apresentam-se como uma opção de baixo custo e acessíveis ao laboratório de rotina.

1.5.5 Métodos bioquímicos colorimétricos

O teste de Carba NP e o Blue-Carba são baseados na detecção da atividade da carbapenemase. O teste de Carba NP detecta uma alteração no pH que é acoplada à hidrólise do imipenem. O procedimento de teste consiste em lise celular seguida de incubação do lisado enzimático com imipenem e vermelho fenol até 2 horas. O teste em Enterobacterales mostrou que o Carba

NP foi capaz de detectar todos os isolados testados de uma coleção mundial de bactérias que produziam classe A (KPC, NMC, SME e GES), classe B (IMI, NDM, VIM e IMP) e enzimas da classe D (OXA-48 ou OXA-181) não apresentando resultados falsos positivos[173]. O teste de Carba NP também foi usado diretamente em frascos de hemocultura para carbapenemases da classe A, B e D, onde este ensaio demonstrou sensibilidade e especificidade de 97,9% e 100%, respectivamente[174]. No entanto, em outro estudo, o teste produziu resultados não-interpretáveis para os isolados cultivados em MacConkey ou ágar Drigalski[175], sugerindo que esses meios podem afetar o seu desempenho. Além disso, o uso em *A. baumannii* pode exigir algumas modificações[176]. O Carba NP é um dos testes recomendados para confirmação de isolados produtores de carbapenemase pelo CLSI[127] e EUCAST[128] e pode ser realizado na maioria dos laboratórios de microbiologia, sem equipamento adicional. A principal vantagem em relação aos métodos em ágar e aos métodos moleculares é o amplo alcance alvo, pois o resultado do teste será positivo, desde que haja carbapenemase suficiente, independentemente da sua classe. O Carba NP apresenta sensibilidade inferior para certas carbapenemases da classe D (por exemplo, OXA-48, OXA-58 e OXA-181) e como desvantagem em comparação com métodos moleculares e testes de inibição do disco é a sua incapacidade de diferenciar as enzimas, embora possa ser alcançado com algumas modificações no teste[177]. Outra metodologia semelhante, mas com um protocolo mais simplificado é o Blue-Carba que usa como indicador o azul de bromotimol. O teste possui uma maior sensibilidade, inclusive para as carbapenemases de tipo OXA e um tempo de resposta mais rápido do que o Carba NP, pois não há necessidade da etapa a de extração[178].

1.6 Métodos para detecção de colonizados por ERC e/ou produtores de carbapenemase

As ERC podem ser transportadas no trato gastrointestinal inferior, orofaringe, pele e urina[3]. Os sítios primários para rastreamento destes

patógenos defendidos pelo CDC e a Sociedade Européia de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas, são as fezes ou *swab* retal ou periretal[5,179].

O método fenotípico baseado em cultura recomendado pelo CDC consiste na inoculação do *swab* em 5 mL de caldo TSB adicionado de um disco de ertapenem ou meropenem e após incubação *overnight*, este caldo é subcultivado em ágar MacConkey, onde somente fermentadores de lactose são selecionados. BGN não fermentadores que podem abrigar carbapenemases não foram avaliadas neste método sendo validado somente para *E. coli* e *Klebsiella spp*[180]. As sensibilidades relatadas para KPC e VIM variaram de 65,6% a 98,8%, com especificidades de 49,6 a 100%[181-182] e para a detecção de OXA-48 a sensibilidade foi de apenas 57,6%[183]. Embora o método de enriquecimento em caldo do CDC visasse aumentar a sensibilidade, estudos demonstram que métodos usando ágar seletivo têm um desempenho superior ou comparável com a vantagem de não necessitar da etapa de enriquecimento[184,185].

Meios cromogênicos com incorporação de substratos de homogeneização (principalmente glicosídeos) liberam pigmento quando hidrolisados por enzimas bacterianas. Os antibióticos adicionados a estes meios os tornam seletivos para um determinado nível de resistência. Dentre estes métodos destacam-se com melhores desempenho, o ChromID®CARBA (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França) e o Supercarba (bioMérieux, Marcy l'Etoile, França), a menos que a incidência de OXA-48 seja alta, merecendo adição de um meio específico para OXA-48 (por exemplo, ChromID®OXA-48)[186,187]. Uma limitação dos estudos de desempenho é que frequentemente são usadas amostras de culturas puras, em vez de *swabs* retais ou periretais.

Assim como os meios cromogênicos a semeadura do *swab* diretamente sob o ágar MacConkey acrescido com discos de carbapenêmicos também são opções para detecção de colonizados com sensibilidade variando entre 75,8% a 96,9%, e especificidade entre 73,8% a 100%. Neste caso, a avaliação do crescimento de Enterobacterales ao redor dos 3 carbapenêmicos aumenta o desempenho do teste. Quando avaliado o crescimento somente ao

redor do imipenem a sensibilidade variou entre 78,3% a 89,5% e especificidade entre 31,9 a 99,4%[188-191].

Dentre as vantagens dos métodos cultiváveis encontram-se a acessibilidade, simplicidade, baixo custo, detecção de resistências emergentes, capacidade de identificação e teste de sensibilidade do patógeno. As limitações consistem na necessidade de testes adicionais para a detecção de carbapenemases, desempenho variável conforme o tipo e expressão da enzima e um elevado "t*urnaround time"* (TAT) impactando prejuízo as práticas de controle de infecção[180].

Ensaios genotípicos automatizados que utilizam a tecnologia de PCR *multiplex*, *microarray* ou amplificação isotérmica realizados a partir do *swab* retal ou periretal vem sendo incorporados às rotinas laboratoriais para o rastreamento de colonizados com patógenos que carregam genes de carbapenemases trazendo vantagens como agilidade e facilidade na execução, reduzido TAT, alta sensibilidade e especificidade, e identificação do tipo de carbapenemase[192,193]. Dentre as plataformas atualmente disponíveis encontram-se; Check-Points Health (CHECK-Direct CPE®), Amplex Biosystems (Eazyplex SuperBug complete A®, Eazyplex Superbug complete B®), Becton Dickinson (BD MAX® CRE) e Cepheid (Xpert Carba-R®)[193-197].

Como parte dos esforços para prevenção de ERC alguns países, como Israel, exigem que estes isolados sejam submetidos à determinação do gene de carbapenemase não confiando apenas na determinação fenotípica e o CDC incentiva, mas não exige, que os laboratórios rastreiem a presença de carbapenemase específicas como KPC, NDM e OXA-48[198].

A escolha do método para detecção de colonizados depende do patógeno prevalente, das estratégias do serviço de controle de infecção hospitalar, estrutura do laboratório de microbiologia e recursos alocados para monitoramento destas vigilâncias.

Em nosso serviço, o rastreamento de colonizados com ERC é realizado através da cultura de vigilância com um TAT variando entre 48 a 120 horas, período em que o paciente é mantido sob precaução de contato. Diante deste cenário, a incorporação de método genotípico automatizado, com

resultado liberado no mesmo dia, apresenta um potencial impacto no manejo destes pacientes além da caracterização epidemiológica local dos genes de resistência. Apesar dos claros benefícios contemplados, se faz necessária a análise de acurácia diagnóstica na população local, bem como análise comparativa com o método baseado em cultura a medida que a resposta microbiológica difere entre eles (genótipo versus fenótipo), justificando-se a necessidade do presente estudo.

2 OBJETIVOS

Os objetivos dessa tese são:

- Avaliar o desempenho diagnóstico do ensaio Xpert Carba-R® para detecção de genes codificadores de carbapenemases diretamente do *swab* retal

- Correlacionar os resultados obtidos pelo Xpert Carba-R® com a cultura de vigilância e caracterizar os microrganismos recuperados de amostras com resultados discrepantes entre as metodologias

- Mensurar as indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases a partir de método genotípico em comparação ao fenotípico.

3 MÉTODOS

3.1 Tipo do estudo

O estudo foi prospectivo, de teste diagnóstico com análise comparativa independente e cega entre metodologias.

3.2 Local do estudo

O estudo foi realizado no laboratório de microbiologia da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (DLC HC-FMUSP). O HC-FMUSP é um complexo hospitalar público, universitário, de referência terciária, conveniado ao Sistema Único de Saúde, com aproximadamente 2 200 leitos e formado por sete institutos, dois hospitais auxiliares, laboratórios de investigação médica, unidades especializadas e áreas de apoio.

3.3 Espécimes clínicos, população e período

Durante 4 meses, abril a julho de 2016, *swabs* retais de pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensivas e Unidades de Transplantados (UTI/UT), considerada cenário de alto risco para aquisição de carbapenemase e de pacientes internados no pronto socorro (PS), considerado cenário de baixo risco para aquisição de carbapenemase foram analisados neste estudo.

3.4 Critério de inclusão e exclusão

Foram incluídas as amostras clínicas que apresentavam as seguintes condições:

- solicitação de cultura de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmicos (CV-ERC);
- coletas realizadas dentro das primeiras 24 horas de internação para os pacientes admitidos no pronto socorro.

Foram excluídas as amostras clínicas que apresentavam as seguintes condições:

- coletas de *swab* retal pareada à *swabs* de orofaringe, virilha, axila e períneo;
- *Swabs* encaminhados para CV-ERC e vigilância de *Acinetobacter spp* e *P.aeruginosa* resistente a carbapenêmicos;
- amostras de pacientes com resultados previamente positivos para CV-ERC detectadas no período do estudo.

3.5 Coleta das amostras

Os pacientes internados nas UTI/UT tiveram um único *swab* retal coletado seguindo a rotina determinada pelo Grupo de Controle de Infecção Hospitalar (GCIH) do complexo HC-FMUSP contemplando o protocolo do Plano de Redução de Patógenos Multirresistentes (Anexo A). Para os pacientes internados no PS, devido ao maior número de coletas previstas, um par de *swab* retal foi randomicamente coletado para agilizar o processamento dentro do laboratório. Uma equipe processou as culturas de vigilância e outra o método molecular. A CV-ERC de pacientes admitidos no PS não esta contemplada na rotina estabelecida pelo GCIH e fez parte de um estudo de prevalência, fator de risco e taxa de aquisição de ERC no PS[199].

Em ambos os cenários, os *swabs* retais foram coletados na admissão e semanalmente (transversal) para os pacientes que permaneciam internados com CV-ERC negativa. As coletas foram realizadas por profissionais da equipe

de enfermagem. O pedido da cultura de vigilância foi realizado por médicos da GCIH.

As amostras foram coletadas usando um *swab* de *rayon* em meio ágar gel Stuart® (Venturi Transystem;Copan, CA).

3.6 Aspectos Éticos

Essa pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ètica para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

O termo de consentimento livre e esclarecido assinado pelo paciente admitido no Pronto Socorro ou pelo seu representante legal e pelo pesquisador responsável foi arquivado, ficando sob a sua guarda.

3.7 Método de referência: PCR *in house* realizado a partir da CV-ERC em caldo de enriquecimento tioglicolato sem antibiótico

3.7.1 Cultura de vigilância

A cultura de vigilância foi adaptada do método preconizado pelo CDC[180]. *Swabs* retais foram inoculados em 10 mL de caldo de enriquecimento tioglicolato (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) com resarzurina sem discos de carbapenêmicos. Os tioglicolatos incubados *overnight* por 12 a 18 horas a 36 ± 1 °C foram subcultivados em placas de ágar MacConkey (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) por esgotamento usando alça de 10 µL. Sobre a superfície do meio já semeado foram adicionados discos de ertapenem

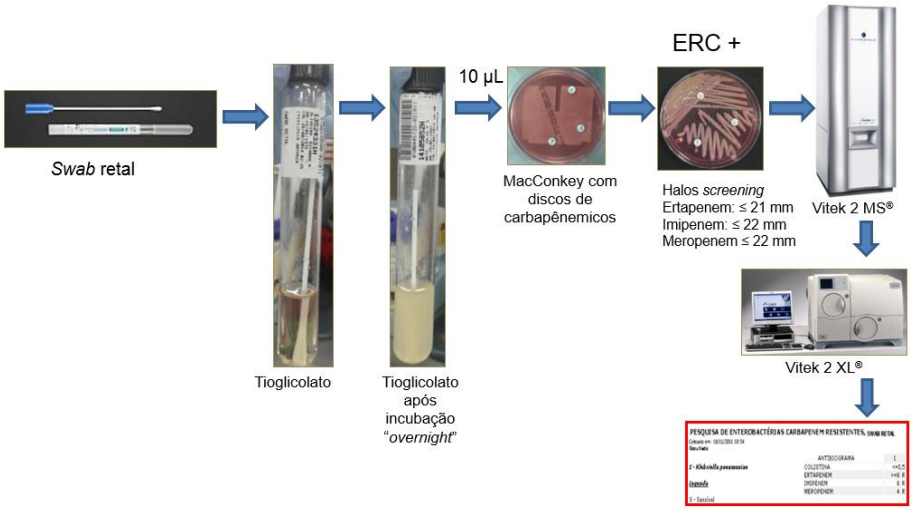
(10 µg), imipenem (10 µg) e meropenem (10 µg) (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England).

Os discos de carbapenêmicos foram estrategicamente posicionados. O ertapenem, como marcador mais sensível, foi posicionado no primeiro quadrante onde inicia-se o esgotamento e portanto, concentrando a maior quantidade de unidades formadoras de colônia (UFC), seguido do meropenem e imipenem no segundo e terceiro quadrante, respectivamente.

Resultados negativos foram considerados para Enterobacterales que apresentaram halos de sensibilidade para todos os carbapenêmicos e resultados positivos para Enterobacterales que apresentaram halos não sensíveis para ertapenem (≤ 21 mm), imipenem ou meropenem (≤ 22 mm) segundo pontos de corte clínicos preconizados pelo CLSI documento M100[127]. Os microrganismos foram identificados e submetidos ao teste de sensibilidade, e testes fenotípicos para carbapenemase (Q-MHT e EDTA). As etapas que envolvem a cultura de vigilância estão elucidadas na Figura 2.

Após o processamento, os recipientes de transporte original (ágar gel Stuart**),** os caldos tioglicolatos e as placas de MacConkey foram armazenados sob refrigeração (2 a 8 ºC) por 7 dias para novos subcultivos, se necessário e após esse período, 2 mL do caldo tioglicolato e os microrganismos cultivados foram armazenados em freezer -80 °C para eventuais repetições ou aplicação de novos testes.

A interpretação das culturas de vigilância foi realizada por colaboradores que desconheciam os resultados moleculares respectivos a cada amostra.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 2 - Processamento da cultura de vigilância

3.7.2 Identificação bacteriana

Os isolados bacterianos recuperados da CV-ERC foram identificados pelo Vitek MS® (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) através da metodologia de espectrometria de massa MALDI-TOF (*Mass Assisted Laser Desorption/Ionization).* Os espectros de massas foram obtidos e processados pelo software Myla® (BioMérieux, França), e posteriormente comparados ao banco de dados com espectros de referência para a identificação de espécie. Os resultados produzidos pelo VITEK MS® são divididos em categorias como "*good identification* (ID)", quando espectro de massa criado encontra perfeita correlação (99,9% valor de probabilidade, valor de confiança), discriminação baixa ou *low discrimination* (> 60% - 99,8% de probabilidade, valor de confiança) ou "*no ID*" (< 60% de probabilidade, valor de confiança).

3.7.3 Teste de sensibilidade

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado no sistema Vitek 2 XL® (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) através dos cartões AST-239® (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France). Na presença de Enterobacterales sensíveis a carbapenêmicos produtores de carbapenemase foram realizados também os métodos de disco-difusão (Kirby-Bauer) e elipsométrico através da fita E-test® (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France).

Para realização do teste de sensibilidade os isolados bacterianos foram suspensos em 3 mL de solução fisiológica 0,45% para obtenção de uma turvação correspondente a escala 0,5 McFarland (1,5 x 10^8 UFC/mL). Esta suspensão foi semeada em ágar Mueller Hinton (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) e/ou inserida no equipamento para a obtenção e interpretação da CIM aos antimicrobianos. Os resultados foram interpretados de acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo CLSI, documento M100[127].

3.7.4 Testes fenotípicos para detecção de carbapenemases

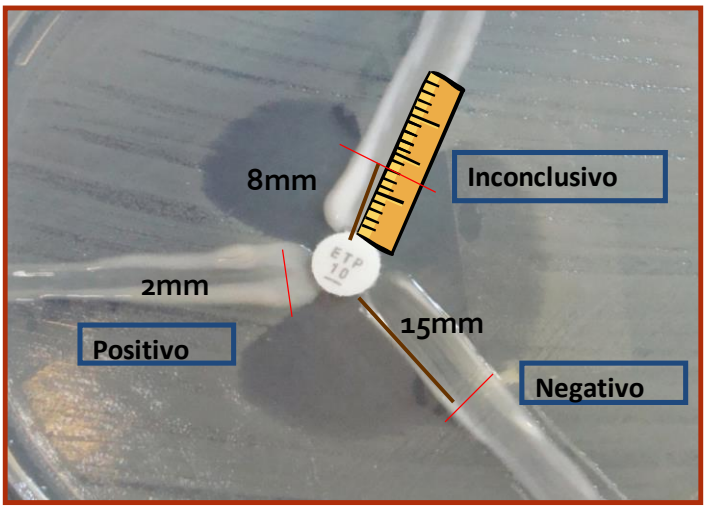
3.7.4.1 Teste de Hodge modificado quantitativo

O teste de Hodge modificado quantitativo (Q-MHT) foi realizado nas Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e naquelas que apresentaram sensibilidade mas que foram detectadas como produtoras de carbapenemases pelo método molecular. A confecção do método seguiu as recomendações do CLSI[127] e a interpretação foi realizada quantitativamente conforme Cury e colaboradores (2014)[153]. Um disco de ertapenem (10 µg) foi inserido em ágar Mueller Hinton sob uma suspensão da *Escherichia coli* ATCC® 25922 na escala 0,5 McFarland. A partir deste disco foi realizada uma estria grosseira com um

swab impregnado de 3 a 5 colônias do isolado a ser investigado a partir de uma cultura com tempo de incubação de 18 a 24 horas.

A interpretação do Q-MHT foi realizada através da medição em milímetros (mm) do crescimento da cepa indicadora (*E.coli* ATCC® 25922) em direção ao disco de ertapenem (Figura 3). Os resultados foram classificados em; positivo, crescimento de 0 a 5 mm; inconclusivo, crescimento de 6 a 10 mm e negativo, crescimento ≥ 11 mm.

A cada ensaio foi utilizado controle positivo *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1706 e controle negativo *K.pneumoniae* ATCC® BAA-1705.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

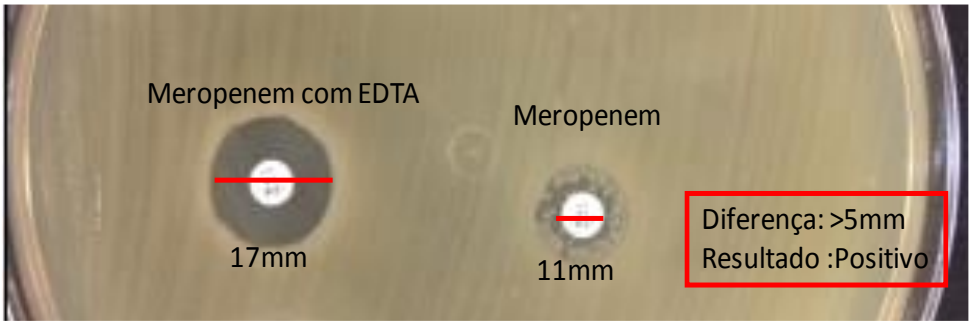
Figura 3 - Medição e interpretação do Q-MHT

3.7.4.2 EDTA

O teste de inibição com EDTA foi aplicado nas Enterobacterales não sensíveis a carbapenêmicos. Uma solução de 50 mL de EDTA 0,1 M foi preparada e distribuida em alíquotas de 1 a 2 mL. Em uma placa de ágar Mueller Hinton foi espalhada homogeneamente uma suspensão bacteriana com turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland e colocado dois discos

de meropenem (10 µg) sob sua superfície. Em seguida, 10 µl da solução de EDTA foi pipetada sob um dos discos de meropenem e incubado por 18 a 24 horas a 36º +/-1 ºC[158].

Isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm no meropenem com EDTA em relação ao meropenem sem EDTA foram interpretados como positivo para inibição com EDTA e, portanto potenciais produtores de metalo-β-lactamases (Figura 4) e isolados que apresentaram diferença < 5 mm foram interpretados como negativos. A cada ensaio um controle positivo de *Providencia rettigeri* previamente caracterizada como produtora de NDM-1, foi testado.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 4 - Teste de EDTA positivo em cepa produtora de NDM

3.7.5. Reação em Cadeia da Polimerase *in house*

A PCR *in house* foi realizada a partir de organismos provenientes da cultura de vigilância e/ou a partir do caldo tioglicolato de acordo com as condições descritas no Quadro 5.

Quadro 5 - Método de referência: PCR *in house* a partir da CV-ERC

Xpert Carba-R®	Método de referência		
	CV-ERC	PCR *in-house* realizado em:	
Positivo	Positivo	ERC	(A)
Positivo	Negativo	OSC	(B)
Negativo	Positivo	ERC e tioglicolato	(C)
Negativo	Negativo	tioglicolato	(D)

(A) Se Xpert Carba-R® e CV-ERC positivas, a PCR *in house* foi realizado a partir das ERC;
(B) Se Xpert Carba-R® positivo e CV-ERC negativo, a PCR *in house* foi realizada a partir de OSC para investigar a presença de carbapenemases nestes isolados;
(C) Se Xpert Carba-R® negativo e CV-ERC positivo, a PCR *in house* foi realizada a partir das ERC e do tioglicolato para confirmar a ausência de carbapenemase nestes isolados e na amostra clinica;
(D) Se Xpert Carba-R® e CV-ERC negativas, a PCR *in house* foi realizada a partir do tioglicolato para confirmar a ausência de genes na amostra.

CV-ERC: cultura de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmicos; OSC: organismos sensíveis a carbapenêmicos

Através da PCR *single-plex*, foi investigada presença dos genes bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{OXA-48} e bla_{IMP-1}, utilizando sequências de oligonucleotídeos descritos no Quadro 6. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando a metodologia de fervura, da seguinte maneira: (I) para os isolados bacterianos; uma alça calibrada de 10 µL de inóculo bacteriano foi diluída em 400 µL de água ultrapura e aquecidas a 95 ºC por 15 minutos. (II) para o caldo tioglicolato; 2 mL do tioglicolato foi centrifugado a 13 000 rpm por 3 minutos, sendo desprezado o sobrenadante e o *pellet* lavado com água estéril, esta solução foi novamente centrifugada a 13 000 rpm por 3 minutos, e o sobrenadante desprezado, o novo *pellet* foi ressuspendido em solução fisiológica estéril 0,4% para retirar possíveis interferentes, esta nova solução turva foi aquecida a 95 ºC por 10 minutos. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 13 000 rpm por 3 minutos e 200 µl do sobrenadante foi recuperado e armazenado em freezer -80 ºC até sua utilização. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). A reação de PCR constou de 10 µL de *GoTaq Green Master Mix* (Promega), 0,5 µM de cada oligonucleotídeo (20 pmol; Invitrogen), 1 µL de DNA e água ultrapura para completar volume final de 20 µL. A ciclagem para cada par de *primers* foi realizada em termociclador

Verit® (Applied Biosystems). Os *amplicons* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com *Syber Safe* e posteriormente visualizados sob luz ultravioleta e fotodocumentados utilizando o equipamento Alpha Innotech® – AlphaImager. Em cada reação de PCR foi utilizado controle interno positivo e controle negativo.

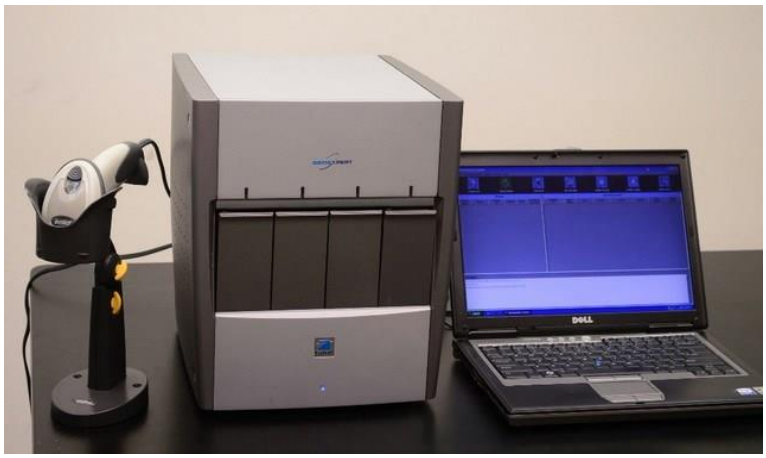
Quadro 6 **-** Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Iniciador	Seq. de oligonucleotideos (5'- 3')	Fragmento	Termociclagem		Referência
			95 ºC - 10 m		
KPC_F	GTCACTGTATCGCCGTCTAG		95 ºC - 30 s		Castanheira e col. (2008)[200]
KPC_R	CAATCCCTCGAGCGCGAGTC	859 pb	53 ºC - 30 s		Castanheira e col. (2008)[200]
			72 ºC - 1 m	35X	
			72 ºC - 10 m		
			95 ºC - 10 m		
NDM_F	GGCGTTAGATTGGCTTACACC		95 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
NDM_R	CTGGGTCGAGGTCAGGATAG	1146 pb	56 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
			72 ºC - 1:30 m	35X	
			72 ºC - 10 m		
			95 ºC - 10 m		
IMP_F	GAGTGGCTTAATTCTCRATC		95 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
IMP_R	AACTAYCCAATAYRTAAC	120 pb	55 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
			72 ºC - 3 m	35X	
			72 ºC - 10 m		
			95 ºC - 10 m		
VIM_F	GTTTGGTCGCATATCGCAAC		95 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
VIM_R	AATGCGCAGCACCAGGATAG	382 pb	55 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
			72 ºC - 3 m	35X	
			72 ºC - 10 m		
			95 ºC - 10 m		
OXA-48_F	TGTTTTTGGTGGCATCGAT	177 pb	95 ºC - 30 s		Monteiro e col. (2012)[201]
OXA-48_R	GTAAMRATGCTTGGTTCGC		50 ºC - 30 s	35x	Monteiro e col. (2012)[201]
			72 ºC - 1 m		
			72 ºC - 10 m		

col: colaboradores; *F: foward;* pb: pares de bases; *R: reverse.* Seq.: sequência.

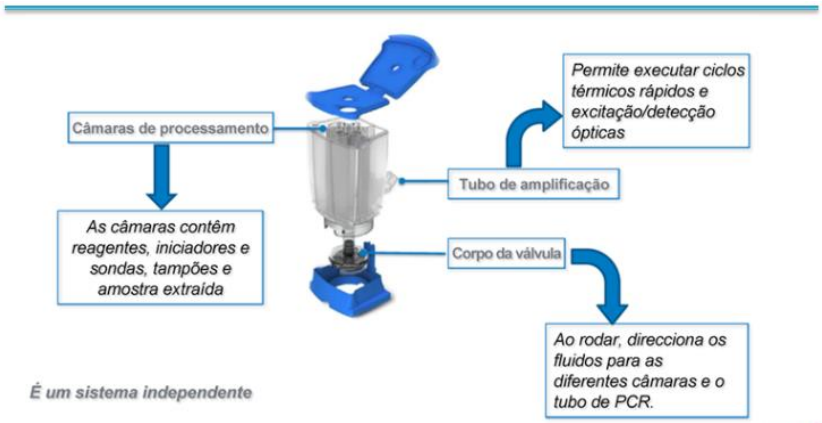
3.8 Sistema Gene Xpert®

A plataforma automatizada de PCR em tempo real utilizada para detecção dos genes de carbapenemases foi o sistema Gene Xpert® (Cepheid, Sunnyvale, CA). O equipamento automatiza e integra as etapas de preparação de amostras, extração, amplificação de ácidos nucléicos e a detecção das sequências alvo a partir de isolados bacterianos ou diretamente de espécimes clinicos. Os sistemas são constituídos por um instrumento, um computador e *software* pré-carregado para executar testes e visualizar os resultados (Figura 5). O *software* é usado para inserir informações do paciente, monitorar o processo do teste, visualizar, imprimir, exportar os resultados e gerar relatórios. O sistema requer a utilização de cartuchos descartáveis, de uso único, que contém os reagentes da PCR e onde decorre todo o processo analítico. Os cartuchos são independentes e autocontidos para minimizar a contaminação cruzada entre amostras (Figura 6).



FONTE: *http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r*[202]

Figura 5 - Sistema Gene Xpert®



FONTE: *http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r*[202]

Figura 6 - Estrutura do cartucho Gene Xpert®

O ensaio Xpert Carba-R® (Cepheid, Sunnyvale, CA) avaliado no instrumento Gene Xpert® é um teste de diagnóstico qualitativo, aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA), desenvolvido para a detecção e diferenciação das seqüências genéticas de bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{VIM}, bla_{IMP} e bla_{OXA-48} (incluindo a OXA-181 e variantes da OXA-232). O teste é utilizado para identificar individuos colonizados com organismos produtores de carbapenemases, incluindo pelo menos 91 genes dentre estas 5 famílias de carbapenemase.

O Xpert Carba-R® identifica o DNA bacteriano através de uma reação em cadeia de polimerase em tempo real com detecção fluorogênica do DNA amplificado e inclui reagentes, iniciadores e sondas, bem como um controle interno de processamento da amostra, *Sample Processing Control* (SPC) que contém esporos de *Bacillus globigii* na forma de uma *bead* seca incluída em cada cartucho para verificar o processamento adequado da amostra, garantir a lise bacteriana, indicar a presença de inibidores na reação de PCR, assegurar que as condições da reação como temperatura e tempo estão apropriadas para a amplificação e que os reagentes estejam funcionais. O SPC deve ser positivo em uma amostra negativa e pode ser negativo ou positivo em uma amostra positiva.

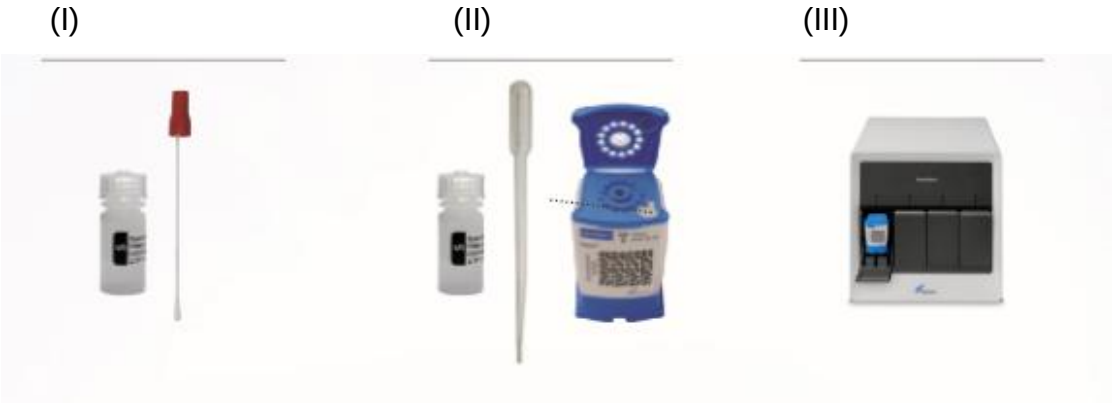
Um outro controle interno adicional, é o controle de verificação da sonda, *Probe Check Control* (PCC), antes do início da PCR, o sistema GeneXpert® mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorar a reidratação das esferas, o preenchimento do tubo de reação, a integridade da sonda e a estabilidade do corante. A verificação da *probe* é aprovada se atender aos critérios de aceitação atribuídos.

O processamento das amostras acontece nas seguintes etapas:

(I) Os *swabs* retais são imersos no frasco Xpert Carba-R® *sample reagent* (Cepheid, Sunnyvale, CA) e agitados no vórtex em alta velocidade por 10 segundos;

(II) Em seguida são transferidos, com uma pipeta descartável, aproximadamente 1,7 mL da amostra líquida para a câmara de amostra do cartucho;

(III) Após o fechamento da tampa, o cartucho é carregado em um módulo do sistema GeneXpert®, e a reação de PCR começa automaticamente ao fechar a porta do módulo (Figura 7).



FONTE: *http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r*[202]

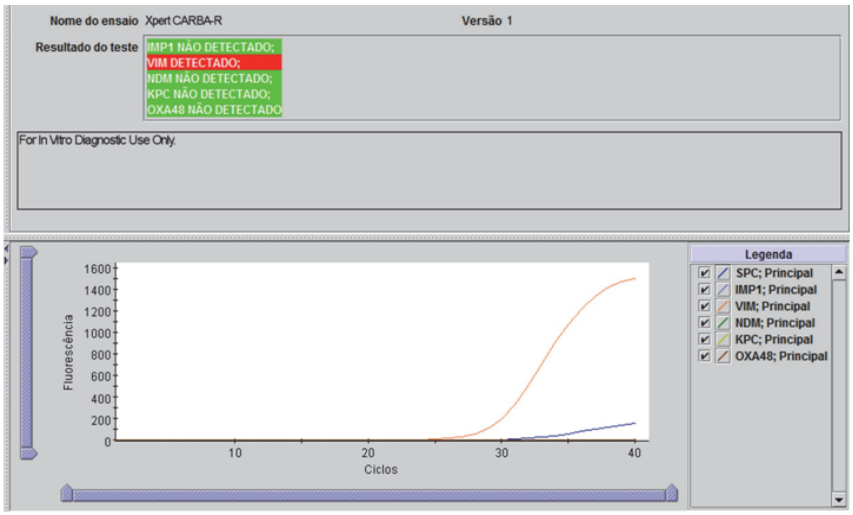
Figura 7 - Etapas do processamento do *swab* retal no Xpert Carba-R®

Os resultados são interpretados pelo sistema GeneXpert® a partir da medição de sinais fluorescentes e algoritmos de cálculo incorporados que são

mostrados na janela “Visualizar Resultados”. Os tipos de resultados que podem ser esperados são:

- “Detectado”: quando detectado pelo menos um gene alvo;
- “Não detectado”: quando não detectado nenhum gene alvo;
- “Inválido”: quando não detectado amplificação por PCR da sequência de DNA do SPC;
- “*Error*”: quando um ou mais resultados da verificação do *probe* falharam através do PCC;
- “*No result*”: quando dados insuficientes foram coletados para produzir um resultado de teste (por exemplo, o operador interrompeu um teste que estava em andamento ou ocorreu uma falha de energia).

A amplificação do DNA alvo pela PCR em tempo real gera um valor de *threshold cycle* (Ct) e um *end point* (ponto final) de fluorescência. Os resultados são relatados individualmente para os 5 genes alvos em formatos tabulares e gráficos (Figura 8).



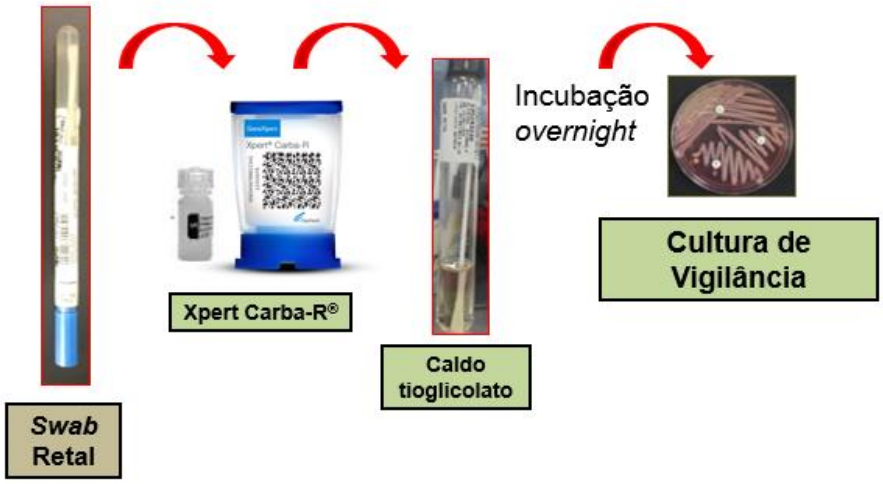
FONTE: *http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r*[202]

Figura 8 - Curva mostrando Ct e fluorescência em amostra positiva para o gene *bla*$_{VIM}$

Após inoculação das amostras, os frascos de tampão de amostras, Xpert Carba-R® *sample reagente,* foram armazenados sob refrigeração (2 a 8 °C) por 4 dias para repetição, se necessário.

3.9 Etapas do processamento das amostras

Ao entrarem no laboratório, os *swabs* foram avaliados quanto a quantidade de fezes visíveis e imediatamente processados. Quando coletado um único *swab* retal, este foi primeiramente inoculado no Xpert Carba-R® *sample reagente* e em seguida no caldo tioglicolato para processamento da cultura de vigilância conforme demonstrado na Figura 9.

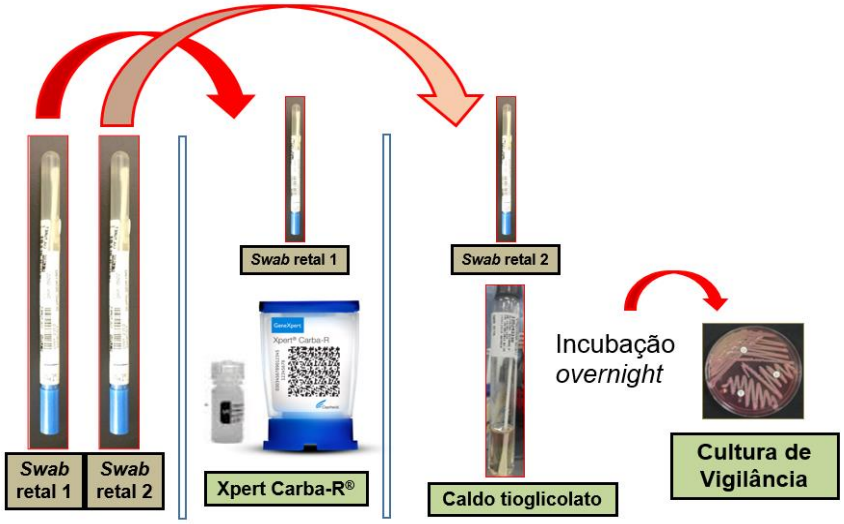


FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 9 - Processamento das amostras quando coletado um único *swab*

Quando coletado um par de *swab* retal o processamento aconteceu da seguinte maneira; o *swab* nº1, (escolhido aleatoriamente) foi inoculado no

Xpert Carba-R® *sample reagent* e o *swab* nº2 foi inoculado no caldo tioglicolato para a realização da cultura de vigilância conforme demonstrado na Figura 10.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 10 - Processamento de amostras quando coletado um par de *swab*

3.10 Interpretação, resultados discrepantes e testes investigacionais

3.10.1 Xpert Carba-R® e método de referência

Resultados concordantes foram definidos como um resultado obtido pelo Xpert Carba-R® que foi confirmado pelo método de referência (verdadeiro positivo e negativo) e resultados discrepantes foram definidos como um resultado obtido pelo Xpert Carba-R® que não foi confirmado pelo método de referência (falso positivo e negativo).

Diante de resultados discrepantes, testes adicionais de investigação foram propostos conforme listados no Quadro 7. Antes de aplicar qualquer

teste investigacional, todos resultados discrepantes foram repetidos pelo Xpert Carba R®.

Quadro 7 - Interpretação e investigação de resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e método de referência.

Xpert Carba-R®	Método referência	Interpretação	Testes investigacionais
Positivo	Positivo	Concordante	Não realizado
Positivo	Negativo	Discrepante	RT-PCR, CV-ERC(r), PCR *in house* e Xpert Carba-R®
Negativo	Negativo	Concordante	Não realizado
Negativo	Positivo	Discrepante	Seq.DNA, CV-ERC(r), PCR *in house*

CV-ERC(r): repetição da cultuta de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmicos; RT-PCR: *Fast Real-Time* PCR®; Seq.DNA: sequenciamento de DNA

Como Xpert Carba-R® é um método de PCR em tempo real e, portanto apresenta sensibilidade analítica maior que a PCR *in house*, diante de um resultado positivo com método de referência negativo foi utilizado um novo PCR em tempo real através do Fast RT-PCR® (Applied Biosystems). Concomitantemente, a cultura de vigilância foi repetida e os organismos, resistentes ou sensíveis, foram submetidos a PCR *in house* e Xpert Carba-R® (Figura 11).

Quando Xpert Carba-R® foi negativo e o método de referência positivo os *amplicons* produzidos pela PCR *in house* foram selecionados para investigar alelos variantes e a cultura de vigilância ressemeada. Os organismos recuperados foram submetidos a PCR *in house*.

Diante de resultados discrepantes, um verdadeiro resultado positivo ou negativo obtido pelo ensaio Xpert Carba-R® foi definido pelo resultado final dos testes investigacionais e quando obtido resultados falso positivos a história clinica dos pacientes foi acompanhada por 6 meses através do prontuário eletrônico.

3.10.2 Xpert Carba-R® e cultura de vigilância

Como Xpert Carba-R® é um teste genotípico e, portanto detecta ausência e presença de gene, enquanto a CV-ERC é um método fenotípico, que detecta resistência ou sensibilidade aos antimicrobianos, culturas de vigilância positivas ou negativas podem apresentar testes genotípicos negativos ou positivos como demonstrado no Quadro 8.

Quadro 8 - Possíveis fenótipos associados a métodos genotípicos e CV-ERC

Métodos Genotípicos	CV-ERC	Possível Fenótipo
Positivo	Positivo	ERC-PC
Positivo	Negativo	ESC-PC
Negativo	Positivo	ERC não PC
Negativo	Negativo	ESC não PC

ERC-PC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos produtora de carbapenemase; ESC-PC: Enterobacterales sensível a carbapenêmicos produtora de carbapenemase; ERC não PC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos não produtora de carbapenemase; ESC não PC: Enterobacterales sensível a carbapenêmicos não produtora de carbapenemase

Embora resultados discrepantes sejam aceitáveis entre as metodologias genotípicas e baseadas em cultura, testes investigacionais foram aplicados para avaliar a correlação entre os métodos e caracterizar o mecanismo de resistência presente nestes isolados. Para isso, foram considerados resultados concordantes; CV-ERC positiva com detecção de gene de carbapenemase e CV-ERC negativa com ausência de genes de carbapenemases. Resultados discrepantes foram considerados em CV-ERC positiva sem a detecção de genes de carbapenemase e CV-ERC negativa com detecção de genes de carbapenemases.

Diante de resultados discrepantes, testes adicionais de investigação foram propostos conforme Quadro 9.

Quadro 9 - Interpretação e investigação de resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e a CV-ERC.

Xpert Carba-R®	CV-ERC	Interpretação	Testes Investigacionais
Positivo	Positivo	Concordante	Não realizado
Positivo	Negativo	Discrepante	Reavaliação da placa primária da CV-ERC, PCR *in house,* Seq. DNA, CV-ERC(r) e Xpert Carba-R®
Negativo	Negativo	Concordante	Não realizado
Negativo	Positivo	Discrepante	PCR *in house*, Xpert Carba-R® e SCG

CV-ERC(r): repetição da cultura de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmicos; SCG: sequenciamento completo do genoma; Seq.DNA: sequenciamento de DNA.

Como a triagem da cultura é um processo operador-dependente uma reavaliação das placas primárias da CV-ERC foi realizada quando Xpert Carba-R® foi positivo e a cultura de vigilância negativa, se a discrepância fosse mantida então PCR *in house* dos isolados sensíveis e sequenciamento do DNA foram realizados. Aquelas com resultados negativos foram submetidas a repetição da cultura e os isolados recuperados, sensíveis e resistentes, foram analisados em nova PCR *in house* e Xpert Carba-R® (Figura 11).

Quando Xpert Carba-R® foi negativo e a cultura de vigilância positiva uma nova PCR *in house* e Xpert Carba-R® foi realizada a partir das ERC para confirmar a ausência de carbapenemase e estas, posteriormente foram encaminhadas ao sequenciamento completo do genoma bacteriano (SCG) para analisar o mecanismo de resistência após a seleção de isolados não clonais pelo *pulsed field gel electrophoresis* (PFGE) (Figura 11).

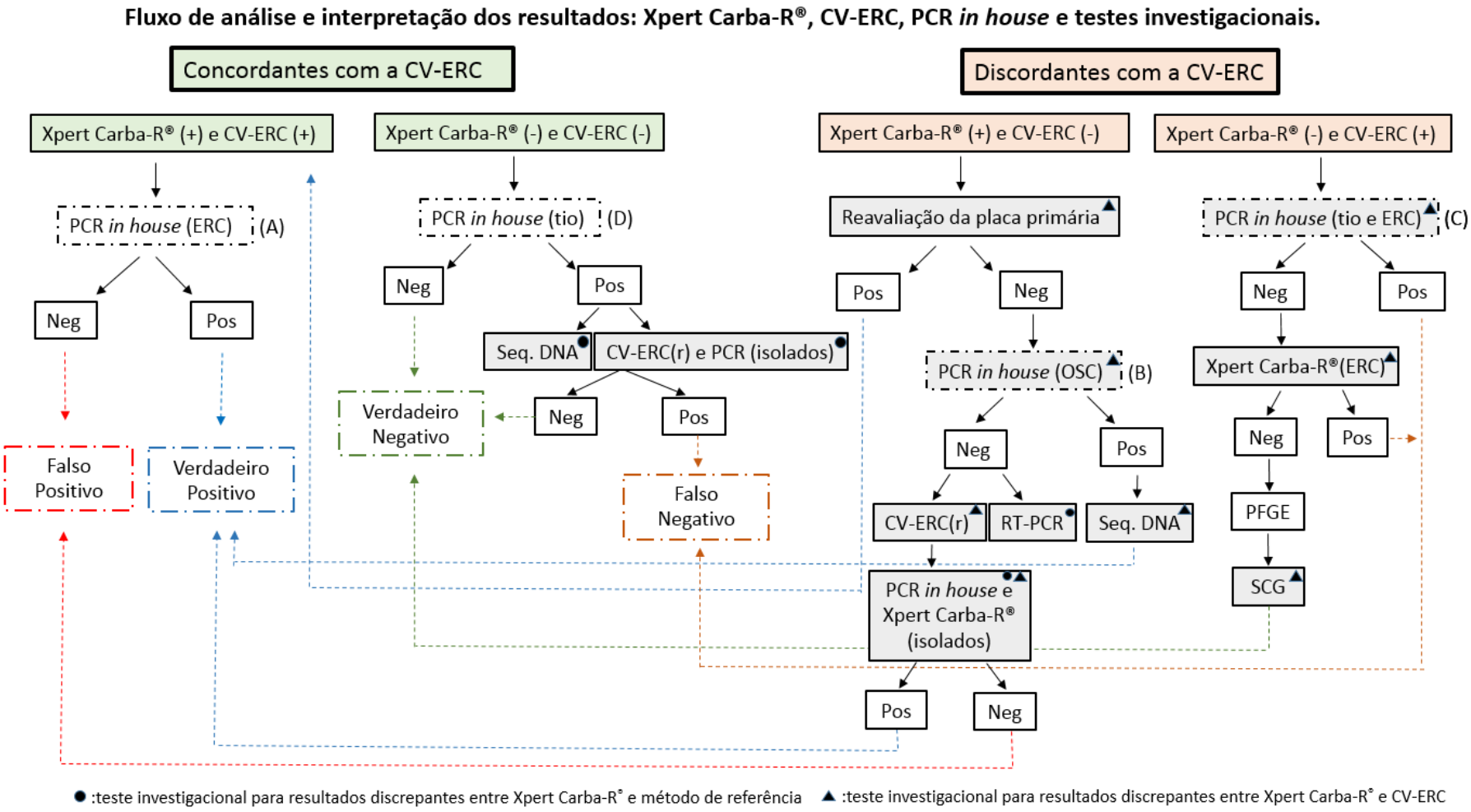


Figura 11 - Fluxo de análise e interpretação dos resultados obtidos pelo Xpert Carba-R®, CV-ERC, PCR in house e testes investigacionais.

(A) (B) (C) (D): método de referência (Quadro 5); CV-ERC(r): repetição da CV-ERC; Neg (-): negativo; OSC: organismos sensíveis aos carbapenêmicos; PCR: PCR in house; Pos (+): positivo; PFGE: pulsed field gel electrophoresis; RT-PCR: Fast Real-Time PCR®; SCG: sequenciamento completo do genoma; Seq.DNA: sequenciamento do DNA; tio: tioglicolato. .
NOTA: testes investigacionais estão destacados em cinza

3.11 Testes investigacionais

3.11.1 Reavaliação e repetição da cultura de vigilância, PCR *in house* e Xpert Carba-R®

Como a interpretação das culturas foi realizada por colaboradores que desconheciam os resultados moleculares, ou seja, interpretação sem tendência de interpretação, uma reavaliação das placas primárias (semeadura inicial do ágar MacConkey) foi realizado pelo pesquisador do estudo em até 24 horas da leitura.

Após a reavaliação das placas primárias, as amostras mantendo resultados discrepantes, foram repetidas. A repetição da cultura foi realizada através da ressemeadura do caldo tioglicolato original, armazenado sob refrigeração, a fim de confirmar o resultado inicial.

A PCR *in house e* Xpert Carba-R®*,* como teste investigacional, foi realizada a partir dos isolados bacterianos sensíveis ou resistentes, provindos da semeadura inicial ou ressemeadura, para confirmar a presença de ESC-PC, ERC-PC ou ERC não-PC obtidos pelo método de referência[200,201]

3.11.2 Applied Biosystems 7500® *Fast Real-Time* PCR

O equipamento ABI 7500® *Fast real-time PCR instrument* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) realiza PCR em tempo real quantitativo com sistemas de ciclagem térmica e *software* responsivo para uma vasta gama de aplicações podendo fornecer resultados em menos de 36 minutos e garantir uma condutividade térmica uniforme nessas altas velocidades (Figura 12).

FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 12 - Equipamento ABI 7500® *Fast real-time PCR instrument* (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA)

As amostras foram submetidas a um ensaio *multiplex* baseado em *Taqman* para pesquisa dos genes bla_{KPC} e bla_{NDM} em uma única reação a partir do caldo tioglicolato. A extração do DNA genômico foi realizada utilizando a metodologia de fervura, da seguinte maneira: 2 mL do caldo tioglicolato foi centrifugado a 13 000 rpm por 3 minutos, sendo desprezado o sobrenadante e o *pellet* lavado com água estéril, esta solução turva foi novamente centrifugada a 13 000 rpm por 3 minutos, desprezado o sobrenadante e o novo *pellet* foi ressuspendido em solução fisiológica estéril 0,4% para retirar possíveis interferentes, esta nova solução foi aquecida a 95 ºC por 10 minutos. Após a extração, as amostras foram centrifugadas a 13 000 rpm por 3 minutos e o sobrenadante recuperado foi armazenado em freezer -80 ºC até sua utilização. Após descongelamento, o sobrenadante foi diluído em 400 µl de solução fisiológica estéril 0,4% e submetido a nova extração antes da reação de PCR. A quantificação de DNA foi realizada por espectrofotometria utilizando Espectrofotômetro NanoDrop® 2000 (Thermo Scientific). O gene universal 16S rRNA foi usado como controle para extração e amplificação de DNA em cada reação. A RT-PCR foi realizada com 18 µL de *Master Mix* contendo 0,5 µM de cada *primer* e 0,25 µM de cada sonda e 2 µL de DNA totalizando volume total

de 20 µL. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas estão descritas no Quadro 10 e a detecção dos sinais aconteceram nas seguintes configurações: 16S Universal: CY5; KPC: FAM e NDM 1 (HEX): VIC.

Quadro 10 - Sequência de oligonucleotídeos e suas respectivas temperaturas de anelamento[203].

Iniciador	Sequência de Oligonucleotideos (5' - 3')	Termociclagem
KPC-F	GGC CGC CGT GCA ATA C	
KPC-R	GCC GCC CAA CTC CTT CA	
KPC-Probe (FAM)	FAM-TG ATA ACG CCG CCG CCA ATT TGT-BHQ	
		95 °C - 10 m
NDM-F	GAC CGC CCA GAT CCT CAA	95 °C - 3 m
NDM-R	CGC GAC CGG CAG GTT	95 °C - 3 s
NDM-Probe (HEX)	HEX-TG GAT CAA GCA GGA GAT-BHQ	60 °C - 30 s
16S rRNA-F	TGG AGC ATG TGG TTT AAT TCG A	
16S rRNA-R	TGC GGG ACT TAA CCC AAC A	
16S rRNA-Probe (CY5)	CY5-CA CGA GCT GAC GAC AR*C CAT GCA-BHQ	

*R = A ou G; m: minutos; s: segundos.

3.11.3 Sequenciamento de DNA

Os *amplicons* resultantes da reação de PCR foram purificados utilizando o Wizard® SV Gel and PCR *Clean-Up System*® (Promega Corporation), de acordo com as recomendações do fabricante. A reação de sequenciamento consta de 2 µL de *BigDye Terminator* v 3.1 (Applied Biosystems), 6 µL de tampão 5x (Applied Biosystems), 0,16 µL de *primer* (3,2 pmol; Invitrogen) e 30 ng de DNA. As condições de ciclagem são as seguintes: desnaturação do DNA a 95 ºC por 1 minuto; anelamento dos oligonucleotídeos

a 50 ºC por 30 segundos e extensão das fitas a 60 ºC por 3 minutos. Os *amplicons* gerados na reação foram precipitados com 30 µL de etanol 70%, ressuspensos em 15 µL de HiDi Formamida (Applied Biosystems) e sequenciados no ABI Prism 3500® (Applied Biosystems). O sequenciamento foi analisado utilizando as ferramentas de alinhamento do *DNA Star* e comparado com sequências depositadas no banco de dados do *GeneBank* (*https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*)[204].

3.11.4 Sequenciamento do genoma total bacteriano

Para determinação dos genes de resistência aos antimicrobianos e para verificação de possíveis mutações genéticas foi realizado sequenciamento genético total pela tecnologia Ion Torrent Personal Genome Machine® (PGM) (Life Technologies). O processo envolve 3 etapas realizadas de acordo com o protocolo da empresa: preparo de biblioteca, PCR em emulsão e sequenciamento.

Para o preparo da biblioteca foi realizado fragmentação enzimática do genoma previamente extraído por kit comercial (Kit de fragmentação do Ion Torrent). O DNA bacteriano foi incubado com enzima específica por 15 minutos a 37 °C. Após esta etapa, foi feita a limpeza com 99 µL de AMPure BEADS® incubados 3 minutos a temperatura ambiente e posteriormente 5 minutos em estante magnética. Foi retirado o líquido restante e as *beads* ligadas a estante foram lavadas 2 vezes com 500 µL de etanol 70%. Após secagem, estas *beads* foram eluídas com 25 µL de tampão Low TE® e novamente colocado em estante magnética. O próximo passo foi a ligação dos adaptadores à amostra com os reagentes do Kit Library do Ion Torrent (10 µL do tampão da ligase, 2 µL dos adaptadores, 2 µL de dNTP, 51 µL de água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato), 2 µL de DNA ligase e 2 µL de polimerase) e incubação de 15 minutos a 25 °C e 5 minutos a 72 °C. Foi, então, realizada uma nova limpeza por *beads* magnéticas e os fragmentos de aproximadamente 200 bp (pares de bases) foram selecionados por corrida em gel de agarose comercial

(E-Gel® - Life Technologies, EUA). Uma reação de PCR em tempo real foi realizada para quantificar a amostra antes de seguir para a PCR emulsão.

A PCR em emulsão foi realizada no aparelho One Touch® (Life Technologies, EUA) com a fase aquosa contendo 595 µL de água, 200 µL de *master mix* do *kit* do Ion Torrent, 100 µL de polimerase, 5 µL da amostra eluída e 100 µL de Ion Sphere®. Ao final da reação, o líquido foi recuperado e acrescido de 1 mL de *One Touch Wash Solution*. Em seguida, foi iniciado o processo de enriquecimento no aparelho Enriched System® com uma tira de 8 poços sendo que no primeiro havia 100 µL de amostra e o segundo 130 µL de uma solução de Dynabeads® MyOne™ Streptavidin a 10% (diluído em solução de lavagem). No terceiro, quarto e quinto poços havia 300 µL de solução de lavagem, o sétimo poço 300 µL de solução Melt Of (*Tween* 20 a 10%, NaOH 1M, água DEPC) e os poços 6 e 8 permaneceram vazios. Ao final do processo, foi recuperado a amostra em um microtubo de 200 µL que foi centrifugado a 15 500 xg e lavado duas vezes com solução de lavagem, restando um volume final de 100 µL. Foram adicionados 5 µL de Ion Sphere® *Quality Control* e 150 µL de Annealing Buffer. O tubo foi centrifugado a 15 500 xg e o sobrenadante recuperado. O processo foi repetido e nos 15 µL restantes foram adicionados 12 µL de *Sequencing Primer*. O tubo foi incubado 2 minutos a 95 °C e 2 minutos a 37 °C.

O *chip* do tipo 318 foi preparado com uma lavagem com 100 µL de isopropanol e duas lavagens com 100 µL de *Annealing Buffer*. Depois de adicionados 3 µL de *Sequence Polimerase* na amostra, foi realizada uma incubação de 5 minutos a temperatura ambiente e uma adição de mais 30 µL de *Annealing Buffer* a 50%. A solução foi sonicada em banho por 10 segundos e 30 µL adicionados no *chip* duas vezes. O *chip* foi centrifugado por 4 minutos e, então, colocado no aparelho Ion Torrent PGM® para sequenciamento do genoma total do microrganismo. Os dados foram obtidos e analisados em *software* específico (TMAP®, Life Technologies). A sequência genética obtida foi comparada com cepas do *Genebank*[205]. As leituras brutas geradas foram extraídas do arquivo em formato sff gerado pelo Ion Torrent usando *sff_extract* (*http://bioinf.comav.upv.es/seq_crumbs/*), com a opção de retirar as sequências

referentes aos adaptadores de sequenciamento para gerar um arquivo em formato fastq com as leituras brutas. As leituras brutas sem adaptadores foram então analisadas com o pacote FASTQC (*www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/*) para avaliar a qualidade das sequencias. O pacote FASTX-toolkit (*http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/)* foi então usado para trimar as leituras a partir da base 100, efetuando a retirada das bases com qualidade Phred menor do que 18. As leituras trimadas foram então usadas como entrada para montagens *de novo* em paralelo, usando os *softwares* Mira. Os *contigs* referentes a cada montagem foram mesclados em uma montagem *de novo* usando o *software* Geneious 7.1.5, com parâmetros muito estringentes de montagem (*maximum gaps per read* = 5%; *maximum gap size* = 2; *minimum overlap identity* = 97%; *minimum overlap* = 100). Os *contigs* mesclados foram então visualmente curados para resolver ambiguidades pontuais. Os *contigs* foram ordenados usando o *software* online Projector2 para gerar um *scaffold* do genoma. Esse *scaffold* foi então submetido a anotação automática através da plataforma RAST - *Rapid Annotation using Subsystems Technology*[206], usando como modelo para gene o programa Glimmer. A análise do sequenciamento genômico foi realizada por meio do *Align Sequences Nucleotide* BLAST (*www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/)* e *ResFinder 2.0 servers*, disponível gratuitamente no site *http://cge.cbs.dtu.dk/services/ResFinder/* através de alinhamento de sequencias genéticas depositadas no *Genebank*[205].

Para utilização do BLAST foi necessário o arquivo com a sequência do genoma, em arquivo *fasta*, e a sequência dos genes de interesse, adquiridos pelo *GeneBank*, para alinhamento, o arquivo contendo a sequência do genoma foi encontrado por meio do botão "*Browser*", a sequência para alinhamento foi colocada no campo especifico, identificada como "*Query Sequence*" e então selecionado o botão "*Blast*".

O *ResFinder* é baseado em um banco de dados de mais de 2 000 genes de resistência que abrange 12 tipos de resistência a diferentes antimicrobianos. Por padronização do programa, apenas os genes com 98% de identidade aos genes da base de dados foram relatados.

Para executar a análise dos dados o arquivo com a sequência do genoma a ser analisada foi selecionado utilizando o botão "*Browse*", os tipos de agentes antimicrobianos para identificação de resistência foram selecionadas em "configuração antimicrobiana", o limiar para a percentagem de identidade entre genes no banco de dados e genes na sequência de entrada foi selecionada em "limite para % ID", o formato de entrada foi especificado em "tipo de suas leituras", assim os genes que apresentaram uma cobertura e identidade > 80% quando alinhadas ao gene de referência, foram considerados positivos[207].

3.12 *Pulsed field gel electrophoresis* (PFGE)

Para a verificação do perfil clonal foi utilizado o método de Eletroforese em Gel de Campo Pulsado (PFGE) a partir de *K. pneumoniae* previamente semeadas em ágar MacConkey e incubados em aerobiose a 35 °C por 18 a 24 horas. Posteriormente foram repicados em caldo TSB e incubados a 37 °C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram centrifugadas a 13 000 rpm durante 20 minutos e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de solução salina estéril e homogeneizados em agitador por 1 minuto. Após esse processo, a suspensão bacteriana foi transferida para microtubos de 2 mL previamente pesados. Essa suspensão foi centrifugada a 13 000 rpm durante 30 segundos e o sobrenadante descartado. Esse procedimento foi repetido três vezes.

O sedimento foi então pesado e ressuspenso em EDTA (25 mM pH 8,0), para uma concentração final de massa bacteriana de 100 µg/µL. Desta suspensão, 25 µl foram transferidos para um tubo de micro-centrífuga contendo 225 µl de tampão TEN (EDTA 0,5 M, pH 7,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; Trisma base 1 M pH 7,0; Trisma base 1 M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio), adicionado de 250 µl de agarose de baixo ponto de fusão a 2% (Sigma, USA) e 20 µl de solução de lisozima (100 µg/ml) (Sigma

USA). Esta suspensão foi, então, transferida para os moldes e permaneceu por 30 minutos a 4 °C, para que os blocos solidificassem.

Após esta etapa, os blocos foram transferidos para uma placa de cultura de células de 24 poços, contendo 2 mL de tampão EC (EDTA 0,5 M, pH 7,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; Trisma base 1 M pH 7,0; Trisma base 1 M pH 8,0; NaCl; N-lauril sarcosil; Brij 58; Deoxicolato de sódio) em cada poço e incubadas a 37 °C por um período de 5 horas, sob agitação suave. Após a incubação, os blocos foram lavados com 2,5 mL de tampão CHEF-TE para Gram-negativo (EDTA 0,5 M pH 7,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; Trisma base 1 M pH 7,0; Trisma base 1 M pH 8,0), e a seguir incubados com 1 mL de tampão ES (EDTA 625 nM pH 9,3; N-lauril sarcosil 5%) adicionado de 50 µL de solução de proteinase K® (20 mg/ml) (Invitrogen USA) e incubados de 8 a 16 horas à temperatura de 50 °C. Os blocos foram lavados com 2,5 mL de tampão CHEF TE para Gram-negativo (EDTA 0,5 M pH 7,0; EDTA 0,5 M pH 8,0; Trisma base 1 M pH 7,0; Trisma base 1 M pH 8,0) com quatro lavagens com incubações de 1 hora cada, e armazenados nesta solução até serem submetidos à digestão enzimática e eletroforese. A digestão do DNA cromossômico foi realizada com a enzima de restrição FastDigest® BcuI (Thermo Fisher Scientific), que reconhece e cliva sequências de nucleotídeos que aparecem poucas vezes ao longo do DNA de *K. pneumoniae* (12 a 20 sítios de restrição). Para o tratamento com enzimas de restrição, um bloco de agarose de cada amostra foi transferido para uma placa de cultura de células de 96 poços contendo 200 µL de tampão DNS (Trisma base 1 M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1 M). A seguir, o mesmo tampão foi retirado e novamente foram adicionados 200 µl do mesmo, o bloco foi incubado a temperatura ambiente durante 1 hora. Este processo foi repetido 4 vezes. Após este período, o tampão DNS (Trisma base 1 M pH 8,0; Cloreto de Magnésio 1M) foi substituído por 100 µL de uma solução contendo tampão FastDigest® 1x e 1 µL da enzima FastDigest® BcuI e, em seguida, incubados por 5 minutos a 37 °C[208].

A eletroforese em campo pulsado foi realizada em gel de agarose a 1% (sigma, USA) em TBE 0,5x (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico, 2 mM EDTA [Amersham Pharmacia Biotech, USA]), no equipamento CHEF DRII System®

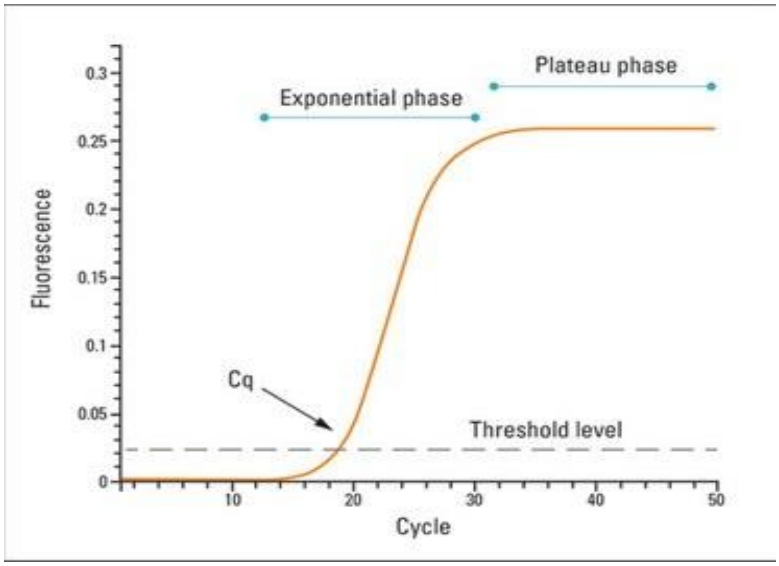
(BIO-RAD, USA) com intervalos de tempo de pulso de 5 a 60 segundos por 20 horas, ângulo de 120°, temperatura de 14 °C e voltagem de 6,0 volts/cm. A seguir, os géis foram corados com solução aquosa contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Sigma, USA) e fotografados sob luz ultravioleta. Foi utilizado como padrão de peso molecular Lambda DNA ladder PFG (New England Biolabs, Inc., USA). Os perfis eletroforéticos gerados foram agrupados utilizando-se o *software* de bioinformática Bionumerics versão 7.6 (Applied Maths). Fragmentos de DNA foram manualmente verificados e normalizados usando o peso Lambda Marker presente em cada gel. Uma tolerância de 1,5% e otimização de 1,5% foram utilizadas para a comparação de diferentes géis. O agrupamento de clusters foi realizado e gerado um dendrograma pelo método de *Unweighted Pair Group* Method with Arithmetic Mean (UPGMA) e coeficiente Dice de similaridade. Para definir os PFT (*Pulsed Field Type*) e subtipos encontrados os isolados com similaridade < 80% foram considerados diferentes PFT[209].

3.13 Análise do *threshold cycle* (Ct)

Os resultados positivos liberados pelo Xpert Carba-R® são determinados pela fluorescência produzida pela amostra. O equipamento Gene Xpert® utiliza uma fonte de luz capaz de excitar o fluórcromo envolvido na reação. O nível de fluorescência computado para cada amostra é aquele suficiente para atingir um limiar de detecção igual para cada conjunto de *primers*/amostras testados e por convenção denominado de *threshold cycle* (Ct) (Figura 13).

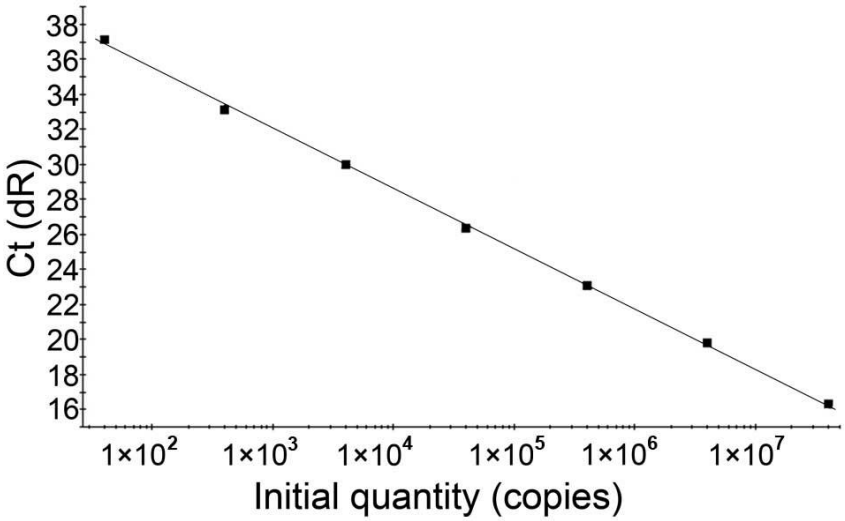
Quanto maior o número de cópias de DNA presentes em uma amostra menor será a quantidade de ciclos necessárias para sua detecção, portanto estão associadas com valores baixos de Ct. Da mesma forma, quanto menor o número de cópias de DNA presentes em uma amostra maior será a

quantidade de ciclos necessárias para a sua detecção, portanto estão associadas a valores altos de Ct (Figura 14).



FONTE: *http://www.bd.com/scripts*[210]

Figura 13 - Curva de monitoramento de fluorescência ilustrando a amplificação em tempo real



FONTE: *http://www.bd.com/scripts*[210]

Figura 14 - Relação do Ct com o número de cópias de DNA

Os valores do Ct obtidos para o gene *bla*$_{KPC}$, automaticamente interpretado pelo *software* do Gene Xpert®, foram correlacionados com a PCR *in house* e posteriormente analisados na área sob a curva ROC (AUC) para determinar o valor com melhor performance diagnóstica.

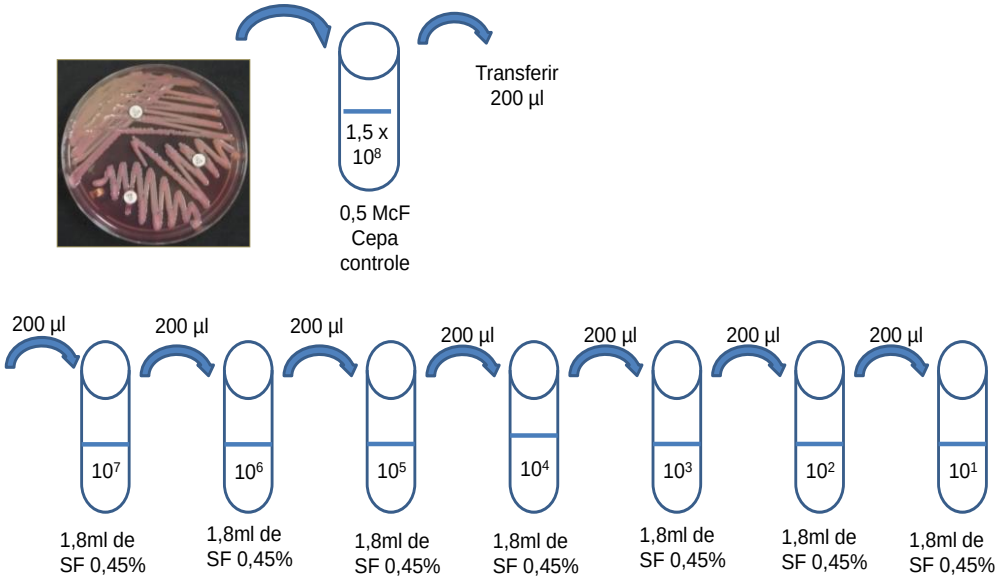
3.14 Limite de detecçao do ensaio Xpert Carba-R® e cultura de vigilância

Limite de detecção (LD) é definido como a concentração mais baixa de células/DNA alvos que podem ser detectadas e distinguidas das amostras negativas. Para determinar o LD no ensaio Xpert Carba-R® para os genes *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{IMP}$ e *bla*$_{VIM}$, foram utilizados cinco OPC previamente caracterizados (Quadro 11). As cepas controles estavam armazenadas no freezer a -80 ºC em meio de cultura líquido TSB com 20% de glicerol no Laboratório de Microbiologia da DLC HC-FMUSP e foram repicadas duas vezes em ágar sangue para a confecção do teste. Os isolados apresentavam crescimento de 18 a 20 horas.

Quadro 11 - Isolados bacterianos usados como controle positivo

Microrganismo	**Identicação da cepa**	**Gene de carbapenemase**
Pseudomonas aeruginosa	Isolado clinico	VIM-2
Klebsiella pneumoniae	ATCC® BAA-1705	KPC-2
Enterobacter gergoviae	Isolado clinico	IMP-1
Klebsiela pneumoniae	Isolado clinico	OXA-48
Providencia rettigeri	Isolado clinico	NDM-1

Suspensões monobacterianas destes organismos foram submetidas a diluições seriadas a partir da escala 0,5 de McFarland (1,5 x10^8 UFC/mL) até 1,5 x 10^1 UFC/mL em solução fisiológica (SF) a 0,45% (Figura 14). Um plaqueamento da concentração inicial (escala 0,5 de McFarland) foi realizado em triplicata para verificar a quantidade de UFC.



FONTE: HCFMUSP, São Paulo

McF: McFarland; SF: solução fisiológica.

Figura 15 - Diluições seriadas para determinação do LD

Posteriormente um *swab* estéril foi imerso em cada uma das diluições, inoculado no *Xpert Carba-R sample reagent*®, agitado em vórtex e inserido no cartucho para processamento. O LD foi realizado com cada OPC individualmente e também em combinação do gene bla_{KPC} com outro gene de carbapenemase (bla_{KPC} + bla_{NDM}, bla_{KPC} + bla_{OXA-48}, bla_{KPC} + bla_{IMP-1} e bla_{KPC} + bla_{VIM}) para avaliar a interferência competitiva. O LD na combinação com dois genes foi determinado em pares da mesma diluição; 10^1 bla_{KPC} + 10^1 bla_{NDM}, 10^2 bla_{KPC} + 10^2 bla_{NDM} e sequencialmente até 10^7 bla_{KPC} + 10^7 bla_{NDM}. Neste caso, um *swab* estéril foi imerso em cada uma das diluições contendo o gene bla_{KPC}, inoculado no *Xpert Carba-R sample reagent*® e reservado. Um segundo

swab foi imerso em cada uma das diluições contendo o outro gene de carbapenemase e então inoculado no mesmo frasco reagente contendo a diluição com o gene *bla*$_{KPC.}$ A solução contendo os dois genes foi agitada em vórtex e inserida no cartucho para processamento. Os testes foram realizados em triplicata e um tubo branco foi incluído em cada reação. Foi considerado o valor de LD aquele que se repetiu 2 ou mais vezes.

Para confirmar os valores do LD obtidos em SF, os testes foram repetidos usando *swabs* retais negativos para avaliar o efeito da matriz. Estes foram imersos em 3 diluições para cada gene; a diluição que determinou o LD em SF, uma acima e uma abaixo. Sob as mesmas condições do ensaio, as etapas de processamento seguiram as recomendações do fabricante.

Para avaliar o LD da CV-ERC, uma suspensão monobacteriana da *K. pneumoniae* ATCC® BAA-1705 foi submetida as mesmas diluições seriadas em SF e um *swab* estéril foi imerso para posterior inoculação no caldo tioglicolato. Este caldo foi incubado *overnight* e então subcultivado em àgar MacConkey com discos de carbapenêmicos. Colônias visíveis foram quantificadas depois de 24 horas de incubação a 35 ºC.

3.15 Critérios para mensurar indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases

De modo a mensurar as indicações de precaução de contato foram considerados como colonizados com OPC, todos os resultados positivos pelo Xpert Carba-R®, mesmo quando não recuperados microrganismos viáveis. Segundo as recomendações do fabricante os resultados devem ser liberados conforme interpretação do *software* do equipamento.

Na rotina laboratorial a repetição ou confirmação das culturas de vigilância diante de resultados discrepantes é incomum, portanto para avaliar o impacto entre os métodos foram consideradas a primeira interpretação da cultura.

3.16 Análise Estatística

A análise da sensibilidade (S), especificidade (E), valor preditivo positivo (VPP), valor prediditivo negativo (VPN), acurácia, coeficiente de Kappa e dados da *Receiver Operating Characteristic* (ROC) curva foi realizada usando intervalo de confiança (IC) de 95% calculado através do programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS) ver.11.0 e MedCalc 14.23 (MedCalc *Software*, Ostend, Begium).

A curva ROC foi gerada para determinar o melhor valor de Ct para discriminar os verdadeiros positivos para o gene bla_{KPC}. O poder discriminatório foi avaliado usando a área sob a curva ROC (AUC), com um valor de 0,5 indicando nenhuma habilidade discriminativa e > 0,8 indicando previsão de boa a excelente.

Os resultados obtidos pelo Xpert Carba-R® e cultura de vigilância foram compilados em tabelas de frequência e analisados em gráficos de pizza, linhas e de colunas agrupadas usando Excel 2013.

Para ilustrar a quantidade de pacientes que seriam submetidos a precaução de contato através do Xpert Carba-R® e/ou cultura de vigilância foi utilizado o diagrama de Venn-Euler.

4 RESULTADOS

4.1 Xpert Carba-R® versus método de referência

4.1.1 Detecção de genes alvos

Um total de 921 *swabs* retais (196 da UTI/UT e 725 do PS) foram analisados. O método de referência detectou 9,1% (84) genes alvos, sendo 8,4% (77) *bla*$_{KPC}$, 0,5% (5) *bla*$_{VIM}$ e 0,2% (2) *bla*$_{NDM}$. O gene *bla*$_{KPC}$ representou 92%.

O Xpert Carba-R® detectou 9,9% (91) genes alvos sendo 9,5% (87) *bla*$_{KPC}$ e 0,4% (4) *bla*$_{NDM}$ (Tabela 1). Nenhum gene *bla*$_{IMP-1}$, *bla*$_{VIM}$ e *bla*$_{OXA-48}$ foi detectado. Das 921 amostras, 24 apresentaram resultados indeterminados ("invalido", "*error*" ou "*no result*") e foram repetidas apresentando resultados válidos.

Tabela 1 - Genes alvos detectados pelo Xpert Carba-R® e método de referência

	Método de referência						
Xpert Carba-R®	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{NDM}$	*bla*$_{OXA-48}$	*bla*$_{IMP-1}$	*bla*$_{VIM}$	Negativo	TOTAL
bla$_{KPC}$	77	0	0	0	0	10	87
bla$_{NDM}$	0	2	0	0	0	2	4
bla$_{OXA-48}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{IMP-1}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{VIM}$	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	5	825	830
TOTAL	77	2	0	0	5	837	921

Das 196 *swabs* retais provindas da UTI/UT, o método de referência detectou 24% (47/196) de genes alvos, sendo 96% (45) *bla*$_{KPC}$ e 4% (2) *bla*$_{NDM}$. O Xpert Carba-R® detectou 27% (53/196) de genes alvos sendo 92,5% (49) *bla*$_{KPC}$ e 7,5% (4) *bla*$_{NDM}$.

Das 725 pares de *swabs* retais provindos do PS, o método de referência detectou 5,1% (37/725) de genes alvos, sendo 86,5% (32) *bla*$_{KPC}$ e 3,5% (5) *bla*$_{VIM}$. O ensaio Xpert Carba-R® detectou apenas *bla*$_{KPC}$ (5,2%) (38/725) (Tabela 2).

Tabela 2 - Genes alvos detectados pelo Xpert Carba-R® e método de referência por unidade de internação

	Método de referência						
Xpert Carba-R® (UTI/UT)	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{NDM}$	*bla*$_{OXA-48}$	*bla*$_{IMP-1}$	*bla*$_{VIM}$	Neg	TOTAL
bla$_{KPC}$	45	0	0	0	0	4	49
bla$_{NDM}$	0	2	0	0	0	2	4
bla$_{OXA-48}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{IMP-1}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{VIM}$	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	0	143	143
TOTAL	45	2	0	0	0	149	196
Xpert Carba-R® (PS)	*bla*$_{KPC}$	*bla*$_{NDM}$	*bla*$_{OXA-48}$	*bla*$_{IMP-1}$	*bla*$_{VIM}$	Neg	TOTAL
bla$_{KPC}$	32	0	0	0	0	6	38
bla$_{NDM}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{OXA-48}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{IMP-1}$	0	0	0	0	0	0	0
bla$_{VIM}$	0	0	0	0	0	0	0
Negativo	0	0	0	0	5	682	687
TOTAL	32	0	0	0	5	688	725

Neg: negativo; PS: pronto socorro; UTI/UT: unidades de terapia intensiva e unidades de transplantados

.

4.1.2 Desempenho diagnóstico do Xpert Carba-R®

Do total de 921 *swabs,* 98,2% dos resultados foram concordantes entre os métodos; 88,5% (815) foram negativos e 9,7% (89) foram positivos em

ambos métodos e 1,8% dos resultados foram discordantes; 1,3% (12) positivos apenas pelo Xpert Carba-R® e 0,5% (5) apenas no método de referência.

Das 196 amostras provenientes da UTI/UT, 24% (47) foram positivas no Xpert Carba-R® e no método de referência, 3% foram positivas apenas pelo Xpert Carba-R® e 73% (143) foram negativos nos dois métodos, totalizando 97% de resultados concordantes.

Dos 725 pares de *swabs* retais coletados no PS, 4,4% (32) foram positivas no Xpert Carba-R® e no método de referência, 0,8% (6) foram positivas apenas pelo Xpert Carba-R®, 0,7% (5) foram positivas apenas pelo método de referência e 94% (682) foram negativas nos dois métodos, totalizando 98,5% de resultados concordantes.

O coeficiente de Kappa, sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo e acurácia diagnóstica do ensaio Xpert Carba-R® foram calculados para todos os genes de carbapenemases detectados (bla_{KPC}, bla_{NDM} and bla_{VIM}) e também para bla_{KPC} sozinha devido a sua maior ocorrência (Tabela 3) (Anexo B).

Tabela 3 - Performance diagnóstica do Xpert Carba-R® versus método de referência (continuação)

	Método de referência						Kappa	Sensib.	Espec.	VPP	VPN	Acurácia
	Negativo		Positivo		Total		IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)
	n	%	n	%	n	%						
Todos os genes												
Xpert Carba-R® (PS+UTI/UT)												
Negativo	825	89,6	5,0	0,5	830	90,1	0,893	94,0	98,6	86,8	99,4	98,2
Positivo	12	1,3	79	8,6	91	9,9	(0,842-0,944)	(86,7-98)	(97,5-99,3)	(78,1-93)	(98,6-99,8)	(97,3-99,1)
Total	837	90,9	84	9,1	921	100						
Xpert Carba-R® (PS)												
Negativo	682	94,1	5,0	0,7	687	94,8	0,845	86,5	99,1	84,2	99,3	98,5
Positivo	6,0	0,8	32	4,4	38	5,2	(0,755-0,935)	(71,2-95,5)	(98,1-99,7)	(68,7-94)	(98,3-99,8)	(97,6-99,4)
Total	688	94,9	37	5,1	725	100						
Xpert Carba-R® (UTI/UT)												
Negativo	143	73	0	0	143	73	0,920	100	96,0	88,7	100	97,0
Positivo	6,0	3,1	47	24	53	27	(0,857-0,983)	(92,5-100)	(91,4-98,5)	(77-95,7)	(97,5-100)	(94,6-99,4)
Total	149	76	47	24	196	100						
apenas *bla*$_{KPC}$												
Xpert Carba-R® (PS+UTI/UT)												
Negativo	834	90,6	0	0	834	90,6	0,933	100	98,8	88,5	100	99,0
Positivo	10	1,1	77	8,4	87	9,4	(0,892-0,974)	(95,3-100)	(97,8-99,4)	(79,9-94,3)	(99,6-100)	(98,4-99,6)
Total	844	91,6	77	8,4	921	100						
Xpert Carba-R® (PS)												
Negativo	687	94,8	0	0	687	94,8	0,910	100	99,1	84,2	100	99,2
Positivo	6,0	0,8	32	4,4	38	5,2	(0,839-0,981)	(89,1-100)	(98,1-99,7)	(68,7-94)	(99,5-100)	(98,6-99,8)
Total	693	95,6	32	4,4	725	100						

continua

Tabela 3 - Performance diagnóstica do Xpert Carba-R® versus método de referência (conclusão)

	Método de referência						Kappa	Sensib.	Espec.	VPP	VPN	Acurácia
	Negativo		Positivo		Total		IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)	IC (95%)
	n	%	n	%	n	%						
Xpert Carba-R® (UTI/UT)												
Negativo	147	75	0	0	147	75	0,944	100	97,4	91,8	100	98,0
Positivo	4,0	2,0	45	23	49	25	(0,889-0,999)	(92,1-100)	(93,4-99,3)	(80,4-97,7)	(97,5-100)	(96-100)
Total	151	77	45	23	196	100						

Especif.: especificidade; IC: intervalo de confiança; PS: pronto socorro; Sensib.: sensibilidade; UTI/UT: unidade de terapia intensiva e transplantados; VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor prediditivo negativo.

4.1.3 Resultados discrepantes

Dezesseis *swabs* foram positivos pelo Xpert Carba-R® (14 bla_{KPC} e 2 bla_{NDM}) e negativos pelo método de referência; no entanto, 4 destes foram positivos para o gene bla_{KPC} em *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos através dos métodos investigacionais e, portanto foram considerados verdadeiros positivos. Então, 12 *swabs* (10 bla_{KPC} e 2 bla_{NDM}) foram negativos pelo método de referência e também por qualquer outro teste investigacional (falso positivos). Em todos estes casos, a CV-ERC foi negativa e os resultados positivos do Xpert Carba-R® apresentaram *threshold cycle* (Ct) > 30,8 (Tabela 4). Em 6 meses após a hospitalização, nenhum dos 12 pacientes tiveram resultados positivos para colonização ou infecção por ERC.

Cinco *swabs* provindos do PS foram negativos pelo Xpert Carba-R® e na CV-ERC mas foram positivos para o gene bla_{VIM} através do PCR *in house* a partir do caldo tioglicolato. O sequenciamento do *amplicon* confirmou tratar-se da variante bla_{VIM-2} e, portanto foram consideradas falso negativos. Esses *swabs* foram ressemeados confirmando a presença de OSC os quais apresentaram resultados negativos para o gene $bla_{VIM.}$ (Tabela 5) (Anexo C)

Tabela 4 - Resultados discrepantes: Xpert Carba-R® postivo e método de referência negativo, resultados dos testes investigacionais e desfecho

Amostra	UI	Xpert Carba-R® (*swab*)			Método de referência			Testes investigacionais			Desfecho
		Gene	Ct	Ct(r)	CV-ERC	Isolado	PCR	Fast RT PCR®	CV-ERC(r)	Xpert Carba-R® e PCR (isolado)	
1	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	35,2	30,8	Neg	*Kle.pne*	Neg	Pos	Pos	Pos	VP
2	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	24,0	27,5	Neg	*Kle.pne, Pse.aer*	Neg	Pos	Pos	Pos	VP
3	PS	*bla*$_{KPC}$	24,2	26,2	Neg	*Kle.pne, Aci.bau*	Neg	Pos	Pos	Pos	VP
4	PS	*bla*$_{KPC}$	36,7	33,4	Neg	*Kle.pne*	Neg	Pos	Pos	Pos	VP
5	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	32,0	34,1	Neg	*Kle.pne, E.coli*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
6	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	35,6	36,5	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
7	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	30,8	31,6	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Ser.mar*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
8	UTI/UT	*bla*$_{KPC}$	35,0	35,4	Neg	*Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
9	UTI/UT	*bla*$_{NDM}$	35,7	36,5	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
10	UTI/UT	*bla*$_{NDM}$	32,2	33,1	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
11	PS	*bla*$_{KPC}$	34,8	37,8	Neg	*Kle.pne, Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
12	PS	*bla*$_{KPC}$	34,7	37,1	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
13	PS	*bla*$_{KPC}$	35,1	36,6	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
14	PS	*bla*$_{KPC}$	37,9	31,8	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Pse.aer, Aci.bau*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
15	PS	*bla*$_{KPC}$	34,6	31,8	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
16	PS	*bla*$_{KPC}$	35,1	36,4	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP

Aci.bau: Acinetobacter baumannii; Ct: *threshold cycle*, Ct(r): repetição do Ct; CV-ERC(r): repetição da cultura de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmicos; *Ent.clo*: *Enterobacter cloacae*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FP: falso positivo; *Kle.pne*: *Klebsiella pneumoniae*; Neg: negativo; PCR: PCR *in house; Pse.aer*: *Pseudomonas aeruginosa*; PS: pronto socorro; Pos: positivo; *Ser.mar*: *Serratia marcescens*; UI: unidade de internação; UTI/UT: unidades de terapia intensiva e transplantados; VP: verdadeiro positivo

Tabela 5 - Resultados discrepantes: Xpert Carba-R® negativo e PCR *in house* positivo

Amostra	Xpert Carba-R®	Método de referência		Testes investigacionais				Desfecho
	Gene alvo	CV-ERC	PCR (tio)	CV-ERC(r)	OSC	PCR (isolado)	Seq. DNA	
1	Neg	Neg	bla_{VIM}	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Pse.aer*	Neg	VIM-2	FN
2	Neg	Neg	bla_{VIM}	Neg	*Kle.pne, Aci.bau*	Neg	VIM-2	FN
3	Neg	Neg	bla_{VIM}	Neg	*Kle.pne, Pse.aer, Aci.bau*	Neg	VIM-2	FN
4	Neg	Neg	bla_{VIM}	Neg	*E. coli, Pse.aer*	Neg	VIM-2	FN
5	Neg	Neg	bla_{VIM}	Neg	*Pse.aer*	Neg	VIM-2	FN

Aci.bau: Acinetobacter baumannii; CV-ERC(r): repetição da cultura de vigilância para Enterobacterales resistente a carbapenêmico; *Ent.clo*: *Enterobacter cloacae*; *E. coli*: *Escherichia coli*; FN: falso negativo; *Kle.pne*: *Klebsiella pneumoniae*; Neg: negativo; OSC: organismo sensível a carbapenêmicos; PCR: PCR *in house; Pse.aer*: *Pseudomonas aeruginosa*; Seq.DNA: sequenciamento do DNA; tio: tioglicolato.

4.1.4 Xpert Carba-R®: análise do *threshold cycle* (Ct) para o gene *bla*$_{KPC}$

Ao todo, 9,5% (87/921) *swabs* foram positivos para *bla*$_{KPC}$, mas apenas 8,4% (77) foram positivos pela PCR *in house*. A distribuição dos Ct foi analisada de acordo com o método de referência. Devido ao pequeno número de *bla*$_{NDM}$ (4) a análise do Ct não foi realizada para este gene.

A análise da área sob a curva ROC (AUC) mostrou que usando valores de *cutoff* de 29,9 ciclos, a especificidade aumenta para 100% [AUC: 0,918 (0,840 – 0,966), $P < 0,001$] excluindo 10 resultados falso negativos. Por outro lado, diminue a sensibilidade para 84,4% pois exclui 10 resultados verdadeiros positivos (Anexo D) (Figura 16).

Dentre 87 *swabs* positivos, 77% (67) apresentaram Ct ≤ 29,9 e 23% (20) apresentaram Ct > 30 e destes, 10 (50%) foram falso positivos.

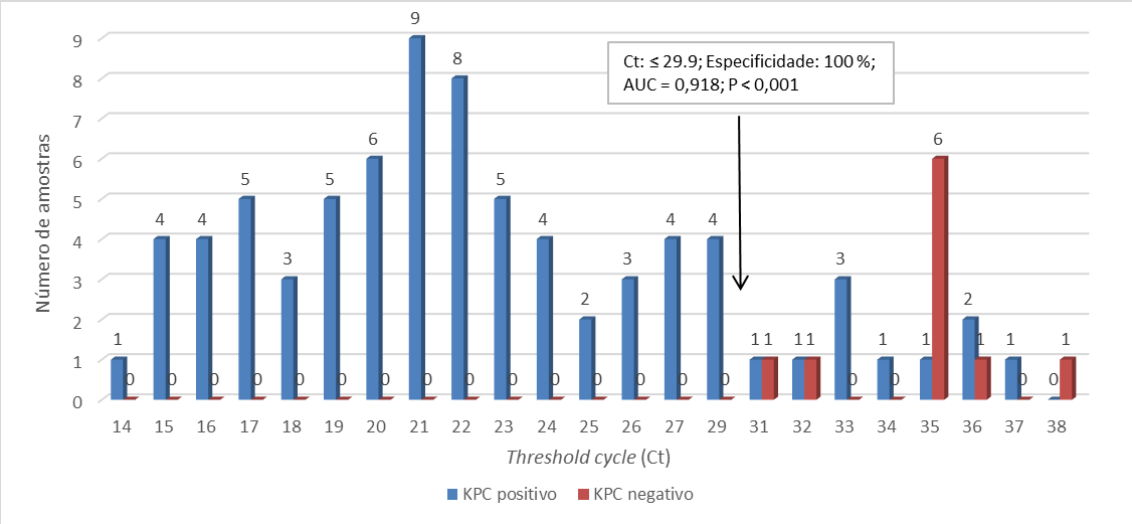


Figura 16. Representação gráfica dos valores de *threshold cycle* (Ct) obtidos com 87 amostras usando Xpert Carba-R® comparado com a positividade do PCR *in house*.

NOTA: Os valores de Ct foram arredondados para 1 casa decimal.

4.1.5 Xpert Carba-R®: análise do limite de detecção

O mais alto valor de Ct medido pelo Xpert Carba-R® para os cinco CPO com *bla*$_{KPC}$, *bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{IMP-1}$ e *bla*$_{VIM}$, foram 37,9, 37,6, 35,7, 37,5 e 39, correspondendo ao LD de 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, e 10^3 UFC/*swab,* respectivamente (Tabela 6).

Quando gene *bla*$_{KPC}$ foi combinado com qualquer outro gene de carbapenemase (*bla*$_{NDM}$, *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{IMP-1}$ ou *bla*$_{VIM}$) os resultados do LD aumentaram de 10^1 para 10^4 UFC/*swab*, independentemente do gene associado.

Para o gene *bla*$_{NDM}$, o LD aumentou de 10^2 para 10^3 UFC/*swab* quando associado com *bla*$_{KPC}$ e os genes *bla*$_{OXA-48}$, *bla*$_{IMP-1}$ e *bla*$_{VIM}$ não mudaram quando comparados a sua detecção individual.

Os valores do LD obtidos com *swabs* retais negativos foram concordantes com os valores na solução fisiológica (Anexo E).

Tabela 6 - Limite de detecção do ensaio Xpert Carba-R®

UFC/*swab*	*bla*$_{KPC}$		*bla*$_{KPC+}$	*bla*$_{NDM}$		*bla*$_{NDM+}$	*bla*$_{OXA-48}$		*bla*$_{OXA-48+}$	*bla*$_{IMP-1}$		*bla*$_{IMP-1+}$	*bla*$_{VIM}$		*bla*$_{VIM+}$
	Ct	Res	Res	Ct	Res	Res	Ct	Res	Res	Ct	Res	Res	Ct	Res	Res
10^7	23,3	pos	pos	22,9	pos	pos	21,3	pos	pos	21,6	pos	pos	25,7	pos	pos
10^6	27,4	pos	pos	26,0	pos	pos	25,8	pos	pos	24,8	pos	pos	27,9	pos	pos
10^5	30,8	pos	pos*	28,3	pos	pos	29,2	pos	pos	28,1	pos*	pos*	31,8	pos	pos
10^4	35,0	pos	pos*	30,1	pos	pos*	32,1	pos*	pos*	29,5	pos*	pos*	35,8	pos*	pos*
10^3	36,9	pos	neg*	36,6	pos*	pos*	35,7	pos*	pos*	37,5	neg*	neg*	39,0	pos*	pos*
10^2	37,2	pos*	neg	37,6	pos*	neg*	neg	neg*	neg*	neg	neg	neg	neg	neg*	neg*
10^1	37,9	pos*	neg	neg	neg*	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

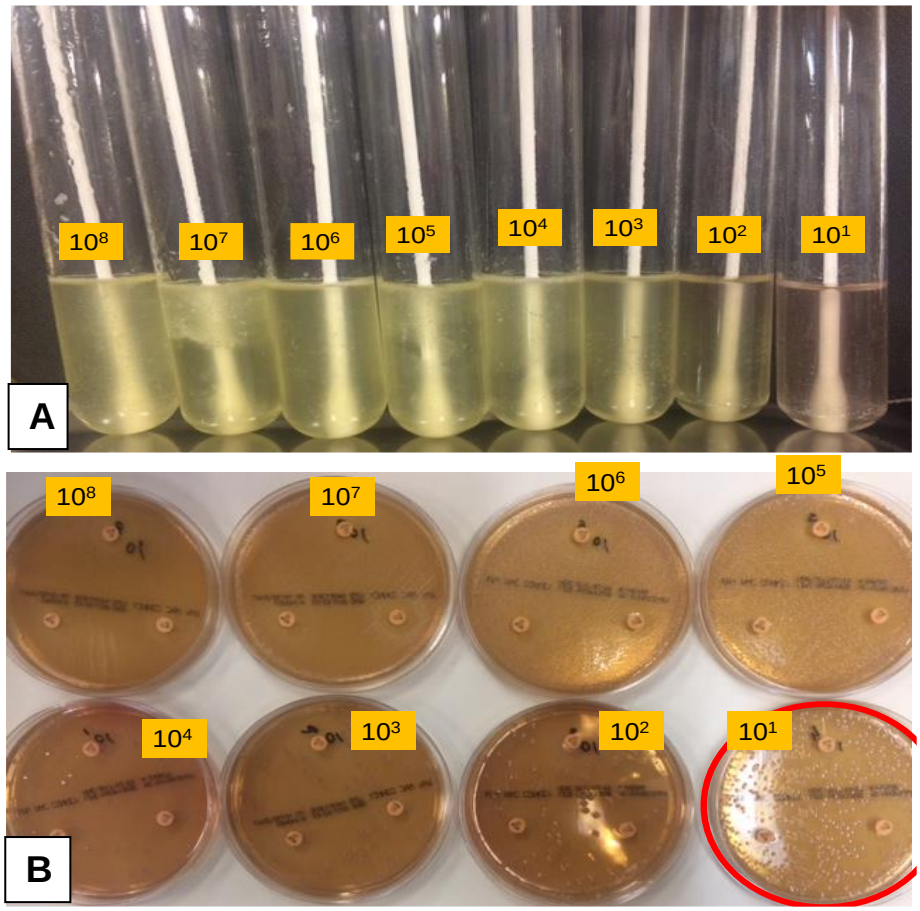
bla$_{KPC+}$: *bla*$_{KPC}$ associada com qualquer outro gene alvo; *bla*$_{NDM+}$: *bla*$_{NDM}$ associada a *bla*$_{KPC}$; *bla*$_{OXA-48+}$: *bla*$_{OXA-48}$ associada a *bla*$_{KPC}$; *bla*$_{IMP-1+}$: *bla*$_{IMP-1}$ associada a *bla*$_{KPC}$; *bla*$_{VIM+}$: *bla*$_{VIM}$ associada a *bla*$_{KPC}$; pos* e neg*: resultados obtidos com *swabs* retais negativos; neg: negativo; pos: positivo; Res: resultado; UFC: unidade formadora de colônia

NOTA: Limite de detecção determinado para cada gene ou combinação de genes estão destacados na cor cinza

4.2 Correlação do Xpert Carba-R® com a cultura de vigilância

4.2.1 Cultura de vigilância: limite de detecção, microrganismos, testes fenotípicos e perfil de susceptibilidade aos carbapenêmicos

O menor limite de detecção (LD) determinado na cultura de vigilância foi ≤ 10^1 UFC/*swab* conforme demonstrado na Figura 17.



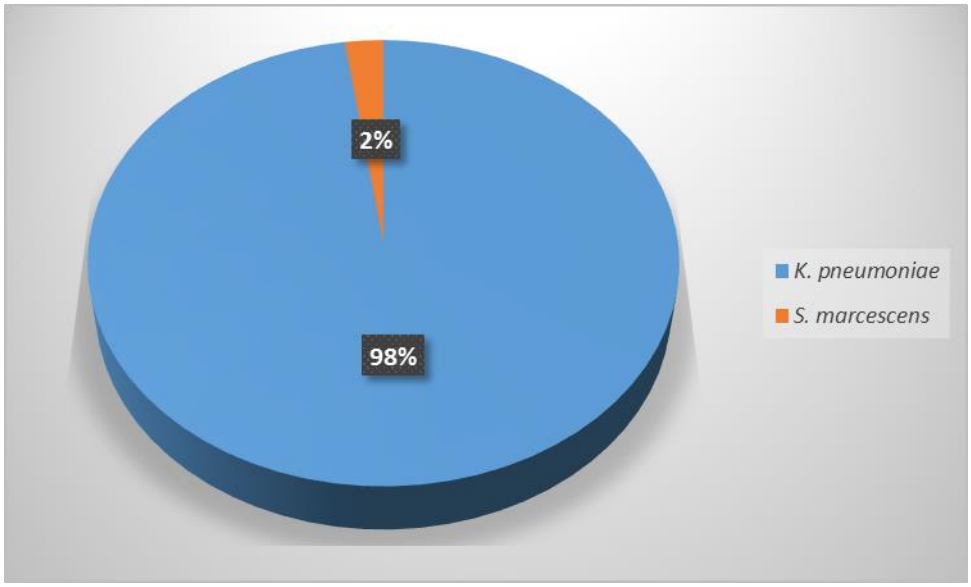
FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 17 – Limite de detecção da CV-ERC. A: caldo tioglicolato com incubação *overnight* sob inóculos variando de 10^8 a 10^1 UFC/*swab* de *K. pneumoniae* BAA-1705. B: ágar MacConkey com discos de carbapenêmicos semeado a partir do caldo tioglicolato após incubação por 16-18 horas.

Foram realizadas 921 CV-ERC, destas 9% (82) foram positivas e 91% (839) negativas.

A partir das 86 amostras positivas, foram recuperados 87 ERC (85 *K. pneumoniae* e 2 *S. marcescens*) (Figura 18). Um *swab* retal apresentou crescimento de duas ERC (*K. pneumoniae* e *S. marcescens)*.

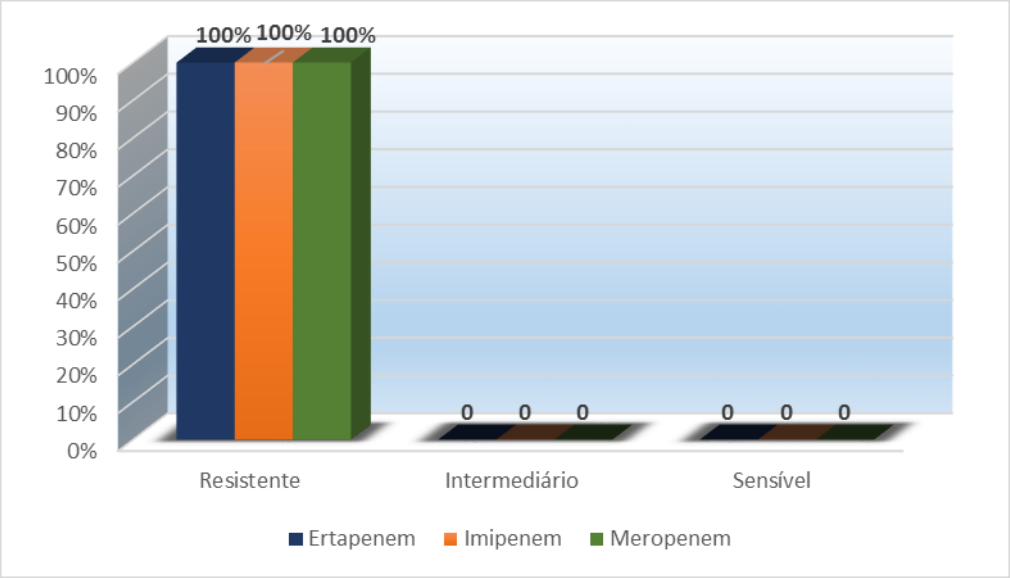
Figura 18. Representação gráfica da ocorrência de microrganismos provindos da CV-ERC (N-87)



K. pneumoniae: Klebsiella pneumoniae; S. marcescens: Serratia marcescens

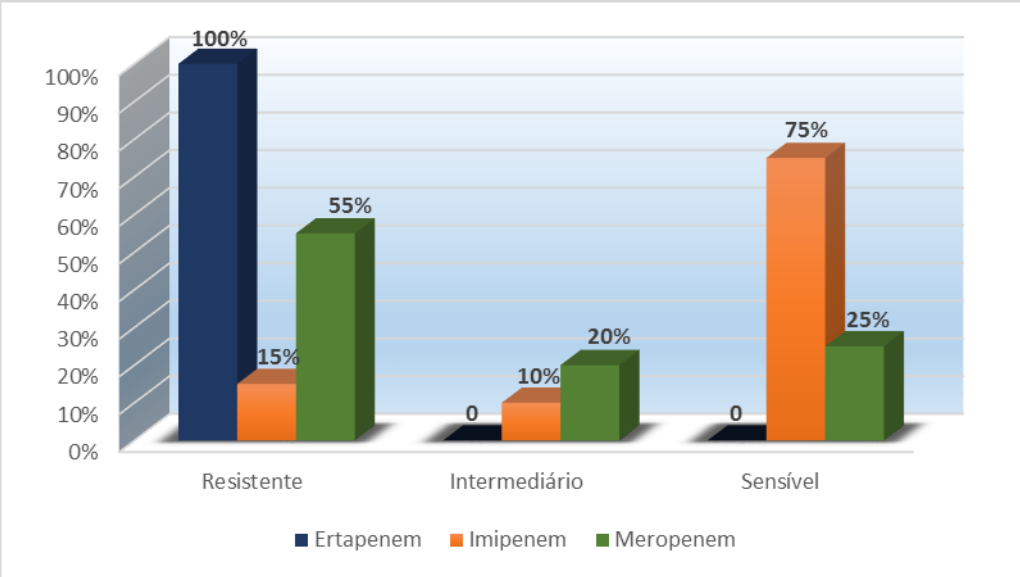
Dentre as 87 ERC identificadas, 67 apresentaram testes fenotípicos positivos para carbapenemase (65 no Q-MHT e 2 no EDTA) com 100% de resistência aos três carbapenêmicos e 20 apresentaram testes fenotípicos negativos para carbapenemase com percentuais de resistência variando entre os carbapenêmicos; 100% ao ertapenem, 15% ao imipenem e 55% ao meropenem (Figuras 19 e 20). As ERC não PC apresentam CIM mais baixas para meropenem e imipenem quando comparado com as ERC-PC (CIM: 4 µg/mL versus 16 µg/mL) (Figura 21).

Figura 19. Representação gráfica do percentual de resistência aos carbapenêmicos em ERC produtoras de carbapenemases (N-67)



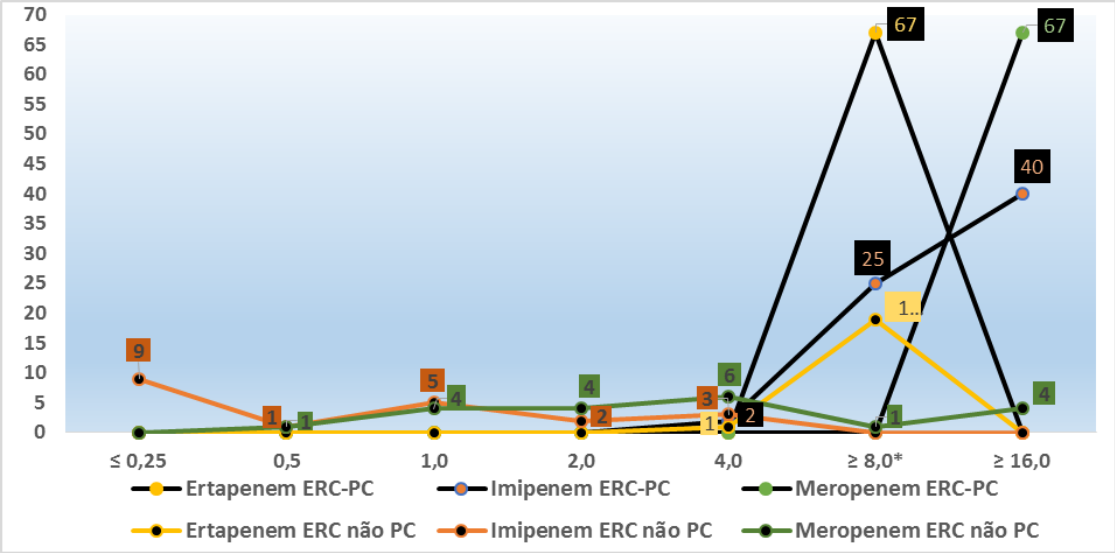
ERC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos

Figura 20. Representação gráfica do percentual de resistência aos carbapenêmicos em ERC não produtoras de carbapenemases (N-20)



ERC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos

Figura 21. Representação gráfica da distribuição das CIM (µg/mL) em ERC produtoras (N-67) e não produtoras de carbapenemases (N-20)



CIM: concentração inibitória mínima; ERC-PC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos produtoras de carbapenemase; ERC não PC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos não produtoras de carbapenemase

NOTA: CIM ≥ 8,0* µg/mL representa a maior CIM detectável pelo Vitek 2® XL para ertapenem.

4.2.2 Xpert Carba-R® versus cultura de vigilância

Dentre as 921 amostras, o Xpert Carba-R® foi positivo em 9,9% (91) e a CV-ERC em 9,3% (86).

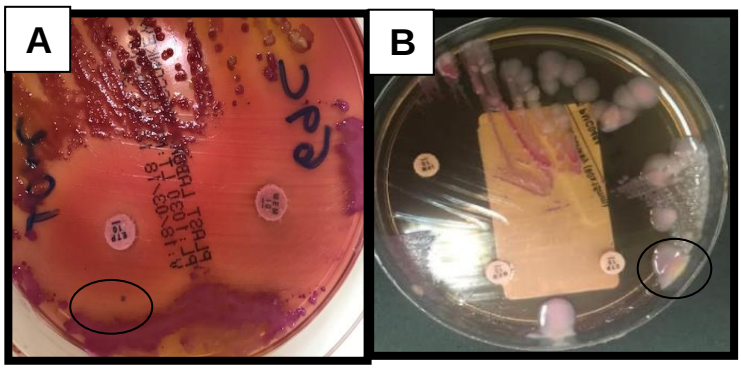
Um total de 66 amostras foram positivas em ambas metodologias (Anexo F), 25 foram positivas apenas pelo Xpert Carba-R®, 20 positivas somente na cultura e 810 foram negativas em ambas metodologias (Tabela 7). O percentual de concordância entre os métodos foi de 95% (876).

Tabela 7 - Resultados do Xpert Carba-R® versus CV-ERC (N-921)

CV-ERC	Xpert Carba-R®		
	Nº Positivo	Nº Negativo	TOTAL
Positivo	66	20	86
Negativo	25	810	835
TOTAL	91	830	921

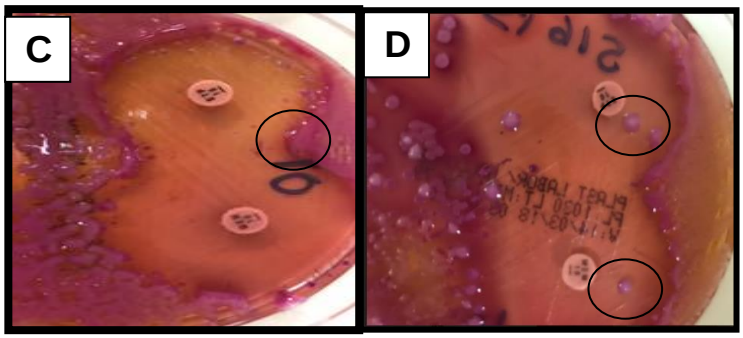
Nº: número de resultados positivos e negativos

Dentre os 25 *swabs* retais positivos somente no Xpert Carba-R®**;** 2 eram positivos na cultura primária, mas foram considerados negativos pelo observador (Figura 22), 23 mantiveram-se negativos após reavaliação da placa primária e destes, 7 foram confirmados positivos para o gene *bla*$_{KPC}$ em ESC e então, 16 foram ressemeados obtendo 4 resultados positivos para ERC-PC (Figura 23). O fluxo com a investigação e resolução destes resultados estão demonstrados na Figura 24.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 22 - Placas A e B demonstrando a presença de colônias dentro do halo do ertapenem não observados na avaliação primária.



FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 23 - Placa C: ausência de colônias resistentes e presença de ESC-PC; placa D: ressemeadura a partir do tioglicolato com presença de ERC-PC.

As 7 ESC-PC (4 *E. coli* e 3 *K. pneumoniae*) foram submetidas ao TSA pelo Vitek 2 XL® e apresentaram perfil de sensibilidade incomum, mostrando MIC ≤ 4 µg/mL para ertapenem e MIC ≥ 16 µg/mL para imipenem e/ou meropenem. Quando testado disco-difusão e fita E-test® foram sensíveis aos 3 carbapenêmicos confirmando os resultados negativos da cultura. Os testes fenotípicos para carbapenemase foram positivos e o sequenciamento do *amplicon* identificou a variante KPC-2 confirmando os resultados positivos do Xpert Carba-R® e a discrepância entre os métodos (Anexo G).

Em 12 amostras que mantiveram resultados discrepantes após a aplicação dos testes investigacionais, não foram confirmadas presença de genes de carbapenemase nos isolados recuperados (OSC) e nem a partir do caldo tioglicolato correspondente. Estes resultados estão demonstrados nas Tabelas 4 e 8.

Dentre os 20 *swabs* positivos somente na cultura de vigilância, os testes investigacionais confirmaram os resultados negativos obtidos diretamente da amostra clínica e os testes fenotípicos para carbapenemases (Q-MHT e EDTA) também foram negativos. Estes isolados foram investigados quanto ao mecanismo de resistência aos carbapênemicos através do SCG, após a análise dos perfis clonais (similaridade genética) através da eletroforese em campo pulsado (PFGE) (Figura 24).

Tabela 8 - Análise dos resultados discrepantes (Xpert Carba R® positivo e CV-ERC negativa) após aplicação dos testes investigacionais (continuação)

	Swab retal		Testes investigacionais (isolados)							TSA (µg/mL) (Vitek 2XL®/ E-test®)			
N	Xpert Carba R®	Ct	Reavaliação da CV-ERC	CV-ERC(r)	Isolados (OSC e ERC)	PCR *in house*	Xpert Carba R®	Q-MHT	EDTA	Erta	Imi	Mero	Seq.
1	*bla*KPC	26,2	Pos	NR	*Kle.pne*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
2	*bla*KPC	33,4	Pos	NR	*Kle.pne*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
3	*bla*KPC	23,4	Neg	NR	*Kle.pne*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	4,0/ 0,25	≥16,0/ 0,5	≥16,0/ 0,25	KPC-2
4	*bla*KPC	35,2	Neg	NR	*Kle.pne*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	≤0,5/ 0,25	≥16,0/ 1,0	0,5/ 1,0	KPC-2
5	*bla*KPC	23,9	Neg	NR	*Kle.pne*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	≤0,5/ 0,5	8,0/ 1,0	≥16,0/ 1,0	KPC-2
6	*bla*KPC	35,2	Neg	NR	*E.coli*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	≤0,5/ 0,5	4,0/ 1,0	≥16,0/ 0,5	KPC-2
7	*bla*KPC	31,5	Neg	NR	*E.coli*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	4,0/ 0,5	≥16,0/ 1,0	≥16,0/ 0,5	KPC-2
8	*bla*KPC	26,3	Neg	NR	*E.coli*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	4,0/ 0,5	≥16,0/ 1,0	≥16,0/ 1,0	KPC-2
9	*bla*KPC	23,7	Neg	NR	*E.coli*	*bla*KPC	NR	Pos	Neg	4,0/ 0,5	0,5/ 1,0	≥16,0/ 1,0	KPC-2
10	*bla*KPC	35,2	Neg	Pos	*Kle.pne*	*bla*KPC	*bla*KPC	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
11	*bla*KPC	24,0	Neg	Pos	*Kle.pne*	*bla*KPC	*bla*KPC	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
12	*bla*KPC	24,2	Neg	Pos	*Kle.pne*	*bla*KPC	*bla*KPC	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
13	*bla*KPC	36,7	Neg	Pos	*Kle.pne*	*bla*KPC	*bla*KPC	Pos	Neg	≥8,0	8,0	≥16,0	NR
14	*bla*KPC	32,0	Neg	Neg	*Kle.pne, E.coli*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
15	*bla*KPC	35,6	Neg	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
16	*bla*KPC	30,8	Neg	Neg	*Kle.pne, Ent.clo Ser.mar*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
17	*bla*KPC	35,0	Neg	Neg	*Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
18	*bla*NDM	35,7	Neg	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
19	*bla*NDM	32,2	Neg	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
20	*bla*KPC	34,8	Neg	Neg	*Kle.pne, Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
21	*bla*KPC	34,7	Neg	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR

continua

Tabela 8 - Análise dos resultados discrepantes (Xpert Carba R® positivo e CV-ERC negativa) após aplicação dos testes investigacionais (conclusão)

	Swab retal		Testes investigacionais (isolados)							TSA (µg/mL) (Vitek 2XL®/E-test®)			
N	Xpert Carba R®	Ct	Reavaliação da CV-ERC	CV-ERC(r)	Isolados (OSC e ERC)	PCR *in house*	Xpert Carba R®	Q-MHT	EDTA	Erta	Imi	Mero	Seq.
22	*bla*$_{KPC}$	35,1	Neg	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
23	*bla*$_{KPC}$	37,9	Neg	Neg	*Kle.pne, Ent.clo Pse.aer, Aci.bau*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
24	*bla*$_{KPC}$	34,6	Neg	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR
25	*bla*$_{KPC}$	35,1	Neg	Neg	*Kle.pne, Ent.clo Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	NR	NR	NR	NR

Aci.bau: Acinetobacter baumannii; Ct: *threshold cycle*; CV-ERC (r): repetição da CV-ERC; *Ent.clo*: *Enterobacter cloacae;* Erta: ertapenem; E.*coli*: *Escherichia coli*; *Kle.pne*: *Klebsiella pneumoniae*; Imi: imipenem; Mero: meropenem; NR: não realizado; Neg: negativo; PCR: PCR *in house;* Pos: positivo; *Pse.aer*: *Pseudomonas aeruginosa*; *Ser.mar*: *Serratia marcescens*; Seq.DNA: sequenciamento de DNA; TSA: teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

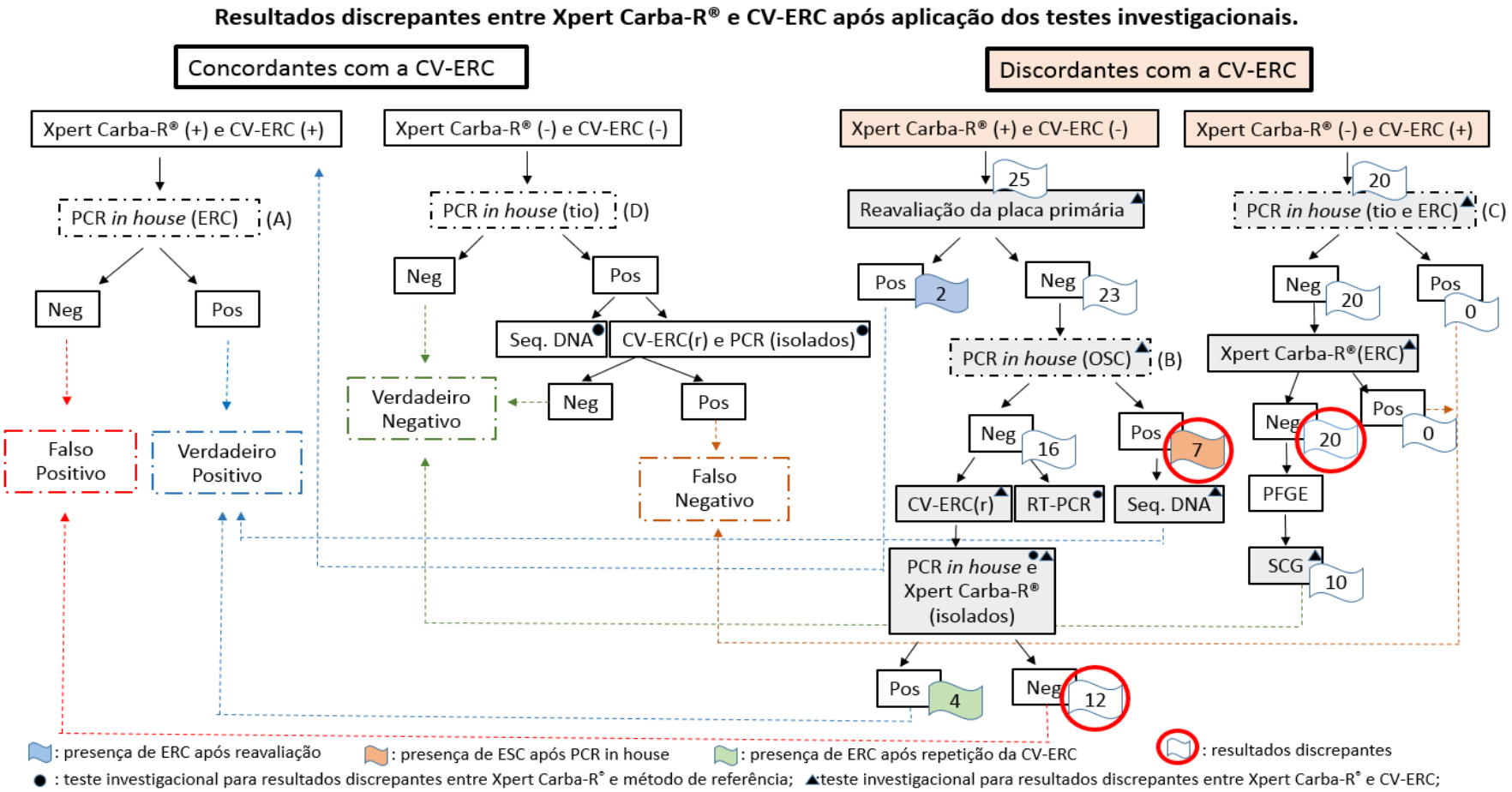
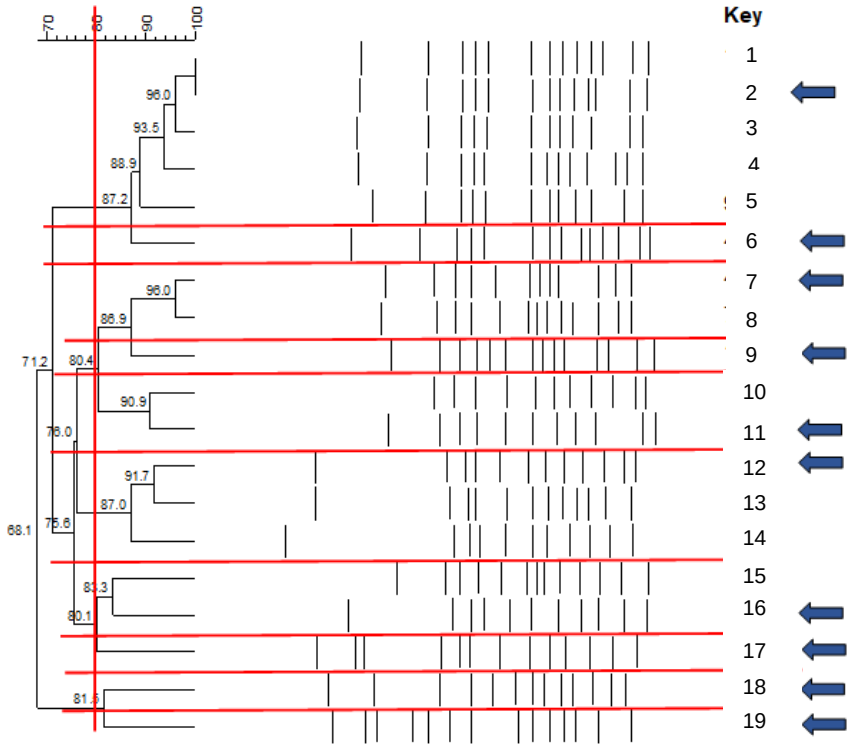


Figura 24 - Resultados discrepantes entre Xpert Carba-R® e CV-ERC após aplicação dos testes investigacionais.

(A) (B) (C) (D): método de referência (Quadro 5); CV-ERC(r): repetição da CV-ERC; Neg (-): negativo; OSC: organismos sensíveis aos carbapenêmicos; Pos (+): positivo; PCR: PCR *in house*; PFGE: *pulsed field gel electrophoresis*; RT-PCR: *Fast Real-Time* PCR®; Seq.DNA: sequenciamento do DNA; SCG: sequenciamento completo do genoma; tio: tioglicolato
NOTA: testes investigacionais destacados em cinza.

No dendograma representado na Figura 25 pode-se observar a presença de 10 diferentes *clusters* entre os 19 isolados de *K. pneumoniae* que foram analisadas (um isolado não foi recuperado), demostrando assim a variabilidade genética das amostras do estudo, então 10 cepas foram selecionados de cada *cluster*, sinalizados com a seta azul, para análise do sequenciamento genômico de acordo com a similaridade clonal (*cutoff* < 83%).



Tolerância – 1,5%

Otimização - 1,5%

FONTE: HC FMUSP, São Paulo

Figura 25 - Dendrograma de avaliação da variabilidade genética para os 19 isolados de *K.pneumoniae* destacando os 10 selecionados para SCG (seta azul).

A análise do sequenciamento genômico, realizada pelo *Align Sequences Nucleotide* BLAST e *ResFinder 2.0 servers*, mostrou a presença de genes de resistência aos antibióticos β-lactâmicos e a presença das proteínas de membrana externa ompK 35, ompK 36 e ompk 37 para as 10 *K.*

pneumoniae resistentes aos carbapenêmicos. A análise do sequenciamento realizada pelo *MLSTfinder* mostrou a presença de 4 tipos diferentes de *Sequence typing* (ST). Não foram encontrados genes de carbapenemases e AmpC confirmando os resultados negativos do Xpert Carba-R®. Os genes relacionados a resistência dos carbapenêmicos e as porinas estão relacionados no Anexo H. A avaliação de proteínas de membrana externa demonstrou mutações nas porinas ompK 35 em 4 cepas e mutações nas porinas ompK 36 e ompk 37 em todas as cepas, não encontrando um padrão homogêneo entre as elas (Anexo I). Algumas mutações encontradas foram diferentes das relatadas na literatura, sugerindo o encontro de novas mutações; A190W, D224E, Q227S, L228V, S346K, N304S, Y306S, D308R, R345H, G189T.

Os resultados do Xpert Carba-R® foram obtidos em 50 minutos e da CV-ERC em até 120 horas após o início do ensaio (negativos: 48 a 72 horas e positivos: 72 a 120 horas). A diferença do TAT, medida em dias, entre o Xpert Carba-R® e a CV-ERC variou de acordo com o crescimento bacteriano no caldo tioglicolato e na placa primária (presença de uma ou mais bactérias resistentes, pouca quantidade de colônias resistentes ou populações mistas necessitando de um ou dois dias para reisolamento das mesmas). O resumo destes resultados esta sumarizado na Tabela 9.

Tabela 9 - Diferença entre o "t*urnaround time"* (TAT) obtido pelo Xpert Carba-R® e culturas conforme crescimento no caldo tioglicolato e placas primárias

Resultado	Cultura de vigilância	Diferença do TAT	Nºamostras
Negativo	Tio turvo em 24h	2 dias	795
	Tio turvo em 48h	3 dias	21
	Reisol. suspeita de ERC	3 dias	19
Positivo	Tio turvo em 24h, sem reisol. (ID e TSA)	3 dias	8
	Tio turvo em 24h, com reisol. (ID e TSA)	4 dias	72
	Tio turvo em 24h, com dois reisol. (ID e TSA)	5 dias	6

ID: identificação; h: horas; Reisol. Reisolamento; Tio: caldo tioglicolato; TSA: teste de sensibilidade aos antimicrobianos.

4.3 Mensurar as indicações de precaução de contato relacionada a Gram-negativo multirresistentes produtores de carbapenemases a partir de método genotípico em comparação ao fenotípico

Foram analisadas 921 amostras de 859 pacientes. A prevalência de colonização por organismos resistente a carbapenêmicos e/ou produtores de carbapenemase foi de 36% (66) na UTI/UT e de 7% (38) no PS. No total, 111 (13%) pacientes estavam colonizados, determinados a partir do método genotípico (n=91) (82%) e/ou fenotípico (n=86) (77%) (Figura 26).

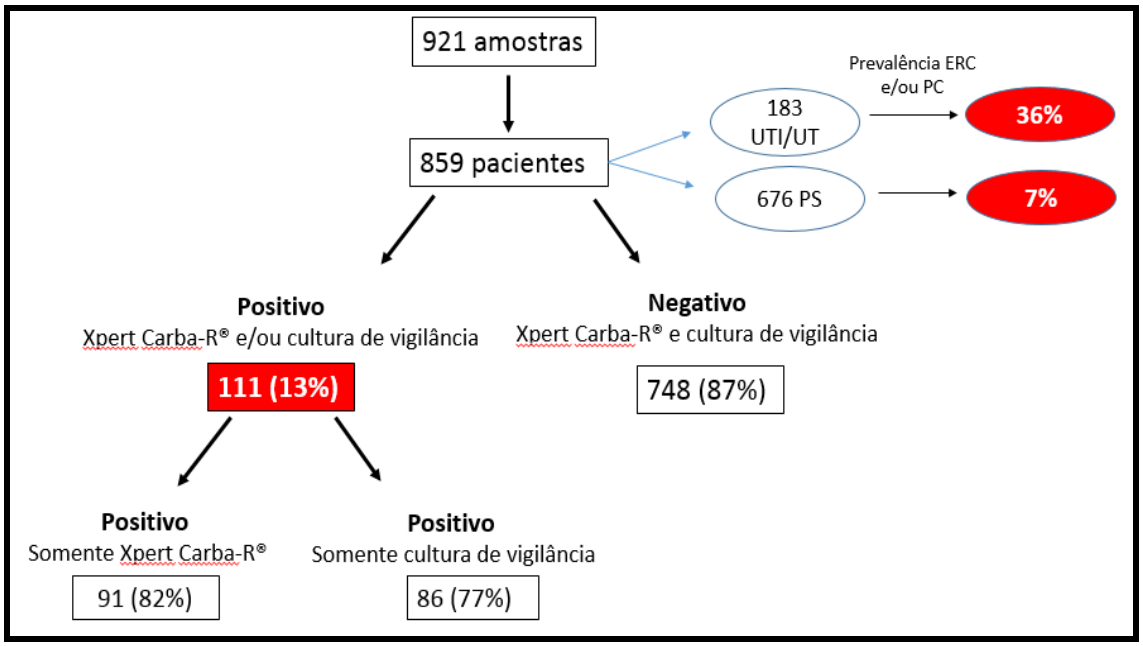


Figura 26 - Prevalência de colonização por microrganismo resistente a carbapenêmicos e/ou produtores de carbapenemase e quantidade de pacientes identificados a partir dos métodos genotípicos e fenotípicos.

ERC: Enterobacterales resistente a carbapenêmicos; PC: produtores de carbapenemases; PS: pronto socorro; UTI/UT: unidades de terapia intensiva e transplantados

Dentre os 91 pacientes detectados pelo Xpert Carba-R®; 72 estavam colonizados com ERC produtoras de carbapenemase, 7 estavam com ESC produtoras de carbapenemase e 12 estavam colonizados com organismos produtores de carbapenemase (OPC) não recuperados na cultura.

Dentre os 86 pacientes detectados pela cultura de vigilância; 66 estavam colonizados com ERC produtoras de carbapenemase e 20 com ERC não produtores de carbapenemase. Para ilustrar quais pacientes foram detectados por ambas metodologias, os resultados foram divididos em conjuntos numéricos onde; A foi considerado como o conjunto dos resultados obtidos pelo Xpert Carba-R® e B o conjunto dos resultados obtidos pela cultura conforme demonstrado na Figura 27.

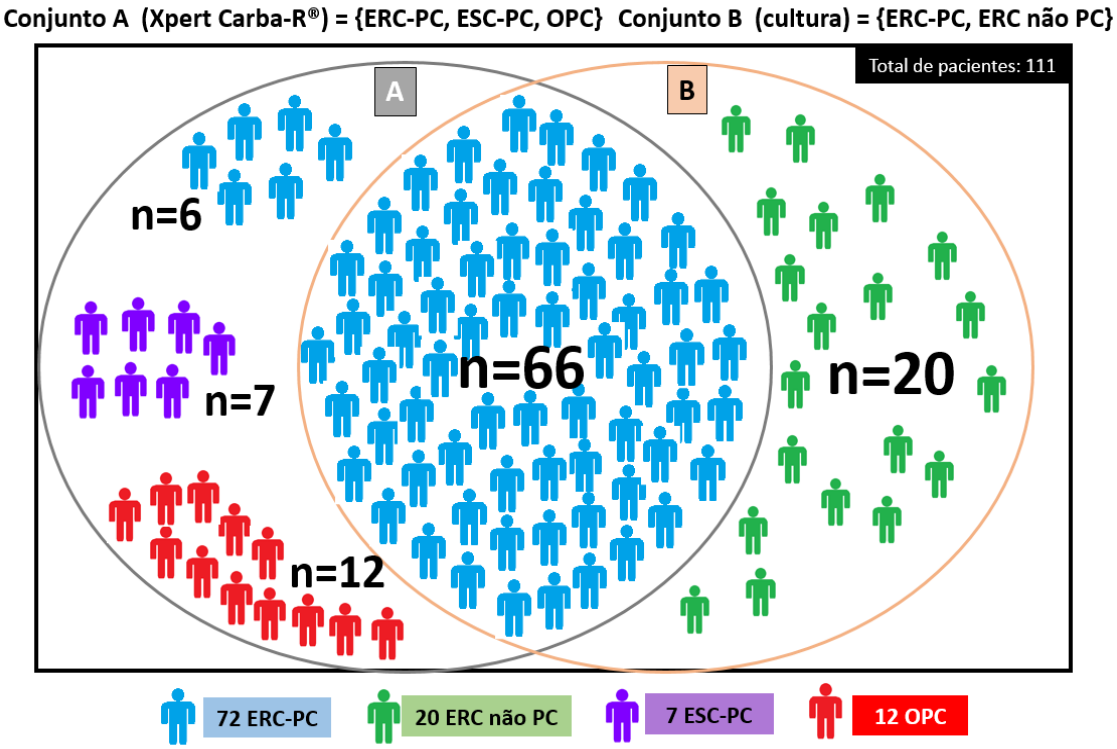


Figura 27 - Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes identificados pelo Xpert Carba-R® (conjunto A) e cultura (conjunto B)

ERC-PC: Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e produtoras de carbapenemase; ERC não PC: Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos não produtoras de carbapenemase; ESC-PC: Enterobacterales sensível a carbapenêmicos e produtoras de carbapenemase; OPC: organismos produtoras de carbapenemase

Diante do exposto, não houve detecção da colonização em 18% (20/111) e 23% (25/111) dos pacientes determinados pelo Xpert Carba-R® e pela cultura de vigilância, respectivamente.

Na análise do subgrupo de pacientes portadores de microrganismos sabidamente resistentes a carbapenêmicos (n=92), o Xpert Carba-R® e a cultura deixaram de detectar, respectivamente, 20 (22%) e 6 (7%) pacientes (estes últimos detectados exclusivamente pela avaliação do pesquisador) (Figura 28).

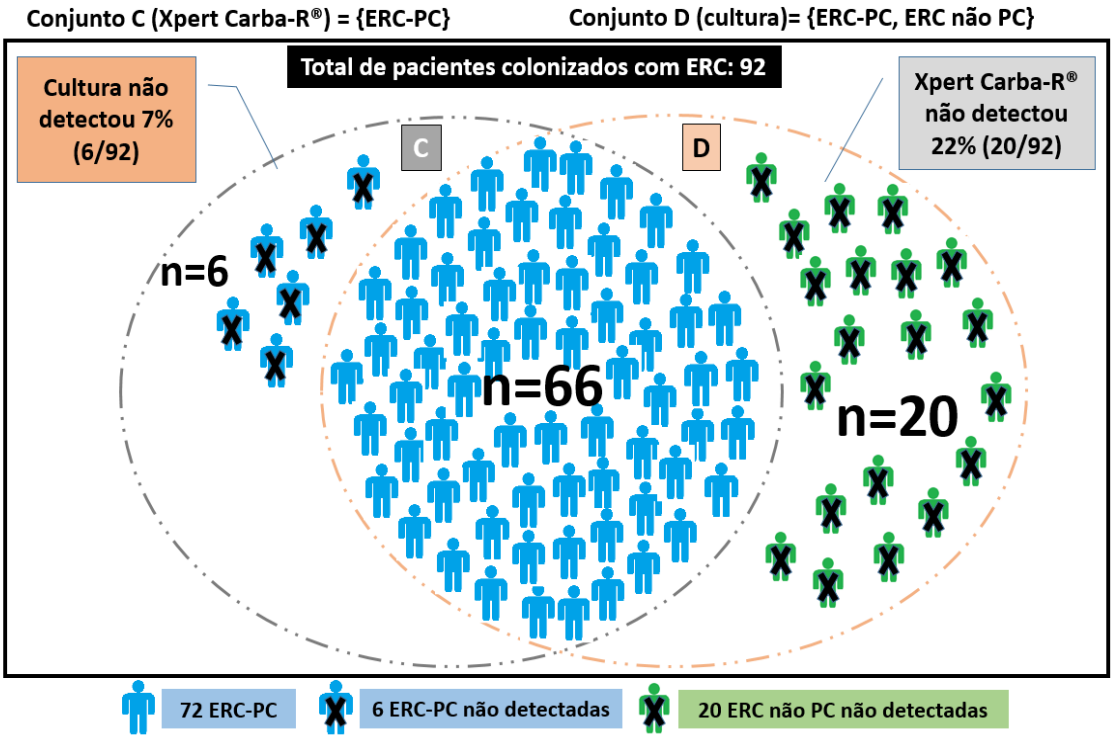


Figura 28 - Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes colonizados com ERC não detectados pelo Xpert Carba-R® e cultura

NOTA: O conjunto C é formado por pacientes com ERC detectadas pelo Xpert Carba-R® e D por pacientes com ERC detectadas pela cultura

ERC-PC: Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e produtoras de carbapenemase; ERC não PC: Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos não produtoras de carbapenemase

Por outro lado, na análise do subgrupo de pacientes portadores de microrganismos com genes codificadores de carbapenemases (n=91), a cultura deixou de detectar 25 (27%) pacientes (23 com microrganismo produtor de KPC e 2 de NDM) (Figura 29).

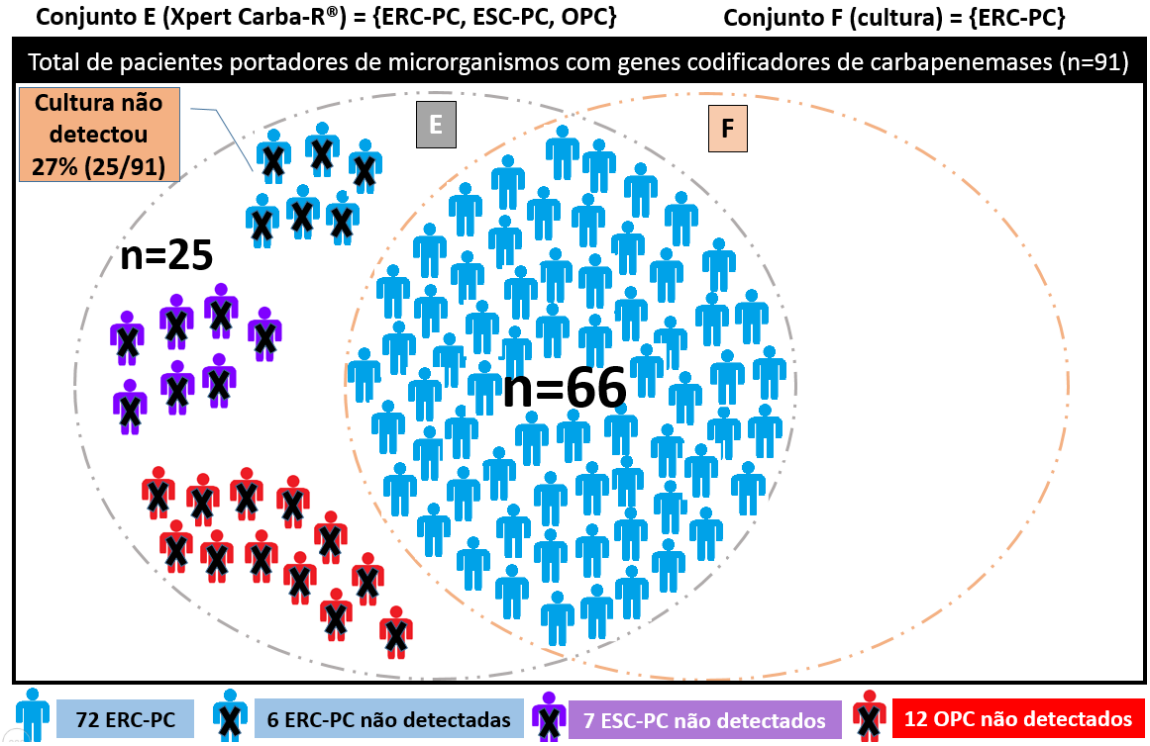


Figura 29: Diagrama de Venn-Euler representando a quantidade de pacientes portadores de microrganismos com genes codificadores de carbapenemases não detectados pela cultura

NOTA: O conjunto E é formado por pacientes com genes de carbapenemase detectadas pelo Xpert Carba-R® e F por pacientes com genes de carbapenemase detectadas pela cultura.
ERC-PC: Enterobacterales resistentes a carbapenêmicos e produtoras de carbapenemase; ESC-PC: Enterobacterales sensivel a carbapenêmicos e produtoras de carbapenemase; OPC: organismos produtoras de carbapenemase

5 DISCUSSÃO

Caracterização da Casuística

No Brasil, KPC é um problema de saúde pública e Enterobacterales resistente a carbapenêmicos apresentam-se em alta prevalência, principalmente devido aos isolados produtores de KPC-2, que são altamente endêmicos[12]. As enzimas do tipo NDM também tem sido identificadas em um ritmo preocupante, desde 2013, com isolados carregando a variante *bla*$_{\text{NDM-1}}$ em 9 estados brasileiros indicando a sua difusão pelo país[105], assim como as variantes OXA-48 (OXA-370) e IMP-1, embora ainda em casos esporádicos[34,35].

Na nossa instituição, as ERC foram esporadicamente observadas até 2005, mas depois de 2009 os produtores de KPC se tornaram um desafio epidemiológico[152,153]. *K. pneumoniae* é o primeiro isolado Gram-negativo de hemocultura e destes, 50% são resistentes a carbapenêmicos, dos quais 85% produzem KPC. As MBL ainda são raras, com poucos casos de NDM e IMP, esta última detectada num surto com *E. gergoviae* na unidade de transplante renal[211]. No entanto, a real prevalência de carbapenemases não é fielmente conhecida, uma vez que métodos fenotípicos utilizados para triagem, Q-MHT e EDTA, apresentam bom desempenho somente para detecção de KPC[149] e MBL[157] em Enterobacterales portanto, não são testados em *Acinetobacter spp* e *P. aeruginosa*. Os bacilos Gram-negativos não fermentadores, potencialmente produtores de MBL, são subdiagnosticados devido às limitações metodológicas fenotípicas, e até mesmo, as serino-carbapenemases são pobremente detectadas neste grupo devido a frequente sobreposição de mecanismos de resistência[66]. Do mesmo modo as oxacilinases, fracamente inibidas pelos inibidores de carbapenemases da classe A, não apresentam um padrão de susceptibilidade que permita a sua detecção através de métodos fenotípicos confiáveis[56].

Organismos produtores de carbepenemases plasmidiais podem dissemina-lá para diferentes espécies[31,33]. Embora a KPC seja mais comumente encontrada em *K. pneumoniae*, representado por 90% das infecções por ERC no nosso instituto, outras Enterobacterales também foram

identificadas como produtores; *E. coli, K. oxytoca, Enterobacter spp, S. marcescens, C. freundii, Proteus spp, Providencia spp* e *Raoultella spp*[212] assim como relatado em outros estudos[71,213]. A maior preocupação é que esses organismos são quase sempre extensivamente resistentes aos antibióticos, ficando poucas opções ativas para o tratamento e resultando em maiores taxas de mortalidade[6,7].

Em nosso instituto, maior hospital público da América Latina, as enfermarias comportam até 4 leitos, as UTI apresentam altas taxas de ocupação e o atendimento no PS é “porta-fechada” restrito para situação de alta complexidade médica. A coleta de vigilância para rastrear colonização por ERC esta contemplada no programa de Controle de Organismos Multiresistentes estabelecido pelo serviço de controle de infecção hospitalar desde 2010. Pacientes internados nas UTI e UT coletam *swabs* retais, virilha-axila-períneo e/ou orofaringe no momento da admissão e semanalmente (transversal), se permanecerem internados e não colonizados. A coleta é realizada usando um único *swab* por sítio anatômico, transportado em meio gel Stuart sendo mensalmente realizadas 5 000 culturas para investigação de portadores com ERC com positividade média de 15%.

Diferentes percentuais de positividade são relatados entre os estudos de vigilância, 38% no Irã[214], 3,4% nos Emirados Arabes[215], 10% nos EUA[216] e 13% no Marrocos[217]. A análise comparativa é dificultada, pois depende não apenas das diferentes populações estudadas mas também da epidemiologia local, das medidas de contenção aplicadas nesses países e da variabilidade nos métodos de vigilância. Diferentes métodos baseados em cultura, com sensibilidades analíticas distintas, estão disponíveis[181-183]. Além disso, as coletas podem variar em relação aos sítios anatômicos; retal, orofaringe, virilha-axila-períneo, assim como a quantidade de *swabs* coletados por sítios a serem processadas no mesmo ensaio.

Em nosso serviço, as culturas de vigilância foram padronizadas incubando previamente os *swabs* em caldo de enriquecimento sem antibiótico e posterior subcultivo em ágar MacConkey adicionados com discos de carbapenêmicos. Tal procedimento permite o processamento simultâneo de

dois ou mais *swabs*, frequentemente coletados, otimizando recursos laboratorias sem perda de sensibilidade diagnóstica. Os resultados são fornecidos entre 48 e 120 horas.

Métodos fenotípicos, baseados em cultura, irão detectar se os isolados são resistentes ou sensíveis aos carbapenêmicos, mas não identificarão se a resistência é devida a produção de carbapenemase ou outros mecanismos.

Atualmente, o conhecimento do tipo de carbapenemases é crucial para a escolha do antibiótico mais adequado, pois os novos medicamentos, com inibidores de carbapenemases, são específicos para a sua classe e podem ou não agir, dependendo do tipo da enzima. Com os recentes avanços nas áreas da genômica e biologia molecular, atualmente é possível identificar microrganismos e genes de resistência, de forma mais rápida e precisa. Testes moleculares que visam a detecção de genes codificadores de carbapenemases têm desempenhado papel importante na rapidez do resultado para os clínicos. Dentre as plataformas disponíveis nos últimos seis anos no Brasil, encontra-se o Gene Xpert® que através do ensaio Xpert-Carba-R®, detecta os cinco principais genes de carbapenemase; bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} e bla_{VIM} em menos de 1 h diretamente de *swabs* retais. Diante do cenário desafiador das infecções causadas por ERC produtoras de KPC, a introdução das novas drogas e as características institucionais, houve um particular interesse em avaliar essa nova ferramenta diagnóstica.

De acordo com as recomendações do *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA)[218], que determina a análise da performance diagnóstica para novos testes incorporados à rotina laboratorial devido a distintas prevalências locais, foi realizado um estudo de desempenho metodológico frente aos pacientes que rotineiramente são investigados quanto a colonização por ERC em nosso serviço. Posteriormente, seus resultados foram correlacionados com a cultura, método laboratorial padrão, a fim de avaliar diferença na resposta microbiológica e na introdução de medidas de precaução de contato. Para isso, as condições de coleta e processamento não sofreram readequação.

Em meio ao processo de validação, iniciou-se um estudo para investigar a prevalência, fatores de risco e taxas de aquisição de EPC em pacientes admitidos no PS, com duração de 3 meses, e estas amostras foram incorporadas na análise de desempenho a fim de aumentar a diversidade populacional. Em decorrência ao alto número de coletas diárias, foi estabelecido a coleta de dois *swabs* retais por paciente para facilitar o fluxo de trabalho dentro do laboratório. Enquanto um time processou a cultura, outro processou o Xpert Carba-R®. Ambas coletas, com 1 ou 2 *swabs*, apresentam limitações em relação ao inóculo bacteriano, enquanto na coleta com um *swab* pode haver diminuição do inóculo bacteriano ao processar primeiramente no Xpert Carba-R® e depois na cultura, ao coletar dois *swabs* pode haver diferença na quantidade de fezes entre ambos. A maioria das análises de desempenho neste formato utilizaram um *swab* duplo em meio de cultura líquido, a fim de equalizar a quantidade de fezes[219, 220].

Até o início deste estudo, as análises de desempenho das plataformas moleculares automatizadas ocorreram em pacientes internados em um mesmo cenário epidemiológico ou com organismos previamente caracterizados e não houve avaliação do impacto frente as medidas de precaução de contato ao utilizar vigilância molecular comparada com a cultura. Neste estudo, o desempenho do Xpert Carba-R® foi analisado em dois cenários distintos para aquisição de carbapenemases; alto risco (UTI/UT) e baixo risco (PS). Foi admitido que pacientes internados no PS são de baixo risco para ERC, porque são provindos da comunidade, embora fatores de risco tenham sido estratificados nestes pacientes[199].

Estabelecer características de desempenho para ensaios moleculares pode ser bastante oneroso para laboratórios clínicos e avaliar a precisão de ensaios automatizados de PCR em tempo real apresenta desafios únicos, pois geralmente apresentam limite de detecção mais baixos do que o “padrão ouro” (PCR *in house*) e métodos investigacionais para analisar resultados discrepantes podem ser estabelecidos nos experimentos de acurácia[221]. Neste estudo, o Fast® RT-PCR, sequenciamento de DNA e a repetição do método de referência confirmaram a presença de bla_{KPC} em quatro amostras inicialmente

negativas e diante disto, o Xpert Carba-R® apresentou desempenho geral excelente, com sensibilidade, especificidade e VPN superiores a 94% e VPP de 86,8%. Quando avaliado somente o gene *bla*$_{KPC}$, o desempenho foi melhor, com sensibilidade, especificidade e VPN superiores a 98% e VPP de 88,5% devido ao menor número de resultados falso positivos e ausência de falso negativos ocasionados pelos genes *bla*$_{NDM}$ e *bla*$_{VIM}$, respectivamente.

Assim como outros estudos, que encontraram percentuais de resultados falso positivos entre 1,0 a 1,5%[219,220,222], esta análise detectou 1,3% (12/921) (4 *bla*$_{KPC}$ e 2 *bla*$_{NDM}$ na UTI; 6 *bla*$_{KPC}$ no PS) de falso positivos e não foi associada a qualquer gene alvo específico ou população fonte. É possível que estes resultados sejam verdadeiros positivos não detectados devido ao carreamento de uma sequência modificada do gene alvo ou a menor sensibilidade do método de referência.

Distinguir se estes resultados foram provenientes do paciente ou do ambiente (bancada, mãos de profissionais, insumos) é uma condição difícil, a menos que testes subsequentes apresentem os mesmos resultados em um mesmo período de processamento, levando a considerar a contaminação do ambiente, mas este não foi o caso destas amostras.

Os 12 *swabs* não confirmados pelos métodos investigacionais, demonstraram valores de Ct > 30 e estes pacientes não apresentaram resultados positivos para colonização ou infecção por ERC nos 6 meses seguintes e, portanto, futuros estudos com esse enfoque são necessários para determinar se esses casos devem ser considerados risco de disseminação ou infecção. Lau e colaboradores (2015)[223] demonstrou a ocorrência de resultados falso positivos com valores de Ct > 35 questionando o valor epidemiológico destes resultados uma vez que a confirmação da cultura foi alcançada em apenas 37% dos casos.

A implementação de um ponto de corte Ct para ajudar a diferenciar achados falso-positivos ou epidemiologicamente insignificantes de resultados verdadeiros pode ser clinicamente útil. Neste estudo, os valores de Ct ≤ 29,9 (AUC = 0,918) foram preditivos de um paciente verdadeiramente colonizado por *bla*$_{KPC}$, capturando 100% de casos confirmados pelo método de referência

e amostras com Ct > 30, alcançaram apenas 50% (10/20) de verdadeiros positivos. Embora os resultados demonstrem um limite potencial para diferenciar os resultados em categorias epidemiologicamente de “alto risco” e “baixo risco”, não podemos recomendar o uso desse ponto de corte, uma vez que amostras verdadeiro-positivas podem ser perdidas. Mais dados são necessários para avaliar a utilidade clínica do estabelecimento de um ponto de corte de Ct para vigilância molecular, e é provável que as interpretações baseadas apenas nos resultados dos testes moleculares sejam diferentes entre as instituições com base nas políticas do hospital e nos recursos disponíveis.

Os valores preditivos positivos e negativos foram semelhantes entre os dois grupos, mas o percentual de falso positivo para bla_{KPC} diferiu, sendo 8,2% do total de amostras positivas no grupo UTI/UT e 15,8% no PS que podem ser justificados devido à menor prevalência de KPC entre os pacientes internados no PS. A prevalência de KPC em amostras da UTI foi de 23%, enquanto nas amostras do PS foi de 4,4%, refletindo a epidemiologia esperada de cada local.

A ocorrência de resultados falso negativos também foi relatada em outros estudos, mas não houve uma relação específica com o gene bla_{VIM}, como aconteceu em 0,5% desta amostragem. Tato e colaboradores (2016)[219] encontraram 0,95% (6/633) de falso negativos (2 bla_{OXA-48}, 1 bla_{IMP}, 1 bla_{KPC} e 2 bla_{VIM}) e Moore e colaboradores (2017)[220] 0,9% (11/1 167) (2 bla_{OXA-48}, 4 bla_{IMP} e 5 bla_{VIM}). A diferença entre nossos achados provavelmente esta relacionada a ausência dos genes bla_{OXA-48} e bla_{IMP} e quando analisado somente o gene bla_{VIM} os resultados entre os estudos tornam-se percentualmente semelhantes aos nossos (0,32%[219]e 0,43%[220]). Mutações ou polimorfismos nas regiões de ligação do *primer* ou da sonda e a presença de gordura fecal podem afetar a detecção de variantes de carbapenemases resultando em falso negativo[224]. Neste estudo não foi avaliada a presença de gordura nas fezes.

Considerando que todas as amostras com bla_{VIM-2} foram detectadas quando dois *swabs* retais foram coletados por paciente avaliamos o risco da troca de pares, no entanto, os seguintes pontos minimizaram essa possibilidade: a. o processo pré-analítico foi amplamente controlado (cadastro,

etiquetagem e verificação por pares) e b. as cinco amostras positivas, uma por paciente, foram admitidas em dias diferentes. A possibilidade de contaminação da reação de PCR também foi investigada, mas considerada improvável, pois as amostras positivas foram testadas em dias diferentes e os resultados dos controles positivo e negativo foram satisfatórios.

O Xpert Carba-R® demonstrou uma concordância quase perfeita (coeficiente Kappa de 0,893) e excelente acurácia diagnóstica; 97% no cenário de alto risco (1 *swab*/paciente) e 98% no cenário de baixo risco (2 *swabs*/paciente), sugerindo que o processamento simultâneo da cultura e do Xpert Carba-R® a partir de um único *swab* ou dois independentes, foram alternativas acuradas. Tal informação apresenta grande valia, principalmente aos laboratórios de rotina que dificilmente utilizam um *swab* duplo, como aqueles descritos, até o momento, nos estudos de desempenho[219,220]. A epidemiologia local de carbapenemase, com predomínio de KPC, raras NDM e VIM e ausência de OXA-48 e IMP, provavelmente influenciou nos resultados de concordância e o uso de espécimes coletadas em regiões com epidemiologia distinta poderia modificá-los.

A análise do LD para cada gene alvo demonstrou alta sensibilidade analítica com capacidade de detecção frente a baixos inóculos bacterianos. Devido ao predomínio de KPC e recentes relatos sobre o aumento de organismos co-produtores de carbapenemases[225,226], a sensibilidade analítica também foi avaliada frente aos genes em combinação de pares com bla_{KPC} mostrando um aumento de 10^1 para 10^4 UFC/*swab* sugerindo que uma menor carga bacteriana pode não ser detectada quando o organismo está co-abrigando dois genes com o mesmo baixo inóculo. O fabricante, por sua vez, também relata que espécies bacterianas produtoras de carbapenemases em diferentes concentrações, uma perto do LD (baixo inóculo) e a outra em concentrações superiores, o alvo de baixa concentração pode não ser detectado[224]. Diante deste fato, destaca-se a possibilidade da presença de organismos co-abrigando bla_{KPC} e outro gene com baixo inóculo não detectado neste estudo.

Ensaios moleculares para rastrear OPC demostram maior sensibilidade do que métodos baseados em cultura[227,228]. Neste estudo, a concordância geral entre os métodos foi excelente (95%) com percentuais de positividade similares; 9,9% obtido pelo Xpert Carba-R® e 9,3% pela cultura. Do ponto de vista epidemiológico o percentual de positividade deste estudo foi inferior ao encontrado na rotina hospitalar (15%) possivelmente relacionada ao menor número de pacientes colonizados do PS. A alta concordância provavelmente esta relacionada ao grande número de amostras negativas e a alta sensibilidade analítica demonstrada em ambos métodos (≤ 10^1 UFC/*swab*).

Embora os percentuais de positividade tenham sido similares, as metodologias expressam informações diferentes (genótipo versus fenótipo) e a presença de resultados positivos somente pelo Xpert Carba-R® foram representados; pela presença de EPC sensível aos carbapenêmicos e devido a não recuperação de organismos em *swabs* positivos com baixa concentração de DNA (Ct alto).

A ausência de antibiótico no caldo de enriquecimento permitiu a recuperação de Enterobacterales produtoras de KPC-2 sensíveis aos carbapenêmicos a partir de culturas negativas. Estes isolados demonstraram sensibilidade pelos métodos de disco-difusão e E-test® com perfil incomum pelo Vitek 2®, CIM menores de ertapenem em comparação ao imipenem e/ou meropenem[229]. Em geral, Enterobacterales produtoras de KPC apresentam altas CIM para carbapenêmicos, principalmente para ertapenem que são mais vulneráveis a hidrólise por carbapenemase[230]. Em nosso serviço, 3% dos organismos produtores de KPC são sensíveis aos três carbapenêmicos[229] representando um risco de disseminação, pois pacientes colonizados, potenciais transmissores destes patógenos, não são identificados pela cultura de vigilância.

A dependência da cultura em expressar resultados positivos a partir de organismos viáveis e com inóculo suficiente para conseguir crescimento detectável associado aos critérios interpretativos dependentes da atenção humana, sobretudo de colônias resistentes mais discretamente evidenciadas na placa, também foram possíveis situações de discordância nesta casuística,

pois tais situações, após a ressemeadura do tioglicolato e reavaliação das placas primárias, apresentaram resultados positivos.

A maior sensibilidade do Xpert Carba-R® traz a vantagem em detectar uma menor quantidade de organismos abrigando genes alvos, por outro lado, apresenta a desvantagem em detectar material genético de bactérias mortas e a inespecificidade na relação gene/espécie, ou seja, se há mais de uma espécie produtora da mesma carbapenemase ou somente uma carreando distintas carbapenemases. Neste estudo foi identificado um paciente colonizado com *K. pneumoniae* e *S. marcencens* ambas produtoras de KPC. Nesta condição a utilização exclusiva do Xpert Carba-R® prejudicaria o isolamento deste paciente uma vez que coorte considerando o gênero das ERC são realizados nas UT. Além disso, o tratamento empírico para infecções graves em pacientes colonizados poderia diferir com a presença de *S. marcencens* devido à resistência intrínseca as polimxinas.

A presença de resultados positivos somente na cultura foi representada por ERC produtoras de ESBL associada a mutações de porinas e bombas de efluxo que apresentaram percentuais de resistência variável entre os carbapênemicos, exceto para ertapenem (100% resistentes), e destacaram-se pela presença de novas mutações em porinas deletérias e a diversidade clonal semelhante aos produtores de KPC descritos no Brasil[231,232]. Embora estes organismos representem a minoria das ERC encontradas, elas estão colonizando pacientes críticos.

Neste estudo foi demonstrado que ao utilizar somente o Xpert Carba-R® as precauções de contato não seriam instituídas em 22% dos pacientes colonizados com ERC. A significância epidemiológica das ERC não PC, ainda é discutível, pois embora as alterações de permeabilidade apresentem potencial limitado de propagação horizontal, as ESBL, alocadas em plasmídeos, apresentam maior potencial[215,233]. Apesar de ensaios clínicos randomizados serem necessários para avaliar a eficácia do isolamento destes organismos, há uma recomendação para ambientes de alto risco (UTI/UT) e cenários de surto ou endêmicos demonstrando que a colonização intestinal com bactérias produtoras de ESBL aumentou quase treze vezes o risco de

infecção da corrente sanguínea subsequente a administração de quimioterapia e na condição de neutropenia febril sendo proposto que pacientes tratados em centros com altas taxas de colonização possam se beneficiar da triagem fecal em combinação com o tratamento empírico direcionado ao carbapenêmico[234,235].

Outra relevância é que infecções por Enterobacterales produtoras de CTX-M, de grande importância clínica, apresentam taxas crescentes impulsionando a prescrição de carbapenêmico, que no que lhe concerne, promove a disseminação de EPC potencialmente intratáveis[233]. Para lidar com essa situação, é necessário monitorar constantemente a epidemiologia global dos genótipos CTX-M, permitindo detectar antecipadamente os genes emergentes através de tentativas, baseadas em evidências, para mitigar esses riscos como estratégias preventivas de rastreamento[236]. Nesta casuística o tipo predominante de ESBL entre as ERC não PC foi a CTX-M-15 (90%) condizente com a alta frequência relatada globalmente[237,238,239].

Nossos resultados também demonstraram que ao utilizar somente a cultura de vigilância as precauções de contato não seriam instituídas em 27% dos pacientes colonizados com carbapenemases. A significância epidemiológica da colonização por EPC é bem estabelecida visto que estes pacientes apresentam maior risco de desenvolver infecções quase impossíveis de tratar culminando em altas taxas de mortalidade e têm sido associadas ao aumento do custo e tempo de permanência hospitalar além do potencial de disseminação horizontal destes genes[24,26].

As ERC produtoras de KPC são principalmente disseminadas de paciente para paciente principalmente pelas mãos dos profissionais de saúde e através de fômites contaminadas. O número de novos casos gerados por um caso primário é estimado em dois na ausência de medidas de controle de infecção[240] e o tempo da colonização também é um problema, pois pacientes com Kp-KPC podem permanecer colonizados por mais de 1 ano criando oportunidades para a transferência horizontal a longo prazo[241]. Além disso, o gene *bla*$_{KPC}$ apresenta potencial de disseminação interespécie e geográfica explicado por sua localização em um *transposon* do tipo Tn3, Tn4401, capaz

de se inserir em diversos plasmídeos de bactérias Gram-negativas e são frequentemente associados a determinantes de resistência a outros antibióticos[242].

Alguns autores defendem o teste de genes de carbapenemase para o monitoramento do controle de infecção, bem como para o diagnóstico microbiológico de rotina[243]. A justificativa é que, embora o aumento das CIM de carbapenêmicos possa sugerir a presença de um OPC, a experiência clínica demonstra que estas CIM nem sempre revelam a presença de carbapenemases como já demonstrado neste estudo. A sua maior sensibilidade em detectar menor número de OPC também é uma importante vantagem. Durante um surto com KPC o método molecular revelou que 39% dos pacientes estavam com colonização gastrointestinal, mas apenas 14% foram identificados por cultura clínica anterior[244].

Por outro lado, o teste de sensibilidade antimicrobiana ainda é o diagnóstico padrão para decisões terapêuticas e é uma ferramenta epidemiológica importante para coletar e analisar dados instituindo decisões de tratamento além de identificar novas tendências em resistência.

Uma questão importante para controlar o ERC é o tempo que leva para obter resultados de culturas. Nesta casuística o tempo médio de liberação das culturas negativas foi de 48 h e das positivas de 96 h com TSA, podendo chegar em até 120 h. De modo a evitar que os pacientes permaneçam nos hospitais por longos períodos, a cultura geralmente não é viável. O desafio é aumentar a velocidade sem sacrificar a precisão.

O Xpert Carba-R® demonstrou-se de simples execução, com baixa carga de trabalho e adaptado para o laboratório de rotina onde os resultados da PCR são interpretados no *software* GeneXpert®, retirando qualquer subjetividade da análise. Além disso, os resultados podem ser salvos eletronicamente, facilitando a auditoria e revisão. O método permite conhecer a epidemiologia local e ser útil para adequar a terapia antimicrobiana, especialmente após a introdução das novas drogas com combinações de inibidores anti-carbapenemases e ainda permite a detecção precoce de surtos.

Os resultados foram obtidos em 50 minutos, substancialmente mais rápido que a cultura.

Entre as desvantagens do Xpert Carba-R®, destaca-se o uso de um ensaio molecular como um “teste autônomo” não sendo capaz de fornecer informações sobre clonalidade, identificação e susceptibilidade antimicrobiana e pode dar resultados falso negativos em caso de presença de carbapenemases não incluídas entre os alvos. Em alguns casos, a interpretação dos resultados moleculares pode ser desafiadora, este é o caso das amostras positivas não confirmadas pelo método de referência. Além disso, detecta a presença ou ausência de genes e não a sua expressão. Outra desvantagem é o custo mais elevado em comparação à cultura. No entanto, a melhoria dos procedimentos de controle de infecções, mediada pela redução do TAT, poderia reduzir significativamente os custos com a saúde, limitando o aparecimento de grandes surtos hospitalares, gerenciando apropriadamente leitos ocupados por pacientes sabidamente portadores de EPC em curto tempo.

Algumas das limitações deste estudo incluem: a ausência de carbapenemases IMP-1 e OXA-48 e baixa prevalência de carbapenemases NDM e VIM encontradas em nossos espécimes clínicos, portanto, nossos resultados não podem ser estendidos a situações epidemiologicas distintas, o número de *swabs* coletados por paciente diferiu nos dois cenários podendo comprometer os resultados de concordância, e por fim, as coletas usando um único *swab* podem levar a diferenças no inóculo bacteriano inicial entre às duas metodologias e quando coletado um par de *swab* não foi realizado um protocolo para harmonizar a quantidade de fezes entre eles.

Em suma, no contexto abordado neste estudo, os resultados refletem a noção de que, para evitar a disseminação da resistência, é necessário evitar a transmissão de não apenas isolados fenotipicamente resistentes, mas também aqueles que transportam elementos transmissíveis que podem se espalhar para bactérias sensíveis e conferir resistência sob condições propícias, portanto, a soma das duas metodologias, Xpert Carba-R® e cultura, maximiza esta abordagem.

Consideraçoes Finais

Como este estudo foi iniciado há 5 anos, mudanças importantes no mercado da medicina laboratorial marcaram este período. Quando este estudo se iniciou, em 2016, poucos métodos estavam disponíveis no Brasil com registro ANVISA para detecção molecular rápida de carbapenemase e durante este período, novas ferramentas de detecção moleculares também compactados e adaptadas ao laboratório de rotina foram lançadas no mercado ganhando atenção pela capacidade de detectar através de painéis sindrômicos, diferentes agentes infecciosos associados a genes de resistência em um único ensaio, diretamente de amostras clinicas em até 4 horas. Estes métodos, até o momento, apresentam um custo maior do que o Xpert Carba-R® e a acessibilidade, ou seja, quantidade de equipamentos disponíveis no Brasil ainda não esta amplamente difundida.

Testes imunocromatográficos também difundiram-se no mercado brasileiro durante os últimos 3 anos. Estes testes detectam genes alvos em até 15 minutos com menor custo quando comparado ao Xpert Carba-R® trazendo a vantagem de não necessitar a compra de equipamentos. Ainda como desvantagem necessita de maiores estudos para detecção direta a partir de amostras clinicas, sendo bem estabelecido a detecção a partir de isolados cultivados.

O custo direto do Xpert Carba-R® é cerca de 14 vezes maior que a cultura de vigilância realizada em nossa rotina (R$ 350,00 contra R$ 25,00) (Fonte: tabela de custo da DLC HCFMUSP) sem contabilizar a aquisição dos equipamentos. O Sistema Único de Saúde (SUS) paga R$ 15,00 reais por exame (Fonte: Tabela SUS) não atingindo, se quer, a cobertura do custo direto da cultura de vigilância, sugerindo a necessidade de uma reestruturação das fontes pagadoras buscando reembolso mínimo dos exames microbiológicos.

Estudos avaliando o custo envolvido na vigilância molecular em relação ao fenotípico vem sendo cada vez mais realizados. O custo anual projetado da PCR para rastrear 6 860 amostras em um centro médico

acadêmico foi cerca de 10 vezes maior que o método fenotípico recomendado pelo CDC (US $224,596 contra US $22,818) para ERC-PC; no entanto, o tempo de resposta mais longo do método baseado na cultura significa que um paciente pode ser desnecessariamente colocado em isolamento preventivo por mais 3 dias, o que foi estimado em US $925 no Canadá[245].

Uma mistura de elementos sociais, econômicos e políticos limitou o avanço e a aceitação de tecnologias de diagnóstico rápido. Entre outros, há uma incompatibilidade entre o custo e os benefícios dos testes rápidos no sistema de saúde. Infelizmente, as tecnologias de diagnóstico são atualmente vistas como um custo não crítico e sua aceitação, e implantação permanecem baixas..

Futuros estudos para avaliar ganhos nos custos indiretos com a utilização de um teste rápido devem ser realizados incluindo os seguintes aspectos; pacientes rapidamente detectados como positivos; isola rápido, diminui a disseminação de resistência, menos colonização, menos infecção, menos morte. Como consequência, haverá diminuição de custo com internação prolongada, antibióticos, outras medicações, paramentação relacionada a precaução de contato, ocupação de leitos onerosos como da UTI e evita a perda de receita em cirurgia eletivas. Por outro lado, pacientes rapidamente detectados como negativos são rapidamente tirados do “isolamento” aumentando a rotatividade de pacientes e possibilitando o aumento de atendimentos, especialmente importantes aos usuários do SUS.

Novos dados mostrando que a colonização precede a infecção com o mesmo patógeno pode ajudar a superar problemas de reembolso.

A resistência aos antibióticos é uma crise de saúde que ficará conosco por muito tempo e continuará evoluindo. A previsão é que esse problema piore antes que melhore e os laboratórios de diagnóstico precisam estar preparados.

6 CONCLUSÃO

Diante dos pontos expostos, conclui-se que:

1. O ensaio Xpert Carba-R® detectou 91 genes de carbapenemases, sendo 87 KPC e 4 NDM com acurácia superior a 97% nas duas populações analisadas; tal resultado demonstra que este ensaio molecular é preciso e eficaz com alta sensibilidade analítica para uma população onde KPC é a carbapenemase mais prevalente.

2. Os resultados obtidos pelo Xpert Carba-R® e a cultura de vigilância concordaram em 95%, no entanto, a concordância dos resultados positivos foi de apenas 59%. Devido aos seus princípios metodológicos, genótipo versus fenótipo, sugere-se a necessidade de complementariedade dos métodos somando, desta forma, os pontos fortes de cada ferramenta e ofertando uma resposta microbiológica efetiva e rápida.

3. A prevalência de colonização por microrganismo resistente a carbapenêmicos e/ou produtores de carbapenemase foi de 36% na UTI/UT e de 7% no PS e as precauções de contato não seriam aplicadas em 23% dos pacientes colonizados com ERC utilizando somente o Xpert Carba-R® e 27% dos pacientes com OPC utilizando somente a cultura de vigilância; tal resultado demonstra que a soma das duas metodologias maximiza a identificação de pacientes colonizados e evita que precauções de contato deixem de ser instituídas.

7 ANEXOS

Anexo A - Diretrizes da Comissão de Infecção Hospitalar. HCFMUSP, São Paulo

COLETA DE SWAB DE VIGILÂNCIA							
UNIDADES	**Segunda-feira**	**Terça-feira**	**Quarta-feira**	**Quinta-feira**	**Sexta-feira**	**Sábado**	**Domingo**
ENF FÍGADO E1CH 9º ANDAR (11 leitos)	**TRANSVERSAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R
TMO 8º ANDAR (20 leitos)	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R + VRE + *Pseudomonas*						
EUTR TX RENAL 7º ANDAR (20 leitos)		**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R					
Coleta VRE swab retal **Coleta Enterobactéria e Acinetobacter swab inguino-retal** **TMO - fezes**							**atualizada 11/2015**

Anexo 1.COLETA DE SWAB DE VIGILÂNCIA NAS UTIS E TRANSPLANTES							
UNIDADES	**Segunda-feira**	**Terça-feira**	**Quarta-feira**	**Quinta-feira**	**Sexta-feira**	**Sábado**	**Domingo**
U2CC / U1CH 9º ANDAR (9 leitos)	**TRANSVERSAL VRE**	**TRANSVERSAL Enterobactérias + *Acinetobacter*** Colistina R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
UARR 9º ANDAR (17 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
UQUE 8º ANDAR (4 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
U1MR 7º ANDAR (4 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
UP6M / U2MP 6º ANDAR (9 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos
UNEU / UP5N 5º ANDAR (9 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos
4 CC 4ª ANDAR (17 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos	**ADMISSIONAL** Enterobactérias resistênte aos carbapenêmicos
UMIN 4º ANDAR (7 leitos)	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
UP4C / UP4NC 4º ANDAR (18 leitos)	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
UP4M 4º ANDAR (14 leitos)	**TRANSVERSAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R	**ADMISSIONAL** Enterobactérias Carbapenem R
Coleta VRE swab retal **Coleta Enterobactéria e Acinetobacter swab inguino-retal**							

Anexo B - Manuscrito 1

Journal of Microbiological Methods 171 (2020) 105884

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Diagnostic performance of the Xpert Carba-R™ assay directly from rectal swabs for active surveillance of carbapenemase-producing organisms in the largest Brazilian University Hospital

Ana Paula Cury[a,*], J.N. Almeida Junior[a], Silvia F. Costa[c,d], Matias C. Salomão[e,c], Ícaro Boszczowski[c], Alberto J.S. Duarte[b], Flávia Rossi[a]

[a] Microbiology Laboratory, LIM 03, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil
[b] Central Laboratory Division (CLD), LIM 03, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brazil
[c] Infection Control Department, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brazil
[d] LIM 54, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil
[e] Department of Infectious Diseases, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Surveillance culture
KPC
Carbapenemase
Enterobacterales
Molecular test
Carbapenem resistance
Xpert Carba-R™
Rectal swab

ABSTRACT

Background: The global spread of carbapenemase-producing organisms (CPO) has been considered by international health authorities as a critical public health concern. Brazil has a high CPO prevalence according to distinct publications but many routine microbiology laboratories have only phenotypic resources to evaluate this epidemiological situation, which is time-consuming and detects only carbapenem-resistant isolates missing CPO susceptible expressing a slightly decreased susceptibility. New molecular platforms can detect CPO faster but a local evaluation is essential.

Aim: To evaluate the performance of CPO detection direct from rectal swabs with the Xpert Carba-R™ assay (Cepheid, Sunnyvale, CA) in the largest Brazilian University Hospital.

Methods: A prospective diagnostic accuracy study of CPO was performed with the collection of rectal swabs from patients admitted into the Intensive Care Unit (ICU) and into the Emergency Department (ED) between April and July 2016. The Xpert Carba-R™ assay results were compared with carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) surveillance cultures plus in-house PCR carbapenemase detection (reference method). In case of discordant results between methods, additional tests were performed. The limit of detection (LoD) for the CRE culture and the Xpert Carba-R™ assay were performed with contrived isolates of known carbapenemases genes.

Results: A total of 921 clinical rectal swabs were analyzed being 21% (196/921) from the ICU and 79% (725/921) from the ED. Overall, the Xpert Carba-R™ assay detected 9.9% (91/921) of CPOs being 9.5% (87/921) positive only for bla_{KPC} and 0.4% (4/921) positive only for bla_{NDM}. The reference method detected 9.1% (84/921) CPO being 77 (8.4%) bla_{KPC}, 5 bla_{VIM} (0.5%) and 2 bla_{NDM} (0.2%). No IMP or OXA-48 like gene was detected.

Overall, twelve samples, 1.3% (10 bla_{KPC}, 2 bla_{NDM}) were Xpert Carba-R™ positive but negative by the reference method. Five isolates (0.5%) were positive for bla_{VIM} only by in-house PCR and confirmed to be bla_{VIM-2} by DNA sequencing. The Kappa value, sensitivity, specificity, positive/negative predictive values and accuracy of the Xpert Carba-R™ assay were; 0.893 (95% confidence interval [CI], 0.842–0.944), 94% (86.7–98.0), 98.6% (97.5–99.3), 86.8% (78.1–93.0), 99.4% (98.6–99.8) and 98.2% (97.3–99.1), respectively. The LoD for bla_{KPC} of the Xpert Carba-R™ assay and the CRE cultures were 10^1 CFU/swab.

Conclusion: The Xpert Carba-R™ assay is an accurate test to detect CPO directly from the rectal swabs with significant lower turnaround time (TAT) when compared to the reference method (CRE culture plus in-house PCR). Xpert Carba-R™ may, therefore, be regarded as a good and fast epidemiological tool.

* Corresponding author.
E-mail address: ana.cury@hc.fm.usp.br (A.P. Cury).

https://doi.org/10.1016/j.mimet.2020.105884
Received 23 November 2019; Received in revised form 2 March 2020; Accepted 2 March 2020
Available online 03 March 2020
0167-7012/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The emergence of novel β-lactamases with direct carbapenem hydrolyzing activity has contributed to an increasing prevalence of carbapenem-resistant organisms (CRO) (Sievert et al., 2013). In the United States, Southern Europe, Israel, and Brazil most clinical infections due to carbapenemases producing organisms (CPO) have been attributed to organisms containing the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (Freire et al., 2015; Glasner et al., 2013; Nordmann and Poirel, 2014; Andrade et al., 2011). In Brazil, a wide dissemination of this gene was observed in 2010, with the spread of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* observed in several hospitals at different Brazilian cities and states (Pereira et al., 2013). New Delhi Metallo-β-lactamase (NDM)-containing organisms have been recovered throughout the Indian subcontinent from clinical samples as well as from environment (Walsh et al., 2011; Dortet et al., 2014) but these carbapenemases still are a rare event in Brazil. Outbreaks due to organisms containing oxacillinase enzymes (e.g., OXA-48) have been reported, particularly in some European countries (Yang, 2015; Poirel et al., 2012), and organisms containing the Verona integron Metallo-β-lactamase (VIM) and the imipenemase (IMP) family of carbapenemases are also problematic in South America, Europe, and Asia (Nordmann et al., 2011).

The carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) are particularly problematic given the frequency with which they cause infections (Freire et al., 2015; Glasner et al., 2013) of high mortality (Freire et al., 2015; Lübbert et al., 2014; Satlin et al., 2013). Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in cancer patients admitted in Brazilian hospital showed the 30-day mortality was 57.8% for all infections and 72.7% for bacteremic infections (Freire et al., 2014). Recent research has shown that risk factors associated with CRE include intensive care therapy, hospitalization in the previous six months, exposure to invasive procedures and antimicrobials, sharing rooms with known carriers, and a high degree of colonization pressure (Paño Pardo et al., 2014; Schwaber and Carmeli, 2014).

Among CRE, carbapenemase-producing Enterobacterales (CPE) have particular importance in terms of infection control because of how easily the carbapenemase genes are able to spread among other Enterobacterales through plasmids (Gasink et al., 2009). Early detection of CPE and the implementation of strict infection control measures are essential to control the spread of these multidrug-resistant organisms. Once CPE is detected, active surveillance cultures with feces or rectal swabs should be conducted.

The detection of fecal carriers of CPE has become a routine clinical practice in many parts of the world and is recommended by public health organizations (WHO, 2016; Centers for Disease Control, 2019; Tato et al., 2016). CDC infection control guidelines include accurate and rapid identification of colonization by carbapenemase producing organisms (CPO), including CPE (CDC, 2015). Both the CDC and European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) support additional periodic screening policies within facilities, for hospitalized patients in high-risk units (Lledo et al., 2009).In Israel, the implement of a CRE screening policy helped curb the nationwide epidemic in 2008 (Schwaber and Carmeli, 2014).

Different methodologies for CRE detection in rectal swabs have been used, including phenotypic and molecular tests (Viau et al., 2016; Hrabák et al., 2014). Molecular multiplex-PCR-based assays with direct CPO detection from rectal swabs have been commercially developed and claim to overcome most of the surveillance culture and conventional molecular test limitations. The main advantage of new molecular CPO tests over the reference microbiological procedure is a much lower turnaround time (TAT), no need for trained personnel with experience in molecular biology and no need for specifics areas to manipulate the samples.

According to Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA) regulations, the adoption of a new molecular platform requires accuracy studies to reproduce the performance characteristics claimed by the manufacturer, and individual laboratories should calculate the performance of the test according to their local epidemiology, taking into account the prevalence of the disease (Burd, 2010).

In our institution, CRE was only sporadically noted in earlier 2005 but after 2009 KPC producers became an epidemiological challenge (Cury et al., 2012). In our institution, *K.pneumoniae* is the first gram-negative isolate from blood cultures. Of them, 50% are carbapenem-resistant, 85% of which produce KPC. Metallo-β-lactamase are still rare. The laboratory performs 5.000 CRE surveillance swabs/month and among the ICU patients, we have an average of 15–20% positivity with routine phenotypic methodologies.

This study is aimed to evaluate the diagnostic performance of the Xpert Carba-R™ (Cepheid, Sunnyvale, CA) assay in patients admitted to our institution: the largest Brazilian University Hospital.

2. Materials and methods

This was a diagnostic accuracy study conducted at a large academic medical center, Hospital das Clínicas, a 2.200-bed tertiary care hospital affiliated with Faculdade de Medicina, Universidade de Sao Paulo, Brazil.

During 4 months, April to July 2016, ICU patients (high-risk setting), had one rectal swab (Venturi Transystem; Copan, CA) collected for CRE surveillance in accordance with local infection control policies. Swabs were sent to the microbiology laboratory and, initially, inoculated in the Xpert Carba-R™ assay, in accordance with the manufacturer package insert (Cepheid, 2016), and then introduced into an enrichment broth-thioglycolate (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) for CRE surveillance culture. In the low-risk setting (ED), due to higher number of specimens, 2 rectal swabs per patient were randomly collected to speed up the steps within of laboratory. One team worked with the CRE cultures and the other with the Gene Xpert™ system. These swabs were registered, labeled and processed simultaneously in both tests. The specimens were collected using one rayon swab in Stuart Agar Gel medium in accordance with the CRE culture protocol of our facility. The amount of stool visible on the swabs was evaluated for all samples. The rectal swabs were collected in the admission and weekly for the patients who remained hospitalized with negative results for CRE screening.

The rectal swabs were immediately processed and were stored as follows: original transport container (Stuart agar gel medium), Xpert Carba-R™ sample reagent and broth-thioglycolate under refrigeration (2 to 8 °C) and after 7 days, 2 mL of the broth-thioglycolate and bacterial isolates were stored at −80 °C.

2.1. Ethics statement

This study was approved by the Ethic Committee of Hospital das Clínicas. The collection of samples from ICU patients followed a routine determined by the local infection control policies. The collection of samples from ED patients was performed after signing the informed consent.

2.2. The reference method: in-house PCR performed after antibiotic-free broth enrichment from CRE culture

The rectal swabs submitted to CRE culture were incubated overnight in 10 mL of enrichment broth - thioglycolate (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England) without any carbapenem disk and subsequently inoculated onto Mac Conkey Agar plate (bioMérieux, Marcy L'Etoile, France) with the 3 carbapenem disks: 10 μg ertapenem, imipenem and meropenem (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England). A positive CRE culture was designated according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) criteria disk diffusion (≤21 mm for ertapenem and ≤22 mm for imipenem and meropenem) (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019). When the screening

CRE test was positive, colonies that grew within the screening CRE breakpoints were subsequently identified by MALDI–TOF (Vitek MS™) and antimicrobial susceptibility tests were performed by Vitek 2™ using AST N239™ card (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France).

In-house PCR was performed from isolates and/or from broth-thioglycolate, according to the following conditions. When the sample was positive in CRE culture and Xpert Carba-R™, in-house PCR was performed from the resistant colonies. When there were no CRE colonies and the Xpert Carba-R™ was positive, the in-house PCR was performed on susceptible isolates (to investigate the presence of carbapenemases in susceptible strains). On the other hand, the in-house PCR was performed directly from the enrichment broth-thioglycolate if the Xpert Carba-R™ was negative; in this situation, if there were resistant isolates in the cultures, PCR was also performed from the colonies.

Thus, all CRE culture colonies were sent to single-plex in-house PCR detection for bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1}, and bla_{VIM} genes (Monteiro et al., 2012). Briefly, bacterial DNA extraction were performed using a boiling method, and PCR amplification and the reaction conditions were performed according to a previous reports, respectively (Castanheira et al., 2010). The PCR products were visualized by electrophoresis on 2% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized with UV light.

2.3. Xpert Carba-R™ assay

The Xpert Carba-R™ assay is a qualitative, FDA-approved assay using a fully automated real-time PCR assay designed to detect five carbapenemase gene families, including bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1}, and bla_{VIM} (including the OXA-181 and OXA-232 variants of OXA-48).

The rectal swabs were processed by Xpert Carba-R™ and analyzed according to manufacturer's instructions: the swabs were inoculated in a sample reagent vial and vortexed for 10s. A total of 1.7 mL of the sample were transferred to the sample chamber in the cartridges loaded into a GeneXpert™ system (Cepheid, Sunnyvale, CA). The final result was obtained in about 50 min. A sample was considered positive if at least one carbapenemase gene was detected. If indeterminate results occurred ("invalid," "error," or "no result"), the sample was retested.

2.4. Interpretation, discrepant results and investigation testing

In our study, a true positive for Xpert Carba-R™ assay was defined when this assay and the reference method were both positive, and a true negative for Xpert Carba-R™ assay was defined when this assay and the reference method were both negative. If discrepant results were found, then supplemental investigation tests were proposed as listed in Table 1. Before applying any investigation testing all discrepant results were repeated by the Xpert Carba-R™ assay.

If Xpert Carba-R™ assay was positive and the reference method was negative, the reference method was repeated and performed the Xpert Carba-R™ of the isolates in accordance with manufacturer's instructions. If the discrepancy persisted, Fast Real-Time PCR™ (Applied Biosystems, Foster City, CA) was performed. The DNA was extracted from the same broth, and for the new test, it was performed by the Qiagen DNeasy blood and tissue kit, using the protocol for gram-negative bacteria and amplified by ABI 7500® Fast real-time PCR instrument.

If Xpert Carba-R™ assay was negative and reference method positive, the CRE culture was repeated and the amplicons produced by in-house PCR were selected to investigate the allelic variant. This amplicons were submitted to DNA sequencing performed with a BigDye Terminator cycle sequencing kit, v3.1 (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) in an MJ Research PTC-200 DNA Engine thermal cycler (Bio-Rad Laboratories,Waltham, USA). Sequencing reaction mixtures were purified by ethanol precipitation, separated, and analyzed using an ABI Prism 3100 genetic analyzer (ABI, Foster City, USA) following the manufacturer's protocols. The sequenced products were compared with software available at the National Center for Biotechnology Information website (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov).

If discrepant results were obtained, a positive or negative true result using Xpert-carba-R™ assay was defined by the final result of the investigation testing and if false positive results were obtained the patient histories were followed.

2.5. Evaluation of the Threshold cycle (Cts) by Xpert-Carba-R™ assay

We evaluated the correlation between the threshold cycle (Cts) value obtained by the Xpert-carba-R™ assay and the results from the bla_{KPC} detection by in-house PCR. The area under the ROC curve (AUC) analysis was calculated to determine Ct values with a better diagnostic performance.

2.6. Limit of detection (LoD) for Xpert Carba-R™ assay and CRE culture

To evaluate the Xpert Carba-R™ LoD for the bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1}, and bla_{VIM} carbapenemase genes, five previous categorized CPO were used: KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*, IMP-1-producing *Enterobacter asburiae*, NDM-producing *Providencia rettgeri*, VIM-producing *Pseudomonas aeruginosa* and OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*.

Monobacterial suspensions of these organisms were subjected to 10-fold dilutions from 0.5 McFarland standard (1.5×10 (Dortet et al., 2014) CFU/mL to 1.5×10^1 CFU/mL) in 0.9% saline. Subsequently, a sterile swab was immersed in each dilution and inoculated in the Gene Xpert™ reagent, vortexed, and processed accordingly to the manufacturer's protocol. The LoD tests were performed with each known CPO alone and also in a combination of bla_{KPC} with other carbapenemases genes ($bla_{KPC} + bla_{NDM}$, $bla_{KPC} + bla_{OXA-48}$, $bla_{KPC} + bla_{IMP-1}$ and $bla_{KPC} + bla_{VIM}$) to evaluated the competitive interference. The LoD in combination with two genes was performed in pairs of the same dilution; $10^1 bla_{KPC} + 10^1 bla_{NDM}$, $10^2 bla_{KPC} + 10^2 bla_{NDM}$, and so on until $10^7 bla_{KPC} + 10^7 bla_{NDM}$). In this case, a sterile swab was first immersed in each dilution containing bla_{KPC} gene, inoculated in the sample reagent and reserved. A second swab was immersed in each of the dilutions containing the other carbapenemase gene and then inoculated in the same sample reagent containing the dilution with the bla_{KPC} gene.

Table 1
Interpretation and discrepant results resolution.

Xpert Carba-R™	Reference Method[e]	Interpretation	Investigation Testing
Positive	Negative	Discrepant	RT-PCR™[a], CRE cult. (r)[b], Xpert Carba-R™ [c], PCR[d]
Negative	Positive	Discrepant	CRE cult. (r)[b], DNA sequencing

[a] RT-PCR: Fast Real-Time PCR™ (AppliedBiosystems).
[b] CRE-cultr. (r): carbapenem resistant to carbapenems culture repetition.
[c] Xpert Carba-R™: Xpert Carba-R™ of isolates.
[d] PCR: in-house PCR of isolates.
[e] Reference method: CRE culture plus in-house PCR.

Table 3
Diagnostic performance of Xpert-Carba-R™ versus reference method.

	Reference method						Kappa coefficient	Sensitivity	Specificity	PPV	NPV	Accuracy
	Negative		Positive		Total		CI (95%)	CI (95%)	CI (95%)	CI (95%)	CI (95%)	CI (95%)
	n	%	n	%	n	%						
All genes*												
Xpert Carba-R™ assay (ED plus ICU)												
Negative	825	89.6	5	0.5	830	90.1	0.893	94.0	98.6	86.8	99.4	98.2
Positive	12	1.3	79	8.6	91	9.9	(0.842–0.944)	(86.7–98.0)	(97.5–99.3)	(78.1–93.0)	(98.6–99.8)	(97.3–99.1)
Total	837	90.9	84	9.1	921	100.0						
Xpert Carba-R™ assay (ED)												
Negative	682	94.1	5	0.7	687	94.8	0.845	86.5	99.1	84.2	99.3	98.5
Positive	6	0.8	32	4.4	38	5.2	(0.755–0.935)	(71.2–95.5)	(98.1–99.7)	(68.7–94.0)	(98.3–99.8)	(97.6–99.4)
Total	688	94.9	37	5.1	725	100.0						
Xpert Carba-R™ assay (ICU)												
Negative	143	73.0	0	0.0	143	73.0	0.920	100.0	96.0	88.7	100.0	97.0
Positive	6	3.1	47	24.0	53	27.0	(0.857–0.983)	(92.5–100.0)	(91.4–98.5)	(77.0–95.7)	(97.5–100.0)	(94.6–99.4)
Total	149	76.0	47	24.0	196	100.0						
Only bla_{KPC}												
Xpert Carba-R™ assay (ED plus ICU)												
Negative	834	90.6	0	0.0	834	90.6	0.933	100.0	98.8	88.5	100.0	99.0
Positive	10	1.1	77	8.4	87	9.4	(0.892–0.974)	(95.3–100.0)	(97.8–99.4)	(79.9–94.3)	(99.6–100.0)	(98.4–99.6)
Total	844	91.6	77	8.4	921	100.0						
Xpert Carba-R™ assay (ED)												
Negative	687	94.8	0	0.0	687	94.8	0.910	100.0	99.1	84.2	100.0	99.2
Positive	6	0.8	32	4.4	38	5.2	(0.839–0.981)	(89.1–100.0)	(98.1–99.7)	(68.7–94.0)	(99.5–100.0)	(98.6–99.8)
Total	693	95.6	32	4.4	725	100.0						
Xpert Carba-R™ assay (ICU)												
Negative	147	75.0	0	0.0	147	75.0	0.944	100.0	97.4	91.8	100.0	98.0
Positive	4	2.0	45	23.0	49	25.0	(0.889–0.999)	(92.1–100.0)	(93.4–99.3)	(80.4–97.7)	(97.5–100.0)	(96.0–100.0)
Total	151	77.0	45	23.0	196	100.0						

* All genes: were detected: bla_{KPC}, bla_{NDM} and bla_{VIM}; ICU: Intensive Care Unit; ED: Emergency Department; PPV: Positive Predictive Value; NPV: Negative Predictive Value; CI: Confidence Interval.

Table 4
Discrepant results, investigation tests results and Outcome (N-16).

Sample	Admission Unit	Xpert Carba-R™ of rectal swab			Reference method			Investigation tests			Outcome
		Target Gene	Ct	Ct (r)	CREcult	Isolate (CSO)	PCR	Fast RT-PCR™	CRE cult (r)	Xpert Carba-R™ and PCR of isolates	
1	ICU	bla_{KPC}	35.2	30.8	Neg	*Kle.pne*	Neg	Pos	Pos	Pos	TP
2	ICU	bla_{KPC}	24.0	27.5	Neg	*Kle.pne, Pse.aer*	Neg	Pos	Pos	Pos	TP
3	ED	bla_{KPC}	24.2	26.2	Neg	*Kle.pne, Aci.bau*	Neg	Pos	Pos	Pos	TP
4	ED	bla_{KPC}	36.7	33.4	Neg	*Kle.pne*	Neg	Pos	Pos	Pos	TP
5	ICU	bla_{KPC}	32.0	34.1	Neg	*Kle.pne, E.coli*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
6	ICU	bla_{KPC}	35.6	36.5	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
7	ICU	bla_{KPC}	30.8	31.6	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Ser.mar*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
8	ICU	bla_{KPC}	35.0	35.4	Neg	*Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
9	ICU	bla_{NDM}	35.7	36.5	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
10	ICU	bla_{NDM}	32.2	33.1	Neg	*Kle.pne, Ent.clo*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
11	ED	bla_{KPC}	34.8	37.8	Neg	*Kle.pne, Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
12	ED	bla_{KPC}	34.7	37.1	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
13	ED	bla_{KPC}	35.1	36.6	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
14	ED	bla_{KPC}	37.9	31.8	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Pse.aer, Aci.bau*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
15	ED	bla_{KPC}	34.6	31.8	Neg	*Kle.pne*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP
16	ED	bla_{KPC}	35.1	36.4	Neg	*Kle.pne, Ent.clo, Pse.aer*	Neg	Neg	Neg	Neg	FP

ED: Emergency Department; ICU: Intensive Care Units; CSO: Carbapenem Susceptible Organism; Ct: threshold cycle, Ct(r): Ct repetition; CRE cult; Carbapenem Resistant Enterobacterales culture; CRE cult (r): Carbapenem Resistant Enterobacterales repetition from broth-thioglycolate; PCR: in-house PCR; Pos: Positive; Neg: Negative; TP: True Positive; FP: False Positive; *Kle.pne: Klebsiella pneumoniae*; *E.coli: Escherichia coli*; *Pse. aer: Pseudomonas aeruginosa*; *Ent. clo: Enterobacter cloacae*; *Ser.mar: Serratia marcescens*; *Aci. bau: Acinetobacter baumannii*;

diagnostic challenges for the routine microbiology laboratory to detect CRE. Early CRE detection and urgent implementation of infection control strategies are necessary to prevent further spread of those isolates (CDC, 2015). It is essential to highlight that culturing methods for antibiotic susceptibility testing are only able to detect those isolates phenotypically resistant to carbapenems. However, some of these may carry carbapenemase genes that do not necessarily express carbapenem resistance and therefore may not be detected. CRE cultures may also lead to positive carbapenem-resistant isolates that may not have carbapenemase genes. Infection control strategies require an understanding of the prevalence or incidence of CPE.

Currently, knowing the type of carbapenemases is crucial for choosing the most appropriate antibiotic in the treatment of CPE infections as carbapenemases inhibiting drugs may or may not act,

The solution with two genes was vortexed and processed according to the Xpert Carba-R™ manufacturer's protocol. To confirm the LoD value obtained in saline water, we repeated the test using negative rectal swabs to take into account the matrix effect.

To evaluate the CRE culture LoD, a monobacterial suspension of carbapenem-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* was subjected to the same dilutions and inoculated on broth–thioglycolate (OXOID LTD, Basingstoke, Hampshire, England), incubated overnight and then subcultured onto MacConkey agar with carbapenem disks; visible colonies were counted after 24 h of incubation at 35 °C.

Plating of the initial concentration (0.5 McFarland) of all CPO was performed in triplicate to verify the amount of Colony Forming Units (CFU).

2.7. Statistical analysis

The analysis of sensitivity, specificity, positive predictive value (PPV), negative predictive value (NPV), values for the Kappa coefficient and data from Receiver Operating Characteristic (ROC) curve was performed using 95% confidence intervals (CIs) calculated with the SPSS ver. 11.0 and MedCalc 14.23 (MedCalc Software, Ostend, Begium).

3. Results

3.1. Xpert Carba-R™ assay results versus the reference method

A total of 921 clinical rectal swabs were collected from 859 patients (196 from the ICU and from the 725 ED). Overall, the reference method detected 9.1% (84/921) of CPO being 77 (8.4%) bla_{KPC}, 5 bla_{VIM} (0.5%) and 2 bla_{NDM} (0.2%). Carbapenemase prevalence in the ED and ICU was 5.1% and 24% and KPC prevalence was 4.4% and 23%, respectively.

The Xpert Carba-R™ assay, detected 9.9% (91/921) of CPO being 9.5% (87/921) positive for bla_{KPC} and 0.4% (4/921) positive for bla_{NDM}. Of the 921 rectal swabs, 2.2% (20/921) samples were Xpert Carba-R™ and in-house PCR negative with CRE culture positive and were considered concordant, true negative results.

Of the 196 rectal swabs collected from the ICU patients, 24% (47/196) were positive by the Xpert Carba-R™ assay and by the reference method; 3% (6/196) were positive only by the Xpert Carba-R™ and 73% (143/196) were negative in both methods. The Xpert Carba-R™ was positive in 27% (53/196) of the samples, 49 bla_{KPC} and 4 bla_{NDM}.

Of the 725 pairs of rectal swabs collected from ED patients, 4.4% (32/725) were positive by the Xpert Carba-R™ assay and by the reference method, 0.8% (6/725) were positive only by the Xpert Carba-R™, 0.7% (5/725) were positive only by reference method and 94% (682/725) were negative in both methods. The Xpert Carba-R™ assay detected only bla_{KPC} (5.2%) (38/725) (Table 2).

The Kappa coefficient, sensitivity, specificity, positive/negative predictive values and accuracy diagnostic of the Xpert Carba-R™ assay were performed for all carbapenemases genes detected (bla_{KPC}, bla_{NDM} and bla_{VIM}) and also for bla_{KPC} alone due to higher frequency of this gene in the ICU and ED patients. (Table 3).

All Xpert Carba-R™ results were obtained within 50 min after initiating the assay and the positive CRE culture was available after 72 to 96 h with the TSA. Of the 921 samples evaluated, 24 presented indeterminate Xpert Carba-R™ results and were repeated with valid results.

Table 2
Individual target results using Xpert Carba-R™ assay and the reference method.

Xpert Carba-R™ assay	Reference method				
	bla_{KPC}	bla_{NDM}	bla_{VIM}	Negative	Total
bla_{KPC}	77	–	–	10	87
bla_{NDM}	–	2	–	2	4
Negative	–	–	5	825	900
Total	77	2	5	837	921

3.2. Discrepant results

Five swabs gave negative results both in Xpert Carba-R™ and CRE culture. Therefore, broth-thioglycolate was submitted to in-house PCR, which resulted positive for bla_{VIM} (false negative). DNA sequencing from these samples showed all were VIM-2.

Sixteen swabs were positive by Xpert Carba-R™ assay (14 bla_{KPC} and 2 bla_{NDM}) and negative by the reference method; however, 4 of these were positive for bla_{KPC} in carbapenem-resistant *K.pneumoniae* by the investigation test and, therefore, were considered true positives. Thus, 12 swabs (10 bla_{KPC} and 2 bla_{NDM}) were negative by the reference method and also by any other investigation test and were considered false positives. In all of these cases, the CRE culture was negative (susceptible carbapenem organisms) and the Xpert Carba-R™ assay positive results had threshold cycles (Cts) > 30.8 (Table 4). In 6 months after hospitalization, none of 12 patients had positive results for colonization or infection by CRE.

3.3. Xpert Carba-R™ assay: Threshold cycle (Cts) analysis for bla_{KPC}

Overall, 9.5% (87/921) swabs were positive for bla_{KPC} but only 8.4% (77) were positive by in-house PCR. Ct distribution was analyzed according to the reference method results. Due to the small number of bla_{NDM} and bla_{VIM}, the Ct analysis was performed only for bla_{KPC} gene (Fig. 1).

The area under the ROC curve (AUC) analysis showed that using the cutoff value of ≤29.9 cycles, increased the specificity to 100% (AUC: 0.918; $P < .001$) excluding 10 false negative results. It is important to note that, this cutoff also excluded 10 true positive results.

3.4. Evaluation of the LoD

The highest Xpert Carba-R™ Ct value measured for the five CPO bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} and bla_{VIM}, were 37.9, 37.6, 35.7, 37.5 and 39 respectively, corresponding to LoD of 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, and 10^3 CFU/swab (Table 5).

A higher LoD bla_{KPC} value was detected when it was measured in combination with another isolate harboring any other carbapenemase gene (bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} or bla_{VIM}) (co-resistance). The LoD bla_{KPC} results increased from 10^1 to 10^4 CFU/swab, regardless of the associated gene.

The LoD bla_{NDM} value increased from 10^2 to 10^3 CFU/swab when associated with bla_{KPC} and the LoD bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1} and bla_{VIM} values did not change when compared to single gene detection. The LoD values obtained with negative rectal swabs were concordant with the values in saline water.

The lowest LoD value of the CRE culture for KPC-producing *K.pneumoniae* was 10^1 CFU/swab.

4. Discussion

The spread of carbapenemases is a threatening clinical and public health problem. CPO are usually multidrug-resistant pathogens that can easily disseminate to other species (Samuelsen et al., 2009; Tsakris et al., 2010; Cuzon et al., 2010) and have been associated with high rates of morbidity and mortality (Calfee and Jenkins, 2008). In Brazil, CRE isolates have a high prevalence level mainly due to KPC-2-producing isolates, which are highly endemic (Andrade et al., 2011). Although still in sporadic cases, the emergence of NDM-1, OXA-48 variant (OXA-370) and IMP-1 reported in some states of Brazil (Freire et al., 2016; Pereira et al., 2015; Rozales et al., 2014) is a considerable epidemiological and treatment challenge. Nowadays, there are many

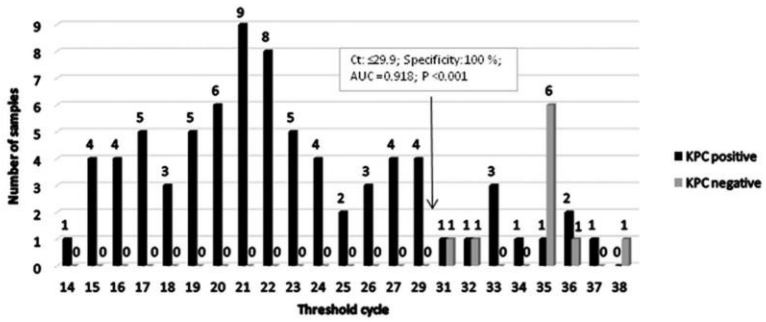


Fig. 1. Distribution of the Ct (threshold cycle) values obtained with 87 samples using Xpert Carba-R™ assay compared to the bla_{KPC} positivity by in-house PCR. Ct values have been reset to 1 decimal place for graphic analysis.

depending on the gene type.

In our institution KPC is the most prevalent carbapenemase, being *K. pneumoniae* the first gram-negative isolated from blood cultures (50% are carbapenem-resistant). Routinely, CRE surveillance cultures are performed only in the high-risk units (ICU) and final results are obtained within 4 days including TSA, if positive.

New CPO molecular tests can rapidly and directly detect, from clinical specimens, different classes and types of carbapenemases genes even when those isolates do not necessarily express carbapenem-resistant phenotype. The CLIA guidelines require a performance diagnostic study for a new test incorporated in laboratory routine, because the performance may vary with the prevalence of the disease (Burd, 2010).

To evaluate the Xpert Carba-R™ assay, we conducted a prospective study in patients admitted to our university hospital. Xpert Carba-R™ is a PCR real-time method developed to detect the five known carbapenemase genes: bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{OXA-48}, bla_{IMP-1}, and bla_{VIM} in less than 1 h directly from rectal swabs. The performance study took place in two distinct settings for carbapenemase acquisition; CRE-high risk (ICU) and CRE-low risk (ED) to assess clinical sensitivity and specificity as close as possible to the real-life population that the laboratory serves. It was admitted that ED patients are CRE-low risk because they come from the community, although risk factors have been stratified in these patients. The screening of ED patients is not routine in our facility and was performed in a point prevalence study (Salomão et al., 2017).

Establishing performance characteristics for molecular assays can be quite costly for routine clinical laboratories and assessing accuracy for newer real-time PCR assays presents some unique challenges. These methods often prove to be more sensitive than the current "gold standard" methods and have lower detection limits than the "old" reference methods[23]. Methods to resolve discrepant results need to be established for conducting accuracy experiments, therefore, for our evaluation, we used a highly sensitive method, Fast-RT PCR and DNA sequencing, to resolve potential discrepancies between our reference method (culture plus in-house PCR) and the Xpert Carba-R™ assay. This consisted of DNA extraction and sequencing from the broth-thioglycollate inoculated with the original specimens. In our study, investigation testing and method reference repetition confirmed the presence of bla_{KPC} gene in 4 samples that had initially been CPO negative. With this approach, overall Xpert Carba-R™ assay performance was excellent with 94% sensitivity, 98.6% specificity, 86.5% PPV and 99.4% NPV. When the evaluation was performed only for bla_{KPC} detection, the performance was better, with 100% sensitivity, 98.8% specificity, 88.5% PPV and 100% NPV.

Of the 921 rectal swabs, we found 1.3% (12/921) false positive results for Xpert Carba-R™ (4 bla_{KPC} and 2 bla_{NDM} in the ICU; 6 bla_{KPC} in the ED) and 0.5% (5/921) false negative results (5 bla_{VIM-2} in the ED), which decreased the sensitivity to 94%. The occurrence of false positive results was also reported in other studies with very similar percentages 1.1% (Tato et al., 2016; Moore et al., 2017) and 1.5% (Traczewski et al., 2018) and it was not associated with any specific carbapenemase target or source population. The false positive results for bla_{KPC} with the Xpert Carba-R™ assay differed in the two different study populations, being the 8.2% of the overall positive sample from the ICU patients group and 15.8% from the ED group. These results may be justified due to the lower prevalence of KPC among patients admitted in the ED. In general, even with different prevalence of CRE carriage in these two departments, the NPV and PPV of Xpert Carba-R™ assay were similar.

Although the Fast RT-PCR has showed positive results, its use did not change the outcome because the reference method repetition (CRE culture and in-house PCR) were enough to confirm the 4 true positive results. The false positive results may be associated with low levels of DNA CPO load that is below the LoD of our reference methods or the organism may carry a modified sequence of the target gene. Recent

Table 5
Limit of Detection (LoD) of the Xpert Carba-R™ assay.

CFU/swab	bla_{KPC}		$bla_{KPC+OTHER}$	bla_{NDM}		bla_{OXA-48}		bla_{IMP-1}		bla_{VIM}	
	Ct	Result	Result	Ct	Result	Ct	Result	Ct	Result	Ct	Result
10^7	23.3	pos	pos	22.9	pos	21.3	pos	21.6	pos	25.7	pos
10^6	27.4	pos	pos	26.0	pos	25.8	pos	24.8	pos	27.9	pos
10^5	30.8	pos	pos	28.3	pos	29.2	pos	28.1	pos	31.8	pos
10^4	35.0	pos	pos	30.1	pos	32.1	pos	29.5	pos	35.8	pos
10^3	36.9	pos	neg	36.6	pos	35.7	pos	37.5	neg	39.0	pos
10^2	37.2	pos	neg	37.6	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg
10^1	37.9	pos	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg

CFU: Colony Forming Units; pos: positive; neg: negative; OTHER: KPC associated with another carbapenemase.

reports in the literature also demonstrated few false negatives results using Xpert Carba-R™ assay when compared to their reference method (CRE culture plus DNA sequencing), but there was not a specific relation with VIM carbapenemase, as happened in our study (Tato et al., 2016; Moore et al., 2017). Moore and colleagues tested 1187 samples (755 prospectively collected rectal swab and 432 contrived specimens) and of these, 0,9% (11/1.167) were falsely negative by the Xpert Carba-R™ assay compared to the reference method (2 bla_{OXA-48}, 4 bla_{IMP} and 5 bla_{VIM}) (Moore et al., 2017). Mutations or polymorphisms in primer or probe binding regions and fecal fat may affect the detection of carbapenemases variants, resulting in a false negative. According manufacturer's package insert the VIM carbapenemase detection has a reduced positive percent agreement and sensitivity of 93.5% (Cepheid, 2016). The presence of bla_{VIM} was not associated with possible PCR reaction contamination because the positive samples were analyzed on different days and the results of the positive and negative controls were satisfactory by in-house PCR. Considering all samples with VIM-2 were detected when 2 rectal swabs were collected per patient, we evaluated the risk of tube inversion, but the following points minimize that chance: a. the pre-analytical process was largely controlled (registration, labeling and verification by peers); b. the 5 positive samples of the bla_{VIM-2} gene, one per patient, admitted at different times and; c. we had no other samples with positive Xpert Carba-R™ results for VIM and negative in-house PCR.

The prevalence of KPC isolates in ICU specimens was 23%, while in the ED specimens was 4.4%, reflecting the expected local epidemiology of each setting and being consistent with KPC endemicity in Brazil (Andrade et al., 2011).

The Xpert Carba-R™ assay and the reference method demonstrated an almost perfect agreement (Kappa coefficient > 0.84) and accuracy of 97.0% and 98.5% in the high (1 swab/patient) and low-risk settings (2 swabs/patient) samples, respectively. The carbapenemase local epidemiology has probably biased the results and the use of contrived specimens could have modified them.

Interestingly, our results suggest that the simultaneous processing of the CRE culture (when inoculated in antibiotic-free enrichment broth) and Xpert Carba-R™ assay from a single rectal swab in Stuart Agar gel is viable, with a Kappa coefficient of 0.920. Furthermore, the LoD value for both methods was $\leq 10^1$ CFU/swab and may account for the excellent agreement between the methods.

Most studies have evaluated LoD of the Xpert Carba-R™ assay using contrived specimens of monobacterial carbapenemase genes. In the manufacture's package insert is described analytical studies using combinations of two bacterial populations on contrived swab specimens indicate that when one carbapenemase-producing bacterial species is inoculated near the LoD and another carbapenemase-producing bacterial species is present at concentrations equal or greater than 5×10^6 CFU/swab, the low concentration target may not be detected by the Xpert Carba-R™ assay (Cepheid, 2016). Due to recent reports about the increase of double carbapenemases co-harboring organisms (Wu et al., 2015; Galler et al., 2014), in this study, the LoD was also evaluated in contrived isolates with bla_{KPC} combined with another isolate containing other carbapenemase gene in the same inoculums. The results showed that the LoD of bla_{KPC} gene increased from 10^1 to 10^4 CFU/ swab suggesting that a lower bacterial load may not be detected when the organism is co-harboring two genes even the same inoculums.

Analyzing the ROC curve, Ct values ≤ 29.9 cycles had 100% specificity and samples with Ct values > 30 cycles had 50% false positives results. We cannot state exactly the reason for this delay; possibilities include cross-contamination or real colonization in a patient who is a low-level spreader. Thus, we believe that future studies with that focus may bring further clarification.

Studies using molecular assays to screen for carbapenemase genes showed higher sensitivity than culture-based methods (Doyle et al., 2012; Singh et al., 2012) and the Xpert Carba-R™ advantages include: absence in the manual steps of extraction, amplification, and detection involved in the in-house PCR assay and therefore can be implemented in routine laboratories with less workload. It allows knowing the local CPO epidemiology and early detection of outbreaks with the ability to detect multiple carbapenemase resistance genes directly from clinical specimens. The results were obtained within 50 min after initiating the assay being a much faster test when compared with CRE culture and in-house PCR.

Some of the limitations of our study are: the absence of IMP-1 and OXA- 48 carbapenemases and low prevalence of NDM and VIM carbapenemases found in our clinical specimens, therefore our results cannot be extended to situations of distinct molecular epidemiology, the number of swabs collected per patient was different in the two epidemiological settings and could compromise the agreement results, the collection of specimens was performed using one rayon swab in Stuart Agar Gel medium and differences in the starting bacterial inoculum for the two different techniques may occurred and a protocol was not carried out to harmonize the sample collection between the two swabs when collected.

In conclusion, the Cepheid Xpert Carba-R™ is a reliable and accurate method to detect CPO directly from the rectal swabs with significant lower turnaround time when compared to the reference method (CRE culture plus in-house PCR) and may, therefore, be regarded as an accurate, reliable and fast epidemiological tool.

Funding sources

None.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgements

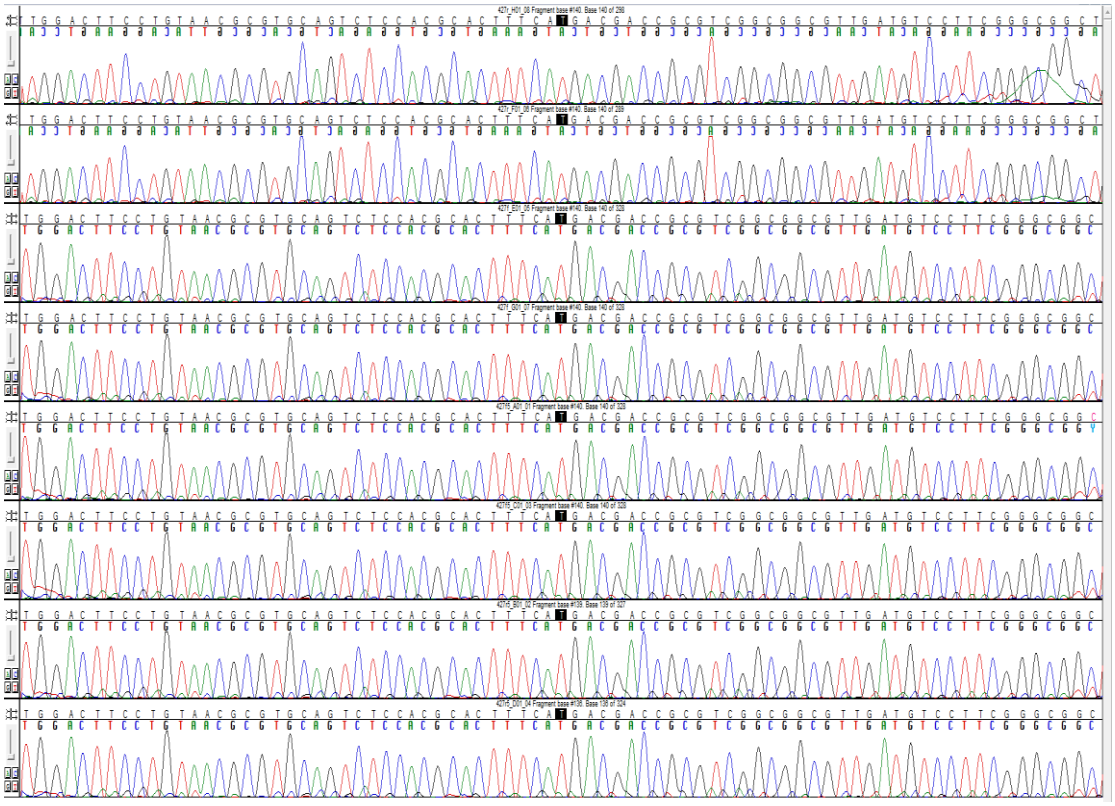
We thank the microbiology laboratory team™ that worked on Gene Xpert™ and CRE surveillance culture; Marcia Maffucci that worked on in-house PCR and; Lauro V Perdigão Neto that revised this manuscript.

References

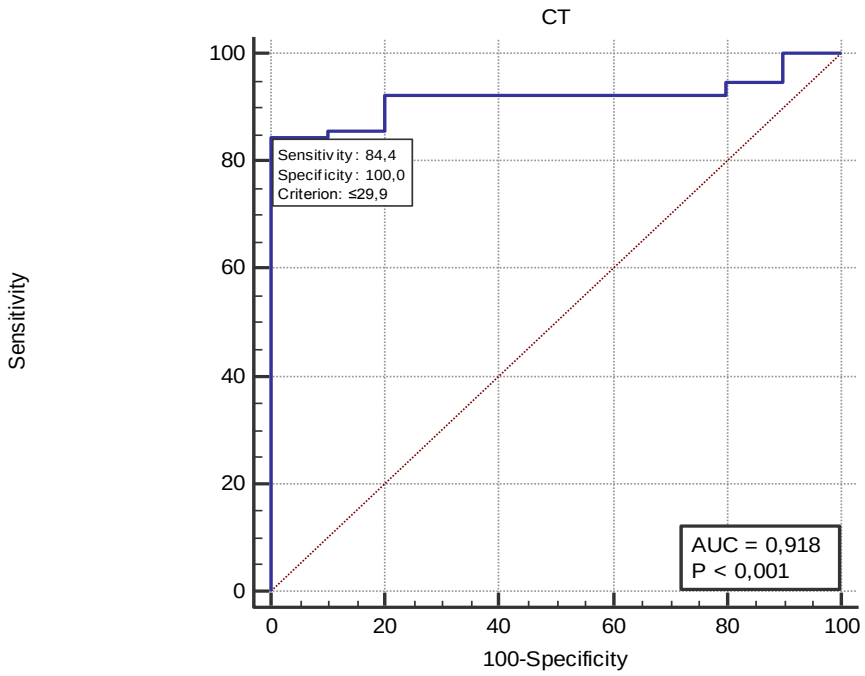
Andrade, L.N., et al., 2011. Dissemination of blaKPC-2by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 3579–3583.
Burd, E.M., 2010. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 23, 550–576.
Calfee, D., Jenkins, S.G., 2008. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 29, 966–968.
Castanheira, M., Sader, H.S., Jones, R.N., 2010. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing Enterobacteriaceae. Microb. Drug Resist. 16, 61–65.
CDC, 2015. Facility Guidance for Control of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae (CRE) Update-CRE Toolkit.
Centers for Disease Control, 2019. U. Antibiotic Resistance Threats in the United States.
Cepheid, 2016. Xpert Carba-R™ Package Insert, Rev B. Cepheid, Sunnyvale,CA.
Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. In: CLSI document M100, 29th ed. Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, Clinical and.
Cury, A., Andreazzi, D., Maffucci, M., Caiaffa-Junior, H., Rossi, F., 2012. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Clinics 67, 1427–1431.
Cuzon, G., et al., 2010. Worldwide diversity of *klebsiella pneumoniae* that produces β-lactamase bla_{KPC-2} gene. Emerg. Infect. Dis. 16, 1349–1356.
Dortet, L., Poirel, L., Nordmann, P., 2014. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in gram-negative bacteria. Biomed. Res. Int. 2014.
Doyle, D., et al., 2012. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. J. Clin. Microbiol. 50 (12), 3877–3880.
Freire, M.P., et al., 2014. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* in cancer patients. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 34, 277–286.
Freire, M.P., et al., 2015. Risk factors and outcome of infections with *Klebsiella*

pneumoniae carbapenemase-producing K. pneumoniae in kidney transplant recipients. Infection 43, 315–323.
Freire, M.P., et al., 2016. Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* among kidney transplant recipients. J. Antimicrob. Chemother. 71, 2577–2585.
Galler, H., et al., 2014. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harbouring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. Clin. Microbiol. Infect. 20.
Gasink, L.B., Edelstein, P.H., Lautenbach, E., Synnestvedt, M., Fishman, N.O., 2009. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 30, 1180–1185.
Glasner, C., et al., 2013. Carbapenemase-producing enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. Eurosurveillance 18.
Hrabák, J., Chudáčková, E., Papagiannitsis, C.C., 2014. Detection of carbapenemases in enterobacteriaceae: a challenge for diagnostic microbiological laboratories. Clin. Microbiol. Infect. 20, 839–853.
Lledo, W., et al., 2009. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing enterobacteriaceae in acute care facilities. Morb. Mortal. Wkly Rep. 58 (10), 256–258.
Lübbert, C., et al., 2014. Colonization of liver transplant recipients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with high infection rates and excess mortality: a case-control analysis. Infection 42, 309–316.
Monteiro, J., Widen, R.H., Pignatari, A.C.C., Kubasek, C., Silbert, S., 2012. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J. Antimicrob. Chemother. 67, 906–909.
Moore, N.M., et al., 2017. Rapid identification of five classes of carbapenem resistance genes directly from rectal swabs by use of the Xpert Carba-R™ assay. J. Clin. Microbiol. 55, 2268–2275.
Nordmann, P., Poirel, L., 2014. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. Clin. Microbiol. Infect. 20, 821–830.
Nordmann, P., Naas, T., Poirel, L., 2011. Global spread of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. Emerg. Infect. Dis. 17, 1791–1798.
Paño Pardo, J.R., Villar, S.S., Ramos Ramos, J.C., Pintado, V., 2014. Infections caused by carbapenemase-producing enterobacteriaceae: risk factors, clinical features and prognosis. Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. 32, 41–48.
Pereira, P.S., et al., 2013. 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. 68, 312–316.
Pereira, P.S., et al., 2015. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 4453–4456.
Poirel, L., Potron, A., Nordmann, P., 2012. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. J. Antimicrob. Chemother. 67, 1597–1606.
Rozales, F.P., et al., 2014. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. Int. J. Infect. Dis. 25, 79–81.
Salomão, M.C., et al., 2017. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department: prevalence, risk factors, and acquisition rate. J. Hosp. Infect. 97, 241–246.
Samuelsen, Ø., et al., 2009. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. J. Antimicrob. Chemother. 63, 654–658.
Satlin, M.J., et al., 2013. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae as causes of bloodstream infections in patients with hematologic malignancies. Leuk. Lymphoma 54, 799–806.
Schwaber, M.J., Carmeli, Y., 2014. An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Clin. Infect. Dis. 58 (5), 697–703.
Sievert, D.M., et al., 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections summary of data reported to the national healthcare safety network at the centers for disease control and prevention, 2009–2010. Infect. Control Hosp. Epidemiol. 34, 1–14.
Singh, K., et al., 2012. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. J. Clin. Microbiol. 50 (8), 2596–2600.
Tato, M., et al., 2016. Multisite evaluation of Cepheid Xpert Carba-R™ assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. J. Clin. Microbiol. 54, 1814–1819.
Traczewski, M.M., et al., 2018. Multicenter evaluation of the Xpert Carba-R™ assay for detection of carbapenemase genes in gram-negative isolates. J. Clin. Microbiol. 56.
Tsakris, A., et al., 2010. In vivo acquisition of a plasmid-mediated blaKPC-2 gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. J. Clin. Microbiol. 48, 2546–2549.
Viau, R., et al., 2016. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: current status of surveillance methods. Clin. Microbiol. Rev. 29, 1–27.
Walsh, T.R., Weeks, J., Livermore, D.M., Toleman, M.A., 2011. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. Lancet Infect. Dis. 11, 355–362.
WHO, 2016. Global action plan on AMR. WHO.
Wu, W., Feng, Y., Carattoli, A., Zong, Z., 2015. Characterization of an *Enterobacter cloacae* strain producing both KPC and NDM carbapenemases by whole-genome sequencing. Antimicrob. Agents Chemother. 59, 6625–6628.
Yang, S. (Shaun), 2015. Identification of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-232 and CTX-M-15 by whole genome sequencing analysis.

Anexo C - Sequenciamento do *amplicon* confirmando gene *bla*$_{VIM-2}$

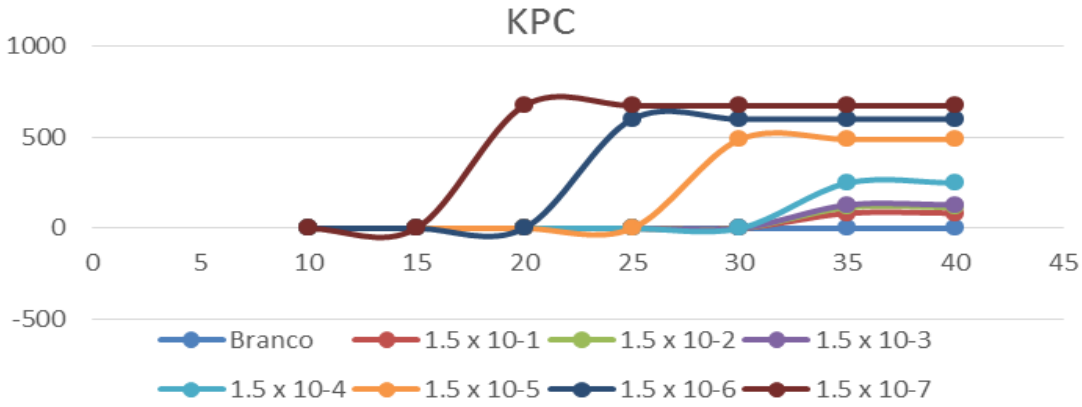


Anexo D – Curva ROC usada para determinar o melhor valor de Ct para discriminar os verdadeiros positivos para *bla*KPC



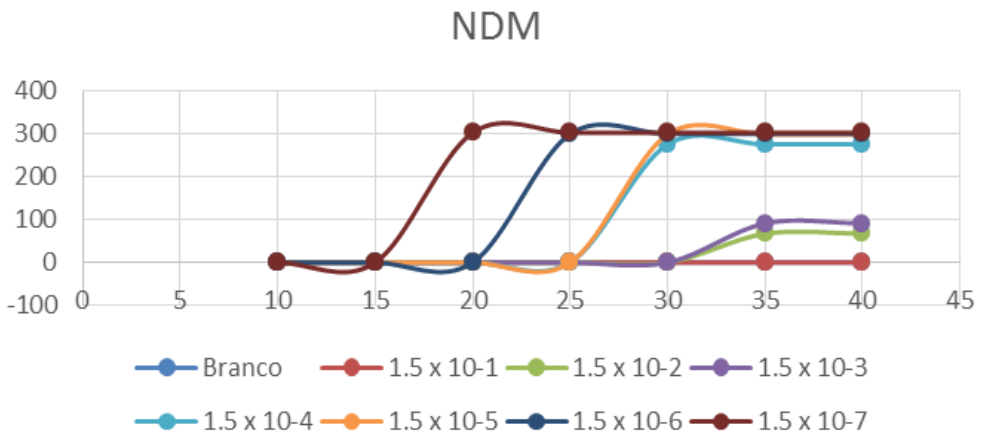
Anexo E – Valores do limite de detecção para os cinco genes alvos determinados pelo Xpert Carba-R®. FONTE: HCFMUSP, São Paulo.

Ct	Fluorescência - KPC							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	673
25	0	0	0	0	0	0	599	673
30	0	0	0	0	0	488	599	673
35	0	83	115	128	249	488	599	673
40	0	83	115	128	249	488	599	673



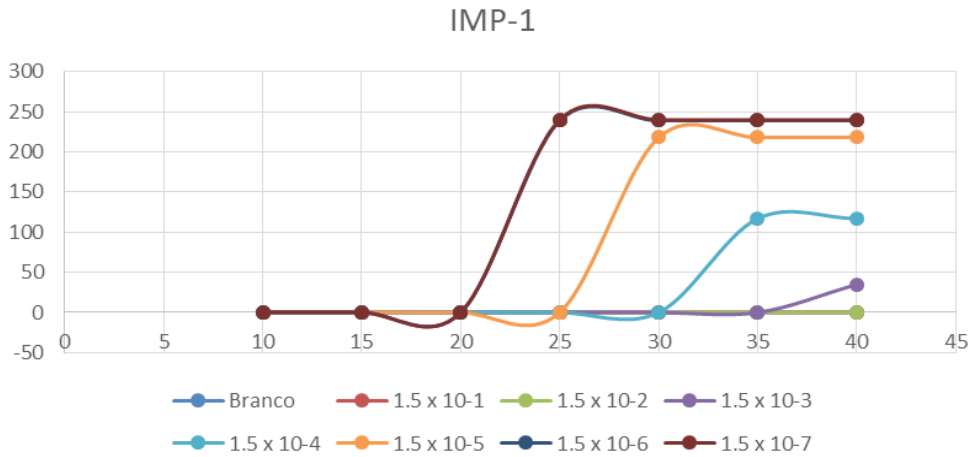
Fluorescência e Ct obtidos para o gene *bla*KPC.

Ct	Fluorescência - NDM							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	302
25	0	0	0	0	0	0	299	302
30	0	0	0	0	275	298	299	302
35	0	0	67	91	275	298	299	302
40	0	0	67	91	275	298	299	302



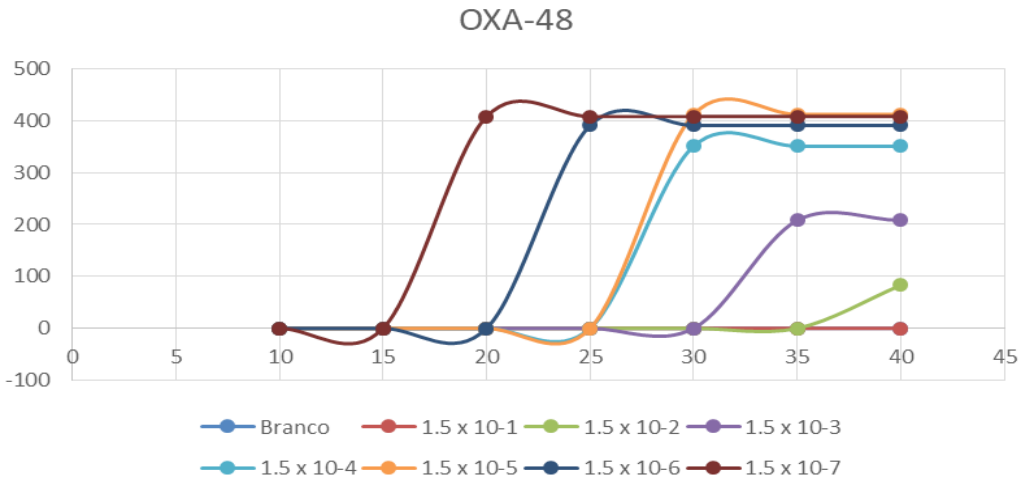
Fluorescência e Ct obtidos para o gene *bla*$_{NDM}$.

Ct	Fluorescência - IMP-1							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0	239	240
30	0	0	0	0	0	218	239	240
35	0	0	0	0	117	218	239	240
40	0	0	0	35	117	218	239	240



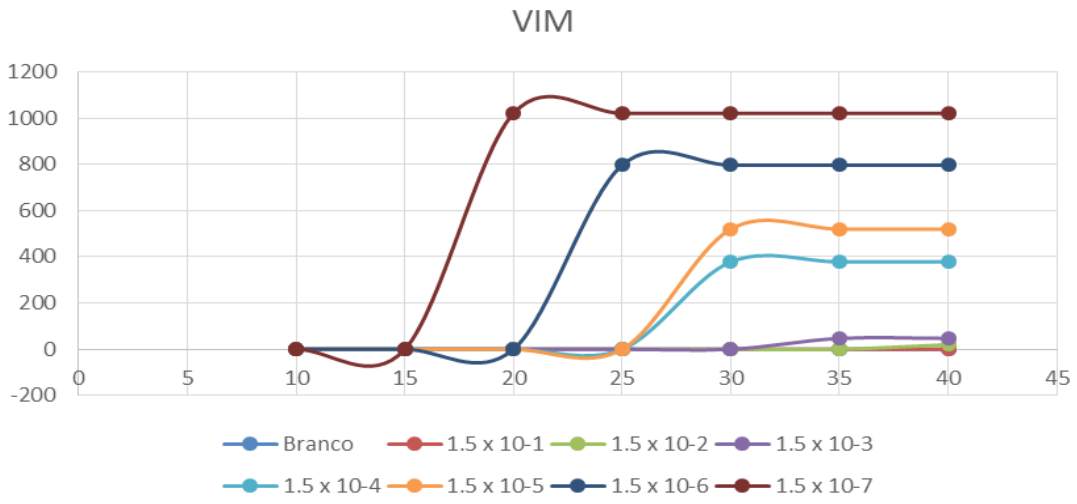
Fluorescência e Ct obtidos para o gene *bla*$_{IMP-1}$.

Ct	Fluorescência – OXA-48							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	408
25	0	0	0	0	0	0	391	408
30	0	0	0	0	351	412	391	408
35	0	0	0	208	351	412	391	408
40	0	0	83	208	351	412	391	408



Fluorescência e Ct obtidos para o gene *bla*$_{OXA-48}$,

Ct	Fluorescência – VIM							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
10	0	0	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0	0	0
20	0	0	0	0	0	0	0	1021
25	0	0	0	0	0	0	797	1021
30	0	0	0	0	378	520	797	1021
35	0	0	0	47	378	520	797	1021
40	0	0	20	47	378	520	797	1021



Fluorescência e Ct obtidos para o gene *bla*$_{VIM}$.

Gene	Fluorescência (genes *bla*$_{KPC}$ + *bla*$_{NDM}$)							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
KPC (isolada)	0	83	115	128	249	488	599	673
NDM (isolada)	0	0	67	91	275	298	290	302
KPC+NDM (KPC)	0	0	0	29	216	366	520	572
KPC+NDM (NDM)	0	0	43	96	203	251	292	292

Fluorescência obtida para *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{NDM}$ individualmente e em combinação.

Gene	Fluorescência (genes *bla*$_{KPC}$ + *bla*$_{IMP-1}$)							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
KPC (isolada)	0	83	115	128	249	488	599	673
IMP (isolada)	0	0	0	35	117	218	239	237
kPC+IMP (KPC)	0	0	0	54	224	343	535	596
kPC+IMP (IMP)	0	0	0	64	59	108	221	249

Fluorescência obtida para *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{IMP-1}$ individualmente e em combinação.

Gene	Fluorescência (genes *bla*$_{KPC}$ + *bla*$_{VIM}$)							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
KPC	0	83	115	128	249	488	599	673
VIM	0	0	20	47	378	520	797	1021
KPC+VIM (KPC)	0	0	0	96	197	385	521	625
KPC+VIM (VIM)	0	0	27	83	59	233	532	973

Fluorescência obtida para *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{VIM}$ indivudualmente e em combinação.

Gene	Fluorescência (genes *bla*$_{KPC}$ + *bla*$_{OXA-48}$)							
	Branco	10^1	10^2	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
KPC	0	83	115	128	249	488	599	673
OXA-48	0	0	83	208	351	412	391	408
KPC+OXA-48 (KPC)	0	0	97	67	241	390	495	584
KPC+OXA-48 (OXA)	0	0	0	21	216	351	378	405

Fluorescência obtida para *bla*$_{KPC}$ e *bla*$_{VIM}$ individualmente e em combinação.

Anexo F - Resultados positivos no Xpert Carba-R® e na CV-ERC

Resultados positivos no Xpert Carba-R® e na CV-ERC (continuação)

		Xpert Carba-R®	CV-ERC	Testes fenotípicos		TSA (µg/mL)		
N	UI	gene alvo (*swab*)	Organismo	Q-MHT	EDTA	Erta	Imi	Mero
1	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
2	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
3	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
4	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
5	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
6	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
7	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
8	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
9	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
10	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
11	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
12	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
13	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
			Ser mar	pos	neg	>=8	>=16	>=16
14	UTI/UT	*bla*KPC	*Ser mar*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
15	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
16	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	4	>=16
17	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
18	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
19	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
20	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
21	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
22	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
23	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
24	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
25	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
26	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
27	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
28	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
29	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
30	UTI/UT	*bla*KPC	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16

continua

Resultados positivos no Xpert Carba-R® e na CV-ERC (continuação)

		Xpert Carba-R®	CV-ERC	Testes fenotípicos		TSA (µg/mL)		
N	UI	gene alvo (*swab*)	Organismo	Q-MHT	EDTA	Erta	Imi	Mero
31	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
32	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
33	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
34	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
35	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
36	UTI/UT	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
37	UTI/UT	bla_{NDM}	*kle pne*	neg	pos	>=8	8	>=16
38	UTI/UT	bla_{NDM}	*kle pne*	neg	pos	>=8	>=16	>=16
39	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
40	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
41	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
42	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
43	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
44	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
45	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
46	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
47	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
48	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
49	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
50	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
51	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
52	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
53	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
54	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	4	>=16
55	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
56	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
57	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
58	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
59	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
60	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
61	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
62	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
63	PS	bla_{KPC}	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16

continua

Resultados positivos no Xpert Carba-R® e na CV-ERC (conclusão)

		Xpert Carba-R®	CV-ERC	Testes fenotípicos		TSA (µg/mL)		
N	UI	gene alvo (*swab*)	Organismo	Q-MHT	EDTA	Erta	Imi	Mero
64	PS	*bla*$_{KPC}$	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16
65	PS	*bla*$_{KPC}$	*kle pne*	pos	neg	>=8	8	>=16
66	PS	*bla*$_{KPC}$	*kle pne*	pos	neg	>=8	>=16	>=16

N: amostra; UTI/UT: unidades de terapia intensiva e undades de transplantados; PS: pronto socorro; neg: negativo; ERC: Enterobacterales resistente aos carbapenêmicos; Q-MHT: teste de Hodge modificado quantitativo; *Kle,pne: Klebsiella pneumoniae*; *Ser mar*: *Serratia marcescens;* Ert: ertapenem; Imi: impenem; Mer: meropenem; TSA (µg/mL)[a]: teste de sensibilidade aos antimicrobianos realizado pelo [a] Teste de sensibilidade realizado pelo Vitek 2® XL (BioMerieux),

Anexo G – Manuscrito 2

International Journal of Infectious Diseases 93 (2020) 118–120

Contents lists available at ScienceDirect

International Journal of Infectious Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijid

Short Communication

KPC-producing Enterobacterales with uncommon carbapenem susceptibility profile in Vitek 2 system

Ana Paula Cury[a,*], Raquel Girardello[b], Alberto José da Silva Duarte[c], Flávia Rossi[a]

[a] Microbiology Laboratory, Central Laboratory Division–LIM 03, Pathology Department, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brazil
[b] Laboratório de Microbiologia Molecular e Clínica, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade São Francisco, Brazil
[c] Medical Director of Central Laboratory Division–LIM 03, Pathology Department, Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 10 December 2019
Received in revised form 15 January 2020
Accepted 16 January 2020

Keywords:
Enterobacterales
Vitek 2™ system
KPC
Carbapenems
Carbapenemases

ABSTRACT

KPC-producing *K. pneumoniae* is an endemic challenge. Seven KPC-producing Enterobacterales showed unusual carbapenems susceptibility profile. These strains were resistance at least one carbapenem and the ertapenem MIC was lower than imipenem and/or meropenem MICs using Vitek 2™ system (bioMerieux). When E-test™ and disk diffusion methods were performed the carbapenems showed susceptible results.
© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

KPC-producing *K. pneumoniae* is an endemic challenge in many countries around the world, and critical infections due to this microorganism have high morbidity and mortality rates with few therapeutic options (Agyeman et al., 2019). Among the carbapenemases-producing Enterobacterales, KPC producers are 47–90% in USA, 21-62% in South and Central America, 75% in Mediterranean countries and 71% in China (van Duin and Doi, 2017). Carbapenem resistance in Enterobacterales in Brazil is around 40% (Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA), 2013) and, at our facility, 80% of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* are KPC producers. In general, this microorganism presents high Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) for carbapenems, mainly for ertapenem that is most vulnerable to hydrolysis due to carbapenemases (Anderson et al., 2007). We present unusual Enterobacterales susceptibility profile using Vitek 2™ (bioMerieux Marcy-L'Etoile,France) in KPC-producing Enterobacterales.

According to routine surveillance for carbapenem-resistant Enterobacterales (CRE) in our hospital, seven patients presented surveillance culture from rectal swab that isolated only Enterobacterales susceptible to carbapenems. These patients, however, had, at the same moment, a positive result for bla_{KPC} using molecular method – Xpert Carba-R™ (Cepheid, Sunnyvale, CA). Thus, we studied these susceptible microorganisms and performed identification using Vitek MS™ (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) and antimicrobial susceptibility testing (AST) (CLSI and Clinical Laboratory Standard Institute, 2019) using AST N239 card of Vitek 2™, E-test™ (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) and disk diffusion methods (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England).

In the last 5 years, 5,158 carbapenemase-producing isolates have been identified in our facility, of which 166 (3.2%) had MIC $\leq$4 μg/ml for ertapenem and MIC $\geq$16 μg/ml for imipenem and/or meropenem using Vitek 2™ (only MIC were evaluated, and automatic category changes generated by Vitek Advanced Expert System were not considered). We studied three *K. pneumoniae* and 4 *E. coli* (one per patient) with this profile. When tested using E-test™ and disk diffusion methods with 10 μg ertapenem, imipenem and meropenem (Oxoid, Basingstoke, Hampshire,England), the strains were susceptible to them, with MIC and inhibition halos around breakpoints (Table 1). Phenotypic tests for detection of carbapenemases were performed: Hodge test (Cury et al., 2012), Rapidec Carba NP (bioMerieux Marcy-L'Etoile, France) and modified Carbapenem Inactivation Method (mCIM) (CLSI and Clinical Laboratory Standard Institute, 2019). All strains were carbapenemase producers according to the three tests.

These isolates were submitted to in house PCR with primers for bla_{KPC}, bla_{NDM}, bla_{IMP}, bla_{VIM} and bla_{OXA-48} (Monteiro et al., 2012; Castanheira et al., 2010), and were negative for the last four genes. The bla_{KPC} amplicons were sequenced using BigDye Terminator v 3.1 in ABI Prism 3500 (Applied Biosystems) and classified as KPC-2.

Genotyping of isolates was performed using the repetitive sequence-based PCR DiversiLab system (bioMerieux Marcy-L'Etoile,

* Corresponding author at: Hospital das Clínicas, Universidade de São Paulo, Avenida Doutor Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo, Brazil
E-mail address: ana.cury@hc.fm.usp.br (A.P. Cury).

https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.01.016
1201-9712/© 2020 The Authors. Published by Elsevier Ltd on behalf of International Society for Infectious Diseases. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

Table 1
Antimicrobial susceptibility and phenotypic profile of KPC-producing *K. pneumoniae* and *E. coli* isolated from clinical samples of HC-FMUSP.

N°	Isolate	MIC (μg/mL)/susceptibility category[a]					Disc diffusion (mm)/ susceptibility category[a]			Phenotypic evaluation of carbapenemase production[b]				KPC sequencing
		Vitek2™			E-test™									
		Imi	Mero	Erta	Imi	Mero	Erta	Imi	Mero	Erta	Hodge[c]	CarbaNP[d]	mCIM[e]	
1	*K. pneumoniae*	> = 16 R	> = 16 R	4 R	0.5 S	0.25 S	0.25 S	27 S	28 S	26 S	pos	pos	pos	KPC-2
2	*K. pneumoniae*	> = 16 R	0.5 S	< = 0.5 S	1.0 S	1.0 S	0.25 S	23 S	24 S	25 S	pos	pos	pos	KPC-2
3	*K. pneumoniae*	8 R	> = 16 R	< = 0.5 S	1.0 S	1.0 S	0.5 S	23 S	23 S	22 S	pos	pos	pos	KPC-2
4	*E. coli*	4 R	> = 16 R	< = 0.5 S	1.0 S	0.5 S	0.5 S	23 S	24 S	22 S	pos	pos	pos	KPC-2
5	*E. coli*	> = 16 R	> = 16 R	4 R	1.0 S	0.5 S	0.5 S	23 S	23 S	22 S	pos	pos	pos	KPC-2
6	*E. coli*	> = 16 R	> = 16 R	4 R	1.0 S	1.0 S	0.5 S	23 S	24 S	22 S	pos	pos	pos	KPC-2
7	*E. coli*	0.5 S	> = 16 R	4 R	1.0 S	1.0 S	0.5 S	23 S	24 S	22 S	pos	pos	pos	KPC-2

[a] Susceptibility category according to CLSI (2019) breakpoints. **S:** susceptible; **I:** intermediate; **R:** resistant. **Imi:** imipenem; **Mero:** meropenem; **Erta:** ertapenem.
[b] Pos: positive for presence of carbapenemase.
[c] Modified Hodge test (Cury et al., 2012).
[d] Rapidec CarbaNP (bioMeriéux).
[e] Phenotypic protocol according to CLSI (CLSI and Clinical Laboratory Standard Institute, 2019).

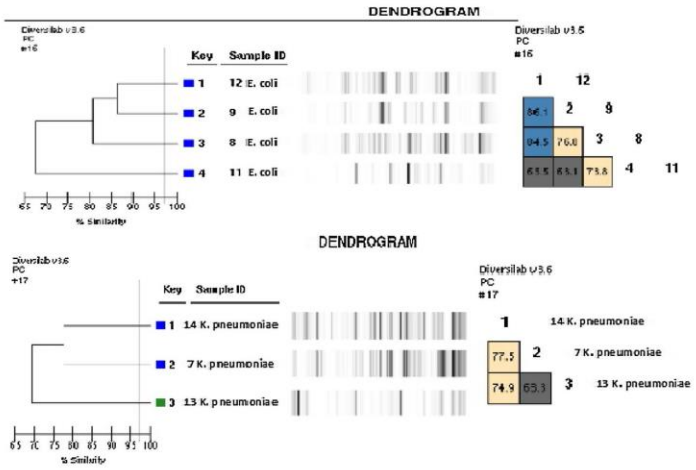


Figure 1. DNA fingerprinting of isolates by repetitive sequence-based PCR (n = 7).

France). A cut-off of 95% similarity was chosen for the determination of clonal relatedness. Four different patterns for *E.coli* and three different patterns for *K.pneumoniae* were described (Figure 1).

Vitek 2™ considered strains harboring bla_{KPC} genes as resistant, but they were susceptible to carbapenems by the other methods. In clinical practice, this has an impact on treatment, as studies have shown that gene expression should guide the therapeutic management (Trecarichi and Tumbarello, 2017). Carbapenem MIC <8 μg/ml allows clinical use, with evidence of impact on mortality. However, if carbapenem MIC >8 μg/ml, the use in association with other active drugs is likely ineffective and the therapeutic management with other drugs with questionable efficacy (polymyxins and aminoglycosides, for example) will be established (Tumbarello et al., 2012).

Carbapenem resistance due to carbapenemases is a serious problem, and, when detected, contact precaution is important to prevent its spread. The microbiology laboratories have an important role in the detection of the genes in the isolates with this profile. However, the dissemination of strains harboring bla_{KPC} with carbapenem susceptibility may go unnoticed, mainly for those who use disk diffusion. This fact can contribute to the dissemination of KPC and to the increase of carbapenems resistance rates. Currently in our routine, when we find higher meropenem and/or imipenem MIC than for ertapenem MIC (≥2 double dilutions) we perform disk diffusion and an E-test™ and search for carbapenemase production.

We suggest to the microbiologists to pay attention to these following points: the phenotypic profile observed in this work alerts Vitek 2™ users to consider the presence of carbapenemase in Enterobacterales but the carbapenems MIC should be confirmed using other methods like disc diffusion and/or E-test™. This warning is about methodology (Vitek 2 system) and this unusual profile that deserves further investigation and not about a new phenotype, as the other methods did not confirm any resistance to carbapenems.

Conflict of interest statement

None.

Funding sources

None.

Ethical approval

Approval was not required.

Acknowledgements

We thank the Microbiology Laboratory team, Central Laboratory Division–LIM 03, Hospital das Clínicas, University of São Paulo.

References

Agyeman AA, Bergen PJ, Rao GG, Nation RL, Landersdorfer CB. A systematic review and meta-analysis of treatment outcomes following antibiotic therapy among patients with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections. Int J Antimicrob Agents 2019;12:105833.

van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. Virulence 2017;460–9.

Brazilian Health Surveillance Agency (ANVISA). Boletim Informativo: Segurança e qualidade em serviço de saúde n° 9: Relatório da resistência microbiana em infecções primárias de corrente sanguínea confirmadas laboratorialmente relacionadas ao uso de cateter venoso central em unidades de terapia intensiva. (Accessed 16 March 2016). Available at:. 2013. http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Boletim+Seguranca+do+Paciente/Seguranca+e+qualidade+em+servico+de+saude+n+9.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. J Clin Microbiol 2007;45(8):2723–5.

CLSI, Clinical Laboratory Standard Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-Six Informational Supplement. Document M100-ED19 Wayne, Pa.. 2019.

Cury AP, Andreazzi D, Maffucci M, Caiaffa-Junior H Hehl, Rossi F. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Clinics 2012;67(12):1427–31.

Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. J Antimicrob Chemother 2012;67:906–9.

Castanheira M, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing enterobacteriaceae. Microb Drug Resist 2010;16:61–5.

Trecarichi EM, Tumbarello M. Therapeutic options for carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections. Virulence 2017;8(4):470–84.

Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, Trecarichi EM, Tumietto F, Marchese A, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase–producing K. pneumoniae: importance of combination therapy. Clin Infect Dis 2012;55(7):943–50.

Anexo H - Descrição dos genes das proteínas de membrana externa *ompK 35, ompk 36 e ompK 37*. FMUSP, São Paulo

ompK35	>tr|O87753|O87753_KLEPN OmpF protein OS=Klebsiella pneumoniae OX=573 GN=ompK35 PE=4 SV=1 MMKRNILAVVIPALLVAGAANAAEIYNKNGNKLDFYGKMVGEHVWTTNGDTSSDDTT YARIGLKGETQINDQLIGYGQWEYNMDASNVEGSQTTKTRLAFAGLKAGEYGSFDYG RNYGAIYDVEAATDMLVEWGGDGWNYTDNYMTGRTNGVATYRNSDFFGLVDGLSFAL QYQGKNDHDRAIRKQNGDGFSTAATYAFDNGIALSAGYSSSNRSVDQKADGNGDKAE AWATSAKYDANNIYAAVMYSQTYNMTPEEDNHFAGKTQNFEAVVQYQFDFGLRPSIG YVQTKGKDLQSRAGFSGGDADLVKYIEVGTWYYFNKNMNVYAAYKFNQLDDNDYTKA AGVATDDQAAVGIVYQF		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. doi: 10.1099/jmm.0.045799-0. Epub 2012 Jun 14.
ompK36	>sp|Q48473|OMPC_KLEPN Outer membrane protein C OS=Klebsiella pneumoniae OX=573 GN=ompC PE=1 SV=1 MKVKVLSLLVPALLVAGAANAAEIYNKDGNKLDLYGKIDGLHYFSDDKDVDGDQTYM RLGVKGETQINDQLTGYGQWEYNVQANNTESSSDQAWTRLAFAGLKFGDAGSFDYGR NYGVVYDVTSWTDVLPEFGGDTYGSDNFLQSRANGVATYRNSDFFGLVDGLNFALQY QGKNGSVSGEGATNNGRGALKQNGDGFGTSVTYDIFDGISAGFAYANSKRTDDQNQL LLGEGDHAETYTGGLKYDANNIYLATQYTQTYNATRAGSLGFANKAQNFEVAAQYQF DFGLRPSVAYLQSKGKDLNGYGDQDILKYVDVGATYYFNKNMSTYVDYKINLLDDNS FTRSAGISTDDVVALGLVYQF		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. doi: 10.1099/jmm.0.045799-0. Epub 2012 Jun 14.
ompK37	>tr|O87754|O87754_KLEPN OmpK37 porin OS=Klebsiella pneumoniae OX=573 GN=ompK37 PE=4 SV=1 MKRKVLALVIPALLAAGAAHAAEIYNKDGNKLDLYGKVDGLHYFSSDSKKDGDQTYL RFGFKGETQINDILTGYGQWEYNVQANNTETSSDQAWTRLAFAGIKVGDYGSFDYGR NYGVLYDVEGWTDILPEFGGDSYTYADNFMAGRANGVATYRNSDFFGLVEGLNFALQ YQGKNEGQNAQDINVGTNNRSSDSDVRFDNGDGFGLSTSYDFGMGISAAAAYTSSDR TNDQMTQTNARGDKAEAWTAGLKYDANDIYLATMYSETRNMTPYGNDGVANKTQNFE VTAQYQFDFGLRPAISYLQSKGKDLYNNGRYADKDLVKYMDVGATYYFNRNMSTYVD YKINLLDGNDKFYEDNGISTDNIVALGLVYQF		Identification and Characterization of a New Porin Gene of Klebsiella pneumoniae: Its Role in b-Lactam Antibiotic Resistance. J Bacteriol. 1999 May;181(9):2726-32.

Anexo I - Genes de mecanismos de resistência determinados pelo SCG em 10 isolados de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos sem carbapenemase.

	TSA (µg/mL)			ST	CC	Genes (*bla*) de resistência	Porinas deletérias			Bomba efluxo
N	Ert	Imi	Mer				OmpK 35	OmpK 36	Ompk 37	família RND
1	4	<=0,25	0,5	15	St	*SHV-28, TEM-1b, CTX-M-15,OXA-1*	PSM	T222L, A183_T184_insLSP	ND	
2	>=8	1	4	15	St	*SHV-28, TEM-1b, CTX-M-15,OXA-1*	PSM	T222L, A183_T184_insLSP, M1_L14del	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
3	>=8	1	2	15	St	*SHV-28, CTX-M-15,OXA-1*	PSM	D39G, G40N, Y43R, S45G,D47R, D51Q, G52F, D53S, Q54L, T55Q, Y56T, T222L, A183_T184insLSP, G40_L41insDSNLLIVFYVQIVPDDFVMQ[b], K48_D49insGLPAQPCQMLSQIQVVSLNSLRVTLTD[b]	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
4	>=8	0,5	4	101	St	*SHV-1, CTX-M-15, OXA-1*	PSM	**A190W**, G133_G134_insGD, N304_G305_insR	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
5	>=8	<=0,25	2	11	258	*SHV-11, CTX-M-15, OXA-1*	PSM	T222L, A183_T184_insLSP, G134_D135_insD	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
6	>=8	4	>=16	11	258	*SHV-11, CTX-M-15, OXA-1*	PSM	T222L, **Y306S, D308R**, A183_T184_insLSP, L303_N304_insEGRT	N230G, M233_T234insHYTH	CRP, H-NS, acrA, marA
7	>=8	1	4	11	258	*SHV-11, TEM-1b, OXA-2*	G114_R115insVTTARSTTSKRQPICW, R115L, Y117G, G118A, I120T, Y121A, D122G, V123T, E124I, A125P, D128T	T222L, A183_T184_insLSP	N230G, M233_T234insHYTH	CRP, H-NS, acrA, marA
8	>=8	<=0,25	1	16	St	*SHV-1, CTX-M-2, OXA-2*	Q288del	**A190W**, G133_G134insGD, N304_G305insR	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
9	8	<=0,25	1	16	St	*SHV-1, CTX-M-2, OXA-2*	Q288del	G133_G134_insGD, N304_g305_insR	ND	CRP, H-NS, acrA, marA
10	>=8	4	>=16	16	St	*SHV-1, CTX-M-2, CTX-M-15,OXA-2*	Q288del	**A190W**, G133_G134insGD, N304_G305insR	ND	CRP, H-NS, acrA, marA

TSA: teste de sensibilidade aos antimicrobianos, Ert: ertapenem, Imi: imipenem; Mer: meropenem; St: *single ton*; ST: *sequence type*, CC: complexo clonal; OmpK 35, OmpK 36, OmpK 37: out-membrane protein (proteína de membrana externa); PSM: presente sem mutação; ND: porinas não deletérias;[b] G40_L41insDSNLLIVFYVQIVPDDFVMQ, K48_D49insGLPAQPCQMLSQIQVVSLNSLRVTLTD estas sequencias de inserção são fragmentos da ISKpn14; Novas mutações em porinas deletérias: A190W, Y306S, D308R; Novas mutações em porinas não deletérias: D224E, Q227S, L228V, S346K, N304S,R345H, G189T

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Review on Antimicrobial Resistance, Tackling drug resistant infections globally. Disponível em *https://amr-review.org/home.html*
2. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20:821–30.
3. Won SY, Munoz-Price LS, Lolans K, Hota B, Weinstein RA, Hayden MK. Emergence and spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*. 2011;53:532–40.
4. Leavitt A, Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007;51:3026–9.
5. WHO. GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE *http://www.who.int/*
6. Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E, Synnestvedt M, Fishman NO. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2009 Dec;30(12):1180-5.
7. Mouloudi E, Protonotariou E, Zagorianou A, Iosifidis E, Karapanagiotou A, Giasnetsova T, Tsioka A, Roilides E, Sofianou D, Gritsi-Gerogianni N. Bloodstream infections caused by metallo-β-lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010 Dec;31(12):1250-6.
8. Falagas ME, Tansarli GS, Karageorgopoulos DE, Vardakas KZ. Deaths attributable to carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1170e5.
9. Glasner C, Albiger B, Buist G, Tambić Andrasević A, Canton R, Carmeli Y, Friedrich AW, Giske CG, Glupczynski Y, Gniadkowski M, Livermore DM, Nordmann P, Poirel L, Rossolini GM, Seifert H, Vatopoulos A, Walsh T, Woodford N, Donker T, Monnet DL, Grundmann H; European Survey on

Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae (EuSCAPE) Working Group. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe: a survey among national experts from 39 countries, February 2013. *Euro Surveill*. 2013 Jul 11;18(28). Erratum in: *Euro Surveill*. 2013;18. Erratum in: *Euro Surveill*. 2014;19(47).

10. Nordmann, P, Cuzon, G, Naas, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009; 9: p.228-36.
11. Pournaras S, Protonotariou E, Voulgari E, Kristo I, Dimitroulia E, Vitti D, Tsalidou M, Maniatis AN, Tsakris A, Sofianou D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Aug;64(2):348-52.
12. World Health Organization, Antimicrobial Resistance Global Report on Surveillance. WHO, 2017. Disponível em *http://www.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/*
13. Center for Disease Control and Prevention. Antibiotic Resistance Threats in United States. CDC, 2013. Disponível em *http://www.cdc.gov/drugresistance/threatreport2013/*
14. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, Findlay D, Gyssens I, Heuer OE, Kahlmeter G, Kruse H, Laxminarayan R, Liébana E, López-Cerero L, MacGowan A, Martins M, Rodríguez-Baño J, Rolain JM, Segovia C, Sigauque B, Tacconelli E, Wellington E, Vila J. The global threat of antimicrobial resistance: science for intervention. *New Microbes New Infect*. 2015 Apr 16;6:22-9. Erratum in: *New Microbes New Infect*. 2015 Nov;8:175.
15. Weiner LM, Webb AK, Limbago B, Dudeck MA, Patel J, Kallen AJ, Edwards JR, Sievert DM. Antimicrobial-Resistant Pathogens Associated With Healthcare-Associated Infections: Summary of Data Reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2011-2014. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2016 Nov;37(11):1288-1301.

16. Borg M, Cookson B, Zarb P, Scicluna E. Antibiotic resistance surveillance and control in the Mediterranean region: report of the ARMed Consensus Conference. *J Infect Dev Ctries*. 2009; 3(9):654-659. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858565, accessed 9 April 2014).
17. World Health Organization. *Antimicrobial resistance: global report on surveillance*. World Health Organization, 2014.
18. Meyer WG, Pavlin JA, Hospenthal D, Murray CK, Jerke K, Hawksworth A, Metzgar D, Myers T, Walsh D, Wu M, Ergas R, Chukwuma U, Tobias S, Klena J, Nakhla I, Talaat M, Maves R, Ellis M, Wortmann G, Blazes DL, Lindler L. Antimicrobial resistance surveillance in the AFHSC-GEIS network. *BMC Public Health*. 2011 Mar 4;11 Suppl 2(Suppl 2):S8.
19. Palmore TN, Henderson DK. Managing transmission of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in healthcare settings: a view from the trenches. *Clin Infect Dis*. 2013;57:1593e9.
20. Araújo, B T and Pereira DCR. "Políticas para controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil, 2017." (2017).
21. ERC Toolkit – Guidance for Control of Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, 2015. Available at http://www.cdc.gov/hai/organisms/ERC/ERC-toolkit/index.html
22. Elemam A, Rahimiam J, Mandell W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: a report of 2 cases and a brief review of the literature. *Clin Infect Dis*. 2009;49:271–4.
23. Nicolas-Chanoine MH, Gruson C, Bialek-Davenet S, Bertrand X, Thomas-Jean F, Bert F, Moyat M, Meiller E, Marcon E, Danchin N, Noussair L, Moreau R, Leflon-Guibout V. 10-Fold increase (2006-11) in the rate of healthy subjects with extended-spectrum β-lactamase-producing *Escherichia coli* faecal carriage in a Parisian check-up centre. *J Antimicrob Chemother*. 2013 Mar;68(3):562-8.
24. Herati RS, Blumberg EA. Losing ground: multidrug-resistant bacteria in solid-organ transplantation. *Curr Opin Infect Dis*. 2012;25:445–9.

25. Santoro-Lopes G, de Gouvea EF. Multidrug-resistant bacterial infections after liver transplantation: an ever-growing challenge. *World J Gastroenterol*. 2014;20:6201–10.
26. Van Duin D, van Delden C. Multidrug-resistant gram-negative bacteria infections in solid organ transplantation. *Am J Transplant*. 2013;13:31–41.
27. Lübbert C, Becker-Rux D, Rodloff AC, Laudi S, Busch T, Bartels M, Kaisers UX. Colonization of liver transplant recipients with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* is associated with high infection rates and excess mortality: a case-control analysis. *Infection*. 2014 Apr;42(2):309-16.
28. Satlin MJ, Calfee DP, Chen L, Fauntleroy KA, Wilson SJ, Jenkins SG, Feldman EJ, Roboz GJ, Shore TB, Helfgott DC, Soave R, Kreiswirth BN, Walsh TJ. Emergence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae as causes of bloodstream infections in patients with hematologic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 2013 Apr;54(4):799-806.
29. Freire MP, Abdala E, Moura ML, de Paula FJ, Spadão F, Caiaffa-Filho HH, David-Neto E, Nahas WC, Pierrotti LC. Risk factors and outcome of infections with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in kidney transplant recipients. *Infection*. 2015 Jun;43(3):315-23.
30. Velasco E, Byington R, Martins CA, Schirmer M, Dias LM, Gonçalves VM. Comparative study of clinical characteristics of neutropenic and non-neutropenic adult cancer patients with bloodstream infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2006 Jan;25(1):1-7.
31. Samonis G, Vardakas KZ, Maraki S, Tansarli GS, Dimopoulou D, Kofteridis DP, Andrianaki AM, Falagas ME. A prospective study of characteristics and outcomes of bacteremia in patients with solid organ or hematologic malignancies. *Support Care Cancer*. 2013 Sep;21(9):2521-6.
32. Ramos-Castañeda JA, Ruano-Ravina A, Barbosa-Lorenzo R, Paillier-Gonzalez JE, Saldaña-Campos JC, Salinas DF, Lemos-Luengas EV. Mortality due to KPC carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: Systematic review and meta-analysis: Mortality due to KPC *Klebsiella pneumoniae* infections. *J Infect*. 2018 May;76(5):438-448.

33. Freire MP, Pierrotti LC, Filho HH, Ibrahim KY, Magri AS, Bonazzi PR, Hajar L, Diz MP, Pereira J, Hoff PM, Abdala E. Infection with *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* in cancer patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015 Feb;34(2):277-86.
34. Otter JA, Mutters NT, Tacconelli E, Gikas A, Holmes AH. Controversies in guidelines for the control of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in EU countries. *Clin Microbiol Infect*. 2015;21:1057e66.
35. Dik JW, Dinkelacker AG, Vemer P, Lo-Ten-Foe JR, Lokate M, Sinha B, Friedrich AW, Postma MJ. Cost-Analysis of Seven Nosocomial Outbreaks in an Academic Hospital. *PLoS One*. 2016 Feb 10;11(2):e0149226.
36. Conterno LO, Shymanski J, Ramotar K, Toye B, Zvonar R, Roth V. Impact and cost of infection control measures to reduce nosocomial transmission of extended-spectrum β-lactamase-producing organisms in a non-outbreak setting. *J Hosp Infect*. 2007;65:354e60.
37. Otter JA, Burgess P, Davies F, Mookerjee S, Singleton J, Gilchrist M, Parsons D, Brannigan ET, Robotham J, Holmes AH. Counting the cost of an outbreak of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: an economic evaluation from a hospital perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2017 Mar;23(3):188-196.
38. Friedman ND, Carmeli Y, Walton AL, Schwaber MJ. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: A Strategic Roadmap for Infection Control. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. 2017;38(5):580–94.
39. Enfield KB, Huq NN, Gosseling MF, Low DJ, Hazen KC, Toney DM, Slitt G, Zapata HJ, Cox HL, Lewis JD, Kundzins JR, Mathers AJ, Sifri CD. Control of simultaneous outbreaks of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection in an intensive care unit using interventions promoted in the Centers for Disease Control and Prevention 2012 carbapenemase-resistant Enterobacteriaceae Toolkit. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2014 Jul;35(7):810-7.
40. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, Christofidou M, Sklavou C, Vamvakopoulou S, Anastassiou ED, Filos KS. KPC-producing

Klebsiella pneumoniae enteric colonization acquired during intensive care unit stay: the significance of risk factors for its development and its impact on mortality. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Oct;77(2):169-73.

41. Sadowska-Klasa A, Piekarska A, Prejzner W, Bieniaszewska M, Hellmann A. Colonization with multidrug-resistant bacteria increases the risk of complications and a fatal outcome after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Ann Hematol*. 2018 Mar;97(3):509-517.
42. Dautzenberg MJ, Wekesa AN, Gniadkowski M, Antoniadou A, Giamarellou H, Petrikkos GL, Skiada A, Brun-Buisson C, Bonten MJ, Derde LP; Mastering hospital Antimicrobial Resistance in Europe Work Package 3 Study Team. The association between colonization with carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and overall ICU mortality: an observational cohort study. *Crit Care Med*. 2015 Jun;43(6):1170-7.
43. Pacio GA, Visintainer P, Maguire G, Wormser GP, Raffalli J, Montecalvo MA. Natural History of Colonization With Vancomycin-Resistant *Enterococci*, Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* and Resistant Gram-Negative Bacilli Among Long-Term–Care Facility Residents. *Infection Control & Hospital Epidemiology*. Cambridge University Press; 2003;24(4):246–50.
44. O'Fallon E, Gautam S, D'Agata EM. Colonization with multidrug-resistant gram-negative bacteria: prolonged duration and frequent cocolonization. *Clin Infect Dis*. 2009 May 15;48(10):1375-81.
45. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwartz D, Tarabeia J, Fefer I, Schwaber MJ, Carmeli Y. Surveillance cultures and duration of carriage of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Clin Microbiol*. 2007 May;45(5):1551-5.
46. Muto CA, Jernigan JA, Ostrowsky BE, Richet HM, Jarvis WR, Boyce JM, Farr BM; SHEA. SHEA guideline for preventing nosocomial transmission of multidrug-resistant strains of *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus*. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2003 May;24(5):362-86.
47. Centro de Vigilância Epidemiológica. Disponível em: http://*www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica*.

48. Davin-Regli A, Bolla JM, James CE, Lavigne JP, Chevalier J, Garnotel E, Molitor A, Pagès JM. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets*. 2008 Sep;9(9):750-9.
49. Chow JW, Shlaes DM. Imipenem resistance associated with the loss of a 40 kDa outer membrane protein in *Enterobacter aerogenes*. *J Antimicrob Chemother*. 1991; 28:499–504.
50. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp* clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother*. 2009 Apr;63(4):659-67.
51. Vila J, Martí S, Sánchez-Céspedes J. Porins, effluz pumps and multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrobi Chemother*. 2007;59(6):1210-5.
52. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005;57(10):1486-513.
53. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2003 Dec;67(4):593-656.
54. Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria*. Nat Rev Microbiol*. 2008 Dec;6(12):893-903.
55. Bush K. Characterization of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 1989;33(3):259-63.
56. Bush K, Jacoby GA. Minireview Updated Functional Classification of β-lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. Mai,2010; p.969-976.
57. Bush K. New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis*. 2001;32(7):1085-9.
58. Payne DJ, Marriott MS, Amyes SG. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2. *J Med Microbiol*. 1990 Jun;32(2):131-4.

59. Denton M. Enterobacteriaceae. *International journal of antimicrobial agentes*. 2007; *29*, S9-S22.
60. 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. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Feb;52(2):809.
61. Temkim E, Adler A, Lerner A, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: biology, epidemiology, and mamnagement. *Ann N Y Acad Sci*. 2014; 1323:22-42.
62. 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; 53:333-4.
63. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53:2702.
64. Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado Ade O, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus seuqence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56:4563-4; author reply 4565ri.
65. Ramirez MS, Xie G, Johnson S, Davenport K, van Duin D, Perez F, Bonomo RA, Chain P, Tolmasky ME. Genome Sequences of Two Carbapenemase-Resistant *Klebsiella pneumoniae* ST258 Isolates. *Genome Announc*. 2014 Jun 19;2(3):e00558-14.
66. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20: 440–458.
67. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: report from the MYSTIC Program (1999–2005). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2006; 56: 367–372.

68. Bennett JW, Herrera ML, Lewis JS 2nd, Wickes BW, Jorgensen JH. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* and *Pseudomonas putida* coinfection in a liver transplant recipient. *Antimicrob Agents Chemother*.2009 Jan;53(1):292-4.
69. Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter spp* in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1354-7.
70. Wolter DJ, Khalaf N, Robledo IE, Vázquez GJ, Santé MI, Aquino EE, Goering RV, Hanson ND. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009 Apr;53(4):1660-4.
71. Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60:470-82.
72. Boo TW, O'Connell N, Power L, O'Connor M, King J, McGrath E, Hill R, Hopkins KL, Woodford N. First report of IMI-1-producing colistin-resistant *Enterobacter* clinical isolate in Ireland 2013. *Euro Surveil*. 2013;18: pii:20548.
73. Teo JW, Ls MV, Krishnan P, Ang B, Jureen R, Lin RT. *Enterobacter cloacae* producing an uncommon class A carbapenemases, IMI-1, from Singapore. *J Med Microbiol*. 2013; 62:1086-8.
74. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM. Metallo-β-lactamases: a last frontier for β-lactams? *Lancet Infect Dis*. 2011; 11:381-93.
75. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol*. 2011; 19:588-95.
76. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-51.
77. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini GM. Cloning and characterization of bla_{VIM}, a new integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1584-90.

78. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(4):699-702.
79. Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a β-lactamase gene, bla_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo-β- lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(12):4654-61.
80. Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, bla_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Nov;49(11):4485-91.
81. Yong D, Toleman MA, Bell J, Ritchie B, Pratt R, Ryley H, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of an acquired subgroup B3 metallo-β-lactamase gene, bla_{AIM-1}, and its unique genetic context in *Pseudomonas aeruginosa* from Australia. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012.
82. Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008 Nov;52(11):4194-7.
83. 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.
84. Poirel L, Rodriguez-Martinez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010, 54:2420–2424, 10,1128/AAC,01456-09.

85. El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen O, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo-beta-lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012, 56:2241–2245, 10,1128/AAC,05640-11.
86. Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM; ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo-beta-lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Apr;29(4):380-8.
87. Patel G, Bonomo RA. "Stormy waters ahead": global emergence of carbapenemases. *Front Microbiol*. 2013 Mar 14;4:48.
88. Walsh TR, Weeks J, Livermore DM, Toleman MA. Dissemination of NDM-1 positive bacteria in the New Delhi environment and its implications for human health: an environmental point prevalence study. *Lancet Infect Dis*. 2011 May;11(5):355-62.
89. Rasheed JK, Kitchel B, Zhu W, Anderson KF, Clark NC, Ferraro MJ, Savard P, Humphries RM, Kallen AJ, Limbago BM. New Delhi metallo-β-lactamase-producing Enterobacteriaceae, United States. *Emerg Infect Dis*. 2013 Jun;19(6):870-8.
90. Jain A, Hopkins KL, Turton J, Doumith M, Hill R, Loy R, Meunier D, Pike R, Livermore DM, Woodford N. NDM carbapenemases in the United Kingdom: an analysis of the first 250 cases. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Jul;69(7):1777-84.
91. Roy S, Singh AK, Viswanathan R, Nandy RK, Basu S. Transmission of imipenem resistance determinants during the course of an outbreak of NDM-1 *Escherichia coli* in a sick newborn care unit. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec;66(12):2773-80.

92. Flateau C, Janvier F, Delacour H, Males S, Ficko C, Andriamanantena D, Jeannot K, Mérens A, Rapp C. Recurrent pyelonephritis due to NDM-1 metallo-beta-lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in a patient returning from Serbia, France, 2012. *Euro Surveill.* 2012;17(45)
93. Peirano G, Schreckenberger PC, Pitout JD. Characteristics of NDM-1-producing *Escherichia coli* isolates that belong to the successful and virulent clone ST131. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011 Jun;55(6):2986-8.
94. Cabanes F, Lemant J, Picot S, Simac C, Cousty J, Jalin L, Naze F, Boisson V, Cresta MP, André H, Thibault L, Tixier F, Winer A, Antok E, Michault A. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* and *Salmonella* metallo-beta-lactamase (NDM-1) producers on reunion island. *J Clin Microbiol*. 2012 Nov;50(11):3812.
95. Boyd SE, Livermore DM, Hooper DC, Hope WW. Metallo-β-Lactamases: Structure, Function, Epidemiology, Treatment Options, and the Development Pipeline. *Antimicrob Agents Chemother*. 2020 Sep 21;64(10):e00397-20.
96. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Sep;20(9):821-30.
97. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother*. 2012 Jul;67(7):1597-606.
98. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill*. 2013 Aug 1;18(31):20549.
99. Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan OA, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Mar;54(3):1369-73.
100. Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, Richards GA, Feldman C, Nutt L, van Greune J, Deetlefs JD, Swart K, Devenish L, Poirel L, Nordmann P. Emergence of OXA-48 and OXA-181 carbapenemases among Enterobacteriaceae in South Africa and evidence

of in vivo selection of colistin resistance as a consequence of selective decontamination of the gastrointestinal tract. *J Clin Microbiol*. 2013 Jan;51(1):369-72.

101. Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, Sifri CD. First clinical cases of OXA-48-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "menace" arrives in the new world. *J Clin Microbiol*. 2013 Feb;51(2):680-3.
102. Ellis C, Chung C, Tijet N, Patel SN, Desjardins M, Melano RG, Toye B. OXA-48-like carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Ottawa, Canada. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013 Jul;76(3):399-400.
103. Seiffert SN, Perreten V, Johannes S, Droz S, Bodmer T, Endimiani A. OXA-48 carbapenemase-producing *Salmonella enterica* serovar Kentucky isolate of sequence type 198 in a patient transferred from Libya to Switzerland. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2446-9.
104. Thomas CP, Moore LS, Elamin N, Doumith M, Zhang J, Maharjan S, Warner M, Perry C, Turton JF, Johnstone C, Jepson A, Duncan ND, Holmes AH, Livermore DM, Woodford N. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. *Int J Antimicrob Agents*. 2013 Dec;42(6):531-6.
105. da Silva IR, Aires CAM, Conceição-Neto OC, de Oliveira Santos IC, Ferreira Pereira N, Moreno Senna JP, Carvalho-Assef APD, Asensi MD, Rocha-de-Souza CM. Distribution of Clinical NDM-1-Producing Gram-Negative Bacteria in Brazil. *Microb Drug Resist*. 2019.
106. Arana DM, Saez D, García-Hierro P, Bautista V, Fernández-Romero S, Ángel de la Cal M, Alós JI, Oteo J. Concurrent interspecies and clonal dissemination of OXA-48 carbapenemase. *Clin Microbiol Infect*. 2015 Feb;21(2):148.e1-4.
107. Hammoudi D, Ayoub Moubareck C, Aires J, Adaime A, Barakat A, Fayad N, Hakime N, Houmani M, Itani T, Najjar Z, Suleiman M, Sarraf R, Karam Sarkis D. Countrywide spread of OXA-48 carbapenemase in Lebanon: surveillance and genetic characterization of carbapenem-non-susceptible

Enterobacteriaceae in 10 hospitals over a one-year period*. Int J Infect Dis*. 2014 Dec;29:139-44.

108. Österblad M, Kirveskari J, Hakanen AJ, Tissari P, Vaara M, Jalava J. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Finland: the first years (2008-11). *J Antimicrob Chemother*. 2012 Dec;67(12):2860-4.
109. Mnif B, Ktari S, Chaari A, Medhioub F, Rhimi F, Bouaziz M, Hammami A. Nosocomial dissemination of *Providencia stuartii* isolates carrying bla_{OXA-48}, bla_{PER-1}, bla_{CMY-4} and qnrA6 in a Tunisian hospital. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Feb;68(2):329-32.
110. Carattoli A, Seiffert SN, Schwendener S, Perreten V, Endimiani A. Differentiation of IncL and IncM Plasmids Associated with the Spread of Clinically Relevant Antimicrobial Resistance. *PLoS One*. 2015 May 1;10(5):e0123063.
111. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic features of the widespread plasmid coding for the carbapenemase OXA-48. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012 Jan;56(1):559-62.
112. Alenton L, Hsann MY, Tambyah P, Lin R, Ng KS, Rethanam S, Poh L, Soong SL, Pada SK. O048: OXA-181- carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae*: an emerging threat? The first reported nosocomial outbreak in Singapore. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013 Jun 20;2(Suppl 1):O48.
113. Dortet L, Poirel L, Al Yaqoubi F, Nordmann P. NDM-1, OXA-48 and OXA-181 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Sultanate of Oman. *Clin Microbiol Infect*. 2012 May;18(5):E144-8.
114. Oueslati S, Nordmann P, Poirel L. Heterogeneous hydrolytic features for OXA-48-like β-lactamases. *J Antimicrob Chemother*. 2015 Apr;70(4):1059-63.
115. Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM, Ecker DJ, Adams MD, Toltzis P, Dul MJ, Windau A, Bajaksouzian S, Jacobs MR, Salata RA, Bonomo RA. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute

care facilities on dissemination. *J Antimicrob Chemother*. 2010 Aug;65(8):1807-18.

116. Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004 Jan;48(1):15-22.
117. Nordmann P, Naas T, Poirel L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis*. 2011 Oct;17(10):1791-8.
118. Lyon JA. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intell Clin Pharm*. 1985;19(12):895-99.
119. Bou G, Oliver A, Martinez-Beltran J. OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenem activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000;44(6):1556-61.
120. Brown S, Young HK, Amyes SGB. Characterisation of OXA-51, a novel class D carbapenemase found in genetically unrelated clinical strains of *Acinetobacter baumannii* from Argentina. *Clin Microbiol Infect*. 2005;11(1):15-23.
121. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, Wichelhaus TA, Göttig S, Hunfeld KP, Seifert H, Witte W, Higgins PG. Molecular characterization of bla_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Sep;66(9):1998-2001.
122. Poirel L, Marque S, Heritier C, Segonds C, Chabanon G, Nordmann P. OXA-58, a novel class D β-lactamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(1):202–8.
123. Higgins PG, Poirel L, Lehmann M, Nordmann P, Seifert H. OXA-143, a novel carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009;53(12):5035-8.
124. Kim CK, Lee Y, Lee H, Woo GJ, Song W, Kim MN, Lee WG, Jeong SH, Lee K, Chong Y. Prevalence and diversity of carbapenemases among imipenem-nonsusceptible *Acinetobacter* isolates in Korea: emergence of a novel OXA-182. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2010 Dec;68(4):432-8.

125. Gonçalves D, Cecilio P, Ferreira H. First detection of OXA-48-like producing *Acinetobacter baumannii* in the faecal flora of nursing home residents in Northern Portugal. abstr eP748, In: 23rd Eur Congr. *Clin Microbiol Infect Dis*, Berlin, Germany, 2013.
126. Landman D, Bratu S, Quale J. Contribution of OmpK36 to carbapenems susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *J Med Microbiol.* 2009; 58: 1303-1308.
127. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 21th informational supplement, CLSI document M100-ED 30, Wayne, PA: CLSI, 2020.
128. EUCAST. EUCAST Guidelines for Detection of Resistance Mechanisms and Specific Resistances of Clinical and/or Epidemiological Importance. 2017; 4–11. Disponível em: http://www.eucast.org/resistance_mechanisms
129. Loli A, Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Carattoli A, Vatopoulos AC, Tassios PT, Miriagou V. Sources of diversity of carbapenem resistance levels in *Klebsiella pneumoniae* carrying $bla_{\text{VIM-1}}$. *J Antimicrob Chemother*. 2006 Sep;58(3):669-72.
130. Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother*. 2003 Mar;51(3):711-4.
131. Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Cantón R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo-beta-lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis*. 2007 Nov 1;45(9):1171-8.
132. Ikonomidis A, Ntokou E, Maniatis AN, Tsakris A, Pournaras S. Hidden VIM-1 metallo-beta-lactamase phenotypes among *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *J Clin Microbiol*. 2008 Jan;46(1):346-9.
133. He´ritier C, Poirel L, Lambert T, Nordmann P. Contribution of acquired carbapenem-hydrolyzing oxacillinases to carbapenem resistance in

Acinetobacter baumannii. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005; 49: 3198–3202.

134. Martins AF, Zavascki AP, Gaspareto PB, Barth AL. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallobeta-lactamases in hospitals from southern Brazil. *Infection.* 2007; 35: 457–460.
135. Clancy CJ, Chen L, Shields RK, Zhao Y, Cheng S, Chavda KD, Hao B, Hong JH, Doi Y, Kwak EJ, Silveira FP, Abdel-Massih R, Bogdanovich T, Humar A, Perlin DS, Kreiswirth BN, Hong Nguyen M. Epidemiology and molecular characterization of bacteremia due to carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in transplant recipients. *Am J Transplant*. 2013 Oct;13(10):2619-33.
136. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2009 Jun;47(6):1631-9.
137. Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, Warner M, Livermore DM. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents*. 2007 Apr; 29(4):456-9.
138. Codjoe, F.S.; Donkor, E.S. Carbapenem Resistance: A Review. *Med. Sci.* 2018, *6*, 1.
139. Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Daikos GL, Miriagou V, Petrikkos G, Legakis NJ, Vatopoulos AC. Discrepancies and interpretation problems in susceptibility testing of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol*. 2005 Jan;43(1):494-6.
140. 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.
141. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE Jr, Hanna B. Carbapenem

resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1209-13.

142. Bulik CC, Fauntleroy KA, Jenkins SG, Abuali M, LaBombardi VJ, Nicolau DP, Kuti JL. Comparison of meropenem MICs and susceptibilities for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates by various testing methods. *J Clin Microbiol*. 2010 Jul;48(7):2402-6.
143. 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.
144. Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol*. 2010 Aug;48(8):2999-3002.
145. Pitout JD, Gregson DB, Poirel L, McClure JA, Le P, Church DL. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* producing metallo-beta-lactamases in a large centralized laboratory. *J Clin Microbiol.* 2005; 43: 3129–3135.
146. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*. 2009 Apr;9(4):228-36.
147. Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE Jr, Hanna B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis*. 2006 Aug;12(8):1209-13.
148. Vading M, Samuelsen Ø, Haldorsen B, Sundsfjord AS, Giske CG. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. *Clin Microbiol Infect*. 2011 May;17(5):668-74.
149. Amjad A, Mirza Ia, Abbasi S, Farwa U, Malik N, Zia F. Teste de Hodge modificado: Um teste simples e eficaz para detecção de produção de carbapenemase. *Iran J Microbiol* . 2011; 3 (4): 189-193.

150. Carvalhaes 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Volume 65, Issue 2, February 2010, Pages 249–251.
151. Pasteran F, Gonzalez LJ, Albornoz E, Bahr G, Vila AJ, Corso A. Triton Hodge Test: Improved Protocol for Modified Hodge Test for Enhanced Detection of NDM and Other Carbapenemase Producers. *J Clin Microbiol.* 2016 Mar;54(3):640-9.
152. Cury AP, Andreazzi D, Maffucci M, Caiaffa-Junior HH, Rossi F. The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. *Clinics.* 2012; 67: 1427–1431.
153. Cury AP, Alemida Junior JN, Maffucci M, Caiaffa-Junior HH, Rossi F. Quantitative modified Hodge test (Q-MHT) interpretation for the detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in Enterobacteriaceae. Is that possible? In: 24th ESCMID, 2014. Barcelona, *Clinical Microbiology And Infection*. 2014.
154. Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo-β-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clinical microbiology and infection*. 2001 Feb 1;7(2):88-91.
155. Lee K, Lim YS, Yong D, Yum JH, Chong Y. Evaluation of the Hodge test and the imipenem-EDTA double-disk synergy test for differentiating metallo-β-lactamase-producing isolates of *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. *Journal of clinical microbiology*. 2003 Oct 1;41(10):4623-9.
156. Kimura S, Ishii Y, Yamaguchi K. Evaluation of dipicolinic acid for detection of IMP or VIM-type metallo-β-lactamase–producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2005 Nov 1;53(3):241-4.
157. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo-β-lactamase-producing gram-negative bacilli in the

clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2006 Sep 1;44(9):3139-44.

158. Galani I, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo-β-lactamase production in Enterobacteriaceae. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2008 Mar 1;61(3):548-53.
159. Walsh TR, Bolmström A, Qwärnström A, Gales A. Evaluation of a new Etest for detecting metallo-β-lactamases in routine clinical testing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002 Aug 1;40(8):2755-9.
160. Conseil A. Disponível em: http//:*www.biomerieux-diagnostics.com*
161. Shin KS, Son BR, Hong SB, Kim J. Dipicolinic acid-based disk methods for detection of metallo-β-lactamase–producing *Pseudomonas spp* and *Acinetobacter spp*. *Diagnostic microbiology and infectious disease*. 2008 Sep 1;62(1):102-5.
162. Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type β-lactamase by use of a boronic acid compound. *Journal of clinical microbiology*. 2008 Dec 1;46(12):4083-6.
163. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D, Pournaras S, Sofianou D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *Journal of clinical microbiology*. 2009 Feb 1;47(2):362-7.
164. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *Journal of clinical microbiology*. 2009 Jun 1;47(6):1631-9.
165. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vrioni G, Voulgari E, Koumaki V, Agodi A, Pournaras S, Sofianou D. Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of clinical microbiology*. 2011 Aug 1;49(8):2804-9.

166. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-β-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clinical microbiology and infection*. 2011 Apr 1;17(4):552-6.
167. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Petropoulou D, Sofianou D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-β-lactamases and class A KPC carbapenemases in Enterobacteriaceae clinical isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2010 Aug 1;65(8):1664-71.
168. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *Journal of antimicrobial chemotherapy*. 2010 Jul 1;65(7):1319-21.
169. van der Zwaluw K, de Haan A, Pluister GN, Bootsma HJ, de Neeling AJ, Schouls LM. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0123690.
170. Aguirre A, Gamal D, Cano ME, Calvo J, Martinez-Martinez L. apresentados no 26º Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas, Amsterdã, Holanda, de 9 a 12 de abril de 2016.
171. Willey BM, Rajadurai S, Grohn DN, Ioboni R, Trimi X, Ricci G, Lo P, Mazzulli T, Poutanen SM. apresentados no 26º Congresso Europeu de Microbiologia Clínica e Doenças Infecciosas, Amsterdã, Holanda, de 9 a 12 de abril de 2016.
172. Jing X, Zhou H, Min X, Zhang X, Yang Q, Du S, Li Y, Yu F, Jia M, Zhan Y, Zeng Y, Yang B, Pan Y, Lu B, Liu R, Zeng J. The Simplified Carbapenem Inactivation Method (sCIM) for Simple and Accurate Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacilli. *Front Microbiol*. 2018 Oct 30;9:2391.

173. Dortet L, Poirel L, Nordmann P. Rapid identification of carbapenemase types in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas spp* by using a biochemical test. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012 Dec;56(12):6437-40.
174. Dortet L, Bréchard L, Poirel L, Nordmann P. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from blood cultures. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):340-4.
175. Dortet L, Bréchard L, Poirel L, Nordmann P. Impact of the isolation medium for detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae using an updated version of the Carba NP test. *J Med Microbiol*. 2014 May;63(Pt 5):772-776
176. Bakour S, Garcia V, Loucif L, Brunel JM, Gharout-Sait A, Touati A, Rolain JM. Rapid identification of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* using a modified Carba NP test. *New Microbes New Infect*. 2015 Jul 10;7:89-93.
177. Campana EH, Chuster SG, da Silva IR, Paschoal RP, Bonelli RR, Moreira BM, Picão RC. Modified Carba NP test for the detection of carbapenemase production in gram-negative rods: optimized handling of multiple samples. *Braz J Microbiol*. 2017 Apr-Jun;48(2):242-245.
178. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec;51(12):4281-3.
179. Bassetti M, Ginocchio F, Mikulska M, Taramasso L, Giacobbe DR. Will new antimicrobials overcome resistance among Gram-negatives? Expert *Rev Anti Infect Ther*. 2011;9:909–22.
180. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory protocol for detection of carbapenem-resistant or carbapenemase-producing, *Klebsiella spp*. or *E. coli* from rectal swabs. Atlanta, GA: United States Department of Health and Human Services; 2009 [accessed 2016 Aug 20]. *https://www.cdc.gov/HAI/pdfs/labSettings/Klebsiella_or_Ecoli.pdf*
181. Lolans K, Calvert K, Won S, Clark J, Hayden MK. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella*

pneumoniae and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. *J Clin Microbiol.* 2010; 48:836-41.

182. Vrioni G, Daniil I, Voulgari E, Ranellou K, Koumaki V, Ghirardi S, Kimouli M, Zambardi G, Tsakris A. Comparative evaluation of a prototype chromogenic medium (ChromID CARBA) for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:1841-6.
183. Zarakolu P, Day KM, Sidjabat HE, Kamolvit W, Lanyon CV, Cummings SP, Paterson DL, Akova M, Perry JD. Evaluation of a new chromogenic medium, chromID OXA-48, for recovery of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae from patients at a university hospital in Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2015; 34:519-25.
184. 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; 46:3110-1.
185. Vasoo S, Lolans K, Li H, Prabaker K, Hayden MK. Comparison of the CHROMagar KPC, Remel Spectra CRE, and a direct ertapenem disk method for the detection of KPC-producing Enterobacteriaceae from perirectal swabs*. Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014; 78:356-9.
186. Viau R, Frank KM, Jacobs MR, Wilson B, Kaye K, Donskey CJ, Perez F, Endimiani A, Bonomo RA. Intestinal carriage of carbapenemase-producing organisms: Current status of surveillance methods. *Clin Microbiol Rev.* 2016; 29:1-27.
187. Simner PJ, Martin I, Opene B, Tamma PD, Carroll KC, Milstone AM. Evaluation of multiple methods for detection of gastrointestinal colonization of carbapenem-resistant organisms from rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2016; 54:1664-7.
188. Blackburn J, Tsimiklis C, Lavergne V, Pilotte J, Grenier S, Gilbert A, Lefebvre B, Domingo M-C, Tremblay C, Bourgault A-M, et al.. Carbapenem disks on MacConkey agar in screening methods for detection of carbapenem-resistant Gram-negative rods in stools. *J Clin Microbiol*. 2013; 51:331-3.

189. Adler A, Navon-Venezia S, Moran-Gilad J, Marcos E, Schwartz D, Carmeli Y. Laboratory and clinical evaluation of screening agar plates for detection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from surveillance rectal swabs. *J Clin Microbiol*. 2011; 49:2239-42.
190. Pournaras S, Zarkotou O, Poulou A, Kristo I, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, Tsakris A. A combined disk test for direct differentiation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in surveillance rectal swabs*. J Clin Microbiol*. 2013; 51:2986-90.
191. Papadimitriou-Olivgeris M, Bartzavali C, Christofidou M, Bereksi N, Hey J, Zambardi G, Spiliopoulou I. Performance of chromID(R) CARBA medium for carbapenemases-producing Enterobacteriaceae detection during rectal screening. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014; 33:35-40.
192. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:3877-80.
193. Singh K, Mangold KA, Wyant K, Schora DM, Voss B, Kaul KL, Hayden MK, Chundi V, Peterson LR. Rectal screening for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: comparison of real-time PCR and culture using two selective screening agar plates. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:2596-600.
194. Nijhuis R, Samuelsen O, Savelkoul P, van Zwet A. Evaluation of a new real-time PCR assay (Check-Direct CPE) for rapid detection of KPC, OXA-48, VIM, and NDM carbapenemases using spiked rectal swabs. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013; 77:316-20.
195. van der Zee A, Roorda L, Bosman G, Fluit AC, Hermans M, Smits PH, van der Zanden AG, Te Witt R, Bruijnesteijn van Coppenraet LE, Cohen Stuart J, et al.. Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. *BMC Infect Dis*. 2014; 14:27.
196. Garcia-Fernandez S, Morosini MI, Marco F, Gijon D, Vergara A, Vila J, Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Evaluation of the eazyplex(R) SuperBug CRE system for rapid detection of carbapenemases and ESBLs in clinical

Enterobacteriaceae isolates recovered at two Spanish hospitals. *J Antimicrob Chemother*. 2015; 70:1047-50.

197. Cuzon G, Naas T, Bogaerts P, Glupczynski Y, Nordmann P. Evaluation of a DNA microarray for the rapid detection of extended-spectrum β-lactamases (TEM, SHV and CTX-M), plasmid-mediated cephalosporinases (CMY-2-like, DHA, FOX, ACC-1, ACT/MIR and CMY-1-like/MOX) and carbapenemases (KPC, OXA-48, VIM, IMP and NDM). *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67:1865-9.
198. Schwaber MJ, Carmeli Y. An ongoing national intervention to contain the spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Clin Infect Dis*. 2014; 58:697-703.
199. Salomão MC, Guimarães T, Duailibi DF, Perondi MBM, Letaif LSH, Montal AC, Rossi F, Cury AP, Duarte AJS, Levin AS, Boszczowski I. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in patients admitted to the emergency department: prevalence, risk factors, and acquisition rate. *J Hosp Infect*. 2017 Nov;97(3):241-246.
200. Castanheira M, Sader HS, Jones RN. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing Enterobacteriaceae. *Microb. Drug Resist*. 2010; 16:61–65.
201. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother*. 2012; Apr;67(4):906-9.
202. Cepheid clinical *in vitro* diagnostic tests. Disponível em: *http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/clinical-ivd-tests/healthcare-associated-infections/xpert-carba-r.*
203. Centers for Disease Control and Prevention. Disponível em: *https://www.cdc.gov/hai/pdfs/labsettings/kpc-ndm-protocol-2011.pdf*
204. Sequências depositadas no *GeneBank.* Disponível em*: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi*
205. Larsen MV, Cosentino S, Rasmussen S, Friis C, Hasman H, Marvig RL, Jelsbak L, Sicheritz-Pontén T, Ussery DW, Aarestrup FM, Lund O.

Multilocus sequence typing of total-genome-sequenced bacteria. *J Clin Microbiol*. 2012 Apr; 50(4):1355-61.

206. Aziz RK, Bartels D, Best AA, DeJongh M, Disz T, Edwards RA, Formsma K, Gerdes S, Glass EM, Kubal M, Meyer F, Olsen GJ, Olson R, Osterman AL, Overbeek RA, McNeil LK, Paarmann D, Paczian T, Parrello B, Pusch GD, Reich C, Stevens R, Vassieva O, Vonstein V, Wilke A, Zagnitko O. The RAST Server: rapid annotations using subsystems technology. *BMC Genomics*. 2008 Feb 8;9:75.
207. Kleinheinz KA, Joensen KG, Larsen MV. Applying the ResFinder and VirulenceFinder web-services for easy identification of acquired antibiotic resistance and *E. coli* virulence genes in bacteriophage and prophage nucleotide sequences. *Bacteriophage*. 2014 Jan 1;4(1):e27943.
208. Durmaz R, Otlu B, Koksal F, Hosoglu S, Ozturk R, Ersoy Y, Aktas E, Gursoy NC, Caliskan A. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii, Escherichia coli* and *Klebsiella spp*. *Jpn J Infect Dis*. 2009 Sep;62(5):372-7.
209. Seifert H, Dolzani L, Bressan R, van der Reijden T, van Strijen B, Stefanik D, Heersma H, Dijkshoorn L. Standardization and interlaboratory reproducibility assessment of pulsed-field gel electrophoresis-generated fingerprints of *Acinetobacter baumannii. J Clin Microbiol*. 2005 Sep;43(9):4328-35.
210. PCR em tempo real. Disponível em: *http://www.bd.com/scripts*
211. Freire MP, de Oliveira Garcia D, Cury AP, Spadão F, Di Gioia TS, Francisco GR, Bueno MF, Tomaz M, de Paula FJ, de Faro LB, Piovesan AC, Rossi F, Levin AS, David Neto E, Nahas WC, Pierrotti LC. Outbreak of IMP-producing carbapenem-resistant *Enterobacter gergoviae* among kidney transplant recipients. *J Antimicrob Chemother*. 2016 Sep;71(9):2577-85.
212. Cury AP, Maffucci M, Domingos CEB, Carmo DB, di Gioia, TSR, Almeida Junior JN, Caiaffa Junior HH, Rossi F. Ocorrência de Enterobacterias não *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC e correlação com teste de

Hodge modificado quantitativo. 9º Congresso Paulista de Infectologia; 2014; São Paulo.

213. Bassetti M, Peghin M. How to manage KPC infections. *Ther Adv Infect Dis*. 2020 May 14;7 :2049936120912049.
214. Solgi H, Badmasti F, Aminzadeh Z, Giske CG, Pourahmad M, Vaziri F, Havaei SA, Shahcheraghi F. Molecular characterization of intestinal carriage of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae among inpatients at two Iranian university hospitals: first report of co-production of bla_{NDM-7} and bla_{OXA-48}. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2017 Nov;36(11):2127-2135.
215. Moubareck CA, Hammoudi Halat D, Sartawi M, Lawlor K, Sarkis DK, Alatoom A. Assessment of the performance of CHROMagar KPC and Xpert Carba-R assay for the detection of carbapenem-resistant bacteria in rectal swabs: First comparative study from Abu Dhabi, United Arab Emirates. *J Glob Antimicrob Resist*. 2020 Mar;20:147-152.
216. Nordmann P, Poirel L. Epidemiology and Diagnostics of Carbapenem Resistance in Gram-negative Bacteria. *Clin Infect Dis*. 2019 Nov 13;69(Suppl 7):S521-S528.
217. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum β-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a university hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Apr;20(4):350-4.
218. Verification of Qualitative Real-Time PCR Methods. Measure twice, cut once accuracy. Flu Season 2011—2012. Disponível em: *http://www.ahsoman.com/documents/catelogue/12.pdf*
219. Tato M, Ruiz-Garbajosa P, Traczewski M, Dodgson A, McEwan A, Humphries R, Hindler J, Veltman J, Wang H, Cantón R. Multisite evaluation of cepheid xpert carba-R assay for detection of carbapenemase-producing organisms in rectal swabs. *J Clin Microbiol.* 2016; 54:1814-9.
220. Moore NM, Cantón R, Carretto E, Peterson LR, Sautter RL, Traczewski MM; Carba-R Study Team. Rapid Identification of Five Classes of

Carbapenem Resistance Genes Directly from Rectal Swabs by Use of the Xpert Carba-R Assay. *J Clin Microbiol*. 2017 Jul;55(7):2268-2275.

221. Burd ME. Validation of laboratory-developed molecular assays for infectious diseases. *Clinical microbiology reviews.* 2010 23.3: 550-576.
222. Traczewski MM, Carretto E, Canton R, Moore NM; Carba-R Study Team. Multicenter Evaluation of the Xpert Carba-R Assay for Detection of Carbapenemase Genes in Gram-Negative Isolates. *J Clin Microbiol*. 2018 Jul 26;56(8):e00272-18.
223. Lau AF, Fahle GA, Kemp MA, Jassem AN, Dekker JP, Frank KM. Clinical Performance of Check-Direct CPE, a Multiplex PCR for Direct Detection of bla_{KPC}, bla_{NDM} and/or bla_{VIM}, and bla_{OXA-48} from Perirectal *Swabs*. *J Clin Microbiol*. 2015 Dec;53(12):3729-37.
224. Cepheid clinical *in vitro* diagnostic tests. Disponível em: *https://www.cepheid.com/Xpert-Carba-R-Rx-Only-US-IVD-PORTUGUESE-Package-Insert-301-2438-PT-Rev-F.pdf*
225. Chiu SK, Ma L, Chan MC, Lin YT, Fung CP, Wu TL, Chuang YC, Lu PL, Wang JT, Lin JC, Yeh KM. Carbapenem Nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan: Dissemination and Increasing Resistance of Carbapenemase Producers During 2012-2015. *Sci Rep*. 2018 May 31;8(1):8468.
226. Galler H, Feierl G, Petternel C, Reinthaler FF, Haas D, Grisold AJ, Luxner J, Zarfel G. KPC-2 and OXA-48 carbapenemase-harbouring Enterobacteriaceae detected in an Austrian wastewater treatment plant. *Clin Microbiol Infect*. 2014 Feb;20(2):O132-4.
227. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):3877-80
228. Yee R, Dien Bard J, Simner PJ. The Genotype-to-Phenotype Dilemma: How Should Laboratories Approach Discordant Susceptibility Results? *J Clin Microbiol*. 2021 May 19;59(6):e00138-20.

229. Cury AP, Girardello R, Duarte AJDS, Rossi F. KPC-producing Enterobacterales with uncommon carbapenem susceptibility profile in Vitek 2 system. *Int J Infect Dis*. 2020 Apr;93:118-120.
230. 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.
231. Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado Ade O, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae isolated in Brazilian hospitals. Antimicrob Agents Chemother. 2012 Aug;56(8):4563-4; author reply 4565.
232. 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 bla_{KPC-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.
233. Vehreschild MJ, Hamprecht A, Peterson L, Schubert S, Häntschel M, Peter S, Schafhausen P, Rohde H, Lilienfeld-Toal MV, Bekeredjian-Ding I, Libam J, Hellmich M, Vehreschild JJ, Cornely OA, Seifert H. A multicentre cohort study on colonization and infection with ESBL-producing Enterobacteriaceae in high-risk patients with haematological malignancies. *J Antimicrob Chemother*. 2014 Dec;69(12):3387-92.
234. Alevizakos M, Karanika S, Detsis M, Mylonakis E. Colonisation with extended-spectrum β-lactamase-producing Enterobacteriaceae and risk for infection among patients with solid or haematological malignancy: a systematic review and meta-analysis. *Int J Antimicrob Agents*. 2016 Dec;48(6):647-654.
235. Liss BJ, Vehreschild JJ, Cornely OA, Hallek M, Fätkenheuer G, Wisplinghoff H, Seifert H, Vehreschild MJ. Intestinal colonisation and blood stream infections due to vancomycin-resistant enterococci (VRE) and

extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae (ESBLE) in patients with haematological and oncological malignancies. *Infection*. 2012 Dec;40(6):613-9.

236. Elhani D, Bakir L, Aouni M, Passet V, Arlet G, Brisse S, Weill FX. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiella pneumoniae strains in a university hospital in Tunis, Tunisia, 1999-2005. *Clin Microbiol Infect*. 2010 Feb;16(2):157-64.
237. Robin F, Beyrouthy R, Bonacorsi S, Aissa N, Bret L, Brieu N, Cattoir V, Chapuis A, Chardon H, Degand N, Doucet-Populaire F, Dubois V, Fortineau N, Grillon A, Lanotte P, Leyssene D, Patry I, Podglajen I, Recule C, Ros A, Colomb-Cotinat M, Ponties V, Ploy MC, Bonnet R. Inventory of Extended-Spectrum-β-Lactamase-Production Enterobacteriaceae na França como avaliado por um estudo multicêntrico. *Antimicrob Agents Chemother*. 23 de fevereiro de 2017; 61 (3): e01911-16.
238. Rodrigues C, Machado E, Ramos H, Peixe L, Novais Â. Expansion of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients: a successful story of international clones (ST15, ST147, ST336) and epidemic plasmids (IncR, IncFIIK). *Int J Med Microbiol*. 2014 Nov;304(8):1100-8.
239. Bevan ER, Jones AM, Hawkey PM. Global epidemiology of CTX-M β-lactamases: temporal and geographical shifts in genotype. *J Antimicrob Chemother*. 2017 Aug 1;72(8):2145-2155.
240. Lerner A, Adler A, Abu-Hanna J, Cohen Percia S, Kazma Matalon M, Carmeli Y. Spread of KPC-producing carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: the importance of super-spreaders and rectal KPC concentration. *Clin Microbiol Infect*. 2015 May;21(5):470.e1-7.
241. Conlan S, Park M, Deming C, Thomas PJ, Young AC, Coleman H, Sison C; NISC Comparative Sequencing Program, Weingarten RA, Lau AF, Dekker JP, Palmore TN, Frank KM, Segre JA. Plasmid Dynamics in KPC-Positive *Klebsiella pneumoniae* during Long-Term Patient Colonization. mBio. 2016 Jun 28;7(3):e00742-16.

242. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*$_{KPC}$ gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55:5370-3.
243. Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol*. 2006 Sep;14(9):413-20.
244. 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.
245. Richter SS, Marchaim D. Screening for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: Who, When, and How? *Virulence*. 2017 May 19;8(4):417-426.