

# CARBAPENEMASES: UM PROBLEMA EM EVOLUÇÃO

## CARBAPENEMASES: A PROBLEM IN EVOLUTION

Vaneska Magalhães Rios<sup>1</sup>; Margarete Teresa Gottardo de Almeida<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Farmacêutica, Pós-Graduanda “Lato-Sensu” em Microbiologia Clínica - Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto - SP.

<sup>2</sup> Bióloga, Doutora em Ciências da Saúde pela Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), Professora Adjunto da FAMERP, docente e orientadora do Programa de Pós Graduação da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, docente da Academia de Ciência e Tecnologia, São José do Rio Preto - SP.

### RESUMO

A resistência bacteriana frente aos antimicrobianos, em especial o desenvolvimento de carbapenemases, constitui-se em um grave problema de saúde pública. Estas enzimas são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenêmicos, acarretando em alta morbimortalidade para os pacientes infectados, levando ainda a uma terapia antibiótica bastante restrita, complexa e onerosa. Diante disso, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre as carbapenemases, abordando suas classificações, métodos de detecção, terapêutica, controle e prevenção; considerando a necessidade de alerta aos profissionais de saúde e a população em geral a respeito da relevância do tema. Logo, foram consultados artigos científicos, teses e dissertações junto a base de dados do Google Acadêmico, Scielo e PubMed, utilizando, principalmente, as palavras-chave: carbapenemase, resistência bacteriana, detecção carbapenemases, tratamento carbapenemases. Livros de microbiologia, notas técnicas e resoluções emitidas pela Anvisa, disponibilizadas virtualmente, e o CLSI do ano vigente também foram fonte de pesquisa. Micro-organismos produtores de carbapenemases têm sido frequentemente identificados no Brasil e em todo mundo, tanto em membros da família *Enterobacteriaceae* quanto em não fermentadores, como *Acinetobacter* spp. As principais carbapenemases isoladas e reportadas são a KPC e a NDM, apresentando ampla disseminação, pois geralmente são codificadas em genes plasmidiais. A triagem por disco-difusão e o teste de Hodge modificado são as metodologias mais empregadas para detecção fenotípica de carbapenemases, porém apenas testes moleculares, como a PCR, são confirmatórios. Medidas específicas para seu controle e prevenção devem ser reforçadas, sobretudo a importância do uso racional de antibióticos; uma vez que sua inadequada administração predispõe ao desenvolvimento de resistência, um problema que é inevitável e progressivo, caso não contido e controlado.

Palavras-chave: Resistência Bacteriana, Carbapenemases, Métodos de Detecção.

### ABSTRACT

The bacterial resistance against antimicrobials, in particular the development of carbapenemases, is in a serious public health problem. These enzymes are capable

of hydrolyzing penicillins, cephalosporins, aztreonam and carbapenems, resulting in high morbidity and mortality for infected patients, leading even to a very limited, complex and expensive antibiotic therapy. Therefore, the objective was to conduct a literature review on the carbapenemases, addressing their ratings, detection methods, treatment, control and prevention; considering the need to alert health professionals and the general population about the importance of the topic. So they were consulted scientific papers, theses and dissertations from the Google Scholar database, Scielo and PubMed, using primarily keywords: carbapenemase, bacterial resistance, carbapenemases detection, carbapenemases treatment. Microbiology books, technical notes and resolutions issued by Anvisa, provided virtually, and the current year CLSI were also a source of research. Producers carbapenemases microorganisms have often been identified in Brazil and around the world, both members of the *Enterobacteriaceae* as in non-fermenters, such as *Acinetobacter* spp. The main isolated and reported carbapenemases are the KPC and NDM, with wide spread as they are usually encoded in plasmid genes. Screening by disk diffusion and modified Hodge test are the methods most used for phenotypic detection carbapenemases, but only molecular tests such as PCR, are confirmatory. Specific measures for its control and prevention should be strengthened, especially the importance of rational use of antibiotics; since their inadequate administration predisposes to the development of resistance, a problem that is inevitable and progressive, if not contained and controlled.

Keywords: Bacterial Resistance, Carbapenemases, Detection Methods.

## 1. INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana vem sendo mais discutida no Brasil, desde que surtos em hospitais chamaram a atenção da população através da mídia. O fato é que encontra-se como um assunto que deve ser debatido em todo mundo, sendo um problema de saúde pública global (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; LEE; BURGESS, 2012; ANVISA, 2013a; JASKULSKI, 2013).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno biológico natural. À medida que agentes antimicrobianos são incorporados às práticas clínicas, cepas de microorganismos resistentes são detectadas em laboratório (MELO, 2010).

Os mecanismos de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos são causados, sobretudo, pelo uso indiscriminado dos mesmos e pela própria pressão seletiva do ambiente exercida pelo consumo de tais fármacos. Levando, assim, a falhas terapêuticas e, conseqüentemente, ao aumento da morbimortalidade e de gastos relativos à internação e às potentes drogas necessárias (CHAGAS, 2011; FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

A codificação da resistência bacteriana através de mecanismos genéticos se exterioriza por meio de diferentes formas, tais como: produção de enzimas inativadoras dos fármacos, modificações dos antibióticos e/ou dos sítios alvo de ação, hiperexpressão de sistemas de efluxo, alterações da permeabilidade da membrana (KONEMAN et al., 2008; ANDRADE, 2011).

Destaca-se, por conseguinte, as carbapenemases, enzimas capazes de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos), classe de antimicrobiano mais diversificada e largamente utilizada. Ressaltando ainda, que nestes casos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas apresentam, muitas vezes, sensibilidade diminuída, deixando a antibioticoterapia bastante reduzida (HIRSCH; TAM, 2010; AREND, 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

A primeira enterobactéria produtora de carbapenemase (Nmca) foi descrita em 1993, na França, sendo de um isolado de *Enterobacter cloacae* (NAAS; NORDMANN, 1994). Desde então, diversas carbapenemases têm sido identificadas. Na atualidade, as de destaque são *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) e a New Delhi Metalo  $\beta$ -lactamase (NDM), sendo responsáveis por surtos em diversas regiões do mundo, inclusive no Brasil (QUEIROZ et al., 2012; VIEIRA, 2013; DJAHMI et al., 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

Nesse contexto, considerando a relevância e os desafios impostos pelo próprio tema, objetivou-se realizar uma revisão bibliográfica sobre as carbapenemases, abordando suas classificações, métodos de detecção, terapêutica, controle e prevenção. Realizando uma atualização e alerta aos profissionais envolvidos na área, permitindo uma reflexão sobre a emergência do problema.

## **2. MATERIAIS E MÉTODO**

Este estudo constituiu-se de uma revisão bibliográfica de artigos científicos, teses e dissertações junto a base de dados do Google Acadêmico, Scielo e PubMed, utilizando, principalmente, as palavras-chave: carbapenemase, resistência bacteriana, detecção carbapenemases, tratamento carbapenemases. Livros de microbiologia, notas técnicas e resoluções emitidas pela Anvisa, disponibilizadas virtualmente, e o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) do ano vigente também foram consultados.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Carbapenemases**

A resistência aos antimicrobianos encontra-se em constante evolução, levando a preocupações no âmbito hospitalar e comunitário. A limitação na antibioticoterapia é uma das consequências deste problema, o que acarreta a necessidade de tratamentos modernos, complexos e onerosos (MUGNIER et al., 2010; SOARES, 2012; TUMBARELLO et al., 2012; BANERJEE et al., 2014; ROCK et al., 2014).

Ressalta-se, ainda, que o surgimento de novas opções terapêuticas é bem inferior à velocidade de seleção e disseminação de resistência bacteriana; tendo em vista que um fármaco, desde sua descoberta, pesquisa e desenvolvimento, demora em torno de dez anos para ser comercializado (QUEIROZ et al., 2012; ALVES; BEHAR, 2013; FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

Com o aparecimento de bactérias produtoras de  $\beta$ -lactamases, especialmente enterobactérias, houve o crescente uso de drogas alternativas para o tratamento, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Com a larga administração destas, os micro-organismos adquiriram uma menor susceptibilidade as mesmas, com isso passou-se a usar carbapenêmicos para tratamento de bactérias multirresistentes. Assim, houve o surgimento de enzimas mais versáteis, com espectro mais amplo que ESBL, as quais conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos - as carbapenemases (THOMSON, 2010; TZOUVELEKIS et al., 2012; DJAHMI et al., 2014; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

As carbapenemases foram inicialmente descritas como enzimas codificadas somente por genes cromossômicos em algumas cepas bacterianas. Na década de 1990, porém, foram identificadas carbapenemases cujos genes codificadores se encontravam em plasmídeos. A partir de então, favoreceu a disseminação de tais cepas multirresistentes, sendo estas frequentemente isoladas em todo o mundo (ANDRADE, 2011; AREND, 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

#### **3.2 Classificação**

As  $\beta$ -lactamases, incluindo as carbapenemases, são categorizadas empregando distintos critérios. As classificações amplamente difundidas são: Ambler (1980) e Bush, Jacoby e Medeiros (1995).

A classificação proposta por Ambler (1980) baseia-se na estrutura molecular das enzimas e inclui todas as  $\beta$ -lactamases descritas em quatro classes: A, B, C e D. As classes A, C e D são compostas por enzimas com serina no sítio ativo, e a classe B é composta por enzimas com zinco em seu sítio ativo. Bush, Jacoby e Medeiros (1995) agruparam as enzimas correlacionando seus substratos e perfis de inibição, em grupos de 1 a 4, com subdivisões nos mesmos. A correlação entre estas duas classificações, molecular e fenotípica, foi atualizada por Bush e Jacoby (2010).

Desse modo, as carbapenemases fazem parte das classes A, B e D de Ambler (1980) e aos grupos 2df, 2f, 3a e 3b de Bush e Jacoby (2010).

### **3.2.1 Carbapenemases classe A**

As carbapenemases da classe molecular A são serina carbapenemases e correspondem ao grupo funcional 2f. Elas possuem capacidade de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos; além disso, não são inibidas pelo EDTA, apenas parcialmente pelo ácido clavulânico ou tazobactam (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; DJAHMI et al., 2014).

Uma variedade de carbapenemases classe A foram reportadas, algumas codificadas por genes cromossomais, NmcA, SME, IMI-1, SFC-1; outras, por genes presentes em plasmídeos, KPC, IMI-2, GES. As mais disseminadas e, portanto, de maior importância são KPC e GES (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; AREND, 2014).

A primeira KPC foi identificada na Carolina do Norte, Estados Unidos, em 1996, proveniente de um isolado clínico de *Klebsiella pneumoniae*. Sua atividade foi associada a um plasmídeo não conjugativo, o qual codificava a KPC-1 (YIGIT et al., 2001). Logo em seguida, houve muitos relatos de uma KPC variante à descoberta na costa leste dos Estados Unidos, sendo denominada KPC-2. Mais tarde, observou-se que KPC-1 é idêntica à KPC-2 através do resequenciamento do gene *bla*<sub>KPC-1</sub> (MIRIAGOU et al., 2003; MOLAND et al., 2003; YIGIT et al., 2008).

Os genes *bla*<sub>KPC</sub>, que codificam a KPC, estão localizados em sua maioria no transposon *Tn4401*, sendo este frequentemente associado ao *Tn1331*, o qual contém os genes *bla*<sub>OXA-9</sub> e *bla*<sub>TEM-1</sub>. Assim, por ser um gene encontrado em um elemento móvel, é facilmente transferido entre diferentes bactérias (NAAS et al., 2008; ANDRADE, 2011; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012).

No Brasil, as primeiras KPCs foram registradas na cidade de Recife, em 2006, e no Rio de Janeiro, em 2009. Logo após, foi relatada em várias localidades do país, mostrando sua disseminação nas espécies e gêneros bacterianos. Denotando-se, assim, a emergência do problema em muitos hospitais brasileiros (MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al., 2009; CARVALHO-ASSEF et al., 2010; ZAVASCKI et al., 2010; BEIRÃO et al., 2011; SEKI et al., 2011; CABRAL et al., 2012; FEHLBERG et al., 2012; JÁCOME et al., 2012; NICOLETTI et al., 2012; ANVISA, 2013a; PEREIRA et al., 2013).

Arend (2014), em sua pesquisa, analisou 1029 isolados bacterianos com suspeita de produção de KPC, provenientes de hospitais do Estado do Paraná, os quais foram encaminhados para o Laboratório Central do Estado (LACEN-PR) no período de janeiro de 2009 a maio de 2012. Um total de 74,9% isolados positivos para o gene *bla<sub>KPC</sub>* foram relatados e 25,1% negativos. Alves e Behar (2013) observaram que 41,5% dos pacientes com exame clínico positivo para enterobactéria produtora de KPC, em um hospital de Porto Alegre, evoluíram para óbito, evidenciando a alta morbimortalidade associada.

Algumas diferentes variantes de KPC já foram descritas em todo o mundo, sendo predominantemente isoladas em *Klebsiella pneumoniae* e outras enterobactérias: *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter* spp, *Salmonella* spp, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Serratia* spp. No entanto, essa enzima também já foi relatada em não fermentadores, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (QUEENAN; BUSH, 2007; VILLEGAS et al., 2007; HIRSCH; TAM, 2010; ROBLEDO et al., 2010; THOMSON, 2010; JÁCOME et al., 2012; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014; FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

Em 2000, na África do Sul, foi descrita a mais recente carbapenemase da classe A, a GES-2 (Guiana Extended-Spectrum), em isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa*. Esta enzima é oriunda de uma  $\beta$ -lactamase de espectro estendido, GES-1, que adquiriu capacidade de hidrolisar carbapenêmicos (POIREL et al., 2001; AREND, 2014).

Os genes que codificam tais enzimas, *bla<sub>GES</sub>*, têm sido localizados como cassetes gênicos em integrons, transposons ou associados com sequências de inserção, albergados em plasmídeos (QUEENAN, BUSH, 2007; ANDRADE, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Diversas carbapenemases GES variantes (GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14, GES-18) foram detectados em todo o mundo em várias bactérias gram negativas, fermentadoras ou não (BONNIN et al., 2011; DJAHMI et al., 2014; ZEKA et al., 2014).

### 3.2.2 Carbapenemases classe B

As carbapenemases da classe B são dependentes de zinco ( $Zn^{+2}$ ) como cofator enzimático, portanto, são denominadas metalo  $\beta$ -lactamases (M $\beta$ LS). Estas correspondem ao grupo funcional 3 e possuem capacidade de hidrolisar todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. São inibidas pelo EDTA, porém não pelo ácido clavulânico ou tazobactam (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

As M $\beta$ LS podem ter origem cromossomal ou plasmidial. As cromossomais que foram relatadas inicialmente, estavam presentes em *Bacillus cereus*, *Aeromonas* spp. e *Stenotrophomonas maltophilia* (SABATH; ABRAHAM, 1966; SAINO et al., 1982; IACONIS; SANDERS, 1990; WALSH et al., 1997). As plasmidiais, por sua vez, conferem maior importância devido a sua disseminação. Dentre algumas M $\beta$ LS plasmidiais descritas, têm-se: IMP (imipenemase), VIM (Verona imipenemase), SPM (São Paulo metalo  $\beta$ -lactamase), GIM (German imipenemase), SIM (Seoul imipenemase), NDM-1. Tendo maior destaque e reporte mundial IMP, VIM e NDM. No Brasil, além destas, a SPM (ANDRADE, 2011; TZOUVELEKIS et al., 2012; ANVISA, 2013a).

A maioria dos genes que codificam as M $\beta$ LS estão localizados como cassetes gênicos em uma diversidade de integrons, como no caso dos genes *bla*<sub>IMP</sub> e *bla*<sub>VIM</sub>. Quando estes integrons se associam com transposons ou plasmídeos, a disseminação da resistência é facilitada (QUEENAN; BUSH, 2007; AREND, 2014).

A primeira M $\beta$ L plasmidial reportada foi a IMP-1, identificada em isolados de *Pseudomonas aeruginosa* em 1988 no Japão (WATANABE et al., 1991). Desde então, IMP propagou-se mundialmente, sendo detectada principalmente em *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e várias enterobactérias (WALSH et al., 2005; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014). Em 1997, a enzima VIM foi descrita em Verona, na Itália. Tipos variantes de VIM tornaram-se as mais prevalentes M $\beta$ LS em todo mundo, sendo isoladas de diversas espécies de bactérias (LAURETTI et al., 1999; POIREL et al., 2000; DJAHMI et al., 2014).

Ressalta-se, ainda, que nem todas as carbapenemases da classe B estão associadas a integrons e transposons, como exemplo a SPM-1. Esta carbapenemase foi isolada primeiramente de *Pseudomonas aeruginosa* em São Paulo em 2001 (TOLEMAN et al., 2002). De acordo com Poirel e colaboradores (2004), o gene *bla*<sub>SPM</sub>, o qual codifica esta enzima, está associado com regiões comuns que integra um novo tipo de estrutura transferível com potenciais recombinases e sequências promotoras. Desde o primeiro isolamento de SPM-1, clones de *Pseudomonas aeruginosa* contendo SPM-1 têm causado diversos surtos restritos aos hospitais brasileiros com alta mortalidade (GALES et al., 2003; ZAVASCKI et al., 2005; BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; AREND, 2014).

Recentemente, em 2008, uma nova carbapenemase foi identificada: a NDM-1. Esta foi detectada no norte da Europa em *Klebsiella pneumoniae* isolada de uma infecção do trato urinário de um paciente de origem indiana, que havia sido internado em Nova Delhi (YONG et al., 2009).

NDM variantes têm sido reportadas esporadicamente em algumas áreas do globo, sendo associadas ao turismo médico. O continente Indiano é o que possui altas taxas de prevalência desta enzima. As NDMs são identificadas principalmente em isolados de bactérias da família *Enterobacteriaceae*, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e em menor extensão, em *Acinetobacter* spp. (ANDRADE, 2011; DJAHMI et al., 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

O gene *bla*<sub>NDM</sub>, pode ser encontrado em plasmídeo ou cromossomicamente. Em enterobactérias estão localizados principalmente em plasmídeos conjugativos heterogêneos, de diferentes tamanhos e pertencentes a diferentes grupos de incompatibilidade. Em não fermentadores, como *Acinetobacter* spp., são frequentemente localizados no cromossomo. Os plasmídeos que carregam o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> podem abrigar numerosos genes de resistência, que conferem inatividade a aminoglicosídeos, macrolídeos, sulfa e rifampicina (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; AREND, 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

Em comparação com as demais carbapenemases, as NDMs são clinicamente mais significativas, pois possuem características que trazem consigo um impacto social e na saúde pública bem relevantes. Pode-se citar a alta capacidade de disseminação do gene *bla*<sub>NDM</sub> entre diferentes espécies; aquisição frequente por patógenos comumente isolados em hospitalais e na comunidade (*Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*); tamanho do reservatório – subcontinente indiano,



onde foi proveniente a primeira detecção e onde a população e o isolamento são altos (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; GONZÁLEZ-LÓPEZ, 2014).

Os primeiros casos de NDM no Brasil ocorreram em 2013 no Rio Grande do Sul. Estes casos foram confirmados pela Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro e comunicados nacionalmente pela Anvisa. A partir de então, foram lançadas notas técnicas relatando medidas de controle e prevenção de infecções por estas bactérias multirresistentes (ANVISA, 2013a; ANVISA 2013b; CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

Rozales e colaboradores (2014) realizaram um estudo de vigilância em 17 hospitais de Porto Alegre entre abril e outubro de 2013. Analisaram 1134 isolados com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, destes, em 11 (0,97%) o gene *bla<sub>NDM-1</sub>* foi detectado.

Mais casos estão sendo reportados de NDM em todo Brasil, inclusive em associação com outros tipos de carbapenemases (VIEIRA, 2013; CARVALHO-ASSEF et al., 2014; NODARI et al., 2014; PILLONETTO et al., 2014; PEREIRA et al., 2015; QUILES et al., 2015).

### **3.2.3 Carbapenemases classe D**

As carbapenemases da classe D, assim como as da classe A, são serina carbapenemases. Também chamadas de oxacilinas (OXAs), correspondem ao grupo funcional 2df, hidrolisam oxacilina ou cloxacilina e carbapenêmicos, a estes últimos apresentam uma baixa taxa de hidrólise quando comparada às demais classes. Ácido clavulânico ou tazobactam possuem atividade variável na inibição das OXAs, porém elas não são inibidas pelo EDTA (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY, 2010; DJAHMI et al., 2014).

Algumas enzimas da classe D são apenas  $\beta$ -lactamases de espectro estendido, não apresentando capacidade de hidrolisar carbapenêmicos. Já as que possuem esta atividade são principalmente: OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26, OXA 27, em especial, OXA-48. A resistência aos carbapenêmicos parece ocorrer em conjunto – OXAs que os hidrolisam juntamente com a impermeabilidade da membrana e/ou bomba de efluxo dos antibióticos (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; AREND, 2014).

O primeiro produtor de OXA-48 foi identificado em isolado de *Klebsiella pneumoniae* na Turquia em 2003 (POIREL et al., 2004). Logo após, bactérias produtoras desta enzima foram relatadas como fonte de surtos hospitalares ainda na Turquia. Países da Europa, parte sul e leste do Mar Mediterrâneo e África já detectaram a presença de OXA-48. No Brasil, o primeiro caso foi identificado a partir de um isolado de *Enterobacter cloacae* em um hospital de Porto Alegre em 2013 (CARRER et al., 2010; POIREL et al., 2011; ANVISA, 2013a; ROZALES et al., 2013).

A OXA-48 não é inibida pelo ácido clavulânico ou tazobactam, hidrolisa penicilinas e fracamente carbapenêmicos, aztreonam e cefalosporinas, sendo a resistência aparente quando outros mecanismos estão envolvidos. É provavelmente a carbapenemase mais difícil de ser identificada. São detectadas geralmente em *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* e algumas enterobactérias (POIREL; NAAS; NORDMANN, 2010; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; POIREL; POTRON; NORDMANN, 2012; DJAHMI et al., 2014).

### **3.3 Métodos de detecção**

A detecção fenotípica de carbapenemases ainda é difícil. Usualmente, as metodologias usadas são: focalização isoelétrica, disco-difusão, *E-test* (CIM – Concentração Inibitória Mínima), teste de Hodge modificado, Carba NP, teste com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina, automação, dentre outros (ANDERSON et al., 2007; ANVISA, 2013a; CLSI, 2015). Já para a pesquisa do gene envolvido utilizam-se as técnicas de biologia molecular. Os critérios para detecção de tais enzimas foram preconizados na Nota Técnica da Anvisa nº 01/2013.

#### **3.3.1 Disco-Difusão e Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

Ao executar o antibiograma de enterobactérias isoladas de pacientes nosocomiais, o microbiologista deverá testar simultaneamente ertapenem, imipenem e meropenem. Para bactérias do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*), apenas imipenem e meropenem (ANVISA, 2013a; CLSI, 2015).

Os critérios interpretativos de susceptibilidade a estes carbapenêmicos em enterobactérias estão descritos abaixo (Quadro 1), segundo o CLSI 2015.

A determinação da CIM pode ser realizada por macrodiluição ou microdiluição em caldo ou por teste epsilométrico, como o *E-test* (AREND, 2014).

Caso o micro-organismo isolado seja susceptível a todos os carbapenêmicos, não se faz necessário a pesquisa de carbapenemases. Caso ao menos um seja resistente, através deste método pode-se apenas sugerir a produção de carbapenemases, sendo necessária a confirmação por outros testes (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; ANVISA, 2013a).

Quadro 1 – Critérios para interpretação da susceptibilidade aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*.

	Disco Difusão (mm)			CIM (µg/mL)		
	Sensível	Intermediário	Resistente	Sensível	Intermediário	Resistente
Doripenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Ertapenem	≥ 22	19-21	≤ 18	≤ 0,5	1	≥ 2
Imipenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4
Meropenem	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	2	≥ 4

Fonte: M100-S25, CLSI 2015.

### 3.3.2 Teste de Hodge modificado

O CLSI 2015 determina que com a implementação dos novos critérios de interpretação da susceptibilidade, o teste de Hodge modificado (MHT) só deverá ser realizado em casos de controle epidemiológico e de infecção, não necessário seu uso na rotina laboratorial.

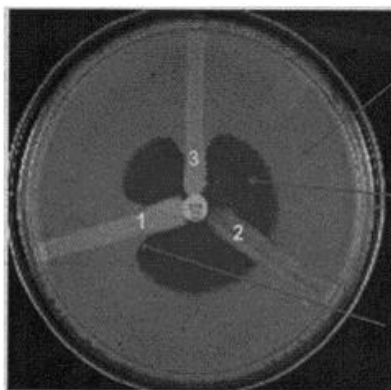
Muitos laboratórios brasileiros, porém, o realizam para a detecção fenotípica de produtor de carbapenemase, uma vez que é de fácil execução e seu custo baixo. Algumas limitações citadas são a presença de resultados falso-positivos em isolados que produzem ESBL ou AmpC; aplicação somente em bactérias da família *Enterobacteriaceae*; resultados falso-negativos ocasionalmente reportados, como em isolados produtores de NDM; complexa interpretação (ANDERSON et al., 2007; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; TZOUVELEKIS et al., 2012; ANVISA, 2013).

De acordo com o CLSI (2015), para realização do MHT, semeia-se a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922 (diluída 1:10 e com turvação 0,5 na escala de McFarland) em ágar Mueller Hinton (MH) e coloca-se um disco de ertapenem ou

meropem no centro da placa. Não se recomenda por disco de imipinem, pois este antimicrobiano não consegue detectar a presença de carbapenemase no teste, levando a resultados falsos negativos. Deve-se, ainda, fazer estrias partindo do centro da placa para a periferia de uma cepa controle positivo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705), controle negativo (*Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706) e amostra teste. Incuba-se *overnight* a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ . O crescimento de *Escherichia coli* ao redor das estrias, com deformação do halo de inibição denota produção de carbapenemases (Figura 1).

O MHT apresenta boa sensibilidade para detecção de KPC, porém para a enzima NDM a sensibilidade é menor que 50% (DOYLE et al., 2012; GIRLICH; POIREL; NORDMANN, 2012). Portanto, a Anvisa (2013a) também preconiza que este teste não deve ser utilizado para confirmar a detecção de carbapenemases, especialmente NDM.

Figura 1 – Teste de Hodge modificado.



Legenda: 1, Amostra teste; 2, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1706; 3, *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA-1705.

Fonte: CLSI, 2010.

### 3.3.3 Teste com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina

Os testes com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina, por sua vez, são simples e com alta sensibilidade e especificidade. A detecção fenotípica de carbapenemases baseia-se na capacidade que o EDTA tem de quelar os íons de zinco do sítio ativo das MβLs, como a NDM, ou na capacidade do ácido fenilborônico (AFB) inibir KPCs ou AmpCs plasmidiais, sem ou com potenciação quando adicionada a cloxacilina, respectivamente (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012;

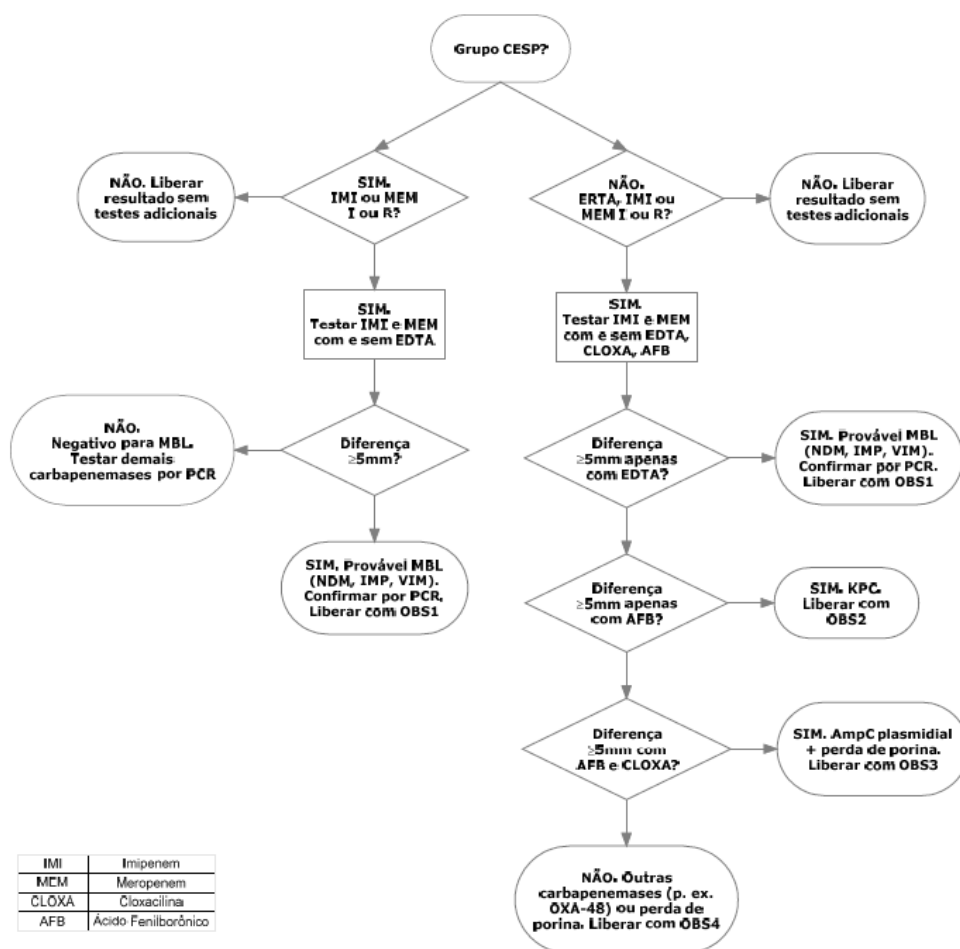
TZOUVELEKIS et al., 2012; BANERJEE et al., 2014; DORTET; POIREL; NORDMANN, 2014).

Logo, o diâmetro da zona de inibição em torno do disco do carbapenêmico com EDTA, AFB ou cloxacilina é comparado ao do disco de carbapenêmico respectivo sem tais substâncias (DOYLE et al., 2012; AREND, 2014).

Para as bactérias em geral esse teste é realizado com EDTA, AFB ou cloxacilina, ou seja, consegue detectar MβLs, KPCs e outros mecanismos de resistência. Já para as bactérias pertencentes ao grupo CESP, utiliza-se somente EDTA, identificando somente MβLs, pois com as demais substâncias muitos resultados falsamente positivos foram reportados (ANVISA, 2013a).

A Figura 2 mostra simplificada como é realizada a interpretação desses testes de acordo com a Nota Técnica da Anvisa nº 01/2013.

Figura 2 – Fluxograma de interpretação dos testes com disco de EDTA, ácido fenilborônico ou cloxacilina para detecção fenotípica de carbapenemases.



Fonte: Nota Técnica da Anvisa nº 01/2013.

É importante ressaltar, que mesmo com a positividade para carbapenemases com estes testes fenotípicos, faz-se necessária a confirmação por técnicas de biologia molecular, detectando o gene envolvido. Isto é o que consta basicamente nas observações mostradas na Figura 2.

#### **3.3.4 Automação**

Os sistemas automatizados que realizam teste de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentam falhas na detecção de carbapenemases, em particular KPCs, sobretudo quando o ertapenem não é testado; uma vez que este é mais sensível à atividade das KPCs (ANDERSON et al., 2007; QUEENAN; BUSH, 2007; AREND 2014).

Alguns estudos foram realizados e mostraram que há erros na susceptibilidade de isolados. Estes erros demonstram falsa sensibilidade aos carbapenêmicos, não detectando precisamente KPCs (BRATU et al., 2005; TENOVER et al., 2006; ANDERSON et al., 2007; DIENSTMANN et al., 2010).

Tenover e colaboradores (2006) observaram em sua pesquisa, que muitos sistemas de automação, tanto Microscan, Phoenix, Sensititre quanto Vitek e Vitek 2 mostraram problemas na detecção de resistência a carbapenêmicos em amostras positivas para KPCs.

Ressalta-se, dessa forma, a necessidade de aperfeiçoamento de tal metodologia e de testes complementares a este para detecção precisa de carbapenemases.

#### **3.3.5 Testes moleculares**

Os testes que utilizam as técnicas de biologia molecular e, assim, permitem a identificação dos genes envolvidos na resistência aos carbapenêmicos são considerados padrão-ouro (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; AREND, 2014).

As técnicas moleculares mais empregadas para detecção de tais genes são baseadas na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tais como: PCR convencional, PCR em Tempo Real, PCR *Multiplex*, *SYBR Green*, *Southern Blot*, Eletroforese de Campo Pulsante (PFGE), dentre outras (GASPARETO, 2005; MUGNIER et al., 2010; DOYLE et al., 2012; TZOUVELEKIS et al., 2012; JASKULSKI, 2013; AREND, 2014; HOFKO et al., 2014; FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

As análises moleculares apresentam alta sensibilidade e especificidade; são métodos precisos e rápidos na detecção de carbapenemases. Estes testes têm sido incorporados aos poucos na rotina de alguns laboratórios, porém devido à exigência de equipamentos e técnicas especializados, o que eleva seu custo, não são empregados comumente. Dessa forma, ficam restritos a laboratórios de referência e/ou de pesquisas científicas (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; TZOUVELEKIS et al., 2012).

### **3.4 Antibioticoterapia, Controle e Prevenção**

As opções de antimicrobianos para tratamento de infecções por bactérias produtoras de carbapenemases são bem limitadas, não sendo recomendada a monoterapia, devido ao risco de rápida resistência. Logo, a utilização de dois ou mais fármacos em associação torna-se mais seguro (COTRIM; ROCHA; FERREIRA, 2012; AREND, 2014).

Ressalta-se, ainda, que o teste de sensibilidade aos antimicrobianos deve ser analisado, sendo as drogas susceptíveis mais adequadas para a combinação terapêutica. Geralmente a polimixina B ou colistina são usadas com aminoglicosídeos, ou carbapenêmicos ou tigeciclina. Mesmo os isolados sendo capazes de hidrolisar carbapenêmicos, estes podem ser utilizados pois aumentam a sobrevida dos pacientes. Ultimamente, a fosfomicina tem sido administrada com sucesso quando comprovada sua sensibilidade pelo antibiograma, também não recomendada como monoterapia (CASTANHEIRA et al., 2008; LEE; BURGESS, 2012; QUEIROZ et al., 2012; TUMBARELLO et al., 2012; ANVISA, 2013a; FIGUEIRAL; FARIA, 2015).

Novas drogas estão sendo pesquisadas e desenvolvidas para o combate de isolados produtores de carbapenemases, porém sabe-se que a resistência aos antibióticos é inevitável (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; HIRSCH; TAM, 2010; QUEIROZ et al., 2012).

Uma das mais importantes causas para propagação das resistências aos antimicrobianos é o uso indiscriminado de tais fármacos. Em 2011, a Anvisa lançou a RDC nº 20, que ao necessitar de prescrição com retenção de receita para a venda de antibióticos, restringiu a administração irracional dos mesmos. Constituindo, assim, em um grande avanço.

Para o controle e prevenção da disseminação de micro-organismos produtores de carbapenemases, a Anvisa (2013a) relatou uma série de medidas específicas, tais como: importância da higienização das mãos, utilização de equipamentos de proteção individual (EPIs), isolamento de paciente infectado, sistema de vigilância epidemiológica, Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) atuante, uso racional de antimicrobianos, dentre outros.

#### **4. CONCLUSÃO**

Percebe-se, com o exposto, que a resistência bacteriana aos antimicrobianos acarreta sérios problemas de saúde pública, em particular isolados produtores de carbapenemases. Estes encontram em ampla disseminação em escala mundial, já que geralmente são codificados em genes plasmídias; sendo a KPC e mais recentemente a NDM as principais carbapenemases reportadas.

Algumas metodologias de detecção dessas enzimas são realizadas, especialmente a triagem em disco-difusão, MHT e teste com disco de EDTA, este último ainda não muito difundido nos laboratórios brasileiros. A PCR, usada como confirmatória, por ser um teste mais complexo e oneroso não é utilizada de forma rotineira atualmente, porém está em propagação.

Em relação à terapia antimicrobiana das infecções por bactérias produtoras de carbapenemases, relata-se as poucas opções disponíveis; sendo necessária a combinação de drogas, uma vez que o rápido desenvolvimento de resistência com o uso da monoterapia pode surgir.

Novos fármacos estão em estudo, no entanto sabe-se que as bactérias apresentam capacidade de desenvolver inúmeros mecanismos de resistência, como já mencionado. Logo, faz-se necessária a conscientização dos profissionais de saúde e de toda população das medidas de controle e prevenção perante este perigo e problema que só evolui.

#### **REFERÊNCIAS**

ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS**, v. 57, n. 3, p. 213-218, 2013.

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.



ANDERSON, K. F.; LONSWAY, D. R.; RASHEED, J. K.; BIDDLE, J.; JENSEN, B.; MCDUGAL, L. K.; CAREY, R. B.; THOMPSON, A.; STOCKER, S.; LIMBAGO, B.; PATEL, J. B. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2723-2725, 2007.

ANDRADE, L. N. **Genética e epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de KPC no Brasil**. 2011. 68 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

ANVISA. **Nota Técnica Nº 01/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013a.

ANVISA. **Comunicação de Risco Nº 001/2013 - GVIMS/GGTES-ANVISA - Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metallobetalactamase" ou NDM no Brasil**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2013b.

AREND, L. N. V. S. **Caracterização molecular, fenotípica e epidemiológica de micro-organismos produtores de carbapenemase KPC isolados no Estado do Paraná**. 2014. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Interna), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

BANERJEE, P.; JAGGI, T.; HAIDER, M.; MISHRA, B.; THAKUR, A. Prevalence of Carbapenemases and Metallo- $\beta$ -lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae*. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 8, n. 11, 2014.

BEIRÃO, E. M.; FURTADO, J. J.; GIRARDELLO, R.; FERREIRA FILHO, H.; GALES, A. C. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.

BERTONCHELI, C. M.; HÖRNER, R. A review on metallo- $\beta$ -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p. 577-599, 2008.

BONNIN, R. A.; NORDMANN, P.; POTRON, A.; LECUYER, H.; ZAHAR, J. R.; POIREL, L. Carbapenem-hydrolyzing GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p. 349-354, 2011.

BRASIL. Resolução RDC nº 20, de 5 de maio de 2011. **Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação**. Órgão Emissor: Anvisa – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 14 de agosto de 2015.

BRATU, S.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; LANDMAN, D.; GULLANS, C.; PETTINATO, B.; KARUMUDI, U.; TOLANEY, P.; QUALE, J. Emergence of KPC-possessing

*Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 7, p. 3018-3020, 2005.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211, 1995.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CABRAL, A. B.; MELO, R. D. E. C.; MACIEL, M. A.; LOPES, A. C. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

CARRÈR, A.; POIREL, L.; YILMAZ, M.; AKAN, O. A.; FERİHA, C.; CUZON, G.; MATAR, G.; HONDERLICK, P.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1369-1373, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; LEÃO, R.S.; DA SILVA, R. V.; FERREIRA, A. G.; SEKI, L. M.; ASENSI, M. D.; MARQUES, E. A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 3, p. 337-338, 2010.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; CHAGAS, T. P. G.; TIMM, L. N.; SILVA, R. C. F.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, 2013.

CARVALHO-ASSEF, A. P.; PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; BERIÃO, G. C.; TAVARES, C. P.; CHAGAS, T. P.; MARQUES, E. A.; TIMM, L. N.; SILVA, R. C.; FALCI, D. R.; ASENSI, M. D. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475-2476, 2014.

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. 570-573, 2008.

CHAGAS, T. P. G. **Detecção de bactérias multirresistentes aos antimicrobianos em esgoto hospitalar no Rio de Janeiro**. 2011. 129 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; 20th Informational Supplement. CLSI

document M100-S20. Wayne, PA, USA, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; 25th Informational Supplement. CLSI document M100-S25. Wayne, PA, USA, 2015.

COTRIM, E. R.; ROCHA, R. D. R.; FERREIRA, M. F. R. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase–KPC em *Enterobacteriaceae*: o desafio das bactérias multirresistentes. **Revista do Centro Universitário Newton Paiva**, v. 5, n. 1, 2012.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23-7, 2010.

DJAHMI, N.; DUNYACH-REMY, C.; PANTEL, A.; DEKHIL, M.; SOTTO, A.; LAVIGNE, J. Epidemiology of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii* in Mediterranean countries. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the NDM-type carbapenemases in Gram-negative bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

DOYLE, D.; PEIRANO, G.; LASCOLS, C.; LLOYD, T.; CHURCH, D. L.; PITOUT, J. D. D. Laboratory detection of *Enterobacteriaceae* that produce carbapenemases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 12, p. 3877-3880, 2012.

FEHLBERG, L. C.; CARVALHO, A. M.; CAMPANA, E. H.; GONTIJO-FILHO, P. P.; GALES, A. C. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 577-580, 2012.

FIGUEIRAL, A. C. D.; FARIA, M. G. I. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase: um problema sem solução? **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 9, n. 1, p. 45-48, 2015.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GASPARETO, P. B. **Pesquisa de genes de metalo-beta-lactamases em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em três hospitais universitários de Porto Alegre**. 2005. 47 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

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. 477-479, 2012.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1119-1125, 2010.

HOFKO, M.; MISCHNIK, A.; KAASE, M.; ZIMMERMANN, S.; DALPKE, A. H. Detection of carbapenemases by real-time PCR and melt curve analysis on the BD Max system. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1701-1704, 2014.

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

JÁCOME, P. R. L. A.; ALVES, L. R.; CABRAL, A. B.; LOPES, A. C. S.; MACIEL, M. A. V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 9, p. 4990-4990, 2012.

JASKULSKI, M. R. **Avaliação da presença de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas como mecanismo de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp.** 2013. 132 f. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde) - Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; DOWELL-JUNIOR, V. R.; SOMMERS, H. M. **Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1488 p.

LAURETTI, L.; RICCIO, M. L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G. M. Cloning and characterization of bla VIM, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEE, G. C.; BURGESS, D. S. Treatment of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) infections: a review of published case series and case reports. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 11, n. 13, p. 32, 2012.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ-LÓPEZ, J. J.. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Types and molecular epidemiology. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 32, p. 4-9, 2014.

MELO, D. B. **Padrão clonal e perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* isoladas de alimentos e de espécimes clínicas**. 2010. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

MIRIAGOU, V.; TZOUVELEKIS, L. S.; ROSSITER, S.; TZELEPI, E.; ANGULO, F. J.; WHICHARD, J. M. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1297-1300, 2003.

MOLAND, E. S.; HANSON, N. D.; HERRERA, V. L.; BLACK, J. A.; LOCKHART, T. J.; HOSSAIN, A.; JOHNSON, J. A.; GOERING, R. V.; THOMSON, K. S. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 51, n. 3, p. 711-714, 2003.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

MUGNIER, P. D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide Dissemination of the blaOXA-23 Carbapenemase Gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, p. 35, 2010.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V.; LARTIGUE, M. F.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the  $\beta$ -lactamase blaKPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 1257-1263, 2008.

NAAS, T.; NORDMANN, P. Analysis of a carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase from *Enterobacter cloacae* and of its LysR-type regulatory protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 16, p. 7693-7697, 1994.

NICOLETTI, A. G.; FEHLBERG, L. C. C.; PICÃO, R. C.; MACHADO, A. O.; GALES, A. C. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 56, n. 8, p. 4563-4564, 2012.

NODARI, C. S.; ROZALES, F. P.; MAGAGNIN, C. M.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. Presença concomitante de OXA-370 e NDM-1 no complexo *Enterobacter cloacae*: primeiro relato no Brasil. **Clinical and Biomedical Research**. Porto Alegre, 2014.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n. 4, p. 228-236, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p. 1791, 2011.

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. 2702-2702, 2009.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PASSOS, V. L. V.; PINTO, M. C. F. G.; GUERRA, L. R.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265-268, 2009.

PEREIRA, P. S.; ALBANO, R. M.; ASENSI, M. D.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D. Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 580-582, 2015.

PEREIRA, P. S.; ARAUJO, C. F. M.; SEKI, L. M.; ZAHNER, V.; CARVALHO-ASSEF, A. P. D.; ASENSI, M. D. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312-316, 2013.

PILLONETTO, M.; AREND, L.; VESPERO, E. C.; PELISSON, M.; CHAGAS, T. P.; CARVALHO-ASSEF, A. P.; ASENSI, M. D. The first report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* ST 25 in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 58, p. 7592-7594, 2014.

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

POIREL, L.; NAAS, T.; NICOLAS, D.; COLLET, L.; BELLAIS, S.; CAVALLO, J. D.; NORDMANN, P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase and its plasmid-and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 4, p. 891-897, 2000.

POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D  $\beta$ -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 1, p. 24-38, 2010.

POIREL, L.; POTRON, A.; NORDMANN, P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 7, p. 1597-1606, 2012.

POIREL, L.; ROS, A.; CARRER, A.; FORTINEAU, N.; CARRICAJÓ, A.; BERTHELOT, P.; NORDMANN, P. Cross-border transmission of OXA-48-producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, p. 1181-1182, 2011.

POIREL, L.; WELDHAGEN, G. F.; NAAS, T.; CHAMPS, C.; DOVE, M. G.; NORDMANN, P. GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-2603, 2001.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile  $\beta$ -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007.

QUEIROZ, G. M.; SILVA, L. M.; PIETRO, R. C. L. R.; SALGADO, H. R. N. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 10, n. 2, 2012.

QUILES, M. G.; ROCCHETTI, T. T.; FEHLBERG, L. C.; KUSANO, E. J. U.; CHEBABO, A.; PEREIRA, R. M. G.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C. C. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 2, p. 174-177, 2015.

ROBLEDO, I. E.; IRAIDA E. ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTÉ, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEÓN, C. F.; VÁZQUEZ, G. J. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 1354-1357, 2010.

ROCK, C.; THOM, K. A.; MASNICK, M.; JOHNSON, J. K.; HARRIS, A. D.; MORGAN, D. J. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 35, n. 4, p. 426-429, 2014.

ROZALES, F. P.; MAGAGNIN, C. M.; OLIVEIRA, M.; MARTINS, A.; FALCI, D. R.; CASSOL, R.; DALAROSA, M. G.; SAMPAIO, J. L. M.; ZAVASCKI, A. P.; BARTH, A. L. **bla OXA-48-like: Descrição do primeiro caso no Brasil**. In: Congresso Brasileiro de Microbiologia, 27., 2013, Natal. *Anais...* Natal, 2013.

ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D. R.; MACHADO, A.; BARTH, A. L.; ZAVASCKI, A. P. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79-81, 2014.

SABATH, L. D.; ABRAHAM, E. P. Zinc as a cofactor for cephalosporinase from *Bacillus cereus* 569. **Biochemical Journal**, v. 98, p. 11C-13C, 1966.  
SAINO, Y.; KOBAYASHI, F.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Purification and properties of inducible penicillin beta-lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 22, n. 4, p. 564-570, 1982.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA, M. D. A. P.; CONCEIÇÃO, M. D. E. S.; MARQUES, E. A.; PORTO, C. O.; COLNAGO, E. M.; ALVES, C. D. E. F.; GOMES, D.; ASSEF, A. P.; SAMUELSEN; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274-277, 2011.

SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251-253, 2012.

TENOVER, F. C.; KALSI, R. K.; WILLIAMS, P. P.; CAREY, R. B.; STOCKER, S.; LONSWAY, D.; RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; MCGOWAN JR, J. E.; HANNA, B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 8, p. 1209, 2006.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- $\beta$ -lactamase, AmpC, and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TOLEMAN, M. A.; SIMM, A. M.; MURPHY, T. A.; GALES, A. C.; BIEDENBACH, D. J.; JONES, R. N.; WALSH, T. R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- $\beta$ -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 5, p. 673-679, 2002.

TUMBARELLO, M.; VIALE, P.; VISCOLI, C.; TRECARICHI, E. M.; TUMIETTO, F.; MARCHESE, A.; SPANU, T.; AMBRETTI, S.; GINOCCHIO, F.; CRISTINI, F.; LOSITO, A.; TEDESCHI, S.; CAUDA, R.; BASSETTI, M. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 7, p. 943-950, 2012.

TZOUVELEKIS, L. S.; MARKOGIANNAKIS, A.; PSICHOGIOU, M.; TASSIOS, P. T.; DAIKOS, G. L. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. **Clinical microbiology reviews**, v. 25, n. 4, p. 682-707, 2012.

VIEIRA, F. J. **Detecção e caracterização dos primeiros casos de enterobactérias produtoras de NDM-1 no Brasil**. In: Salão de Iniciação Científica da Universidade do Rio Grande do Sul, 25., 2013, Porto Alegre. *Anais...* Porto Alegre, 2013.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 4, p. 1553-1555, 2007.

WALSH, T. R.; STUNT, R. A.; NABI, J. A.; MACGOWAN, A. P.; BENNETT, P. M. Distribution and expression of beta-lactamase genes among *Aeromonas* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 40, n. 2, p. 171-178, 1997.

WALSH, T. R.; TOLEMAN, M. A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Metallo- $\beta$ -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 2, p. 306-325, 2005.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 35, n. 1, p. 147-151, 1991.

YIGIT, H.; QUEENAN, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -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.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER F. C. 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, 2008.

YONG, D.; TOLEMAN, M. A.; GISKE, C. G.; CHO, H. S.; SUNDMAN, K.; LEE, K.; WALSH, T. R. Characterization of a new metallo- $\beta$ -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZAVASCKI, A. P.; GASPARETO, P. B.; MARTINS, A. F.; GONÇALVES, A. L.; BARTH, A. L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1148-1151, 2005.

ZAVASCKI, A. P.; ZOCCOLI, C. M.; MACHADO, A. B. M. P.; OLIVEIRA, K. R. P.; SUPERTI, S. V.; PILGER, D. A.; CANTARELLI, V. V.; BARTH, A. L. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 6, p. 539-540, 2010.

ZEKA, A. N.; POIREL, L.; SIPAHI, O. R.; BONNIN, R. A.; ARDA, B.; OZINEL, M.; ULUSOY, S.; BOR, C.; NORDMANN, P. GES-type and OXA-23 carbapenemase-producing *Acinetobacter baumannii* in Turkey. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1145-1146, 2014.