

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LAVINIA NERY VILLA STANGLER AREND

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FENOTÍPICA E EPIDEMIOLÓGICA DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CARBAPENEMASE KPC ISOLADOS NO ESTADO DO PARANÁ.

CURITIBA

2014

LAVINIA NERY VILLA STANGLER AREND

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FENOTÍPICA E EPIDEMIOLÓGICA DE MICRO-ORGANISMOS PRODUTORES DE CARBAPENEMASE KPC ISOLADOS NO ESTADO DO PARANÁ.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Interna, Área de Concentração em Doenças Infecciosas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção de título de Mestre.

Orientador: Dr. Felipe F. Tuon

Co-orientadora: Dra Sueli M. Nakatani

CURITIBA

2014



Ministério da Educação  
Universidade Federal do Paraná  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA  
= MESTRADO e DOUTORADO =

## PARECER

Aos vinte e sete dias do mês de junho do ano de dois mil e quatorze, a banca examinadora constituída pelos Professores: Dra. Laura Lúcia Cogo (UNIBRASIL), Professora Dra. Libera Maria Dalla Costa (UFPR) e Professor Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon - (UFPR) Orientador, exarou o presente parecer sobre a dissertação elaborada por LAVINIA NERY VILLA STANGLER AREND, aluna concluinte do **Programa de Pós-Graduação em Medicina Interna - Mestrado da Universidade Federal do Paraná**, intitulada: **"CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR, FENOTÍPICA E EPIDEMIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS PRODUTORES DE CARBAPENEMASE blaKPC ISOLADOS NO ESTADO DO PARANÁ"**. A Banca examinadora considerou que a aluna apresentou trabalho adequado para dissertação e o defendeu com segurança e propriedade nas arguições que lhe foram feitas de modo a merecer a sua **aprovação**, sendo recomendado à Universidade Federal do Paraná que lhe seja concedido o título de **Mestre em Medicina Interna**, e a publicação de artigo em revista técnico-científica com corpo editorial, depois de incorporadas as sugestões apresentadas no decurso das arguições, cumpridas outras exigências previstas em normativas da pós-graduação.

Professora Dra. Laura Lúcia Cogo

Professora Dra. Libera Maria Dalla Costa

Professor Dr. Felipe Francisco Bondan Tuon

## **AGRADECIMENTOS**

*Agradeço aos amigos e colegas do Laboratório Central do Estado do Paraná, aos amigos do Núcleo de Estudos em Bacteriologia NEBaC. Ao meu orientador Felipe Francisco Tuon pela sua disponibilidade, paciência e força de vontade, à minha co-orientadora Sueli Massumi Nakatani e à amiga Irina Riediger por terem me ensinado a beleza da Biologia Molecular. Às diretoras do Laboratório Central do Estado Célia Fagundes da Cruz e Elizabeth el Hajjar Droppa pelo apoio. À Maria do Carmo Debur Rossa e Paula Virginia Michelin Toledo por me incentivarem e ajudarem a trilhar este caminho . Aos colegas da Bacteriologia Marcelo Pilonetto, Christian de Alencar Siebra , Karin Obladen Kalluff, Vera Lucia Mocelin pela ajuda tão necessária à conclusão deste trabalho. À Gislene Botão Kussen por ser amiga de todas as horas, à Libera Maria DallaCosta por ter acreditado que um dia eu poderia ser uma boa microbiologista.*

## DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho aos meus pais Virginia e Gelson, que sempre me amaram e incentivaram a estudar e correr atrás dos meus sonhos. Ao meu marido Konrahd e filhinha Ana Maria pelo apoio e a paciência e por me darem o tempo, esse bem tão precioso, que seria seu por direito. Á Maria Eduarda, que ainda não nasceu e já está em nossos pensamentos. Á minha irmã e melhor amiga Letícia e á Amanda por sempre estarem ao meu lado.*

## EPÍGRAFE

*“Yes, how many times must a man look up  
Before he can see the sky ?  
Yes, how many ears must one man have  
Before he can hear people cry ?  
Yes, how many deaths will it take till he knows  
That too many people have died ?  
The answer my friend is blowing in the wind  
The answer is blowing in the wind.”*

Bob Dylan

## RESUMO

A disseminação de micro-organismos resistentes, produtores de KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é um problema de saúde pública emergente. A disseminação rápida e a crescente lista de patógenos em qual o gene *bla*<sub>KPC</sub> é devida a presença do gene em um elemento móvel, denominado transposon, Tn4401. Este estudo teve como objetivo avaliar as características dos isolados suspeitos de produção de carbapenemase KPC e realizar a caracterização epidemiológica, fenotípica e genotípica dos isolados enviados de outubro de 2009 a maio de 2012. De um total de 1028 isolados analisados, foram encontrados 770 positivos para KPC (75%) e 258 foram negativas (25%). A maioria das amostras recebidas foram de swab de vigilância 334 (32%), seguidas de amostras de urina 232 (22%), amostras respiratórias 134 (13%), sangue 99 (10%) dentre outras menos prevalentes. Para a determinação dos perfis clonais foi utilizada a técnica do repPCR e para a determinação da variante KPC foi realizado sequenciamento do gene da enzima. Foi avaliado também o valor da técnica fenotípica do teste de Hodge modificado em comparação com o padrão ouro PCR em tempo real. A tipagem molecular da enzima KPC foi compatível com a variante KPC-2, uma variante frequentemente reportada nas Américas. A análise dos perfis clonais pelo Diversilab mostrou 8 perfis clonais com 2 predominantes para o micro-organismo *Klebsiella pneumoniae*, 7 perfis clonais para *Enterobacter spp* com um predominante. Não foi observada clonalidade para os isolados de *Escherichia coli*, sugerindo que esta pode ter recebido o transposon Tn4401 por conjugação. A sensibilidade e especificidade do teste de Hodge modificado para a detecção de KPC utilizando ertapenem e meropenem como substratos foram 99,61% e 97,83% respectivamente. Este estudo mostrou que a técnica do teste de Hodge é sensível e específica e pode ser utilizada para a detecção de KPC quando esta enzima é endêmica e outras carbapenemases não são prevalentes por ser acessível a qualquer laboratório e de fácil realização pelos laboratórios clínicos.

**Palavras chave:** KPC, carbapenêmicos, epidemiologia.

## ABSTRACT

The spread of carbapenem-resistant microorganisms harboring KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) carbapenemase is an emerging public health threat. The rapid spread and growing list of pathogens in which gene *bla*<sub>KPC</sub> is reported is due to its carriage in a mobile element, a transposon, called *Tn4401*. This study aims to evaluate the characteristics of isolates suspected of harboring KPC carbapenemase and perform molecular and phenotypic characterization of these bacterial isolates. The period of analysis was from October 2009 to May 2012. An amount of 1028 isolates analyzed, 770 were KPC producing (75%) and 258 were not KPC producing (25%). Isolates were recovered mostly of vigilance swabs 334 (32%), followed by urinary samples 232 (22%), respiratory tract 134 (13%) and blood 99 (10%) among others less prevalent. We used repPCR for determination of clonal profiles, sequence the enzyme gene for detection of KPC's variant. We also evaluate the value of phenotypic technique modified Hodge test by comparing it to the gold standard technique PCR. Molecular typing of KPC enzyme was compatible with KPC-2 gene, a variant frequently reported in Americas. Cluster analysis from Diversilab fingerprints showed 8 clonal profiles with 2 predominant for *Klebsiella pneumoniae*, 7 clonal profiles for *Enterobacter* spp with one predominant. No clonal similarity was observed in *Escherichia coli*, suggesting that it may have received transposon *Tn4401* through conjugation. The sensitivity and specificity of modified Hodge test for the detection of KPC, when using ertapenem and meropenem, were respectively 99.61% and 97.83%. This study showed that MHT technique is highly sensitive for detecting KPC producers when this enzyme is endemic, and has its value for being affordable and easy to perform by clinical laboratories.

**Keywords:** KPC, carbapenem, epidemiology

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS.....	17
FIGURA 2 - AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	21
FIGURA 3 - EVOLUÇÃO DOS GENÓTIPOS DE blaKPC.....	30
FIGURA 4 - TRANSPOSON Tn 4401 .....	30
FIGURA 5 - PCR EM TEMPO REAL.....	36
FIGURA 6 - TESTE DE HODGE MODIFICADO .....	43
FIGURA 7 – DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de <i>Klebsiella pneumoniae</i> KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab. ....	54
FIGURA 10 - OCORRÊNCIA DE KPC POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ .....	55
FIGURA 8 - DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de <i>Escherichia coli</i> KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab. ....	56
FIGURA 9 - DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de <i>Enterobacter spp.</i> KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab. ....	57

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	19
TABELA 2 - GENÓTIPOS <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	28
TABELA 3 - MATERIAIS CLÍNICOS FONTE DOS ISOLADOS .....	49

## LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1 - MATERIAIS RECEBIDOS .....	50
GRÁFICO 2 - AMOSTRAS RECEBIDAS NO PERÍODO DE 2009 A 2012 .....	51
GRÁFICO 3 - PREVALÊNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS .....	52

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	17
3.1	ANTIBIÓTICOS BETA-LACTAMICOS.....	17
3.2	DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE BETA-LACTAMASES.....	17
3.3	AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES.....	20
3.4	CARBAPENEMASES E TIPOS .....	21
3.4.1	Classificação das carbapenemases .....	22
3.4.1.1	Carbapenemases classe A .....	22
3.4.1.2	Carbapenemases classe A cromossomais SME, NMC e IMI.....	22
3.4.1.3	Carbapenemases classe A plasmidiais KPC e GES.....	23
3.4.1.4	Carbapenemases classe B – metalo-beta-lactamases .....	24
3.4.1.5	Metal- beta-lactamases cromossomais .....	24
3.4.1.6	Metal- beta-lactamases plasmidiais IMP, VIM, GIM, SIM, SPM, NDM..	25
3.4.1.7	Carbapenemases classe D – Oxacilinas .....	26
3.5	KPC – <i>Klebsiella pneumoniae</i> CARBAPENEMASE .....	27
3.5.1	Testes fenotípicos .....	31
3.5.1.1	Teste de Hodge modificado .....	31
3.5.1.2	Teste de inibição pelo ácido borônico .....	32
3.5.1.3	Detecção da resistência por métodos automatizados .....	33
3.5.1.4	Testes epsilométricos.....	33
3.5.1.5	Método de Kirby Bauer.....	34
3.5.2	Testes moleculares .....	34
3.6	SIMILARIDADE GENÉTICA .....	36
3.6.1	RepPCR .....	37
3.6.2	Epidemiologia molecular .....	37
3.7	TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR KPC .....	38
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	41
4.1	AMOSTRAS CLÍNICAS.....	41
4.2	CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA.....	41

4.2.1	Identificação e teste de suscetibilidade antimicrobiana .....	41
4.2.2	Teste de Hodge modificado .....	42
4.3	CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA .....	43
4.3.1	IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	43
4.3.2	Sequenciamento para tipificação da <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	44
4.3.3	RepPCR .....	46
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	49
5.1	CONFIRMAÇÃO DE PRODUÇÃO DE <i>bla<sub>KPC</sub></i> EM AMOSTRAS RECEBIDAS 49	
5.2	ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TESTE DE HODGE MODIFICADO (THM) COMO TESTE DE TRIAGEM DE KPC .....	52
5.3	RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE .....	53
5.4	EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR POR repPCR.....	54
6	<b>CONCLUSÃO</b> .....	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	<b>ARTIGO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os antibióticos carbapenêmicos são uma classe muito importante para a terapêutica dos micro-organismos multiresistentes, particularmente os produtores de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), para os quais estas drogas são os antibióticos de escolha. (CHEN, 2012) As enzimas carbapenemases ocorriam em certos micro-organismos cromossomalmente, o que não possibilitou grande disseminação deste tipo de resistência. (QUEENAN, 2005) A partir de 2001, uma nova classe de carbapenemase foi descrita, chamada *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), incidente principalmente em *Klebsiella pneumoniae* e enterobactérias (YIGIT, 2001). Este tipo de resistência está presente em um elemento genético móvel, o que possibilitou uma rápida disseminação no mundo todo (Endiamini, 2005).

Diante da crescente resistência aos antimicrobianos e a diminuição do arsenal terapêutico disponível, é necessário o conhecimento destas bactérias que causam surtos para que se busquem alternativas válidas para a resolução do problema (ENDIMIANI; DEPASQUALE; *et al.* , 2009). Aliado a isso vem a necessidade de otimizar os recursos diagnósticos disponíveis, uma vez que os métodos chamados padrão ouro podem ser de alto custo e demorados, além de não se encontrarem disponíveis para o laboratório de microbiologia clínica presente em hospitais (NORDMANN *et al.* , 2009).

*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é uma beta-lactamase que confere resistência a todos os beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos (YIGIT *et al.* , 2008). A mortalidade das infecções causadas por micro-organismos produtores de KPC é torno de 50%, embora alguns dos isolados mostre sensibilidade aos carbapenêmicos, o significado clínico deste fenômeno ainda está em estudo. A terapêutica para tratamento está relacionado a associação de drogas como a tigeciclina e a polimixina, além dos carbapenêmicos e aminoglicosídeos, fato que eleva os custos hospitalares (QURESHI *et al.* , 2012).

O gene responsável pela produção da KPC é denominado de *bla*<sub>KPC</sub> e está presente em um elemento móvel caracterizado por apresentar alto nível de transmissão (*transposon*), motivo pelo qual a carbapenemase do tipo KPC possui

grande importância epidemiológica (KITCHEL *et al.* , 2009). Outra preocupação relacionada aos transposons se dá pelo fato de ocorrer transmissão do gene para outros micro-organismos bacterianos, e não apenas entre *Klebsiella pneumoniae*, como *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Citrobacter* e para diversos bacilos Gram-negativos (NAAS *et al.* , 2008). Micro-organismos produtores de KPC são predominantemente isolados de *Klebsiella pneumoniae*, embora a presença de KPC tenha sido descrita também em *Enterobacter spp*, *Citrobacter spp*, *Proteus sp*, *Serratia sp*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (BRATU *et al.* , 2007 ;CAI *et al.* , 2008; D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF *et al.* , 2010 , NORDMANN *et al.* , 2009 e CHEN, 2012).

Os primeiros relatos do seu aparecimento foram descritos nos Estados Unidos em 2001 (YIGIT *et al.* ,2001) Micro-organismos produtores da carbapenemase KPC foram isolados em diversos países de todos os continentes (BRATU *et al.* , 2007; LEAVITT *et al.* , 2010; VILLEGAS, M. V. *et al.* ,2006 e WOODFORD *et al.* , 2008).

Monteiro *et al.* (2009) relataram em janeiro de 2009, 4 casos de pacientes com infecção por *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC isolados em 2006 (MONTEIRO *et al.* , 2009). A presença de *bla*<sub>KPC</sub> no Brasil é descrita desde 2005, apesar da publicação ter acontecido em junho de 2009 (PAVEZ *et al.* , 2009). Desde então, vários casos foram relatados em diversos estados do país, como Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Pernambuco e Paraíba (PEIRANO *et al.* ,2009 ; FEHLBERG, 2012; CABRAL, 2012).

Nos últimos anos ocorreu um aumento significativo de infecções por bactérias produtoras de KPC, o que contribuiu para um sério problema da saúde pública, uma vez que as opções terapêuticas para o tratamento destes micro-organismos são escassas (NORDMANN *et al.* , 2009 e ROSSI, 2011). Com a escassez de tratamento, o aumento do consumo de antibióticos tem elevado os custos nos hospitais e a alta mortalidade atribuída a estas bactérias tem se tornado um problema nos países em desenvolvimento, como o Brasil (QURESHI *et al.* , 2012).

Além das questões clínicas e epidemiológicas, KPC é reportada como uma carbapenemase de difícil detecção fenotípica, pois a sua detecção não é segura,

mesmo por métodos automatizados de suscetibilidade antimicrobiana, usados em um grande número de hospitais. Este fato tem exigido a necessidade de outros métodos práticos e acessíveis para a sua identificação (QUEENAN; BUSH, 2007).

A metodologia recomendada pelo CLSI desde 2009 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para a controle e confirmação da presença de carbapenemases tipo KPC é o teste de Hodge modificado, que prediz a produção de KPC, com sensibilidade e especificidade superior a 90% (“Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement,” 2011). Para a confirmação do gene *bla*<sub>KPC</sub> são necessários testes moleculares, uma vez que o teste de Hodge prediz apenas a presença de enzima carbapenemase, que pode ser de outras classes, como as metalo-beta-lactamases (QUEENAN; BUSH, 2007).

Técnicas como o teste de Hodge modificado são facilmente realizados pelos laboratórios para a detecção de carbapenemases em espécimes de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, porém estudos apresentam resultados conflitantes (CARVALHAES *et al.*, 2010). Diante disto há a necessidade de se avaliar os métodos mais comumente utilizados na rotina comparando-os com os padrão ouro. O conhecimento da epidemiologia, tipificação do gene da enzima da carbapenemase e verificação da variabilidade genética dos micro-organismos são importantes para caracterizar e colocar o controle de infecção em um contexto global, além de permitir o rastreamento epidemiológico das infecções relacionadas à atividade em saúde e implementar políticas públicas de tratamento e controle de infecção.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é realizar a caracterização epidemiológica, fenotípica e genotípica de isolados suspeitos de serem produtores de KPC enviados por 48 hospitais do Estado do Paraná para confirmação da produção de *bla*<sub>KPC</sub> no período de janeiro de 2009 a maio de 2012.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Confirmar a presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> por PCR (reação em cadeia da polimerase) em tempo real em isolados suspeitos de serem produtores de carbapenemase enviados ao Laboratório Central do Estado, LACEN-PR.
- Realizar o sequenciamento do gene *bla*<sub>KPC</sub> para a determinação da sua variante.
- Realizar a avaliação da epidemiologia molecular dos isolados produtores de carbapenemase KPC pelo método do repPCR.
- Determinar a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e negativo do teste de Hodge modificado para a detecção de bactérias produtoras de KPC.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

Os antibióticos beta-lactâmicos, (FIGURA 1) que incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos, inibem a transpeptidase D-ala-D-ala e a atividade de carboxipeptidase das enzimas de síntese de parede celular. Essas enzimas, também chamadas de PBPs (do inglês *penicillin-binding-proteins*), são responsáveis por fazer a ligação cruzada entre componentes da parede celular, constituída basicamente pelo peptideoglicano. Se a ligação cruzada entre os peptideoglicanos não é realizada, é iniciado um processo de lise por autolisinas que o clivam, causando a morte da célula (LIVERMORE, 2006).

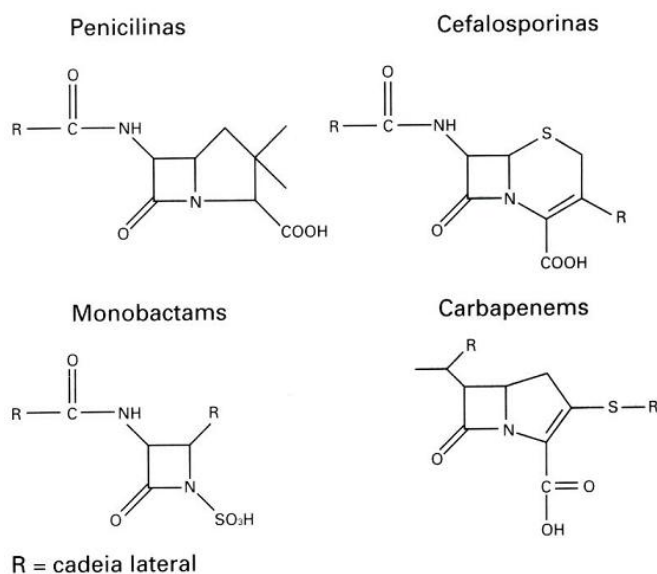


FIGURA1 - ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

FONTE: WILLIAMS ( 1999)

#### 3.2 DEFINIÇÃO E CLASSIFICAÇÃO DE BETA-LACTAMASES

Beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar amidas, amidinas ou outras pontes C-N, quebrando o anel beta-lactâmico. A produção de beta-lactamases é a forma de resistência mais comum aos antibióticos beta-lactâmicos e tem sido alvo de extensa pesquisa microbiológica, bioquímica e genética (BUSH et

al. ,1995; LIVERMORE 1995). As beta-lactamases podem ser endógenas e ocorrerem em toda uma espécie ou podem estar presentes em elementos móveis dentro de plasmídeos (LIVERMORE, 2006). Estas enzimas parecem ocorrer somente em bactérias, com a função de proteger a célula contra os antibióticos beta-lactâmicos. As beta-lactamases são amplamente distribuídas entre as bactérias, podendo ocorrer tanto em bactérias gram-positivas quanto em bactérias gram-negativas. Elas são produzidas em altas concentrações por bactérias gram-positivas, como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*. Em gram-negativos a quantidade de enzima produzida é bem menor que em gram-positivos, porém a sua localização no espaço periplasmático traz grande vantagem a estes micro-organismos pois nele há uma maior concentração da enzima, melhorando sua performance (AMBLER ,1980).

A classificação das beta-lactamases é baseada em duas características: funcional e molecular. Inicialmente, a classificação das beta-lactamases foi baseada unicamente de acordo com seu espectro de ação, sua susceptibilidade a inibidores de beta-lactamases ou ainda se sua localização era plasmidial ou cromossomal ( LIVERMORE,1995). Os primeiros trabalhos com beta-lactamases tentavam classificá-las por métodos bioquímicos, isolando-se a proteína e analisando as suas propriedades, como ponto isoelétrico e características de inibição. As taxas de hidrólise para vários substratos e reação a inibidores permitiam a classificação da nova enzima (JACK; RICHMOND, 1970, QUEENAN; BUSH, KAREN, 2007 , RICHMOND; SYKES 1973).

A primeira tentativa de classificação funcional das beta-lactamases foi proposta Fleming e separava as enzimas com alta afinidade por cefalosporinas das que apresentavam afinidade por penicilinas (RICHMOND, 1970). As classificações propostas a seguir foram a de Sawai em 1968, que descrevia as penicilinases e cefalosporinases usando anti-soros como agente discriminador, a de Jack Richmond em 1970 e a de Richmond e Sykes em 1973 que descrevia todas as beta-lactamases conhecidas na época, classificando-as em 5 grupos de acordo com seus substratos (RICHMOND,1970 ,RICHMOND; SYKES, 1973). Esta classificação foi estendida posteriormente por Sykes e Matthew em 1976 e trazia ênfase em beta-lactamases transmitidas por plasmídeos que eram diferenciadas através de seu ponto isoelétrico (SYKES; MATTHEW, 1976). Em 1981 um esquema foi proposto por Mitsuhashi e Inoue, que incluía a categoria “cefuroximase” na classificação de

“penicilinas e cefalosporinas” (YOTSUJI *et al.* , 1988). Uma reorganização foi proposta por Bush em 1989 e revisada em 1995 e foram as primeiras que buscavam correlacionar substratos e inibidores. (BUSH,1989; BUSH *et al.* ,1995) As classificações fenotípicas apresentam o problema de que uma simples mutação de ponto pode interferir na especificidade de ligação ao substrato e também em sua suscetibilidade aos inibidores, como o ácido clavulânico, por este motivo a classificação molecular é considerada mais confiável ( LIVERMORE, 1995).

A classificação funcional de Bush, de 1995, separa as beta-lactamases em 4 grupos, de acordo com seus substratos e inibidores. O grupo 1 é composto por beta-lactamases que não sofrem inibição completa pelo ácido clavulânico, grupo 2 composto pelas penicilinas, cefalosporinas, e beta-lactamases de espectro estendido as quais são inibidas por inibidores de beta-lactamase e o grupo 3, das metalo-beta-lactamases que são fracamente inibidas por inibidores de beta-lactamases (BUSH *et al.* ,1995).

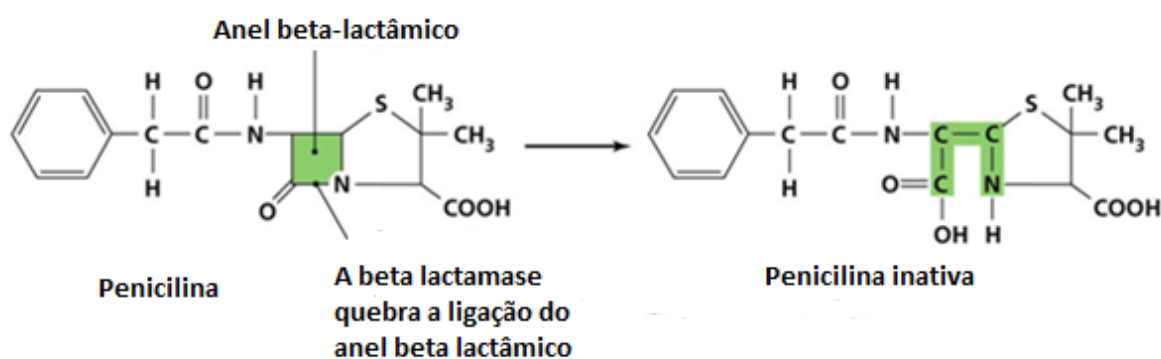
Ambler propôs em 1980 uma classificação baseada em sequenciamento nucleotídico. Esta reconheceu 4 classes, de A a D. As classes A,C e D são compostas por serina beta-lactamases e a classe B por metalo-beta-lactamases que possuem o íon zinco em seu sítio ativo (AMBLER 1980). Existe uma boa correlação entre as classificações de Ambler e Bush, sendo as duas amplamente utilizadas até os dias atuais (TABELA 1) (LIVERMORE, D M 1995).

Classe Funcional	Classe molecular	Substrato preferido	Inibido por		Enzimas
			AC	EDTA	
1	C	Cefalosporinas	-	-	AmpC
2a	A	Penicilinas	+	-	Penicilinases gram positivas
2b	A	Penicilinas; Cefalosporinas	+	-	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	A	Penicilinas; Cefalosporinas amplo espectro; Monobactâmicos	+	-	TEM-3, TEM-26, SHV-2, SHV-6 K1 de <i>Klebsiella oxytoca</i>
2br	A	Penicilinas	±	-	TEM-30, TEM-36, TRC-1
2c	A	Penicilinas; Carbapenêmicos	+	-	PSE-1, PSE-3, PSE-4
2d	D	Penicilinas; Cloxacilina	±	-	OXA-1 a OXA-11 e PSE-1
2e	A	Cefalosporinas	+	-	Cefalosporinase induzível de <i>Proteus vulgaris</i>
2f	A	Penicilinas; Cefalosporinas; Carbapenêmicos	+	-	NMCA-1, SMC-1
3	B	Todos os beta-lactâmicos	-	+	L-1, CcrA
4	?	Penicilinas	-	?	Penicilinases de <i>Burkholderia cepacia</i>

FONTE: BUSH, JACOBY, & MEDEIROS, 1995

### 3.3 AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES

De uma forma geral a ação das beta-lactamases se resume basicamente à seguinte reação: a beta-lactamase cliva o anel beta lactâmico ligando-se não covalentemente ao anel beta-lactâmico formando o complexo de Michaelis, em seguida, este é atacado pela hidroxila livre no local onde o resíduo de serina está presente no sítio ativo da enzima, formando uma ligação covalente acil-éster. Com a hidrólise do éster formado, a enzima é liberada ativa e o antimicrobiano beta-lactâmico hidrolisado e inativo. A ação das metalo-beta-lactamases é semelhante, porém o íon zinco é o responsável pelo ataque ao anel beta-lactâmico (LIVERMORE, 1995).



**FIGURA 2 - AÇÃO DAS BETA-LACTAMASES**

FONTE: PEARSON EDUCATION 2006

### 3.4 CARBAPENEMASES E TIPOS

Carbapenemases são, por definição, beta-lactamases com capacidade de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos, pelo menos imipenem ou meropenem (NORDMANN, P; POIREL 2002), porém elas têm a capacidade de reconhecer quase todos os antibióticos beta-lactâmicos susceptíveis à hidrólise e a maioria delas é resistente aos inibidores de beta-lactamases disponíveis comercialmente até esta data (NORDMANN, POIREL, 2002; LIVERMORE, WOODFORD, 2006). Apesar de alguns pesquisadores defenderem a mudança desta terminologia para “enzimas hidrolisadoras de carbapenêmicos” o termo “carbapenemase” se tornou de uso comum e é utilizado por em toda literatura científica ( QUEENAN; BUSH, 2007).

As carbapenemases pertencem a dois grandes grupos moleculares, distinguindo-se por mecanismos de hidrólise no centro ativo da enzima. A primeira carbapenemase foi descrita em um bacilo Gram-positivo e, diferente das demais beta-lactamases conhecidas até então, era inibida pelo EDTA, caracterizando-se, pois, uma metalo-beta-lactamase. Estudos subsequentes provaram que todas as metalo-beta-lactamases possuem pelo menos uma molécula de zinco no seu centro ativo (FRÈRE et al. 2005). Por volta dos anos 80 foram descritas enzimas que hidrolisavam carbapenêmicos em enterobactérias, porém estas não eram inibidas pelo EDTA. Estudo subsequentes provaram que estas enzimas utilizavam serina em seu centro ativo e podiam ser inativadas por inibidores de beta-lactamase como o tazobactam e ácido clavulânico. Até os anos 90 todas as carbapenemases eram

espécie específicas, cromossomais, com características bem definidas. Com a descrição da imipenemase IMP-1, plasmidial, em *Pseudomonas aeruginosa*, (WATANABE et al. 1991) ARI-1 (OXA-23) em *Acinetobacter baumannii* (PATON et al. ,1993) e KPC-1 em *Klebsiella pneumoniae* (YIGIT et al. , 2001) a disseminação das carbapenemases sofreu uma mudança. O que era considerado um problema de disseminação clonal passou a ser um problema global de disseminação interespecíes (QUEENAN, BUSH, 2007).

As carbapenemases formam um grupo bastante heterogêneo, podendo pertencer á várias classes de beta-lactamases (QUEENAN, BUSH, 2007).

### 3.4.1 Classificação das carbapenemases

Nas classificações funcionais as carbapenemases se encontram nos grupos 2f e 3, enquanto na classificação molecular podem pertencer á classe A (penicilinases), B (metaloenzimas) e D (oxacilinases) de Ambler (AMBLER ,1980, NORDMANN, POIREL, 2002 ; QUEENAN, BUSH, 2007).

#### 3.4.1.1 Carbapenemases classe A

As carbapenemases da classe A são serina carbapenemases pertencentes a classificação funcional 2f (BUSH et al. ,1995) e fazem parte do grupo das penicilinases inibidas pelo ácido clavulânico (NORDMANN, POIREL, 2002). Uma grande variedade de carbapenemases desta classificação foram descritas, algumas cromossomais (NMC A, SME, IMI-1, SFC-1) e outras plasmidiais (KPC, IMI-2, GES), todas hidrolisam carbapenêmicos ( NORDMANN et al. , 2011).

Estas beta-lactamases possuem atividade contra os carbapenêmicos, porém a concentração inibitória mínima não é alta ( $\leq 4 \mu\text{g/mL}$ ), o que pode ser um problema para a sua detecção em testes de rotina. Todas possuem atividade contra carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN; BUSH 2007). Sua atividade hidrolítica está ligada a serina na posição 70 do centro ativo (AMBLER 1980).

#### 3.4.1.2 Carbapenemases classe A cromossomais SME, NMC e IMI

Estas enzimas são parte da classificação 2f e apresentam susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração e resistência aos carbapenêmicos. A enzima SME-1 (de “*Serratia marcescens* enzime”) foi detectada pela primeira vez na Inglaterra de um isolado colhido em 1982, antes que qualquer carbapenêmico tenha sido comercializado (NORDMANN; POIREL, 2002) e foi encontrada isoladamente nos Estados Unidos.(YANG *et al.* ,1990) A IMI ( de “imipenem-hydrolyzing beta-lactamase”) e NMC-A ( de “not metalloenzyme carbapenemase”) foram detectadas em raros isolados de *Enterobacter cloacae*, com 97% de homologia entre si (NORDMANN, *et al.* ,1993 ; RASMUSSEN, *et al.* ,1996).

Os genes destas carbapenemases não estão localizados em elementos móveis, o que explica sua raridade. Seu espectro de ação inclui penicilinas, cefalosporinas de primeira geração, aztreonam e carbapenêmicos. A cefoxitina e as cefalosporinas de espectro estendido não são eficazmente hidrolisadas. São induzíveis com os substratos imipenem e cefoxitina (QUEENAN, BUSH, 2007 ; NORDMANN, POIREL, 2002).

#### 3.4.1.3 Carbapenemases classe A plasmidiais KPC e GES

Também incluída no grupo funcional 2f de Bush, a enzima KPC-1 (de “*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase”) foi reportada de uma *Klebsiella pneumoniae* de um isolado nos Estado Unidos da América, resistente aos carbapenêmicos ( YIGIT *et al.* 2001). Sua expressão não é induzível e é encontrada em elementos móveis, sua atividade é inibida mais fortemente pelos inibidores ácido clavulânico e tazobactam que as enzimas cromossomais, hidroliza primeira e segunda geração de cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos ( NORDMANN, POIREL,2002). Será abordada com detalhes no próximo tópico.

A carbapenemase do grupo A mais recentemente reportada é a GES-2, derivada da beta-lactamase de espectro estendido GES-1, a enzima GES-2 teve seu espectro ampliado por hidrolizar o imipenem com taxas de hidrólise cada vez maiores através da substituição do aminoácido da posição 170, o centro ativo da enzima (NORDMANN, POIREL, 2002 ; NORDMANN *et al.* , 2011 ; QUEENAN, BUSH, 2007).

#### 3.4.1.4 Carbapenemases classe B – metalo-beta-lactamases

As carbapenemases classe B são caracterizadas por apresentarem cátions divalentes, normalmente o zinco, como cofator para a atividade da enzima (WALSH *et al.* 2005). São enzimas que não são inibidas por ácido clavulânico, mas sim por quelantes de íons divalentes como o EDTA e derivados de tiol. Seus substratos vão desde carbapenêmicos, cefalosporinas de espectro estendido, e penicilinas, porém não hidrolisam o aztreonam (QUEENAN; BUSH, KAREN 2007).

As classificações fenotípicas iniciais se basearam no fato das metalo-beta-lactamases hidrolizarem o imipenem serem inibidas por EDTA e não sofrerem inibição por inibidores comerciais. Estes esquemas foram sendo modificados com o tempo para acomodarem todos os tipos de metalo-beta-lactamases (BUSH, 1989 e BUSH, *et al.* 1995). Todas hidrolisam o imipenem em níveis diferentes, podendo classificá-las como carbapenemases ou não. Fazem parte do grupo 3 de Bush, com o grupo 3a apresentando amplo espectro, o 3b tendo como substrato preferencial os carbapenêmicos, e o grupo 3c hidrolisando pobremente os carbapenêmicos em comparação com outros beta-lactâmicos (WALSH *et al.* , 2005).

Do ponto de vista molecular, fazem parte de um grupo muito heterogêneo de enzimas, tornando a classificação difícil de ser padronizada. Foi proposto um esquema de classificação molecular levando em conta aspectos estruturais e moleculares. O grupo B1 possui o zinco coordenado com 3 histidinas, e uma cisteína e acomoda as enzimas transferíveis IMP, VIM, GIM e SPM. A classe B2 inclui aquelas que possuem asparagina no lugar da histidina junto ao zinco, são as NXHXD e SFH-1. No grupo B3 está a enzima L-1 e tem a estrutura de tetrâmero (RASMUSSEN, BUSH, 1997 e WALSH *et al.* , 2005).

#### 3.4.1.5 Metalo- beta-lactamases cromossomais

Alguns micro-organismos ubíquos são portadores de metalo-beta-lactamases cromossomais, o que pode ser explicado por duas hipóteses: estes micro-organismos foram expostos a beta-lactâmicos e necessitavam de aparato para se defender deles ou que estas enzimas tenham outra função, que ainda não está elucidada. A algumas destas metalo-beta-lactamases são induzíveis e a maioria dos micro-organismos que as possuem são altamente resistentes a beta-lactâmicos.

Felizmente a maioria destes micro-organismos é oportunista e salvo exceções, os que causam infecções são *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus* e *Aeromonas sp.* (WALSH *et al.* , 2005). As metalo-beta-lactamases cromossomais que foram descritas primeiramente, estavam presentes em *Bacillus cereus*, *Aeromonas sp.* e *Stenotrophomonas maltophilia*. (IACONIS, SANDERS, 1990 ; LIM *et al.* , 1988 e SAINO *et al.* , 1982). Além das citadas, podem ser encontradas em *Elisabethkingia meningoseptica*, *Chryseobacterium indologenes*, *Legionella gormanii*, *Caulobacter crescentus*, *Myroides spp.*, *Jantirobacterium lividum*, *Flavobacterium johnsoniae*, e *Serratia fonticola*.(WALSH *et al.* , 2005)

#### 3.4.1.6 Metalo-beta-lactamases plasmidiais IMP, VIM, GIM, SIM, SPM, NDM

Genes transferíveis de resistência ao imipenem foram descritos primeiramente em 1990 no Japão, em *Pseudomonas aeruginosa*, seguida de uma segunda carbapenemase reportada em *Bacteroides fragilis* (BANDO *et al.* , 1992 e WATANABE, *et al.* ,1991).

As famílias mais comuns de metalo-beta-lactamases são VIM, IMP, GIM e SIM que estão localizados em uma variedade de integrons que foram incorporados como genes cassetes. Quando estes integrons são associados a transposons ou plasmídeos, a transferência entre bactérias é facilitada (QUEENAN, BUSH, 2007). A maioria dos genes que codificam os tipos de carbapenemase IMP, VIM e GIM estão localizados em integrons de classe 1, embora as IMP possam ocorrer em integrons de classe 3. A maioria das metalo-beta-lactamases são achadas em plasmídeos entre 120 e 180 kb. Nem todas as metalo-beta-lactamases são associadas a integrons e transposons, a enzima SPM-1 (de São Paulo metalo- beta-lactamase) não está associada a nenhum deles. O gene da SPM-1 está localizado perto de uma CR (common region) ou região comum, que pode se mobilizar quando a bactéria está sob estresse (WALSH *et al.* 2005). As CRs contém um novo tipo de estrutura transferível com potenciais recombinases e sequências promotoras (POIREL, *et al.* ,2004)

Em 2009 foi isolada uma nova metalo-beta-lactamase, esta enzima foi inicialmente identificada no norte da Europa, em pacientes que haviam sido internados na Índia. O nome desta nova enzima, *New Delhi* metalo-beta-lactamases (NDM-1) foi dado segundo convenções internacionais, baseado na cidade do

paciente índex. (KUMARASAMY *et al.* , 2010) Estudos de vigilância conseguiram isolar NDM-1 em amostras clínicas de pacientes da Índia em 2006 (CASTANHEIRA *et al.* , 2011). O gene ocorre em um plasmídeo, tendo sido encontrado em diversos membros da família Enterobacteriaceae e bacilos gram negativos não fermentadores, porém já foi encontrado igualmente inserido em cromossomos em uma *E. coli* na Alemanha (BUSH, FISHER ,2011). Pode apresentar resistência variada aos carbapenêmicos. Os plasmídeos que carregam a *bla*<sub>NDM-1</sub> podem abrigar um grande número de genes de resistência, como metilases (resistência a aminoglicosídeos), esterases (resistência a macrolídeos), além de genes de resistência a sulfa e rifampicina. Muitas NDM-1 se mantêm susceptíveis somente a polimixina, tigeciclina e colistina e em alguns casos a fosfomicina (NORDMANN *et al.* , 2011).

#### 3.4.1.7 Carbapenemases classe D – Oxacilinas

As OXA carbapenemases (de “oxacillin hydrolising”) encontravam-se inicialmente incluídas junto com as serina-beta-lactamases nas classificações. Quando foram separadas, nos anos 80, ocorriam principalmente em Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* e eram descritas como penicilinases que hidrolisavam oxacilina e cloxacilina (BUSH, 1988). As enzimas OXA são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e pelo EDTA (BUSH, *et al.* ,1995). Estão presentes principalmente em *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas aeruginosa* (WALTHER-RASMUSSEN, HØIBY, 2006) mas podem ocorrer em enterobactérias, como *Klebsiella pneumoniae* (WALTHER-RASMUSSEN, HØIBY , 2006). Algumas enzimas da classe D são beta-lactamases de espectro estendido, como a OXA-10, OXA-11, OXA-15, OXA-18 e OXA-45 e não apresentam hidrólise do imipenem (QUEENAN, BUSH, KAREN, 2007), são variantes da OXA-10 e ocorrem principalmente em *Pseudomonas aeruginosa* (BRADFORD, 2001).

Das oxacilinases que hidrolisam os carbapenêmicos, as mais frequentes são OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA 27 em *Acinetobacter baumannii*. Estas enzimas possuem taxas de hidrólise baixa para os carbapenêmicos, sendo que a resistência aparece quando ocorrem em conjunto com outros mecanismos de resistência aos mesmos, como impermeabilidade de membrana e/ou efluxo ativo

dos antimicrobianos. Ocorrem em cromossomos ou integrons de classe 1 (NORDMANN, POIREL, 2002).

Foi detectada em 2003, na Turquia, em *Klebsiella pneumoniae*, a enzima OXA-48, uma carbapenemase presente em um plasmídeo de aproximadamente 70 kb, responsável por causar surtos de infecção (POIREL, LAURENT et al. 2004). A sua distribuição no mundo também inclui países da Europa, como a França, Alemanha, Holanda e Reino Unido. A hidrólise do imipenem, aztreonam e cefalosporinas por essa enzima é fraca, sendo que a resistência aparece quando há a associação com outras beta-lactamases e diminuição da concentração de antimicrobiano dentro da célula (NORDMANN, PATRICE et al., 2011).

### 3.5 KPC – *Klebsiella pneumoniae* CARBAPENEMASE

No ano de 2001 foi reportada uma nova carbapenemase, da classe A, a KPC-1 descrita em *Klebsiella pneumoniae* nos Estados Unidos da América. Estudos de transformação e conjugação mostraram uma beta-lactamase com ponto isoelétrico 6,7 codificada em um plasmídeo não conjugativo de 50-kb. O gene *bla*<sub>KPC-1</sub>, de 3,4 kb, foi clonado em *Escherichia coli* e conferiu resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e aztreonam. Este gene contém uma região codificadora de 879 pb, que codifica uma proteína de 293 aminoácidos e 32,23Da, a qual contém a sequência de aminoácidos “serina, serina, fenilalanina, lisina e lisina, treonina, glicina”, características de serina beta-lactamases de classe A.

A enzima KPC-1 mostrou-se suscetível à inibição pelo ácido clavulânico e pelo tazobactam, porém não pelo EDTA, e não é uma enzima induzível. A sequência dos aminoácidos revelou identidade de 45% com a enzima carbapenemase Sme-1 de *Serratia marcescens* S6. KPC-1 mostrou ter grande afinidade pelo meropenem. Estudos de porinas demonstraram a ausência de detecção da produção das porinas OmpK35 e OmpK37, porém a OmpK36 estava presente. A enzima foi classificada no grupo 2f de Bush e classe A de Ambler. Foi comprovada que a ausência das porinas tem seu papel na resistência aos carbapenêmicos (YIGIT et al., 2001).

Confere resistência aos carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas, seu plasmídeo muitas vezes carrega resistência a outros antibióticos como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, tornando seu tratamento um desafio para os clínicos (HIRSCH; TAM, 2010). A KPC é uma enzima de difícil detecção, uma vez que

muitas vezes a concentração inibitória mínima para carbapenêmicos não se apresentam altamente resistentes, motivo pela qual devem ser realizados testes fenotípicos adicionais para a sua detecção, como o teste de Hodge modificado, teste de inibição por ácido borônico e confirmação por PCR (ANDERSON *et al.* , 2007). O valor preditivo positivo mostrado pelo ertapenem também tem sido discutido, porém é um teste com elevada sensibilidade porém de baixa especificidade (DOYLE *et al.* , 2012).

Enzimas KPC foram reportadas pela primeira vez na Carolina do Norte, nos Estados Unidos em 2001 de um micro-organismo isolado em 1996 no projeto ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*), (YIGIT *et al.* 2001) e até 2005 encontrava-se limitada a parte leste dos Estados Unidos ( QUEENAN BUSH, KAREN, 2007). A primeira vez que foi reportada fora deste país foi em 2005 na França, isolada de um paciente vindo dos Estados Unidos (CUZON *et al.* , 2008). Depois da ocorrência deste, houve detecção também na China, Colômbia, Grécia, Israel, Taiwan, Porto Rico, Escócia, Itália, Argentina, Dinamarca, Inglaterra, Finlândia, Alemanha, Hungria, Noruega, Suécia e França (CHEN, LIANG *et al.*, 2011 e CHEN, LUKE, 2012).

TABELA 2 - GENÓTIPOS *bla<sub>KPC</sub>*

<i>bla<sub>KPC</sub></i>	Espécie	Ano	Distribuição
KPC-1	<i>K. pneumoniae</i>	1996	EUA
KPC-2	<i>K. pneumoniae</i>	1998-1999	EUA, Israel, China, Grécia, Itália, Brasil, França, Colômbia e Taiwan
KPC-3	<i>K. pneumoniae</i>	2000-2001	EUA, Israel
KPC-4	<i>E. cancerogenus</i>	2003	Porto Rico, Escócia
KPC-5	<i>P. aeruginosa</i>	2006	Porto Rico
KPC-6	<i>K. pneumoniae</i>	2003	Porto Rico
KPC-7	<i>K. pneumoniae</i>	2007-2008	EUA
KPC-8	<i>K. pneumoniae</i>	2008	Porto Rico
KPC-9	<i>E. coli</i>	2009	Israel
KPC-10	<i>A. baumannii</i>	2009	Porto Rico
KPC-11	<i>K. pneumoniae</i>	2010	Grécia

Fonte: CHEN (2012)

O primeiro gene de KPC descrito na Carolina do Norte chamou-se KPC-1, (YIGIT *et al.*, 2001), subsequentemente foram descritos novas variantes do gene, de

KPC-2 a KPC-11 até o ano de 2010 (TABELA 2) (CHEN, 2012). Análises genéticas em 2008 mostraram um erro no sequenciamento em uma única base da descrição da KPC-1, na posição 174, reportada como AGC que codifica uma “serina”, seria GGC, que codifica uma “glicina”. Com isso, mostrou-se que a variante KPC-2 é idêntica á KPC-1. Hoje utiliza-se a denominação KPC-2 (YIGIT *et al.*, 2008). A diferença entre as variantes é de apenas um nucleotídeo, que se traduz em um códon diferente (não sinônimo) para fins de tradução, (FIGURA 3) (CHEN *et al.*, 2011) o gene da KPC em todas as variantes detectadas até então encontra-se em um transposon, denominado *Tn 4401* (FIGURA 4) (NORDMANN *et al.*, 2011). O gene que codifica a enzima KPC está localizado entre sequências de transposases, e se encontra em plasmídeos conjugativos, o que torna sua disseminação bastante significativa (CUZON *et al.*, 2008).

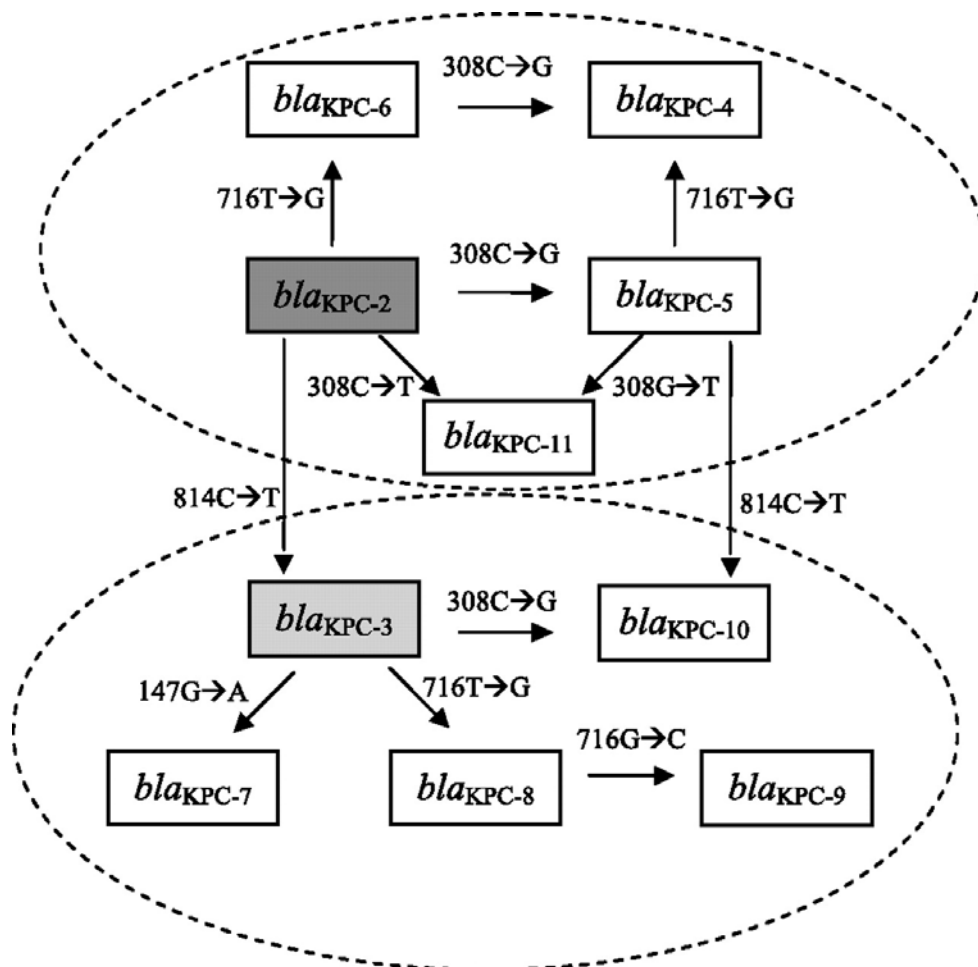


FIGURA 3 - EVOLUÇÃO DOS GENÓTIPOS DE *bla*<sub>KPC</sub>

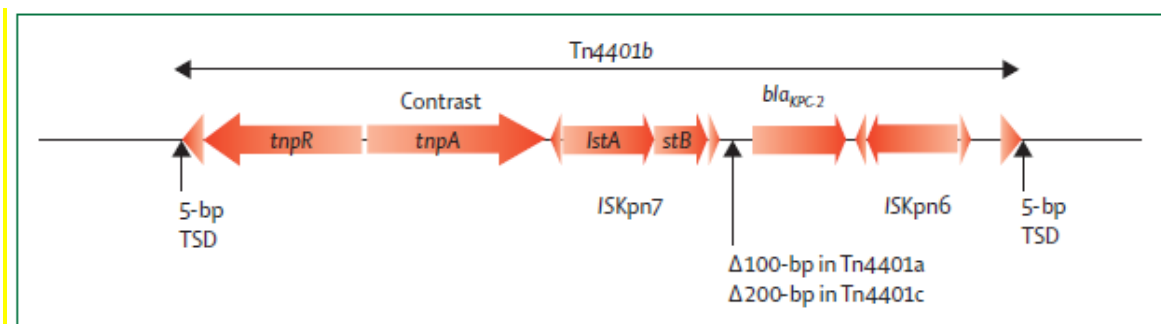


FIGURA 4 - TRANSPOSON Tn 4401

A ocorrência de KPC é reportada mais frequentemente em *Klebsiella pneumoniae*, porém também há a ocorrência em outras Enterobactérias, como *Serratia marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus sp.*, *Citrobacter sp.*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella sp.* e também em bactérias não fermentadoras da glicose como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (CUZON *et al.*, 2008 e NORDMANN *et al.*, 2009).

No Brasil, as primeiras detecções se deram em 2006, de pacientes hospitalizados em Pernambuco, Rio de Janeiro e São Paulo (MONTEIRO *et al.*, 2009 e PAVEZ *et al.*, 2009 e PEIRANO *et al.*, 2009). Em Curitiba, foram notificadas pelo sistema SONIH- SESA PR (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ) e avaliadas pela CMIRAS (COMISSÃO MUNICIPAL DE INFECÇÕES RELACIONADAS AOS SERVIÇOS DE SAÚDE) 19 casos de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC em 2010, 436 casos em 2011, 546 casos em 2012 e 1165 em 2013 (CMIRAS, 2014).

### 3.5.1 Testes fenotípicos

Os testes padrão ouro para a detecção da KPC são a PCR e testes de hidrólise dos carbapenêmicos. Estes testes muitas vezes não são possíveis de se realizar no laboratório clínico, havendo a necessidade do envio a laboratórios de referência para confirmação. Baseada neste fato, vários tipos de testes fenotípicos foram desenvolvidos, dentre eles o teste de Hodge modificado (indicado pelo CLSI como confirmatório para fins epidemiológicos), a inibição pelo ácido borônico e análise da susceptibilidade aos carbapenêmicos por métodos manuais e automatizados (HIRSCH, TAM, 2010).

Embora a carbapenemase KPC seja a enzima mais comumente envolvida na resistência a carbapenêmicos em Enterobacteriaceae até então, a sua detecção pode ser problemática fenotipicamente devido à heterogeneidade da expressão da resistência aos beta lactâmicos. Os sistemas de automação podem falhar na detecção da resistência em isolados produtores de KPC, mostrando resultados inconsistentes, muitas vezes associado ao carbapenêmico utilizado para teste. (BRATU MOOTY *et al.*, 2005 e FRANCIS *et al.*, 2012). Por esta razão, é necessário o uso de vários testes, como o teste de Hodge, para a correta detecção deste tipo de resistência (FRANCIS *et al.*, 2012).

#### 3.5.1.1 Teste de Hodge modificado

A enzima KPC pode ser detectada por diversos testes fenotípicos, sendo o mais comum o teste de Hodge modificado. Este teste não é específico para KPC,

indicando apenas a presença de uma carbapenemase, porém, em locais onde a prevalência da KPC é grande, pode ser um preditor importante deste tipo de resistência, sendo reportado pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) como um teste com sensibilidade e especificidade maior que 90% para a detecção de KPC (GIRLICH *et al.*, 2012). O teste de Hodge é importante para a detecção da KPC pois apresenta uma sensibilidade e especificidade alta, maior que 90%. Por outro lado, quando o teste é negativo, não pode se excluir a presença de outras carbapenemases, uma vez que a carbapenemase NDM e OXA apresentam grande número de resultados falso negativos para este teste. Uma manobra importante para que estas carbapenemases também sejam detectadas pelo teste seria a adição de zinco ao meio (GIRLICH *et al.*, 2012).

Além das limitações relacionadas à bactéria, a interpretação é um problema bastante reportado com este teste, pois nem sempre o resultado é tão evidente, gerando discordância entre técnicos, levando ao resultado indeterminado (DOYLE *et al.*, 2012).

### 3.5.1.2 Teste de inibição pelo ácido borônico

O teste com ácido borônico foi desenvolvido nos anos 1980 para a detecção de beta-lactamases AmpC (BEESLEY *et al.*, 1983). porém estudos recentes mostraram que o ácido borônico poderia ser um valioso método de inibição para a detecção da carbapenemase KPC Tsakris *et al* (2009) testaram compostos como o ácido fenilborônico e 3 aminofenilborônico como inibidores da ação da KPC. Neste teste foi encontrado que uma diminuição de 5mm nos halos de inibição dos antibióticos cefepime, imipenem e meropenem em relação aos discos sem inibidor indica a presença de KPC. A sensibilidade e especificidade encontradas foram de 100%, sendo o meropenem o substrato que apresentou maior diferença entre os halos (TSAKRIS, KRISTO *et al.*, 2009). Como há alta prevalência de ESBL entre os isolados produtores de KPC, o mesmo grupo desenvolveu um método utilizando o ácido borônico e ácido clavulânico, mostrando também 100% de sensibilidade e especificidade (TSAKRIS, POULOU, *et al.* , 2009).

Doi e colaboradores encontraram os mesmos resultados, porém, em seu estudo a adição de ácido borônico ao ertapenem, meropenem, mas não ao

imipenem resultava em um aumento da zona de inibição maior do que 5 mm em relação ao disco sem inibidor (DOI *et al.*, 2008).

### 3.5.1.3 Detecção da resistência por métodos automatizados

O uso de métodos automatizados para a realização de testes de sensibilidade pode ser problemático na detecção da resistência aos carbapenêmicos em isolados produtores de KPC. Foi observado um importante efeito inóculo, especialmente na detecção da resistência ao imipenem em cepas altamente mucosas, quando do uso de aparelhos automatizados. O ertapenem não sofre este efeito inóculo, sendo este carbapenêmico o mais indicado para os testes de vigilância de KPC (ENDIMIANI, DEPASQUALE *et al.*, 2009).

Bratu encontrou 15% de falsa sensibilidade ao imipenem no método automatizado Microscan, causado em grande parte por problemas de inóculo, problema que pode ser sanado, segundo a autora, testando-se ertapenem e meropenem em todos os isolados. O sistema Vitek2 foi testado pela autora, igualmente apresentando resultados insatisfatórios (BRATU, MOOTY, *et al.*, 2005, BRATU, LANDMAN, *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado por Tenover e colaboradores em 2006 vários sistemas automatizados (Microscan, Phoenix, Sensititre, Vitek e Vitek2), mostraram-se falhos na detecção da resistência á carbapenêmicos em amostras positivas para KPC, mesmo quando o sistema de interpretação “*expert*” encontra-se ativado. Uma dificuldade importante foi o fenômeno chamado de “*flip-flop*” que é a mudança de sensível/resistente nos métodos automatizados quando se testa o mesmo isolado mais de uma vez. Foi observada falsa resistência ao imipenem, especialmente em *Proteus mirabilis*, falsa sensibilidade em produtores de carbapenemase, mostrando que a interpretação dos resultados de automação para os carbapenêmicos deve ser realizada com critério pelo analista. (TENOVER *et al.*, 2006) Bratu e colaboradores encontraram igualmente falsa sensibilidade aos carbapenêmicos, nos aparelhos Vitek2 (Biomérieux) e Microscan Walkaway (Dade Behring), segundo ela, provavelmente ocasionado por inóculo abaixo do preconizado pelo fabricante (BRATU, LANDMAN *et al.*, 2005 e BRATU, MOOTY, *et al.*, 2005).

### 3.5.1.4 Testes epsilométricos

Testes epsilométricos, como o E-test<sup>®</sup> (Biomérieux), determinam a concentração inibitória mínima através de tiras com concentrações crescentes. São uma variação do método de Kirby Bauer com resultados quantitativos (BOLMSTRÖM *et al.*, 2007).

Estes poderiam ser utilizados como confirmação de resultados duvidosos encontrados em aparelhos automatizados. A problemática se encontra na interpretação dos resultados de concentração inibitória mínima, pois há a formação de microcolônias dentro do halo de inibição, tornando a leitura de difícil interpretação (TENOVER *et al.*, 2006).

### 3.5.1.5 Método de Kirby Bauer

O teste de Kirby Bauer, ou teste por disco difusão é um dos testes mais simples para a realização do teste de susceptibilidade a antimicrobianos. É um teste qualitativo, baseado na inibição do crescimento bacteriano ocasionado por discos embebidos em concentrações fixas de antibiótico (Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement 2012). Apesar de ser um método de fácil realização, para a detecção da resistência a carbapenêmicos pelos produtores de KPC, há evidências que este seria um método confiável para confirmação de resistência a carbapenêmicos, especialmente meropenem em *Klebsiella pneumoniae* (TENOVER *et al.*, 2006). No uso de testes epsilométricos e disco difusão não foi observada discrepância de resultados causados por efeito inóculo, uma vez que pode ser observada a presença de microcolônias dentro dos halos de inibição (BRATU, MOOTY, *et al.*, 2005, BRATU, LANDMAN, *et al.*, 2005).

### 3.5.2 Testes moleculares

A detecção correta e rápida dos isolados produtores de carbapenemases é crucial para a prevenção da disseminação deste tipo de resistência entre pacientes e hospitais (BRATU MOOTY *et al.*, 2005).

O modo mais rápido para se determinar a qual família uma carbapenemase pertence é a reação da cadeia da polimerase (PCR). Oligonucleotídeos iniciadores

(*primers*) para todos os tipos e subtipos de carbapemenases são encontrados publicados na literatura científica (QUEENAN, BUSH 2007).

Nordmann *et al.* (2009) defendem que a identificação padrão ouro das bactérias produtoras de KPC devem ser feitas através de métodos moleculares. Esta detecção é feita através de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos e pode ser feita com PCR de ponto final ou PCR em tempo real (RT-PCR). São técnicas específicas e confiáveis, porém requerem laboratórios especializados para este fim, equipamentos e pessoal treinado. A realização de métodos moleculares, alternativamente, pode ser restrita a laboratórios de referência, para confirmação de resultados fenotípicos. (NORDMANN *et al.*, 2009) Há um esforço da comunidade científica para o desenvolvimento de métodos utilizando o PCR convencional, PCR em tempo real usando sondas Taqman (FIGURA 5) , SYBR Green e HRM (High resolution melting) para a detecção de produtores de KPC, tanto em amostras de isolados bacterianos como clínicas (FRANCIS *et al.*, 2012 e MONTEIRO *et al.*, 2012 e WANG *et al.*, 2012). Com o objetivo de contenção e coorte dos pacientes colonizados, a detecção por métodos moleculares direto da amostra dos pacientes (swab anal/perianal) tem sido reportada por vários autores, com ótimos resultados (HINDIYEH *et al.*, 2008).

Com a transmissão das carbapenemases através de elementos móveis, a disseminação, que antes era clonal, passou a ser interespecíes. A proliferação de novos membros das famílias estabelecidas de carbapenemases, é de suma importância o estudo e a caracterização destas enzimas, detalhando suas limitações e suas propriedades (QUEENAN, BUSH, 2007).

Técnicas como a hibridização juntamente com o Southern Blot são utilizadas para análises mais aprofundadas como para determinar se o gene existente está localizado em um plasmídeo ou cromossomo (QUEENAN, BUSH ,2007).

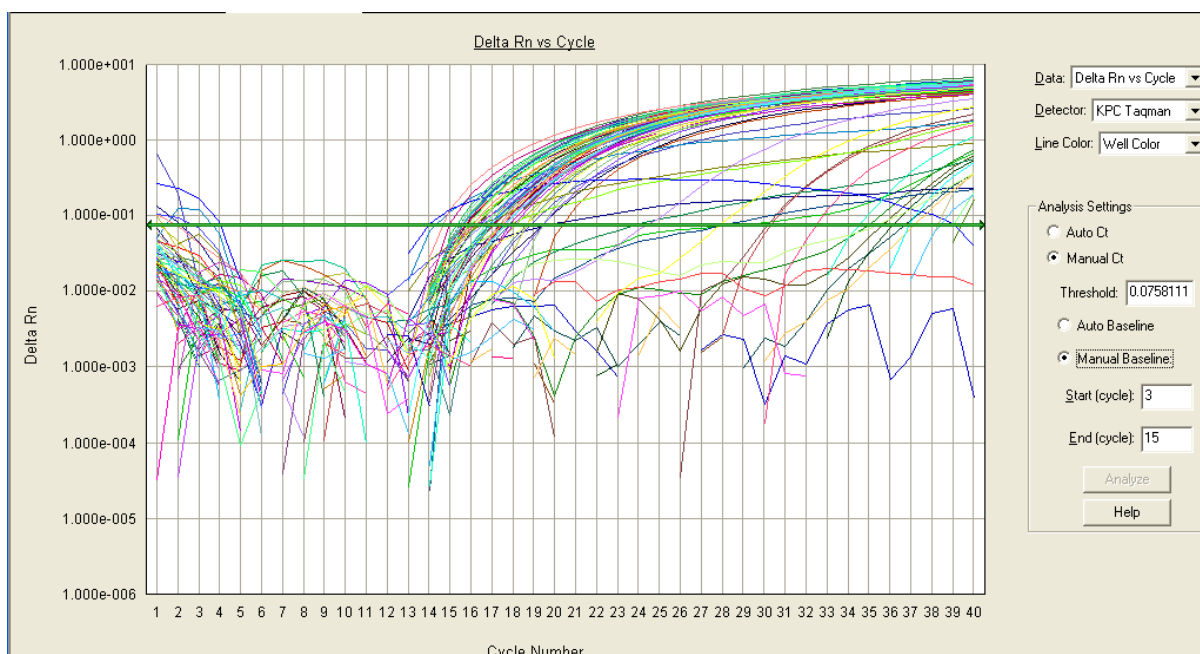


FIGURA 5 - PCR EM TEMPO REAL

FONTE: LACEN/PR

### 3.6 SIMILARIDADE GENÉTICA

Apesar dos diferentes conceitos de surto, o mais prático é o aumento do número de infecções em relação a uma incidência basal ou esperada. Quando não há registro de uma determinada bactéria em um determinado hospital, também podemos considerar como surto, pois a incidência basal era zero. As infecções em surtos têm um agente etiológico em comum. Muitas vezes, o surto provém de uma só célula mãe, que é geneticamente idêntica ou muito semelhante ao organismo fonte. Em termos epidemiológicos, podemos dizer que são clonais. Apesar de apresentarem uma origem em comum, eles podem ser isolados de fontes diferentes, em datas diferentes, e em regiões geográficas diferentes (OLIVE BEAN, 1999).

O estudo da similaridade genética pode ser realizado através de várias técnicas como *pulsed-field gel eletrophoresis* (PFGE), *restriction fragment length polymorphism* (RFLP), *random amplified polymorphic DNA* (RAPD), *Repetitive extragenic palindromic PCR* (Rep-PCR), *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC-PCR), *cleavase fragment length polymorphism* (CFLP), *amplified fragment length polymorphism* (AFLP), e o sequenciamento genético (OLIVE, BEAN, 1999).

Estas técnicas possuem preços, poder discriminatórios, técnicas e facilidade de interpretações diferentes, sendo necessário o laboratório analisar qual a sua necessidade, disponibilidade de recursos e tempo para a realização dos testes. A técnica considerada padrão ouro para a realização da análise da similaridade genética é o PFGE, sendo que o uso de outras técnicas normalmente é realizado após a comparação com o método de referência (OLIVE, BEAN, 1999).

### 3.6.1 RepPCR

As técnicas do repPCR e ERIC-PCR foram descritas por Versalovic em 1991, são baseadas na amplificação de padrões específicos de elementos repetitivos presentes no DNA genômico bacteriano (VERSALOVIC *et al.*, 1991). O repPCR está se tornando um dos métodos mais usados para tipagem bacteriana, por seu preço acessível, facilidade de manuseio e a possibilidade de ser testar um número grande de isolados (HAHM *et al.*, 2003 e MAZZARIOL *et al.*, 2012 e TOLEDO, 2011). Quanto ao seu poder discriminatório, mostrou ser superior a ribotipagem, caracterizações bioquímicas, *multilocus enzyme eletrophoresis*, análise de restrição do 16S rRNA, entre outros (CARSON *et al.*, 2003 e SNELLING *et al.*, 1996) A comparação do repPCR e PFGE mostrou que o repPCR é igual ou levemente menos discriminatório para algumas espécies como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, porém adequado para espécies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter sp* (FLUIT *et al.*, 2010;HAHM *et al.*, 2003).

O repPCR foi adaptado para um formato automatizado, (Diversilab®, Biomérieux) utilizando-se de iniciadores fluorescentes para criar um perfil separado através da fluorescência gerada, obtidos através de um bioanalisador a laser. O método permite que se armazenem imagens de géis virtuais, permitindo assim a comparação com o banco de dados gerados (FLUIT *et al.*, 2010). A automatização e o uso de um software *online* (via *web*) reduzem o problema de reprodutibilidade, além de permitir uma análise mais fácil e rápida de diversos perfis ao mesmo tempo. Uma vantagem importante do repPCR automatizado é que ele pode ser realizado em apenas um dia, partindo de colônias isoladas (FLUIT *et al.*, 2010).

### 3.6.2 Epidemiologia molecular

A epidemiologia molecular é uma ciência que estuda aplicação de técnicas de tipagem molecular em um âmbito epidemiológico. O foco desta ciência é determinar a distribuição de características de interesse em termos de tempo e espaço, assim como os fatores que determinam sua transmissão, manifestação e progressão. A epidemiologia é motivada uma oportunidade ou possibilidade de intervenção ou prevenção (FOXMAN, 2001).

O que distingue o termo “molecular” é o uso das técnicas de biologia molecular para caracterizar o DNA e estudar a distribuição e determinantes da ocorrência de doenças em populações humanas. As técnicas moleculares podem ser aplicadas para medir e detectar associações, estratificar e refinar dados através de mensurações sensíveis e específicas, facilitando as atividades epidemiológicas, incluindo a vigilância a doenças, investigação de surtos, identificação de padrões de transmissão e fatores de risco entre casos aparentemente distintos, caracterizar interações patógeno-hospedeiro, detectar organismos não cultiváveis, e prover melhor entendimento da patogênese das doenças em um nível molecular (FOXMAN, 2001).

### 3.7 TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR KPC

A KPC confere resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos. Adicionalmente, os plasmídeos que contém a KPC também carregam resistências variadas a outros antibióticos, como a fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol-trimetoprim (CHEN, 2012). As opções para tratamento de bactérias produtoras de KPC são limitadas. Apesar de alguns isolados apresentarem sensibilidade aos carbapenêmicos e até cefalosporinas no teste de susceptibilidade, há evidências que não terão ação “*in vivo*” e poderão, em contrapartida, selecionar isolados com alta produção de beta-lactamase KPC. (HONG *et al.*, 2005) Muitos isolados mantém sua sensibilidade aos aminoglicosídeos e a sulfametoxazol-trimetoprim, e a maioria deles a tigeciclina e colistina (BRATU, LANDMAN, *et al.*, 2005 e SMITH MOLAND, 2003) .

A tigeciclina é uma gliciliciclina com atividade expandida contra enterobactérias, incluindo as produtoras ESBL e KPC, porém casos de falha

terapêutica têm sido reportados. A sua baixa concentração no soro é problemática quando usada para o tratamento da bacteremia e também não é recomendada para tratar infecções do trato urinário por sua baixa concentração na urina (CASTANHEIRA *et al.*, 2008).

As polimixinas têm sido utilizadas cada vez mais, porém estão associadas à nefrotoxicidade e neurotoxicidade. Estudos recentes têm reportado que a nefrotoxicidade associada a esta droga pode não ser tão pronunciada como se esperava, porém a dose segura ainda não é conhecida. Como muitos isolados produtores de KPC apresentam somente a colistina como antimicrobiano sensível, esta pode ser a última opção de terapia de salvamento. Uma vez que sua ação bactericida não ocorre em subdose e depende da concentração máxima da droga e do tempo de concentração inibitória mínima abaixo da curva, a determinação da concentração eficaz da colistina é um assunto relevante, porém ainda em aberto (DALFINO *et al.*, 2012 e GARONZIK *et al.*, 2011). Estudos de coorte mostraram que a colistina e a polimixina não são bons tratamentos quando usados em monoterapia (TUMBARELLO *et al.* 2012, HIRSCH; TAM 2010).

A fosfomicina tem sido utilizada com sucesso para isolados produtores de KPC que apresentam sensibilidade a esta droga. Uma vez que muitos produtores de KPC são resistentes a todos os antibióticos e tem apresentado boa sensibilidade a fosfomicina, esta tem sido considerada uma boa opção para tratamento de infecções do trato urinário. Esta droga apresenta baixa toxicidade e boa penetração dos tecidos, porém, quando usada em monoterapia a resistência desenvolve-se rapidamente. O uso em sinergia com aminoglicosídeos mostrou que boa eficácia terapêutica, mostrando-se um tratamento efetivo para infecções de multirresistentes (CAI *et al.*, 2009 e ENDIMIANI *et al.*, 2010).

Os carbapenêmicos, paradoxalmente, apesar de serem hidrolisados pela KPC, aumentam a sobrevida dos pacientes quando usados em terapia combinada, especialmente quando a concentração inibitória mínima é menor do que 8 µg/mL. (TUMBARELLO *et al.*, 2012, DAIKOS ,2014) encontrou em seu trabalho que um carbapenêmico com MIC ≤ 4 mg/L associado a uma droga ativa (como um aminoglicosídeo ou colistina ou tigeciclina) resultou em mortalidade significativamente menor do que combinações sem carbapenêmicos, mesmo com todos as drogas ativas no teste de sensibilidade( DAIKOS *et al.*, 2014) Tumbarello *et al.* (2012) sugerem ainda que o melhor carbapenêmico para tratamento de

isolados de KPC seria o meropenem, associado com tigeciclina ou colistina. (TUMBARELLO *et al.*, 2012)

Existem evidências fortes que a monoterapia resulta em mortalidade maior em relação à terapia combinada. A combinação de duas ou mais drogas ativas contra o micro-organismo foi a terapia com maior taxa de sobrevivência. A melhor associação encontrada foi colistina, tigeciclina em combinação com um carbapenêmico. Ela foi comprovadamente melhor que a terapia com colistina e tigeciclina isolados (DAIKOS *et al.*, 2014 e HIRSCH; TAM 2010 e QURESHI *et al.*, 2012 e TUMBARELLO *et al.*, 2012).

Tentativas de descolonização de pacientes têm sido reportadas, No afã de proteger pacientes susceptíveis, como transplantados e imunocomprometidos. Estudos recentes mostraram êxito em descolonizar pacientes portadores de KPC utilizando gentamicina oral e polimixina “E” em gel. O uso do fármaco oral foi melhor do que o uso oral e sistêmico. Os fármacos usados para descolonização não podem ser resistentes no teste de suscetibilidade (OREN *et al.*, 2013 e SAIDEL-ODES *et al.*, 2012 e TASCINI *et al.*, 2014).

Novos antimicrobianos e inibidores estão sendo desenvolvidos para o tratamento de produtores de KPC. Estes incluem inibidores de beta-lactamase que são capazes de inibir KPC, assim como aminoglicosídeos chamados neoglicosídeos, também com ação contra estes micro-organismos (PAUKNER *et al.*, 2009).

NXL-104, LK-157 e BLI-489, ACHN-409 são exemplos de novas terapias para bactérias produtoras de KPC. NXL-104 é um inibidor de beta-lactamase com ação comprovada contra KPC (ENDIMIANI *et al.*, 2011 e ENDIMIANI, CHOUDHARY, *et al.*, 2009), LK-157 é um carbapenêmico tricíclico que apresenta potente atividade contra beta-lactamases da classe A e da classe C (PAUKNER *et al.*, 2009). A atividade de BLI-489, um penem bicíclico, tem sido demonstrada para diversas enzimas, porém ainda está sendo testada contra produtores de KPC. (PETERSEN *et al.* 2009) ACHN-409 é um novo aminoglicosídeo (neoglicosídeo), que aparenta ter potente ação *in vitro* contra produtores de KPC (ENDIMIANI, HUJER, *et al.* , 2009).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 AMOSTRAS CLÍNICAS

Foram analisados um total de 1028 isolados bacterianos encaminhados para o Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) entre Janeiro de 2009 a Maio de 2012 com suspeita de serem produtores de KPC, provenientes de hospitais localizados no Estado do Paraná.

As amostras foram repicadas em ágar McConkey (Biomérieux) de forma a obter-se colônias isoladas incubando-se em estufa bacteriológica por 18 a 24 horas. Após o crescimento em McConkey, os isolados foram analisados quanto a sua pureza e morfologia e foram encaminhados para caracterização fenotípica e extração do DNA e RNA para caracterização genotípica.

Todas as amostras recebidas foram submetidas á caracterização fenotípica, incluindo identificação, teste de sensibilidade e o teste de Hodge modificado. Amostras resistentes a pelo menos um carbapenêmico e/ou apresentaram teste de Hodge positivo foram testadas para a detecção do gene *bla*<sub>KPC</sub> (ANDERSON, *et al.* , 2007). Amostras que se apresentaram sensíveis aos carbapenêmicos e negativas para o teste de Hodge modificado foram excluídas da avaliação genotípica.

Após a avaliação fenotípica foram armazenados em BHI + 10% de glicerol a uma temperatura de -80°C para posterior avaliação genotípica.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA

#### 4.2.1 Identificação e teste de suscetibilidade antimicrobiana

Os isolados foram submetidos à identificação e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) no aparelho Vitek2® (Biomérieux, França), utilizando-se os cartões GN e ASTN105 (Biomérieux, Durham, CA) sr. eguindo as recomendações do fabricante como descrito a seguir:

Partindo de colônias isoladas e puras realiza-se uma turvação equipavente ao tubo 0,5 da escala de McFarland, medida em aparelho Densichek plus (Biomérieux, Durhan, CA). Desta solução toma-se uma alíquota de 145 µL e dilui-se em 3mL de solução salina 0,45% para a realização do teste de sensibilidade utilizando-se o

cartão ASTN 105. A identificação é feita através da primeira solução preparada, utilizando-se o cartão GN. As soluções e os cartões são posicionadas em suporte adequado e submetidos a uma câmara de vácuo para que o líquido adentre os cartões microfluídicos. Uma vez cheios, são selados pelo aparelho Vitek2® através de uma seladora a quente e incubados a uma temperatura de 35°C no interior do aparelho, o qual realizará leituras periódicas das provas e teste de sensibilidade presente no cartão.

#### 4.2.2 Teste de Hodge modificado

Todas as amostras foram testadas para a detecção de carbapenemase através do teste de Hodge modificado, utilizando-se para este, discos de ertapenem e meropenem 10µg conforme previamente descrito (ANDERSON *et al.*, 2007).

Para o teste de Hodge realizou-se uma suspensão 0,5 McFarland através do método de suspensão direta da colônia da cepa padrão *E. coli* 25922 e em seguida diluiu-se a solução 1:10. Inoculou-se em Mueller Hinton ágar (Biomérieux) formando-se um tapete uniforme e deixou-se a placa secar por 3 a 10 minutos. Aplicaram-se os discos de ertapenem e meropenem a uma distância de 20mm borda a borda, tomou-se 3 a 4 colônias com um swab e semeadas numa linha partindo-se do disco (FIGURA 5). Este procedimento foi realizado com os testes e com um controle positivo *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705.

A interpretação do teste de Hodge modificado faz-se através da observação do crescimento da cepa de *Escherichia coli* 25922 dentro do halo de inibição formado pelo antibiótico carbapenêmico. Considerando-se que o ertapenem é muito sensível e o meropenem é mais específico, considera-se positivo o teste em que há a entrada da *Escherichia coli* 25922 no halo dos dois carbapenêmicos, mesmo que apenas levemente no halo do meropenem. Resultados positivos somente no ertapenem são considerados negativos.

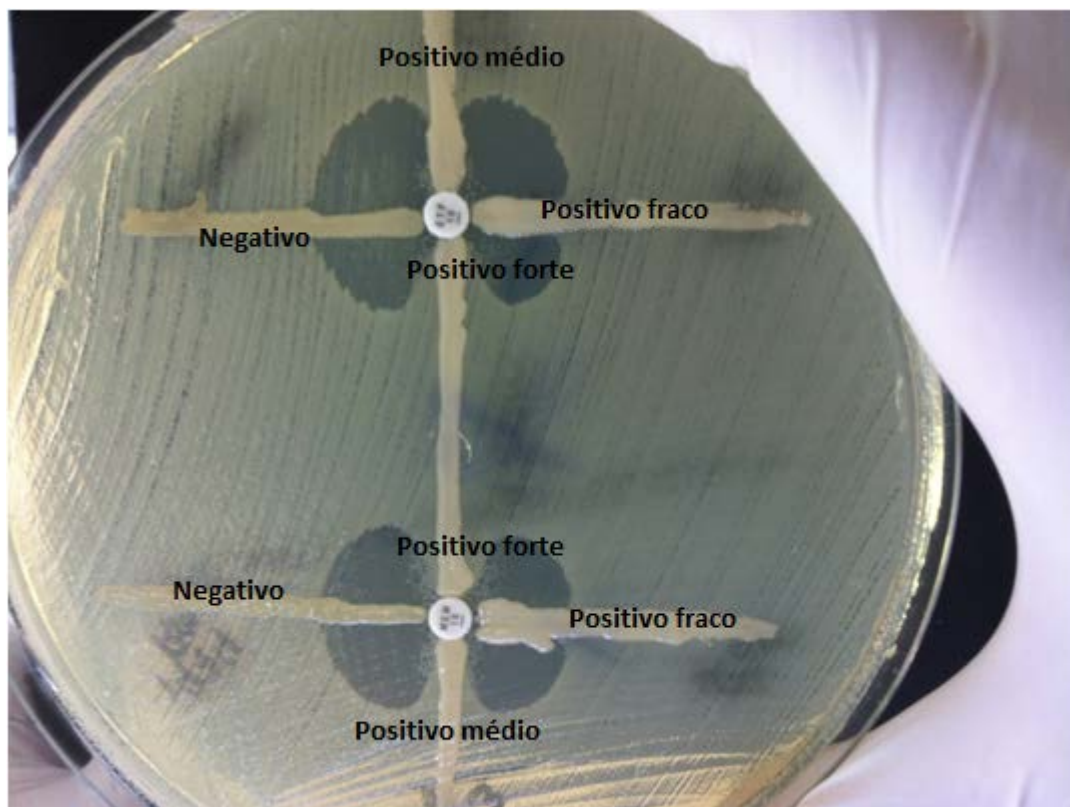


FIGURA 6 - TESTE DE HODGE MODIFICADO

FONTE: LACEN/PR

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO GENOTÍPICA

Foi realizada em todas as amostras com resistência aos carbapenêmicos. A pesquisa do gene *bla<sub>KPC</sub>* foi realizada utilizando-se o kit EasyQ KPC, bioMérieux, (SPANU et al. 2012)

Para determinação da variante do gene *bla<sub>KPC</sub>* foram sequenciados 50 amplicados do gene escolhidos aleatoriamente entre os clones obtidos por repPCR através de tabelas de números aleatórios, geradas no programa Excel.

#### 4.3.1 IDENTIFICAÇÃO DA PRESENÇA DO GENE *bla<sub>KPC</sub>*

##### 4.3.1.1 Extração do material genético

A extração do DNA e RNA mensageiro foi realizada pelo método de lise por fervura para as técnicas de PCR em tempo real e sequenciamento.

De uma solução salina com turvação bacteriana equivalente a escala 0,5 de McFarland foi retirada uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$ , a qual foi submetida a uma temperatura de 94°C por 5 minutos para a extração do material genético, centrifugadas e retiradas 50  $\mu\text{L}$  do sobrenadante. As amostras de DNA e RNA extraídos foram guardadas em tubos *ependorf* em freezer -80°C até a realização do PCR para a pesquisa da *bla<sub>KPC</sub>* em todas as amostras e posterior sequenciamento das amostras selecionadas para este fim.

#### 4.3.1.2 PCR em tempo real para a detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>*.

Para detecção da do gene *bla<sub>KPC</sub>* foi utilizada a técnica de PCR em tempo real baseado em sondas oligonucleotídicas que fluorescem com a hibridização (*molecular beacons*), através do kit Easy Q KPC (Biomérieux, Marcy-L'Étoile, France) a partir do RNA mensageiro extraído conforme descrito anteriormente. Os componentes da reação foram preparados a partir de reagentes liofilizados: controle interno, oligonucleotídeos iniciadores/sonda e enzima. Estes foram adicionados a tubos ópticos nas seguintes quantidades: 2,5  $\mu\text{L}$  do controle interno, 2,5  $\mu\text{L}$  do RNAm extraído, 10  $\mu\text{L}$  da mistura de oligonucleotídeos iniciadores/sonda. Na tampa dos tubos foi adicionada a enzima Taq polimerase fornecida pelo kit. Os tubos foram incubados em termociclador a 65 °C por 2 minutos e 41°C por 2 minutos. Após a incubação os tubos foram tampados submetidos a uma centrifugação rápida (*spin*) e homogeneizados, para que a enzima que se encontrava na tampa tivesse acesso ao para o tubo. Após a adição da enzima, o conjunto de tubos foi colocado no aparelho EasyQ (bioMérieux, Marcy-L'Étoile, France) para reação e leitura. Os resultados foram obtidos após 1 hora e 30 minutos de reação e detecção.

#### 4.3.2 Sequenciamento para tipificação da *bla<sub>KPC</sub>*

Nas amostras em que se identificou o gene *bla<sub>KPC</sub>*, escolhidas aleatoriamente entre os clones foi realizada uma nova reação de PCR convencional (ponto final) para posterior sequenciamento.

A extração do DNA de cada amostra foi idêntica àquela descrita no item 3.3.1.1.

#### 4.3.2.1 PCR para sequenciamento

Os oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a reação inicial de PCR convencional foram KpcA (CTG TCT TGT CTC TCA TGG CC) e KpcB (CCT CGC TGT GCT TGT CAT CC) (NAAS *et al.* 2008). A cada tubo da reação de PCR foi composta de 32,55  $\mu$ L de água Mili Q, 5 $\mu$ L de tampão 10x, 1,2  $\mu$ L de cloreto de magnésio 50mM, 4 $\mu$ L de solução 2,5mM de DNTPs, 1  $\mu$ L Primer KPCa 10mM, 1  $\mu$ L Primer KPCb 10mM, 0,25 de Taq DNA polimerase 1,250, 5  $\mu$ L de DNA extraído por reação totalizando 50 $\mu$ L. As reações foram realizadas em termociclador ABI 9700 (Applied Biosystems) nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 65°C por 5 segundos, 72°C por 45 segundos e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. A purificação foi feita com utilizando-se reagente Exosap (USB corporation, Cleveland,USA) 2  $\mu$ L para cada 5  $\mu$ L de produto de PCR com posterior incubação a 37°C por 15 minutos e 80 °C por 15 minutos.

#### 4.3.2.2 Sequenciamento nucleotídico

Utilizando-se os produtos purificados da PCR convencional, a reação de sequenciamento foi realizada com os mesmos iniciadores (*primers*) em um volume total de 10  $\mu$ L utilizando-se Big dye terminator v. 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sendo 4  $\mu$ L de Big dye terminator, 2  $\mu$ L de tampão EDTA 5x, 1 $\mu$ L de primer KPCa (0,4 $\mu$ M), ou Primer 1 $\mu$ L KPCb (0,4 $\mu$ M), com ciclagem de 96°C por 1 minuto, e 40 ciclos de 96°C por 45 segundos, 65°C por 30 segundos, 60°C por 4 minutos. O produto da reação de sequenciamento foi purificado com reagente Big Dye XTerminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) da seguinte maneira: 20  $\mu$ L de XTerminator e 90 $\mu$ L de reagente SAM, agitação por 30 minutos em vórtex de placa e centrifugação por 2 minutos. O sequenciamento foi realizado em um analisador genético ABI 3100 (Applied Biosystems Inc., Foster, CA) utilizando polímero POP7 e capilar de 50cm. As sequências obtidas, fita *sense* e *antisense*,

foram alinhadas usando o software Clustal W para detecção de inconsistências no sequenciamento. Com a mesma ferramenta foi gerada uma sequência consenso, a qual foi comparada com a base de dados do Genbank através da ferramenta BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/blast.cgi>) e com o gene completo da carbapenemase KPC-2 obtido dos disponíveis na ferramenta GENE do GenBank. (blaKPC-1, GenBank accession no. AF297554 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9389494>)

#### 4.3.3 RepPCR

Para a caracterização epidemiológica, utilizando por repPCR das amostras positivas para KPC, foi utilizado cálculo amostral utilizando-se 90% de confiança e 5% de erro amostral. Foi utilizada a técnica de amostragem aleatória estratificada através de tabelas de números aleatórios gerados no programa Excel, garantindo representatividade amostral na caracterização da similaridade genética. Dos 770 isolados de *Klebsiella pneumoniae* positivos para KPC foram analisados 207 por repPCR para análise de clones. Todos os isolados de *Escherichia coli* e *Enterobacter* sp. positivos para KPC foram testados quanto a clonalidade, excluindo-se apenas aqueles que após duas repetições não foi possível a realização do teste (cepas não tipáveis) (SANTOS, 2009).

A similaridade genética dos isolados foi determinada através da técnica de repPCR (repetitive extragenic palindromic PCR). Esta técnica se baseia na amplificação de sequências repetitivas não codificadoras presentes no DNA bacteriano (ENDIMIANI *et al.* 2009).

A técnica escolhida para o repPCR foi o DiversiLab® automatized system (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, França). A extração do DNA foi feita utilizando o *UltraClean™ Microbial DNA Isolation kit* (MO Bio Laboratories, Inc., Carlsbad, CA, USA).

A técnica consiste em:

fase 1 – Adição de células bacterianas ao tubo contendo micropartículas de sílica estéril (*beads*) e estabilização e homogeneização da dispersão das células bacterianas antes da lise através do reagente *Microbead solution*,

fase 2 – Lise química com tampão MD1 que contém um detergente aniônico que quebra as lipídeos de membrana das células,

fase 3 – Agitação da mistura obtida nas fases 1 e 2 por 10 minutos em vórtex *MO BIO Vortex* para que ocorra a combinação de lise química e mecânica.

fase 4 – Centrifugação por 30 segundos a 10.000G para precipitação do debris de células no fundo do tubo.

fase 5 – Precipitação do material orgânico e inorgânico não-DNA incluindo debris celular e proteínas com o reagente MD2. Centrifugação por 30 segundos a 10.000G

fase 6 – Transferência do material para tubo com coluna de sílica e adição de uma solução salina hipersaturada para a fixação o DNA na membrana de sílica contida no tubo. Centrifugação por 30 segundos a 10.000G.

fase 7 – Lavagem com solução baseada em metanol (solução MD4) para a retirada de resíduos de sal e outros contaminantes que não estão ligados á membrana. Centrifugação por 30 segundos a 10.000G.

fase 8 - Centrifugação por 1 minuto a 10.000G para a secagem da membrana de sílica.

fase 9 – Adição do tampão de eluição MD5 para liberação do DNA ligado á membrana. Centrifugação por 30 segundos a 10.000G.

O DNA obtido foi lido em um espectrofotômetro com filtro de 260nm, faixa de leitura da dupla fita (Eppendorf Biophotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Germany), analisado quanto a sua pureza (relação 260/280 maior que 1,5 e relação 260/230 maior que 1,0 foram consideradas aceitáveis) e foi diluído a uma concentração de 35ng/μL para uma boa padronização da análise. Para o repPCR foi utilizado o kit DiversiLab® *Klebsiella* (Biomérieux, Marcy-L'Étoile, France). A reação foi realizada segundo instruções do fabricante consistindo em: 2,5 μL de tampão Gene Amp 10x, 0,5 μL de enzima AmpliTaq, Taq DNA polimerase (Life Diagnostics), 2,0 μL de conjunto de primers e 18 μL de solução Rep PCR MM1 por reação, finalizando um volume de 23 μL . A esta mistura foi adicionado 2 μL do DNA extraído. Os tubos de

controle positivo e negativo são confeccionados com a mesma mistura de reagentes e acrescidos dos controles positivos e negativos fornecidos pelo kit. Foram incubados em termociclador Veriti (Life Technologies, Tokio, Japan) com o protocolo repPCR55 que consiste em 94°C por 2 minutos e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 70°C por 90 segundos, seguidas de uma extensão final de 3 minutos a 70°C, sendo mantidas a 4°C até que os tubos sejam retirados do termociclador. A eletroforese dos amplificadores gerados foi realizada em microchip específico e lida através do equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). Os fingerprints foram analisados através do software baseado na internet DiversiLab<sup>®</sup> utilizando-se a correlação de Pearson. Para os isolados de *Klebsiella pneumoniae* analisados foram considerados clonais os que apresentaram similaridade maior que 90%. Endimiani; Depasquale; et al. (2009), *Escherichia coli* e *Enterobacter sp.* foram considerados clonais quando a similaridade foi maior que 95% (STEINMANN *et al.*, 2011).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 CONFIRMAÇÃO DE PRODUÇÃO DE *bla<sub>KPC</sub>* EM AMOSTRAS RECEBIDAS

Um total de 1028 amostras foram analisadas no período de janeiro de 2009 a maio de 2012. Destas, 770 (74,9%) foram positivas para o gene *bla<sub>KPC</sub>* e 258 (25,1%) foram negativas. Os materiais recebidos estão ilustrados na TABELA 3 e GRÁFICO 1.

TABELA 3 - AMOSTRAS CLÍNICAS FONTE DOS ISOLADOS

Amostra	Quantidade	%
Swab de vigilância (swab retal)	334	32,5%
Urina	232	22,6%
Trato respiratório	134	13%
Sangue	99	9,6%
Não informado	73	7,1%
Ponta de cateter	66	6,4%
Ferida cirúrgica	51	4,9%
Líquor	12	1,2%
Líquidos estéreis	12	1,2%
Biópsia	9	0,9%
Abscesso	6	0,6%
<b>Total</b>	<b>1028</b>	<b>100%</b>

FONTE: A AUTORA 2014

Como podemos observar na tabela e fica bem representado no gráfico abaixo, a maioria das amostras recebida preliminarmente foram de swabs de vigilância (swab retal), seguidas de amostras urinárias, respiratórias e sangue.

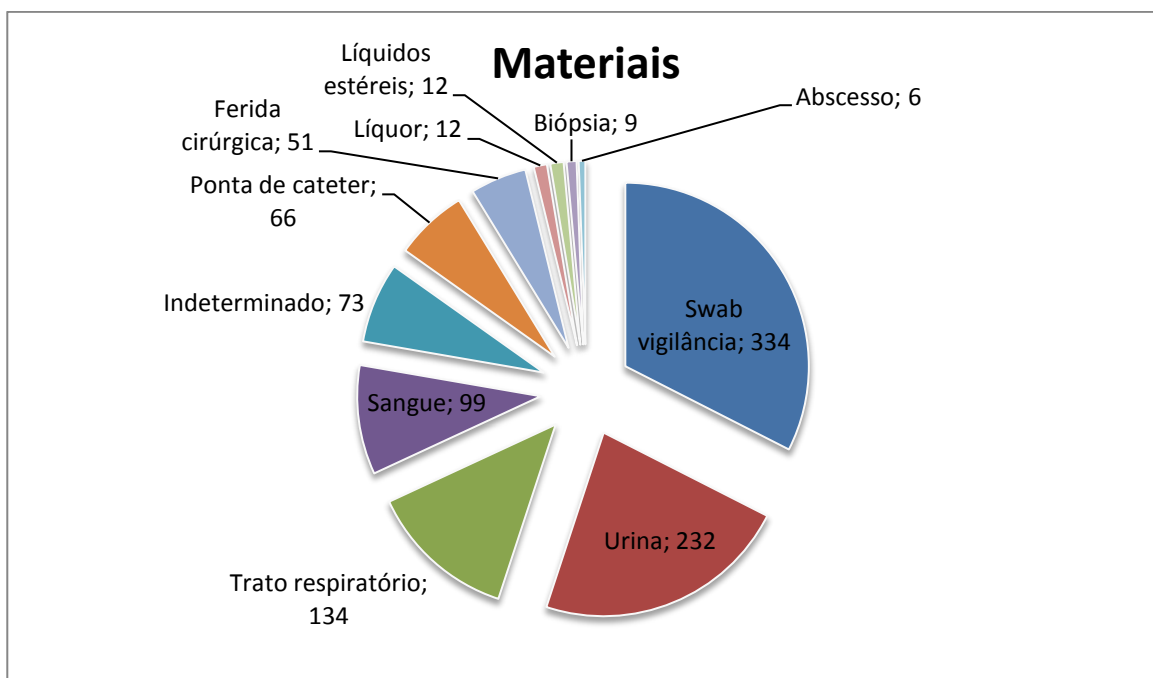


GRÁFICO 1 – AMOSTRAS CLÍNICAS FONTE DOS ISOLADOS RECEBIDOS

FONTE: A AUTORA 2014

Das 1028 amostras analisadas, observamos que no ano de 2009 foram encaminhadas 17 amostras de enterobactérias com suspeita de serem produtoras de KPC, porém não houve identificação desta carbapenemase em nenhuma das amostras. No ano de 2010 foram recebidas 73 amostras suspeitas de produção de carbapenemase, 11 foram positivas para KPC (15%) e 62 (84,9%) foram negativas, sendo o primeiro isolado positivo para *bla*<sub>KPC</sub> por PCR encontrado em Outubro de 2010.

No ano de 2011 foram recebidas 571 isolados suspeitos, sendo 452 positivos para *bla*<sub>KPC</sub> (79,2%) e 119 (20,8%) negativos. De Janeiro a Dezembro de 2011 este tipo de resistência havia chegado a 21 hospitais distribuídos em cinco cidades do Estado do Paraná.

Entre Janeiro e Maio de 2012 foram recebidas 366 amostras, onde 307 casos foram positivos (83,9%) para *bla*<sub>KPC</sub> e 59 (16,1%) negativos. Em maio de 2012 havia 30 hospitais em que foram detectados micro-organismos produtores de KPC.

Entre 2009 e 2012 houve um aumento significativo de amostras recebidas e positivas, como ilustrado no GRÁFICO 2.

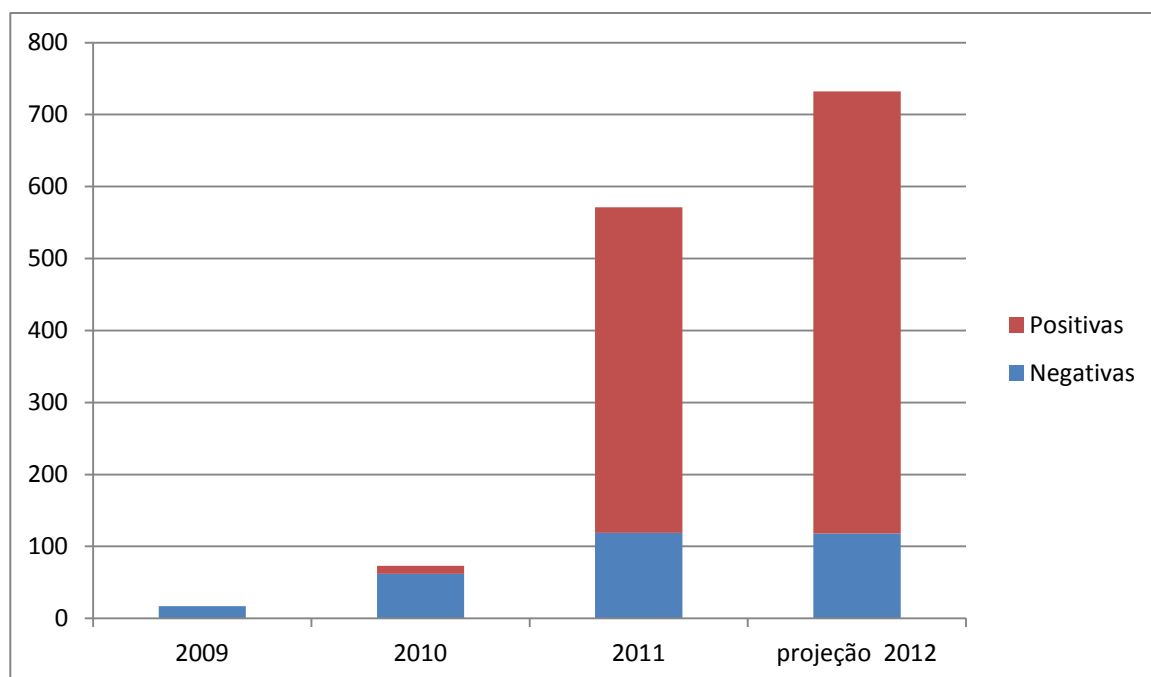


GRÁFICO 2 - AMOSTRAS RECEBIDAS NO PERÍODO DE 2009 A 2012

FONTE: A AUTORA 2014

Até o ano de 2005, a resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos era um evento pouco frequente e havia uma preocupação em estudar os isolados encontrados para evitar a sua disseminação. (BRATU, MOOTY *et al.*, 2005) Apesar da carbapenemase KPC ter sido descrita em 2001 por Yigit (YIGIT *et al.*, 2001), as sua disseminação só se deu a partir de 2005, na Carolina do Norte, Estados Unidos. (BRATU, MOOTY, *et al.*, 2005)

Infelizmente, assim como os micro-organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), os produtores de KPC se disseminaram rapidamente pelo mundo. Em apenas um ano já havia se espalhado pela Europa, Américas, e Ásia. (CHEN, 2012)

No Estado do Paraná o primeiro isolado se deu em outubro 2009, apesar de já estar presente no Brasil desde 2005 (PAVEZ *et al.*, 2009). Outros estados do Brasil já haviam relatado a presença de KPC, como o Rio de Janeiro, São Paulo, Pernambuco e Paraíba. (PEIRANO *et al.*, 2009)

Dentre os 770 isolados positivos para KPC, foram encontradas 726 (94,4%) *Klebsiella pneumoniae*, 23 (3%) *Enterobacter* spp., 12 (1,6%) *Escherichia coli*, 4 (0,5%) *Serratia marcescens*, 2 (0,26%) *K. oxytoca*, 1 (0,12%) *Citrobacter koseri*, e 1 (0,12%) *Pseudomonas aeruginosa*. (GRÁFICO 3)

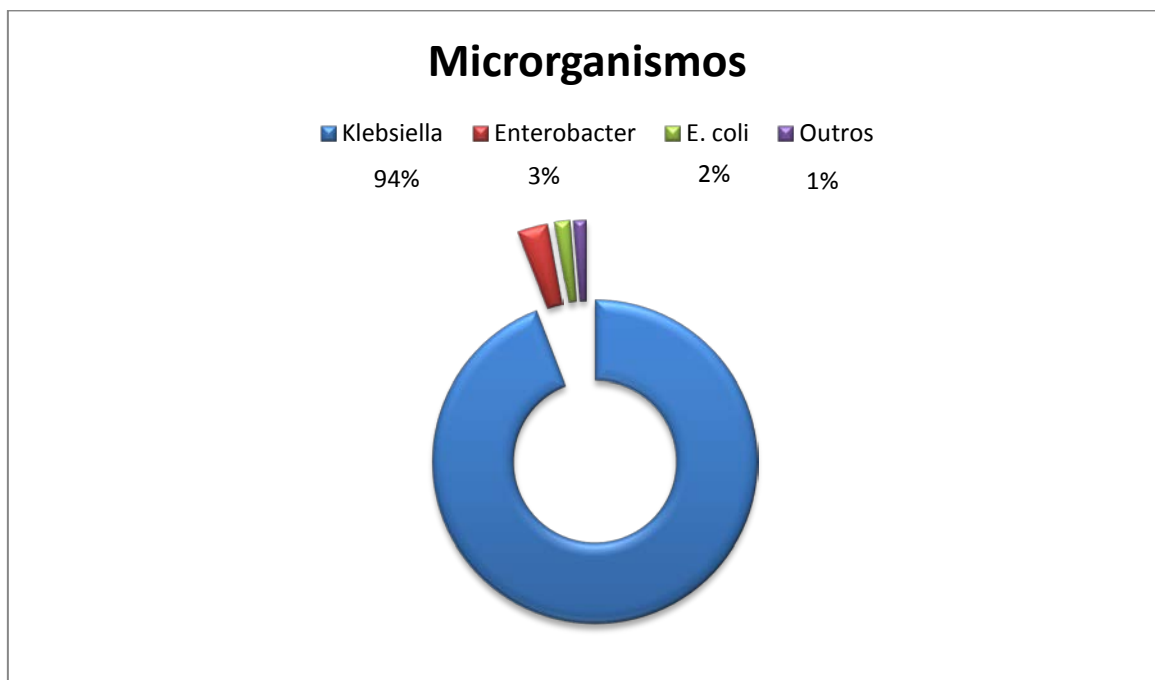


GRÁFICO 3 - PREVALÊNCIA DOS MICRO-ORGANISMOS

FONTE: A AUTORA 2014

Assim como vários estudos, (BRATU, LANDMAN *et al.*, 2005) a maior prevalência de KPC foi encontrada em *Klebsiella pneumoniae* (94%), seguida por *Escherichia coli*, *Enterobacter* sp. e outras espécies menos frequentes. A prevalência de gene *bla<sub>KPC</sub>* em *Klebsiella pneumoniae* é notória.

## 5.2 ANÁLISE DA EFICÁCIA DO TESTE DE HODGE MODIFICADO (THM) COMO TESTE DE TRIAGEM DE KPC

De um total de 1028 testes de Hodge modificado realizados no período, encontramos 770 verdadeiros positivos, 17 falso positivos, 227 verdadeiro negativos e 1 falso negativo, usando a detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>* como padrão ouro (*gold standard*), 15 (1,45 %) foram considerados testes de Hodge inconclusivos. Estes últimos foram considerados negativos para efeito de cálculo. Encontramos um bom

grau de correlação da positividade para KPC no teste de Hodge, o que nos mostra que o teste de Hodge modificado ainda pode ser um teste importante a ser feito para a detecção de KPC em áreas com alta prevalência deste tipo de resistência e aonde outras carbapenemases não ocorram com frequência. O uso de ertapenem e meropenem como marcadores, sendo o primeiro com alta sensibilidade e o segundo com alta especificidade para a detecção de KPC, minimiza os resultados falso positivos para produtores de enzimas como a CTX-M e AmpC (CARVALHAES, PICÃO, NICOLETTI, XAVIER, & GALES, 2010; ANDERSON *et al.*, 2007). A ocorrência de resultados falso positivos, falso negativos e inconclusivos se deve em grande parte na experiência de interpretação do técnico que realiza a leitura, uma vez que alguns micro-organismos produtores de enzimas como a CTX-M e cefalosporinases do tipo AmpC podem aparentar ser resultados positivos fracos para o teste, apesar de não apresentarem atividade de carbapenemase.

Apesar de terem sido propostas medidas para melhorar a sensibilidade e especificidade do teste para outras carbapenemases, como a adição de zinco ao meio, (GIRLICH *et al.*, 2012) atualmente, a tendência para a detecção das carbapenemases parece ser a realização de testes com inibidores como o ácido borônico (detecção de KPC) e EDTA (detecção de metalo-beta-lactamases), dada a disseminação de outros mecanismos que não KPC. Para o teste de Hodge, a sensibilidade para detecção de NDM-1 parece ser menor que 50%, enquanto OXA-48, outro mecanismo emergente, não se mostra positivo para este teste (YAN *et al.*, 2011).

### 5.3 RESULTADO DO SEQUENCIAMENTO DO GENE

Após a obtenção da sequência nucleotídica e comparação com os genes depositados no GenBank o gene *bla<sub>KPC</sub>* compatível com a variável KPC-2.

A variável do gene *bla<sub>KPC</sub>* encontrada em nosso estudo foi o KPC-2, o qual é comumente encontrado em países como o Brasil e também em Israel, China, França, Grécia, Colômbia, Taiwan e Estados Unidos. Outras variáveis de KPC foram descritos, mas, com exceção da KPC-3, parecem estar circunscritos aos locais de descrição (CHEN, 2012).

#### 5.4 EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR POR repPCR

Na epidemiologia molecular de *Klebsiella pneumoniae* foram encontrados 8 perfis clonais, sendo que há a prevalência de 2 clones principais, com elevado número de isolados (110 e 67 respectivamente), e 6 clones com reduzido número de amostras. Podemos observar que a diversidade maior de clones ocorreu na cidade de Curitiba, porém isto pode ser resultado do grande número de isolados proveniente desta cidade (639 isolados, 83% dos positivos para KPC). (FIGURA 7)

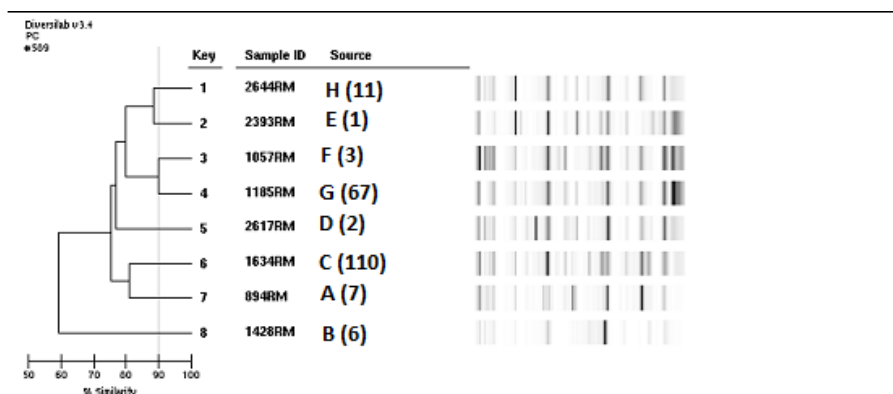


FIGURA 7 – DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de *Klebsiella pneumoniae* KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab.

FONTE: A AUTORA 2014

O clone A (7 isolados) ocorre em apenas 4 hospitais de Curitiba, clone B (6 isolados) em apenas dois hospitais de Curitiba, distintos do clone A e que tem a particularidade de serem administrados pela mesma instituição. O clone C (110 isolados) parece ser o clone epidêmico que disseminou-se por 19 hospitais e 4 cidades diferentes, Curitiba, Campina Grande do Sul, Maringá e Paranavaí. O clone D é constituído de apenas 2 isolados, porém tem a característica de estar presente em duas cidades, Curitiba e Londrina. O clone E é um caso isolado e só conta com um representante localizado na cidade de Curitiba. O clone F (3 isolados) com três representantes, também pode ser considerado como casos isolados e contém duas instituições da cidade de Curitiba envolvidas. O clone G (67 isolados) é o segundo maior clone e está presente nas cidades de Curitiba e Londrina. O clone H (11 isolados) é pequeno, porém está disseminado em 3 cidades, Maringá, Londrina e Curitiba.

Observamos que o clone C foi um clone importante para a disseminação no Estado, estando em maior número de presente em todas as regionais e na maioria das cidades estudadas, porém não em Londrina, a segunda cidade em incidência de KPC. Podemos observar também que o clone G está presente apenas em Londrina, Campo Mourão e Curitiba. O perfil clonal mais bem sucedido sua disseminação no Paraná foi o C, indicando que a capital provavelmente foi um pólo importante na disseminação da KPC no Estado.

Quanto a temporalidade podemos observar que os clones A, B, E e F estão presentes apenas nos anos de 2010 e 2011, o clone D apenas no ano de 2012. Os clones G e H estão presentes nos anos de 2011 e 2012, sendo que o clone C é o único presente desde 2010 até 2012.



FIGURA 8 - OCORRÊNCIA DE KPC POR REGIONAL DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ  
 FONTE: SESA (SECRETARIA DE SAÚDE – PARANÁ) MODIFICADO PELA AUTORA 2014

A epidemiologia molecular dos isolados (6 isolados) de *Escherichia coli* mostrou total ausência de clonalidade entre os isolados, (FIGURA 8) sugerindo a aquisição de elemento genético móvel entre bactérias presentes no trato gastrointestinal dos pacientes portadores de KPC, como reportado em estudos anteriores, porém o reduzido número de isolados analisados não permite que se façam afirmações, somente sugestões (GOREN *et al.*, 2010). As *Escherichia coli* produtoras de KPC foram encontradas em 2 hospitais de Curitiba e 3 hospitais de Londrina.

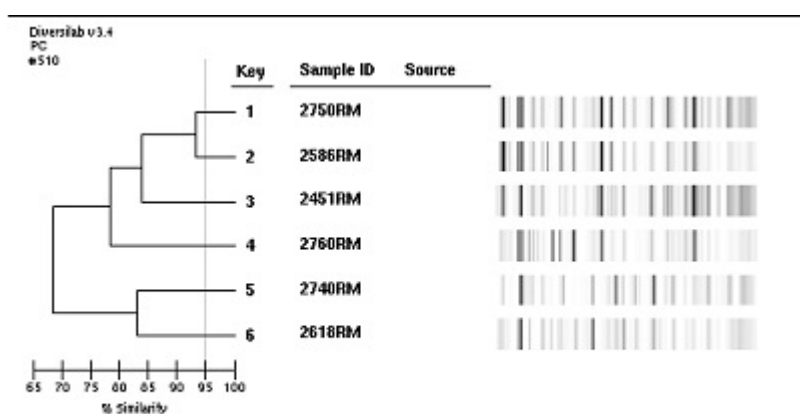


FIGURA 9 - DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de *Escherichia coli* KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab.

FONTE: A AUTORA 2014

Para o micro-organismo *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* foram encontrados 3 e 2 perfis clonais respectivamente. Em relação aos *Enterobacter aerogenes*, apesar do reduzido número de isolados estudados, (10 isolados), foi possível observar expansão clonal, uma vez que o clone A possui 70% dos isolados. No caso da espécie *Enterobacter cloacae* o reduzido número de isolados (3 isolados) não possibilitou a análise de perfis clonais, apesar de que dois dos 3 isolados apresentaram-se semelhantes. Os isolados de *Enterobacter sp.* positivos para KPC foram encontrados nos municípios de Araucária, Curitiba e Londrina, sendo em um hospital de Araucária, 7 hospitais de Curitiba e 3 hospitais de Londrina.

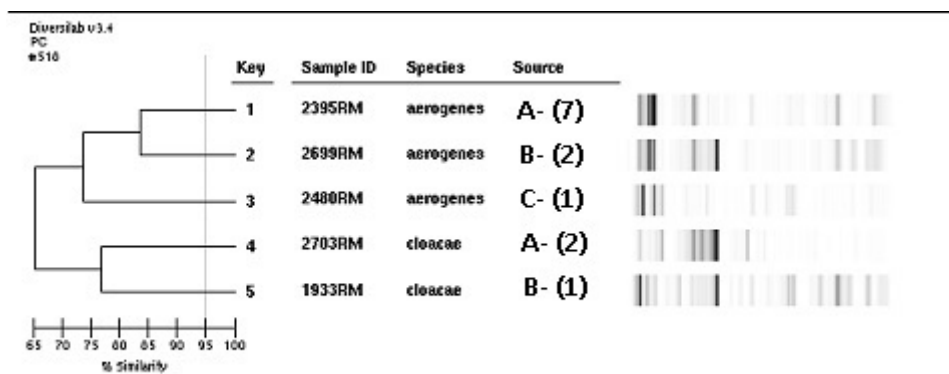


FIGURA 10 - DENDROGRAMA representando os perfis de similaridade genética de *Enterobacter* spp. KPC por repPCR gerado pelo sistema Diversilab.

FONTE: A AUTORA 2014

## 6 CONCLUSÃO

- A presença da carbapenemase KPC foi confirmada em 770 amostras das 1028 recebidas para confirmação no LACEN/PR. Das amostras que apresentaram resultados positivos, foram encontradas 726 (94,29%) *Klebsiella pneumoniae*, 23 (2,99%) *Enterobacter sp.*, 12 (1,56%) *Escherichia coli*, 4 (0,52%) *Serratia marcescens*, 1 (0,13%) *Citrobacter koseri*, 1 (0,13%) *Klebsiella oxytoca*, 1 (0,13%) *Pseudomonas aeruginosa*.
- A sequência obtida do gene *bla*<sub>KPC</sub> presente nos diferentes perfis clonais determinados por repPCR foi compatível com a variante KPC-2.
- Foram testados 207 isolados para a caracterização epidemiológica do micro-organismo *Klebsiella pneumoniae* por repPCR, revelando 8 perfis clonais, sendo 2 predominantes, com 110 e 67 isolados, abrangendo 53,2% e 32,3% as amostras respectivamente e 6 perfis clonais com pequeno número de amostras. Para *Escherichia coli*, dentre os 6 isolados testados, verificou-se presença de 6 perfis clonais para a bactéria, sugerindo que estes micro-organismos podem ter adquirido a resistência por conjugação. Com relação à *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes* o estudo de respectivamente 3 e 11 isolados revelou a presença de 2 perfis clonais para o *Enterobacter cloacae* e 3 perfis clonais distintos para *Enterobacter aerogenes* sendo clone um predominante, abrangendo 7 isolados, o que sugere uma expansão clonal deste micro-organismo.
- A correlação do teste de Hodge modificado para a detecção da produção da carbapenemase KPC frente ao padrão ouro PCR para *bla*<sub>KPC</sub> foi muito boa, mostrando ser um bom teste para predizer a produção de KPC em áreas endêmicas onde não haja predominância de outras carbapenemases.

## REFERÊNCIAS

- AMBLER, R. P. The Structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980. Disponível em: <<http://rstb.royalsocietypublishing.org/cgi/doi/10.1098/rstb.1980.0049>>. Acesso em: 13/2/2013.
- ANDERSON, K. F.; LONSWAY, D. R.; RASHEED, J. K.; et al. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723–5, 2007. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/45/8/2723.short>>. Acesso em: 6/7/2013.
- BEESELEY, T.; GASCOYNE, N.; KNOTT-HUNZIKER, V.; et al. The inhibition of class C beta-lactamases by boronic acids. **Biochemical Journal**, 1983. Portland Press Ltd. Disponível em: <<http://www.biochemj.org/bj/209/bj2090229.htm>>. Acesso em: 23/12/2013.
- BOLMSTRÖM, A.; KARLSSON, A.; ENGELHARDT, A.; et al. Validation and reproducibility assessment of tigecycline MIC determinations by Etest. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2474–9, 2007. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1951261&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 16/1/2014.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Archives of internal medicine**, v. 165, n. 12, p. 1430–5, 2005. American Medical Association. Disponível em: <<http://archinte.jamanetwork.com/article.aspx?articleid=486627>>. Acesso em: 16/1/2014.
- BRATU, S.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 3018–20, 2005. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/49/7/3018.full>>. Acesso em: 16/12/2013.
- BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. MINIREVIEW A Functional Classification Scheme for  $\beta$ -Lactamases and Its Correlation with Molecular Structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.
- CAI, Y.; FAN, Y.; WANG, R.; AN, M.-M.; LIANG, B.-B. Synergistic effects of aminoglycosides and fosfomicin on *Pseudomonas aeruginosa* in vitro and biofilm infections in a rat model. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 64, n. 3,

p. 563–6, 2009. Disponível em:

<<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/long/64/3/563>>. Acesso em: 24/3/2014.

CARSON, C. A.; SHEAR, B. L.; ELLERSIECK, M. R.; SCHNELL, J. D. Comparison of Ribotyping and Repetitive Extragenic Palindromic-PCR for Identification of Fecal *Escherichia coli* from Humans and Animals. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 3, p. 1836–1839, 2003. Disponível em:

<<http://aem.asm.org/content/69/3/1836.short>>. Acesso em: 20/1/2014.

CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; NICOLETTI, A. G.; XAVIER, D. E.; GALES, A. C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 2, p. 249–51, 2010. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19996141>>. Acesso em: 11/5/2012.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; DESHPANDE, L. M.; FRITSCHÉ, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 570–3, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2224761&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 21/1/2014.

CHEN, L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infection and Drug Resistance**, v. 5, p. 133, 2012. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3460674&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23/6/2013.

CHEN, L.; MEDIÁVILLA, J. R.; ENDIMIANI, A.; et al. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla* KPC) variants. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 2, p. 579–85, 2011.

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3043520&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/8/2011.

CUZON, G.; NAAS, T.; DEMACHY, M. C.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 796–7, 2008. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2224780&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 4/9/2011.

- DAIKOS, G. L.; TSAOUSI, S.; TZOUVELEKIS, L. S.; et al. Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Infections: Lowering Mortality by Antibiotic Combination Schemes and the Role of Carbapenems. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2322–8, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24514083>>. Acesso em: 26/3/2014.
- DALFINO, L.; PUNTILLO, F.; MOSCA, A.; et al. High-dose, extended-interval colistin administration in critically ill patients: is this the right dosing strategy? A preliminary study. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 54, n. 12, p. 1720–6, 2012. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/54/12/1720>>. Acesso em: 24/3/2014.
- DOI, Y.; POTOSKI, B. A.; ADAMS-HADUCH, J. M.; et al. Simple Disk-Based Method for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Type  $\beta$ -Lactamase by Use of a Boronic Acid Compound. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 12, p. 4083–4086, 2008.
- DOYLE, D.; PEIRANO, G.; LASCOLS, C.; et al. Laboratory detection of Enterobacteriaceae that produce carbapenemases. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877–80, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3503014&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1/4/2014.
- ENDIMIANI, A.; CHOUDHARY, Y.; BONOMO, R. A. In vitro activity of NXL104 in combination with beta-lactams against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing KPC carbapenemases. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 8, p. 3599–601, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/53/8/3599>>. Acesso em: 24/3/2014.
- ENDIMIANI, A.; DEPASQUALE, J. M.; FORERO, S.; et al. Emergence of bla KPC -containing *Klebsiella pneumoniae* in a long-term acute care hospital : a new challenge to our healthcare system. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, , n. September, p. 1102– 1110, 2009.
- ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; et al. ACHN-490, a neoglycoside with potent in vitro activity against multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4504–7, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/53/10/4504>>. Acesso em: 24/3/2014.
- ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M.; et al. Evaluation of ceftazidime and NXL104 in two murine models of infection due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 82–5, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3019638&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 22/10/2011.

ENDIMIANI, A.; PATEL, G.; HUJER, K. M.; et al. In vitro activity of fosfomicin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 526–9, 2010. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/54/1/526>>. Acesso em: 24/3/2014.

FLUIT, A. C.; TERLINGEN, A. M.; ANDRIESSEN, L.; et al. Evaluation of the DiversiLab system for detection of hospital outbreaks of infections by different bacterial species. **Journal of clinical microbiology**, v. 48, n. 11, p. 3979–89, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3020881&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/5/2012.

FOXMAN, B. Molecular Epidemiology: Focus on Infection. **American Journal of Epidemiology**, v. 153, n. 12, p. 1135–1141, 2001. Disponível em: <<http://aje.oxfordjournals.org/content/153/12/1135.full>>. Acesso em: 30/1/2014.

FRANCIS, R. O.; WU, F.; DELLA-LATTA, P.; SHI, J.; WHITTIER, S. Rapid Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes in Enterobacteriaceae Directly From Blood Culture Bottles by Real-Time PCR. **American Journal of Clinical Pathology**, 2012.

GARONZIK, S. M.; LI, J.; THAMLIKITKUL, V.; et al. Population pharmacokinetics of colistin methanesulfonate and formed colistin in critically ill patients from a multicenter study provide dosing suggestions for various categories of patients. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3284–94, 2011. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/55/7/3284>>. Acesso em: 24/3/2014.

GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 50, n. 2, p. 477–9, 2012. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/50/2/477.full>>. Acesso em: 6/7/2013.

GOREN, M. G.; CARMELI, Y.; SCHWABER, M. J.; et al. Transfer of carbapenem-resistant plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in patient. **Emerging infectious diseases**, v. 16, n. 6, p. 1014–7, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3086234&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 24/3/2014.

HAHM, B.-K.; MALDONADO, Y.; SCHREIBER, E.; BHUNIA, A. K.; NAKATSU, C. H. Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. **Journal of Microbiological Methods**, v. 53, n. 3, p. 387–399, 2003. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701202002592>>. Acesso em: 20/1/2014.

HINDIYEH, M.; SMOLLEN, G.; GROSSMAN, Z.; et al. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. **Journal of clinical microbiology**, v. 46, n. 9, p. 2879–2883, 2008.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119–25, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20378670>>. Acesso em: 18/7/2011.

HONG, T.; MOLAND, E. S.; ABDALHAMID, B.; et al. Escherichia coli: development of carbapenem resistance during therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 40, n. 10, p. e84–6, 2005. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/content/40/10/e84.short>>. Acesso em: 18/2/2014.

JACK, G. W.; RICHMOND, M. H. A comparative study of eight distinct beta-lactamases synthesized by gram-negative bacteria. **Journal of general microbiology**, v. 61, n. 1, p. 43–61, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5489064>>. .

KITCHEL, B.; SUNDIN, D. R.; PATEL, J. B. Regional dissemination of KPC-producing Klebsiella pneumoniae. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 10, p. 4511–3, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2764151&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 30/10/2011.

LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 8, n. 4, p. 557–84, 1995. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172876&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. .

MAZZARIOL, A.; LO CASCIO, G.; BALLARINI, P.; et al. Rapid molecular technique analysis of a KPC-3-producing Klebsiella pneumoniae outbreak in an Italian surgery unit. **Journal of chemotherapy (Florence, Italy)**, v. 24, n. 2, p. 93–6, 2012. Maney Publishing. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/maney/joc/2012/00000024/00000002/art00006>>. Acesso em: 28/9/2013.

MONTEIRO, J.; WIDEN, R. H.; PIGNATARI, A. C. C.; KUBASEK, C.; SILBERT, S. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 67, p. 906–9, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22232516>>. .

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet infectious diseases**, v. 9, n. 4, p. 228–36, 2009. Elsevier Ltd. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19324295>>. Acesso em: 20/7/2011.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791–8, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22000347>>. .

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms MINIREVIEW Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbial Organisms. **Journal of clinical microbiology**, v. 37, n. 6, 1999.

OREN, I.; SPRECHER, H.; FINKELSTEIN, R.; et al. Eradication of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae gastrointestinal colonization with nonabsorbable oral antibiotic treatment: A prospective controlled trial. **American journal of infection control**, v. 41, n. 12, p. 1167–72, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0196655313008894>>. Acesso em: 29/3/2014.

PAUKNER, S.; HESSE, L.; PREZELJ, A.; SOLMAJER, T.; URLEB, U. In vitro activity of LK-157, a novel tricyclic carbapenem as broad-spectrum {beta}-lactamase inhibitor. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 2, p. 505–11, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/53/2/505>>. Acesso em: 24/3/2014.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/content/53/6/2702.short>>. Acesso em: 22/3/2013.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; VAL PASSOS, V. L.; et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–8, 2009. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/cgi/content/long/63/2/265>>. Acesso em: 9/5/2013.

**Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing ; Twenty-Second Informational Supplement.** 2012.

PETERSEN, P. J.; JONES, C. H.; VENKATESAN, A. M.; BRADFORD, P. A. Efficacy of piperacillin combined with the Penem beta-lactamase inhibitor BLI-489 in murine models of systemic infection. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 4,

p. 1698–700, 2009. Disponível em: <<http://aac.asm.org/cgi/content/long/53/4/1698>>. Acesso em: 24/3/2014.

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

Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1932750&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 11/9/2010.

QURESHI, Z. A.; PATERSON, D. L.; POTOSKI, B. A.; et al. Treatment outcome of bacteremia due to KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: superiority of combination antimicrobial regimens. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 4, p. 2108–13, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252816>>. Acesso em: 30/7/2012.

SANTOS, Glauber Eduardo de Oliveira. *Cálculo amostral*: calculadora on-line.

Disponível em: <<http://www.calculoamostral.vai.la>>. Acesso em: [21/08/2009].

SAIDEL-ODES, L.; POLACHEK, H.; PELED, N.; et al. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of selective digestive decontamination using oral gentamicin and oral polymyxin E for eradication of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* carriage. **Infection control and hospital epidemiology : the official journal of the Society of Hospital Epidemiologists of America**, v. 33, n. 1, p. 14–9, 2012.

University of Chicago Press Chicago, IL. Disponível em:

<<http://www.jstor.org/stable/10.1086/663206>>. Acesso em: 1/4/2014.

SMITH MOLAND, E. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711–714, 2003. Disponível em:

<<http://jac.oxfordjournals.org/content/51/3/711.full>>. Acesso em: 16/12/2013.

SNELLING, A.; GERNER-SMIDT, P.; HAWKEY, P.; et al. Validation of use of whole-cell repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR (REP-PCR) for typing strains belonging to the *Acinetobacter calcoaceticus*-*Acinetobacter baumannii* complex and application of the method to the investigation of a hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 34, n. 5, p. 1193–1202, 1996. Disponível em:

<<http://jcm.asm.org/content/34/5/1193.short>>. Acesso em: 20/1/2014.

STEINMANN, J.; KAASE, M.; GATERMANN, S.; et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. ,2011. Disponível em:

<<http://hzi.openrepository.com/hzi/handle/10033/213989>>. Acesso em: 25/5/2014.

TASCINI, C.; SBRANA, F.; FLAMMINI, S.; et al. Oral Gentamicin Gut

Decontamination for Prevention of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections:

Relevance of Concomitant Systemic Antibiotic Therapy. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 1972–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24419337>>. Acesso em: 28/3/2014.

TENOVER, F. C.; KALSI, R. K.; WILLIAMS, P. P.; et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging infectious diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209–13, 2006. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3291231&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 9/3/2013.

TOLEDO, P. V. Surveillance Program for Multidrug Resistant Bacteria in Healthcare Associated Infections - a City Perspective at South Brazil. **Journal of Hospital Infection**, 2011.

TSAKRIS, A.; KRISTO, I.; POULOU, A.; et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 2, p. 362–7, 2009. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/47/2/362.short>>. Acesso em: 23/12/2013.

TSAKRIS, A.; POULOU, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; et al. Use of boronic acid disk tests to detect extended- spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase-possessing enterobacteriaceae. **Journal of clinical microbiology**, v. 47, n. 11, p. 3420–6, 2009. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2772593&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 8/9/2011.

TUMBARELLO, M.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 55, n. 7, p. 943–50, 2012. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/cgi/content/long/55/7/943>>. Acesso em: 24/3/2014.

VERSALOVIC, J.; KOEUTH, T.; LUPSKI, R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 19, n. 24, p. 6823–6831, 1991. Disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org/content/19/24/6823.abstract>>. Acesso em: 20/1/2014.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HØIBY, N. OXA-type carbapenemases. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 57, n. 3, p. 373–83, 2006. Disponível em: <<http://jac.oxfordjournals.org/content/57/3/373.short>>. Acesso em: 4/3/2013.

WANG, L.; GU, H.; LU, X. Rapid low-cost detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes by internally controlled real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, p. 361–363, 2012.

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. S3–S7, 1999. Elsevier. Disponível em: <[http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579\(99\)00085-0/abstract](http://www.ijaaonline.com/article/S0924-8579(99)00085-0/abstract)>. Acesso em: 18/3/2014.

YAN, Y.; MENG, S.; BIAN, D.; et al. Comparative Evaluation of Bruker Biotyper and BD Phoenix Systems for Identification of Bacterial Pathogens Associated with Urinary Tract Infections. **Journal of clinical microbiology**, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21918029>>. Acesso em: 1/11/2011.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing  $\beta$ -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 809–809, 2008. American Society for Microbiology (ASM). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2224771/>>. Acesso em: 23/6/2013.