

ADRIANA GIANNINI NICOLETTI

**Avaliação da Prevalência de Carbapenemases em
Amostras de Enterobactérias Isoladas no Complexo
Hospital São Paulo/UNIFESP**

Tese apresentada à Universidade Federal
de São Paulo – Escola Paulista de
Medicina para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

São Paulo
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

ADRIANA GIANNINI NICOLETTI

**Avaliação da Prevalência de Carbapenemases em
Amostras de Enterobactérias Isoladas no Complexo
Hospital São Paulo/UNIFESP**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Cristina Gales

Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP

São Paulo

2010

Nicoletti, Adriana Giannini

Avaliação da Prevalência de Carbapenemases em Amostras de Enterobactérias Isoladas no Complexo Hospital São Paulo/UNIFESP.

Adriana Giannini Nicoletti. -- São Paulo/SP – Brasil, 2010.

xvii, 141f.

Tese (Mestrado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciências Básicas em Infectologia.

Título em Inglês: Prevalence of Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from Hospital São Paulo/UNIFESP complex.

1. Carbapenemases, 2. Enterobactérias, 3. β -Lactamase, 4. Resistência.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Ângelo Amato Vincenzo de Paola

Coordenador do Curso de Pós-Graduação:

Ricardo Sobhie Diaz

São Paulo
2010

ADRIANA GIANNINI NICOLETTI

**Avaliação da Prevalência de Carbapenemases em Amostras de
Enterobactérias Isoladas no Complexo Hospital São
Paulo/UNIFESP**

BANCA EXAMINADORA:

Titular: Prof. Dr. Alexandre Rodrigues Marra

Titular: Profa. Dra. Elizabeth de Andrade Marques

Titular: Profa. Dra. Mara Corrêa Lelles Nogueira

Suplente: Profa. Dra. Rosa Maria Silva

Aprovada em: 13/05/2010

*Dedico este trabalho aos meus
pais pelo constante apoio e incentivo.
Sem vocês nada disso seria possível.*

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Prof^a Dra. Ana Cristina Gales, por dividir comigo suas experiências e ter acreditado na minha capacidade. Obrigado pela confiança e dedicação. É uma honra ser sua orientanda.

Ao Prof. Dr. Antônio Carlos Campos Pignatari, por me receber no Laboratório Especial de Microbiologia Clínica e por toda a dedicação ao grupo LEMC/ALERTA.

À minha família, a qual amo muito, pelo carinho, paciência e incentivo.

À todos os amigos e companheiros de trabalho do Laboratório Alerta, Anderson Santos, Cecília Carvalhães, Danilo Xavier, Eloiza Campana, Jéssica Werneck, Lorena Fehlberg, Paula Ignez, Paula Peraro, Raquel Girardello, Renata Picão, Rodrigo Cayô e Vitor Marguti, pelos vários momentos agradáveis, pela amizade e apoio durante a realização deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica, Adryella Luz, Alinne Guimarães, Amilton Mouro, André Doi, Cynthea Zanetti, Eliete, Fernanda Inoue, Fernanda Marques, Jussimara Monteiro, Karen Bauab, Kátia Kiyota, Kelly Santiago, Liana Carballo, Loren Paschoal, Maria Cecília Cergole, Martha Rivero, Miriam do Carmo, Paulo Bispo, Roberto Chiroto, Rosana Capecce, Soraya Sgambatti, Talita Trevisani, Thaís Avila, Thomas Chagas Neto, Vinicius Gomes e Marco Zonta, pela convivência e momentos de descontração.

Aos amigos e colegas que passaram pelo grupo LEMC/ALERTA, Andrea Pereira, Andréia Penteado, Ana Paula Takano, Mariana Castanheira e Rodrigo Mendes, que eu tive a alegria e o privilégio de conviver.

Às amigas do antigo Idipa-Lab, Agda, Mirela e Renata, pelos ensinamentos na microbiologia clínica e pelo bom humor.

Aos professores e funcionários da Disciplina de Infectologia da Universidade Federal de São Paulo e do Instituto Paulista de Doenças Infecciosas e Parasitárias, em especial ao Charlys Costa.

Esse trabalho foi realizado com o auxílio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

SÚMARIO

1. Introdução.....	18
2. Objetivos.....	21
3. Revisão da Literatura.....	22
3.1 β -lactamases.....	22
3.2 Carbapenemases.....	25
3.2.1 Carbapenemases da classe A.....	25
3.2.1.1 Enzimas cromossomais: NMC-A, SME e IMI.....	26
3.2.1.2 KPC.....	29
3.2.1.3 GES/IBC.....	31
3.2.2 Carbapenemases da classe B.....	34
3.2.2.1 Família IMP.....	37
3.2.2.2 Família VIM.....	40
3.2.2.3 SPM.....	42
3.2.2.4 GIM.....	43
3.2.2.5 SIM.....	43
3.2.2.6 AIM.....	44
3.2.2.7 KHM.....	44
3.2.2.8 NDM.....	45
3.2.2.9 DIM.....	46
3.2.2.10 TMB.....	46
3.2.2.11 Epidemiologia das MBLs.....	47
3.2.3 Carbapenemases da classe D.....	50
3.3 Detecção laboratorial das carbapenemases.....	51
4. Material e Métodos.....	57
4.1 Amostras bacterianas.....	57
4.2 Extração do DNA bacteriano.....	57
4.3 Identificação dos genes codificadores das MBLs por reação da polimerase em cadeia em tempo real.....	58
4.4 Identificação das amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC pela técnica de PCR.....	60
4.5 Detecção das amostras com redução da sensibilidade ou resistência aos carbapenens.....	61

4.6	Avaliação dos mecanismos de resistência das amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens.....	62
4.6.1	Avaliação do perfil de sensibilidade <i>in vitro</i> aos antimicrobianos.....	62
4.6.2	Teste de hidrólise enzimática.....	63
4.6.3	Detecção fenotípica de carbapenemases pelo teste de Hodge modificado.....	65
4.6.4	Detecção fenotípica de AmpC plasmidial pelo teste tri-dimensional modificado.....	66
4.6.5	Identificação dos genes codificadores de AmpC plasmidial.....	67
4.6.5.1	PCR multiplex.....	67
4.6.5.2	PCR convencional.....	69
4.6.6	Detecção fenotípica de ESBL.....	70
4.6.7	Amplificação dos genes codificadores de ESBL e dos genes codificadores de proteínas de membrana externa.....	72
4.6.8	Reação de seqüenciamento e interpretação dos resultados.....	74
4.7	Avaliação da similaridade genética.....	75
4.8	Tipagem plasmidial.....	77
5.	Resultados.....	81
5.1	Amostras bacterianas.....	81
5.2	Teste de triagem.....	83
5.3	Detecção dos genes codificadores de MBL e KPC.....	86
5.4	Avaliação dos mecanismos de resistência das amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens.....	88
5.4.1	Ágar diluição.....	88
5.4.2	Teste de hidrólise enzimática.....	91
5.4.3	Detecção fenotípica pelo teste de Hodge modificado.....	91
5.4.4	Detecção da produção de β -lactamases do tipo AmpC plasmidial.....	92
5.4.5	Detecção da produção de β -lactamases do tipo ESBL.....	93
5.4.6	Detecção dos genes codificadores das proteínas de membrana externa.....	97
5.5	Avaliação da similaridade genética.....	97
5.6	Tipagem plasmidial.....	98
6.	Discussão.....	101
7.	Conclusão.....	120
8.	Referências Bibliográficas.....	122

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 4.1. Placa modelo do teste de Hodge modificado utilizada para a detecção fenotípica da produção de carbapenemases.....	66
Figura 5.1. Distribuição (em percentagem) das amostras incluídas no estudo por sítio de isolamento.....	83
Figura 5.2. T_m das amostras controles utilizadas na reação de PCR em tempo real. A: <i>P. aeruginosa</i> 73-5671 produtora de GIM-1; B: <i>K. pneumoniae</i> A13309 produtora de IMP-1; C: <i>A. baumannii</i> 03-9-T104 produtora de SIM-1; D: <i>P. aeruginosa</i> 48-1997A produtora de SPM-1; E: <i>E. cloacae</i> 75-10433A produtora de VIM-1; F: Branco.....	87
Figura 5.3. Teste tridimensional. A) <i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603, B) <i>E. coli</i> transconjugante C600 R96D <i>bla</i> _{MIR-1} , C) <i>Enterobacter</i> spp. A35.060, D) <i>Enterobacter</i> spp. A35.002.....	93

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 3.1. Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.....	24
Tabela 3.2. Propriedades hidrolíticas das principais carbapenemases.....	28
Tabela 3.3. Variantes da família IMP descritas atualmente.....	39
Tabela 3.4. Variantes da família VIM descritas atualmente.....	41
Tabela 4.1. Iniciadores utilizados na PCR multiplex em tempo real para a detecção de MBL e suas respectivas T_m segundo padronizado por Mendes <i>et al.</i> , 2007a.....	59
Tabela 4.2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de β -lactamases do tipo AmpC pela PCR multiplex de acordo com a técnica de Perez-Perez e Hanson, 2002.....	70
Tabela 4.3. Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes codificadores de ESBL, AmpC plasmidial e de proteínas de membrana externa e suas respectivas temperaturas de anelamento e tempo de extensão.....	73
Tabela 4.4. Amostras bacterianas e seus respectivos genes, utilizadas como controles positivos na técnica de PCR.....	74
Tabela 4.5. Grupos de incompatibilidade plasmidiais tipados em cada reação de PCR de acordo com as metodologias descritas por Caratolli e colaboradores (2005) e por Götz e colaboradores (1996).....	78
Tabela 4.6. Grupos de incompatibilidade, sequências dos iniciadores, temperaturas de anelamento e seus respectivos tamanhos de amplicon dos iniciadores utilizados para a tipagem plasmidial das amostras estudadas.....	79

Tabela 5.1. Distribuição das amostras bacterianas estudadas, de acordo com a espécie.....	82
Tabela 5.2. Porcentagens das amostras bacterianas inibidas nas respectivas concentrações de carbapenens testadas.....	85
Tabela 5.3. Amostras apresentando sensibilidade reduzida aos carbapenens pelo teste de triagem.....	86
Tabela 5.4. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das doze amostras de enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenens pelo teste de triagem.....	90
Tabela 5.5. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos β -lactâmicos das amostras que confirmaram a redução da sensibilidade ao ertapenem.....	90
Tabela 5.6. Resultados obtidos nos testes de detecção fenotípica e genotípica de β -lactamases do tipo ESBL.....	95
Tabela 5.7. Perfil de sensibilidade e determinantes de resistência identificados nas 7 amostras de enterobactérias com resistência às cefalosporinas.....	96
Tabela 5.8. Grupos de incompatibilidade plasmidial presentes nas amostras testadas.....	100

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ATCC – American Type Culture Collection
- CHDL – Carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases
- CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute
- CIM – Concentração inibitória mínima
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- EDTA – Ácido etilenodiaminotretacético
- ESBL – Extended spectrum β -lactamase
- EUA – Estados Unidos da América
- IS – Insertion Sequence
- ITU – Infecção do trato urinário
- LEMC – Laboratório Especial de Microbiologia Clínica
- MBL – Metallo- β -lactamase
- PCR – Reação da cadeia em polimerase
- RNA – Ácido ribonucléico
- T_m – Temperatura de melting
- Tn – Transposase
- TSB – Caldo tríptico de soja
- UFC – Unidade formadora de colônia
- Zn⁺² – Zinco

RESUMO

Objetivo: O objetivo principal deste estudo foi avaliar a presença de carbapenemases entre amostras de enterobactérias isoladas no Complexo Hospital São Paulo (UNIFESP) entre junho e julho de 2008. **Métodos:** A detecção dos genes codificadores de MBL e KPC foi realizada pela técnica de PCR. O teste de triagem foi realizado para detectar a presença de enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenens, as quais foram submetidas ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de ágar diluição. As amostras que confirmaram a sensibilidade reduzida a pelo menos um dos carbapenens foram submetidas ao teste de Hodge modificado, ao teste de hidrólise de β -lactâmicos e à pesquisa fenotípica e genotípica da produção de ESBL e AmpC plasmidial. A avaliação do perfil de proteínas de membrana externa foi realizada através da amplificação e seqüenciamento dos genes codificadores das porinas OmpK35 e OmpK36. A avaliação da relação genética entre as amostras com redução da sensibilidade aos carbapenens foi realizada pelo método de ribotipagem automatizada. A determinação dos grupos de incompatibilidade plasmidial foi realizada conforme descrito por Carattoli *et al.*, 2005 e Götz *et al.*, 1996, para 10% das amostras incluídas no estudo e para as amostras controles produtoras de MBL. **Resultados:** 450 amostras clínicas de enterobactérias foram estudadas. Os genes codificadores das carbapenemases do tipo MBL e KPC não foram detectados em nenhuma amostra. A taxa de sensibilidade ao meropenem, imipenem e ertapenem entre estas amostras foi de 99,3%, 98,4% e 98%, respectivamente. Os isolados com sensibilidade reduzida a pelo menos um dos carbapenens totalizaram 2,9% das amostras. Destes, somente 45,5%, (5 amostras de *Klebsiella pneumoniae*) confirmaram este fenótipo pela ágar diluição. O teste de Hodge e o teste de hidrólise não detectaram a produção de carbapenemases nestas amostras. Os mecanismos de resistência responsáveis pela redução de sensibilidade aos carbapenens nas amostras de *K. pneumoniae* foram a produção de ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e/ou *bla*_{TEM}) associada a alteração nas proteínas de membrana externa (n=4), ou somente a alteração das proteínas de membrana externa (n=1). Destas amostras, três *K. pneumoniae* foram classificadas como

pertencentes ao mesmo ribogruppo. A determinação dos grupos de incompatibilidade plasmidial foi realizada para verificar se as amostras não adquiriam os genes codificadores de MBL devido à incompatibilidade entre os plasmídeos carreadores de tais genes e os plasmídeos presentes nas amostras de enterobactérias. Não houve amplificação dos genes relacionados aos grupos de incompatibilidade plasmidial em 58,5% das amostras. Os grupos de incompatibilidade plasmidial encontrados nas demais amostras foram I1, FIA, FIB, FIC, FrepB, FIIs, P, K/B, N, L/M, A/C e Q. Somente para duas das sete amostras controles produtoras de MBL foi possível realizar a tipagem plasmidial, *S. marcescens* produtora de IMP-1 (IncQ) e *E. cloacae* produtor de IMP-1 (IncQ e IncA/C). **Conclusões:** Apesar da grande prevalência de *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. produtores de MBL no Hospital São Paulo, a produção de carbapenemases por enterobactérias com diminuição da sensibilidade aos carbapenens não foi detectada. A sensibilidade reduzida aos carbapenens ocorre devido à associação de β -lactamases com alteração das proteínas da membrana externa. A hipótese da não transferência dos genes codificadores de MBL devido à incompatibilidade dos plasmídeos carreadores de tais genes e os plasmídeos naturalmente presentes nas enterobactérias não pode ser confirmada porque as amostras de enterobactérias apresentavam plasmídeos não tipáveis pelas técnicas utilizadas.

ABSTRACT

Objective: The aim of this study was to evaluate the presence of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* isolated in Hospital São Paulo Complex (UNIFESP) between June and July 2008. **Methods:** The presence of MBL- and KPC-encoding genes was investigated by PCR. A screening test was conducted to detect isolates non-susceptible to at least one carbapenem. The antimicrobial susceptibility profile was determined by the CLSI agar dilution method for all isolates non-susceptible to carbapenems. Modified Hodge test and the detection of β -lactam hydrolysis, carried out by spectrophotometer assays, were conducted for the isolates that confirmed to be non-susceptible to at least one carbapenem. The production of ESBL or plasmid-mediated AmpC β -lactamases was investigated by phenotypic tests and their respective encoding genes were investigated by PCR. Amplifications of *ompK35* and *ompK36* genes were performed to evaluate whether outer membrane proteins (OMPs)-encoding genes were disrupted or missing. Clonality among isolates non-susceptible to carbapenems was assessed by automated ribotyping. The incompatibility groups of plasmids were determined by PCR-based replicon typing as previously described by Carattoli *et al.*, 2005 and Götz *et al.*, 1996, for 10% of the isolates included in this study and of 7 MBL-producing control strains. **Results:** 450 *Enterobacteriaceae* clinical isolates were investigated. The MBL and KPC-encoding genes were not detected in any isolate. The susceptibility rate to meropenem, imipenem and ertapenem were 99.3%, 98.4% and 98%, respectively. Overall, 2.9% of the isolates were classified as non-susceptible to carbapenems. Of those, only 45.5% (5 *K. pneumoniae* isolates) confirmed to be non-susceptible to at least one carbapenem by the agar dilution technique. The modified Hodge test and the β -lactam hydrolysis by spectrophotometer assays did not detect carbapenemase production in these isolates. The mechanisms conferring reduced susceptibility to carbapenems among these isolates are the production of ESBL (*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} and/or *bla*_{TEM}) associated with altered OMPs (n=4), or only altered OMPs (n=1). Three *K. pneumoniae* isolates non-susceptible to carbapenems were clustered in one ribogroup. The determination of plasmids' incompatibility group was carried out

to verify if transmission of MBL-encoding genes was prevented due to incompatibility between plasmids occurring in the *Enterobacteriaceae* clinical isolates studied and those carrying MBL-encoding genes. The incompatibility group of 58.5% of isolates could not be determined due to lack of amplification. Among the remaining isolates the incompatibility groups I1, FIA, FIB, FIC, FrepB, FII, P, K/B, N, L/M, A/C and Q were found. Among the MBL producers, the incompatibility group could be determined only for two IMP-1 producers, *S. marcescens* (IncQ) and *E. cloacae* (IncQ and IncA/C). **Conclusions:** While MBL-production is highly prevalent among *P. aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. clinical isolates from Hospital São Paulo, *Enterobacteriaceae* isolates non-susceptible to carbapenems due to carbapenemase production were not detected. In contrast, reduced susceptibility to carbapenems occurred due to the association of β -lactamase production with altered OMPs. The hypothesis that incompatibility between plasmids could have prevented transmission of MBL-encoding genes from non-fermenter rods to *Enterobacteriaceae* could not be confirmed since most strains presented non-typable plasmid content.

1. INTRODUÇÃO

A família *Enterobacteriaceae* é composta por importantes gêneros e espécies que se encontram amplamente distribuídas no solo, nas plantas, na água e nos intestinos de humanos e animais. A maioria destes microrganismos compartilham as mesmas características, sendo bacilos Gram negativos que não formam esporos, aeróbios facultativos, podendo apresentar mobilidade devido a flagelos peritríquios ou serem imóveis. As enterobactérias fermentam glicose e outros açúcares, frequentemente, com produção de gás, são catalase positiva, oxidase negativa e reduzem nitrato a nitrito (Farmer *et al.*, 2007).

As enterobactérias são importantes causas de infecções do trato urinário (ITU), de corrente sanguínea, de pneumonias e de várias infecções intra-abdominais. Dentro desta família, *Escherichia coli* é uma causa freqüente de ITU, *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. são importantes causas de pneumonias, e todas as outras enterobactérias estão envolvidas em infecções de corrente sanguínea, em peritonites e outras infecções intra-abdominais (Paterson, 2006; Farmer *et al.*, 2007). A emergência da resistência aos antimicrobianos em enterobactérias é um problema significativo que requer atenção imediata, pois o aumento de bacilos Gram negativos multirresistentes isolados no ambiente hospitalar é um problema que têm se mostrado cada vez mais freqüente em todo o mundo (Diekema *et al.*, 1999; Paterson, 2006; Andrade *et al.*, 2008).

O surgimento e a disseminação de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) têm comprometido o uso de cefalosporinas de amplo espectro para o tratamento empírico de infecções em pacientes hospitalizados

causadas pelos vários gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Como consequência, o uso terapêutico dos carbapenens tem aumentado significativamente em alguns hospitais e bacilos Gram negativos resistentes a esta classe começaram a ser isolados (Castanheira *et al.*, 2008).

Os carbapenens são estáveis à maioria das β -lactamases produzidas por bactérias Gram negativas. Entretanto, o número de isolados Gram negativos resistentes aos carbapenens vem aumentando. A resistência aos carbapenens pode ocorrer devido à combinação de diferentes mecanismos, como modificações na permeabilidade da membrana externa associada à hiperprodução de β -lactamases do tipo AmpC ou ESBL (Nordmann *et al.*, 2009). Entretanto, a produção de β -lactamases que degradam os carbapenens, conhecidas como carbapenemases, tem sido relatadas com maior frequência recentemente. Estas enzimas são classificadas de acordo com os seus requerimentos funcionais e a estrutura de seu sítio ativo, podendo ser divididas em metalo- β -lactamases (MBLs), pertencentes à classe B de Ambler, e em serino- β -lactamases pertencentes às classes A e D de Ambler (Poirel *et al.*, 2007; Castanheira *et al.*, 2008; Nordmann *et al.*, 2009).

As MBLs estão mundialmente disseminadas e já foram descritas em mais de 28 países. Estas enzimas têm sido reportadas desde 2001 em espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* na América Latina. Segundo Sader e colaboradores (2005a) 38,2% dos bacilos Gram negativos não fermentadores resistentes aos carbapenens, isolados na América Latina, eram produtores de MBL e 88,2% destas amostras foram provenientes do Brasil.

A MBL do subtipo SPM é a mais prevalente em nosso país. Esta enzima encontra-se amplamente disseminada pelo território brasileiro, com a

presença de um clone predominante. No Hospital São Paulo, em um estudo que avaliou amostras de *P. aeruginosa* coletadas durante 10 anos, constatou que 86,5% das amostras produtoras de MBL carregavam o gene *bla*_{SPM-1} (Nicoletti, 2007), enquanto que o restante carregava o gene *bla*_{IMP-1}. Apesar de ser menos freqüente, a presença da enzima do subtipo IMP em espécies de *Acinetobacter* spp. foi relatada neste mesmo hospital (Tognim *et al.*, 2006).

A produção de MBL por enterobactérias somente foi descrito no Brasil, em 2005. A amostra de *K. pneumoniae* produtora de IMP-1 foi isolada, em 2003, no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (Lincopan *et al.*, 2005). Em outro relato, amostras de *K. pneumoniae* isoladas de cinco hospitais localizados na cidade de São Paulo, e pertencentes ao mesmo clone, também carregavam o gene *bla*_{IMP-1}. A detecção de um único genótipo de *K. pneumoniae* entre hospitais não relacionados indica que este tipo de cepa pode, de fato, ser mais prevalente do que pensado previamente, ou que talvez, estas bactérias não estejam sendo reportadas ou diagnosticadas devidamente (Lincopan *et al.*, 2006).

É interessante notar que embora a freqüência de bacilos Gram negativos não fermentadores produtores de MBL seja alta no Hospital São Paulo (Sader *et al.*, 2005b), nenhuma amostra de enterobactéria produtora de MBL foi detectada neste hospital até o momento. Este fato nos motivou à realização deste estudo para confirmar se, realmente, não existem enterobactérias produtoras de MBL em nosso meio, ou se elas não têm sido detectadas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

- Avaliar a prevalência de amostras de enterobactérias produtoras de carbapenemases isoladas de pacientes atendidos no Complexo Hospital São Paulo/UNIFESP.

2.2 Objetivos secundários

- Avaliar a presença dos genes codificadores de MBL e KPC;
 - Avaliar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das amostras que apresentam sensibilidade reduzida aos carbapenens;
 - Avaliar os mecanismos de resistência das amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens;
 - Avaliar a relação genética entre amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens pertencentes à mesma espécie bacteriana;
-

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 β -lactamases

Em bacilos Gram negativos, a produção de β -lactamases é o fator contribuinte mais importante para a aquisição de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos (Bush, 2001). As penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens podem ser hidrolisados por vários membros da família das β -lactamases, e a interação entre estas enzimas e seus substratos resultam em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana. Algumas dessas enzimas utilizam íons de zinco como cofatores enzimáticos, enquanto a grande maioria opera via produção de ésteres de serina (Livermore, 1995). A quantidade de enzima produzida, a habilidade dessa enzima em hidrolisar o β -lactâmico e a velocidade com que o antimicrobiano penetra na célula são fatores que irão influenciar no nível da resistência.

Diferentes tipos de β -lactamases já foram descritas e inúmeras tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostas ao longo dos anos. Atualmente, duas classificações têm sido consideradas como de maior importância: as classificações de Ambler e a de Bush, Jacoby e Medeiros (Ambler, 1980; Bush *et al.*, 1995).

A classificação de Ambler foi proposta com base na estrutura molecular das β -lactamases, de acordo com a sequência de aminoácidos que as codifica. Somente quatro classes moleculares principais de β -lactamases foram descritas: A) β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), penicilinas e

carbenicilinas; B) metalo- β -lactamases (MBLs); C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinas.

A classificação de Bush (Bush, 1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias com a estrutura molecular da enzima. Em 1995, uma atualização da classificação de Bush foi proposta, que combina características estruturais e funcionais das β -lactamases (Bush *et al.*, 1995). A Tabela 3.1, apresenta de modo simplificado, a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980), a de Bush, Jacoby e Medeiros (1995) e as características funcionais das β -lactamases.

Tabela 3.1. Características funcionais e moleculares dos principais grupos de β -lactamases.

Classificação de BUSH, JACOBY e MEDEIROS, 1995		Classificação de AMBLER, 1989	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais dos Gram negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto carbapenens. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A e D	A grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
	2b	A	β -lactamases de espectro limitado de bactérias Gram negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.
	2be	A	β -lactamases de espectro ampliado que conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2br	A	β -lactamases derivadas da TEM resistentes ao inibidor de β -lactamases.
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); pouco inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinas inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
4		ND	Enzimas não seqüenciadas que não são agrupados em outros grupos.

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).

3.2 Carbapenemases

As carbapenemases são β -lactamases com eficiência catalítica contra os carbapenens. Estas enzimas representam a família mais versátil das β -lactamases, possuindo um amplo espectro de atividade, que compreende quase todos os antimicrobianos β -lactâmicos. Além disto, algumas destas enzimas apresentam maior resistência aos inibidores de β -lactamases comercialmente disponíveis (Queenam; Bush, 2007). As carbapenemases estão inseridas nas classes moleculares A, B e D de Ambler e nos grupos funcionais 2f e 3 de Bush, Jacoby e Medeiros.

3.2.1 Carbapenemases da classe A

As serino-carbapenemases da classe A e pertencentes ao grupo funcional 2f têm sido as mais frequentemente reportadas em isolados clínicos desde sua primeira descoberta há mais de 20 anos atrás. As bactérias que produzem estas enzimas podem exibir desde alto grau de resistência aos carbapenens até concentrações inibitórias mínimas (CIMs) situadas abaixo dos pontos de corte de sensibilidade. Estas β -lactamases, portanto, podem não ser reconhecidas pelos testes de sensibilidade rotineiros (Queenam; Bush, 2007).

O mecanismo hidrolítico destas enzimas requer uma serina no sítio ativo, na posição 70 de Ambler (Queenam; Bush, 2007). No processo hidrolítico, a enzima se associa, de forma não covalente, ao antimicrobiano. O anel β -lactâmico é então atacado pelo radical hidroxila livre, presente no resíduo serina do sítio ativo da β -lactamase, formando uma ligação covalente acil-éster. A inativação do antimicrobiano β -lactâmico ocorre no momento da

hidrólise deste éster, entretanto sem a perda da atividade hidrolítica pela enzima (Livermore, 1995). As enzimas serino-carbapenemases possuem a habilidade de hidrolisar uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e carbapenens, e todas são inibidos por ácido clavulânico e tazobactam (Queenam; Bush, 2007).

As maiores famílias de carbapenemases da classe A incluem as enzimas NMC-A, IMI, SME e KPC. Um quarto membro desta classe, as β -lactamases do tipo GES, foi originalmente identificada como uma ESBL, mas variantes que hidrolisam fracamente o imipenem foram descobertas no decorrer do tempo. Este subgrupo da enzima GES também é classificado como carbapenemases do grupo funcional 2f (Queenam; Bush, 2007).

3.2.1.1 Enzimas cromossomais: NMC-A, SME e IMI

Uma das principais características que diferem as carbapenemases cromossomais dos outros grupos de carbapenemases é o seu perfil hidrolítico e o fato de serem enzimas induzíveis. As cepas que expressam as enzimas cromossomais NMC-A, IMI e SME apresentam redução da sensibilidade ou resistência aos carbapenens associado à sensibilidade às cefalosporinas de espectro estendido (Tabela 3.2) (Nordmann; Poirel, 2002; Queenam; Bush, 2007).

A enzima NMC-A (*not metalloenzyme carbapenemase*) foi a primeira carbapenemase da classe A identificada. Esta enzima foi isolada de um *E. cloacae* proveniente de um paciente internado em um hospital francês, em 1990 (Nordmann; Poirel, 2002). Em 1996, foi descrita a enzima IMI-1

(*imipenemase*) a partir de duas amostras de *E. cloacae* isoladas em 1984 no sul da Califórnia. NMC-A e IMI-1 possuem 97% de similaridade entre os aminoácidos que as compõem (Nordmann; Poirel, 2002). Interessantemente, *bla*_{IMI-2}, um gene derivado da *bla*_{IMI-1} por uma mutação pontual, foi identificado em plasmídeos recuperados de cepas de *Enterobacter asburiae* isoladas de cinco rios dos Estados Unidos. Estas cepas eram clonalmente relacionadas, indicando que possa existir um reservatório ambiental para estes genes (Poirel *et al.*, 2007).

A enzima SME-1 (*Serratia marcescens* enzyme) foi identificada em dois isolados de *S. marcescens* isolados em 1982, na Inglaterra, antes da comercialização dos carbapenens. Embora a enzima SME-1 tenha somente 68% de similaridade com a NMC-A, elas possuem um perfil hidrolítico similar (Tabela 3.2). Desde a primeira descrição, outras duas variantes da enzima SME já foram descritas, e diferem entre si por uma a duas substituições de aminoácidos. (Nordmann; Poirel, 2002; Queenam; Bush, 2007; Poirel *et al.*, 2007; Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007).

Existem poucos relatos destas enzimas na literatura. A pouca frequência destas enzimas ocorre, principalmente, devido à sua localização cromossomal. As enzimas do tipo NMC-A/IMI só foram descritas em isolados de *Enterobacter* spp. isolados na França, Estados Unidos, Argentina e China. A enzima SME possui um número um pouco maior de relatos, que na sua maioria ocorrem nos Estados Unidos, entretanto existem relatos de *S. marcescens* produtoras de SME-1 e SME-2 na Inglaterra e no Canadá e Suíça, respectivamente (Poirel *et al.*, 2007; Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007).

Tabela 3.2. Propriedades hidrolíticas das principais carbapenemases.

Classe de Ambler	Tipo de enzima	Antimicrobianos					Inibição	
		Amino-penicilinas	Ureido-penicilinas	Cefalosporinas de amplo espectro	Aztreonam	Carbapenens	Ácido Clavulânico	EDTA
A	NMC-A	●	○	□	○	●	±	-
A	SME-1	●	○	□	○	●	±	-
A	IMI-1	●	○	□	○	●	±	-
A	KPC-2	●	●	○	●	●	+	-
A	GES-2	●	●	●	●	○	+	-
B	IMP-1	●	●	●	□	●	-	+
B	VIM-1	●	●	●	□	●	-	+
B	SPM-1	●	●	●	□	●	-	+
D	CHDLs	●	○	○	□	○	±	-

Abreviatura: CHDL, *carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases* (Adaptado do artigo de Nordmann; Poirel, 2002).

○ Hidrólise Fraca; ● Hidrólise Forte; □ Sem hidrólise

3.2.1.2 KPC

Duas características separam as enzimas do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) das outras enzimas do grupo funcional 2f: as enzimas do tipo KPC são encontradas em plasmídeos transferíveis; e, estas enzimas apresentam um perfil hidrolítico mais amplo quando comparadas às enzimas cromossomais (Tabela 3.2). Dados bioquímicos revelaram que as enzimas do tipo KPC hidrolisam todos os antimicrobianos β -lactâmicos incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Na ausência de outros mecanismos, a KPC pode não conferir resistência aos carbapenens, mas somente uma sensibilidade reduzida, e devido a isso, alguns testes fenotípicos podem classificar bactérias produtoras de KPC como somente produtoras de ESBL (Nordmann *et al.*, 2009; Queenam; Bush, 2007; Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007).

A enzima KPC foi primariamente descrita em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte, EUA, em 1996, durante o estudo de vigilância ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*). Este isolado apresentava resistência à todos os antimicrobianos β -lactâmicos, mas a CIM para os carbapenens sofriam ligeira diminuição após a adição de ácido clavulânico. A descoberta da KPC-1 foi seguida por várias publicações de outra variante, a KPC-2, identificada em 2003, de isolados provenientes de Baltimore, coletados durante os anos de 1998 e 1999. A KPC-2 diferia por apenas uma substituição de aminoácido da enzima KPC-1, entretanto, sequenciamentos realizados posteriormente revelaram que o gene *bla*_{KPC-1} e o gene *bla*_{KPC-2} possuíam 100% de similaridade. Desde a descoberta da enzima

KPC-1/2, oito novas variantes (KPC-3 a KPC-10) foram reportadas em diversos países (Queenam; Bush, 2007, Nordmann *et al.*, 2009; www.lahey.org/studies).

A KPC-3 foi descrita em um surto provocado por *K. pneumoniae* ocorrido, entre 2000 e 2001, em um hospital de Nova Iorque. Esta variante apresenta somente uma mudança de aminoácidos quando comparada à KPC-2; entretanto, possui uma melhor atividade hidrolítica frente à ceftazidima (Woodford *et al.*, 2004). A primeira descrição das enzimas do tipo KPC fora dos Estados Unidos ocorreu com a descrição da KPC-4, identificada em amostras de *Enterobacter cancerogenus* isoladas na Escócia. A KPC-5 foi identificada em uma amostra de *P. aeruginosa* em Porto Rico. A análise da atividade hidrolítica destas enzimas mostrou que, tanto a KPC-4 quanto a KPC-5 apresentam melhor atividade frente à ceftazidima que a KPC-2; entretanto, a hidrólise do imipenem é 6 e 3,5 vezes maior pela enzima KPC-2 que pelas enzimas KPC-4 e KPC-5, respectivamente (Wolter *et al.*, 2009).

As variantes KPC-6, KPC-7 e KPC-8 foram descritas entre junho e outubro de 2008 em cepas de *K. pneumoniae* provenientes de Porto Rico (KPC-6 e KPC-8) e Estados Unidos (KPC-7). A KPC-9 foi descrita em uma amostra de *E. coli* isolada no começo de 2009 em Israel. A última variante das enzimas do tipo KPC (KPC-10) foi descrita em 2010, em um *Acinetobacter* pertencente ao complexo *calcoaceticus-baumannii*. Este isolado foi proveniente de um estudo de vigilância que ocorreu em 2009 do qual participaram 17 hospitais de Porto Rico (Robledo *et al.*, 2010; Número de acesso no GenBank EU555534, EU729727, FJ234412 e FJ624872).

As enzimas do tipo KPC são as mais prevalentes entre as carbapenemases da classe A de Ambler. Estas enzimas encontram-se

disseminadas mundialmente, com relatos na América do Sul, Canadá, Israel, China, em mais de oito países da Europa; entretanto, a frequência destes isolados é endêmica somente nos Estados Unidos, em Israel e na Grécia. Isolados produtores de KPC estão amplamente disseminados no nordeste dos Estados Unidos, sendo detectados em cerca de dez estados americanos. Em Tel Aviv, Israel, foi descrito o primeiro surto de *E. coli* produtora de KPC-2 fora dos Estados Unidos. Na Grécia, um estudo de vigilância revelou a predominância de um clone de *K. pneumoniae* produtor de KPC-2 distribuído em 18 hospitais representativos de todo o território grego (Navon-Venezia *et al.*, 2006; Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007; Giakoupi *et al.*, 2009).

A enzima KPC-2 foi primeiramente descrita no Brasil por Monteiro e colaboradores (2009), em quatro amostras de *K. pneumoniae* isoladas entre setembro e novembro de 2006 em um hospital de Recife. Desde então, isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* produtores de KPC-2 também foram descritas no Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, mostrando que a emergência deste mecanismo de resistência em hospitais brasileiros vem ocorrendo desde, pelo menos, desde o ano de 2005 (Pavez *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2009a).

3.2.1.3 GES/IBC

Em 1998, um isolado de *K. pneumoniae* foi recuperado em um hospital francês de uma criança de 1 mês de idade, que tinha sido transferida de um hospital da Guiana Francesa. A β -lactamase caracterizada desta cepa foi nomeada GES-1 (*Guiana extended-spectrum*), e devido ao seu espectro de hidrólise (Tabela 3.2), que inclui penicilinas e cefalosporinas de espectro

estendido, esta enzima foi classificada como uma ESBL (Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007). Entretanto, em 2000, na África do Sul, foi isolada em uma *P. aeruginosa* uma nova variante da família GES, a enzima GES-2, que difere da GES-1 por uma única substituição de aminoácidos, de glicina por asparagina na posição 170 de Ambler. Devido a esta mutação, o espectro de ação da GES-2 passou a incluir os carbapenems (Poirel *et al.*, 2001). A análise cinética demonstrou que embora a hidrólise de imipenem por GES-2 seja fraca, sua eficiência catalítica frente ao imipenem é 10 vezes superior àquela exibida por GES-1. Por outro lado, a atividade de GES-2 frente aos carbapenems é 1000 vezes inferior às demonstradas por SME-1 e NMC-A (Nordmann; Poirel, 2002; Queenam; Bush, 2007)

A nomenclatura das enzimas do tipo GES e IBC passou por inúmeras revisões, e o consenso atual utiliza a sigla “GES” seguida de um número para designar tais enzimas (Lee; Jeong, 2005). Hoje, a família GES possui 15 variantes, que diferem entre si por alterações de um a quatro aminoácidos, e das quais somente cinco variantes possuem atividade carbapenemase (*bla*_{GES-2}, *bla*_{GES-4}, *bla*_{GES-5}, *bla*_{GES-6}, e *bla*_{GES-11}). (Queenam; Bush, 2007; Walther-Rasmussen; Hoiby, 2007; www.lahey.org/studies)

GES-4 foi identificada em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada, em 2002, em uma unidade de terapia intensiva neonatal de um hospital geral localizado no Japão. Esta cepa apresentava resistência às oximinocefalosporinas e cefamicinas, além de sensibilidade reduzida aos carbapenems. A GES-4 possui somente uma mudança de aminoácidos quando comparada à GES-3 (G170S), enzima que não possui atividade hidrolítica frente aos carbapenems (Wachino *et al.*, 2004). As carbapenemases GES-5 e GES-6

foram descritas por Vourli e colaboradores (2004). Estas enzimas foram identificadas em isolados clínicos de *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente, provenientes de um hospital grego. A enzima GES-5 difere em apenas uma mudança na sequência de aminoácidos quando comparada à GES-1 e GES-2 (G170S). Esta mesma substituição está presente na enzima GES-6, que, no entanto, difere-se da enzima GES-5 por uma substituição de lisina por glutamato na posição 104.

As enzimas que possuem uma serina ao invés da asparagina na posição 170 de Ambler (GES-4, GES-5 e GES-6), possuem, em adição às suas propriedades de carbapenemases, uma capacidade incomum de hidrolizar cefamicinas, além de serem mais resistentes aos inibidores de β -lactamases. (Queenam; Bush, 2007). Entretanto, a enzima carbapenemase GES-11, descrita recentemente por Moubareck e colaboradores (2009), não possui substituição de aminoácidos na posição 170, mas sim uma substituição de glicina por alanina na posição 243 quando comparada à sequência de aminoácidos da enzima GES-1. Curiosamente, a substituição da glicina por serina, nesta mesma posição, presente na enzima GES-9 não confere atividade carbapenemase, apenas uma maior ação contra o aztreonam, que é também observado na GES-11.

A enzima GES-13, isolada de uma amostra de *P. aeruginosa* em Atenas, na Grécia, possui a alteração dos aminoácidos glicina para asparagina na posição 170 de Ambler, a mesma que confere a atividade carbapenemase da GES-2. Entretanto a GES-13 exibe atividade hidrolítica contra o imipenem muito baixa para ser mensurada (Kotsakis *et al.*, 2010). Analisando as sequências inseridas no PUBMED das enzimas GES-14 e GES-15, pode-se

observar que estas enzimas também possuem a alteração de aminoácidos na posição 170 (de glicina para serina), porém ainda não há dados sobre os parâmetros cinéticos destas enzimas (Número de acesso no GenBank GU207844 e GU208678).

Não existem muitos relatos de carbapenemases do tipo GES. A GES-5 é a enzima mais disseminada desta classe, sendo encontrada na África do Sul, Grécia, Canadá, China, Coreia, Espanha e Brasil. As enzimas GES-2, GES-4, GES-6 e GES-11 somente foram encontradas nos países de sua descrição, África do Sul, Japão, Grécia e França, respectivamente. Estas enzimas têm sido freqüentemente associadas com ocorrências únicas. Entretanto, há o relato de cepas de *P. aeruginosa* produtoras de GES-2 que causaram um pequeno surto hospitalar em oito pacientes na África do sul, e seis pacientes da Coreia tiveram infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de GES-5 (Queenam; Bush, 2007). No Brasil, somente a enzima GES-5 foi detectada em isolados de *P. aeruginosa* de São Luís e São Paulo, e em uma cepa de *K. pneumoniae* subespécie *ozaenae* também proveniente de um hospital paulistano (Fonseca *et al.*, 2007; Picão *et al.*, 2009; Picão *et al.*, 2010).

3.2.2 Carbapenemases da classe B

As MBLs são notáveis por exibirem amplo espectro de atividade, podendo degradar todas as classes de β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos, e também por não serem inibidas pelos inibidores de serino- β -lactamases disponíveis comercialmente, tais como o ácido clavulânico, o sulbactam e o tazobactam. As MBLs clivam o anel β -lactâmico dos

antimicrobianos, inativando-os, porém, geralmente, estas enzimas requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como cofatores, sendo, portanto inibidas por agentes quelantes, como ácido etilenodiaminotretacético (EDTA), ou por compostos que alterem a conformação do sítio ativo, como os derivados do tiol e ácido dipicolínico (Payne *et al.*, 1997a; Payne *et al.*, 1997b; Laraki *et al.*, 1999; Bebrone, 2007).

Tanto as serino- β -lactamases quanto as MBLs são responsáveis pela resistência aos β -lactâmicos ao clivar a ligação amida do anel β -lactâmico, entretanto ambos grupos diferem em seu processo hidrolítico. As MBLs possuem um distinto grupo de aminoácidos que definem a estrutura do sítio ativo que coordena os íons zinco, responsáveis pela coordenação de duas moléculas de água necessárias para a hidrólise. Esta seqüência é composta por cinco aminoácidos, histidina-X-histidina-X-ácido aspártico (HXHXD), localizados entre os resíduos 116 a 120 (Murphy *et al.*, 2003; Walsh *et al.*, 2005).

As MBLs foram primeiramente identificadas há cerca de 40 anos em uma cepa de *Bacillus cereus*. Desde então já foram encontradas em, pelo menos, outras 20 espécies. As MBLs, como todas as β -lactamases, podem ser divididas em cromossomais e naquelas que são codificadas por genes móveis. As espécies que geralmente possuem MBLs cromossomais provêm de habitats ambientais, sendo a maioria destas MBLs induzíveis. Felizmente, a maioria destes patógenos, geralmente, não causa infecções em humanos, com exceção de *Stenotrophomonas maltophilia* e *Bacillus anthracis*. As bactérias produtoras de MBLs constitutivas incluem *B. cereus* (BCII), *B. anthracis*, *S. maltophilia* (L1), *Aeromonas* spp. (CphA, ImiS), *Chryseobacterium*

meningosepticum (BlaB ou GOB-1), *C. indologenes* (IND-1), *L. gormanii* (FEZ-1), *Caulobacter crescentus* (Mbl1B), *Myroides* spp. (TUS-1 e MUS-1), *Janthinobacterium lividium* (THIN-B), *Flavobacterium johnsoniae* (JOHN-1) e *Serratia fonticola* (SFH-1). (Wang *et al.*, 1999; Nordmann; Poirel, 2002; Walsh *et al.*, 2005).

Um grupo de genes de MBLs que é frequentemente descrito como cromossomal, mas, em fato, trata-se de MBLs móveis, são aquelas associadas com o *Bacterioides fragilis*. Comparado com outras bactérias anaeróbias, esta espécie é relativamente resistente aos β -lactâmicos, principalmente devido à sua produção em potencial da MBL, designada CfiA, ou algumas vezes CcrA. *Bla_{CfiA}* foi o primeiro gene codificador de MBL a ser caracterizado, em 1990, e CfiA é uma das MBLs mais intensivamente estudadas com respeito ao seu mecanismo de catálise, estrutura e propriedades bioquímicas (Walsh *et al.*, 2005).

Entretanto, desde o início da década de 90, novos genes que codificam MBLs têm sido descritos em patógenos clinicamente importantes, tais como *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp., e membros da família *Enterobacteriaceae* (Queenan; Bush, 2007; Poirel *et al.*, 2007). Estes novos genes que codificam MBLs estão inseridos em estruturas genéticas móveis, sendo assim, as enzimas codificadas por tais genes são conhecidas como MBLs móveis ou adquiridas. Atualmente, são conhecidas 10 novas sub-classes de MBLs adquiridas: IMP (*imipenemase*), VIM (*Verona imipenemase*), SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*), GIM (*German imipenemase*), SIM (*Seul imipenemase*), AIM (*Australian imipenemase*), KHM (*Kyorin Health Science MBL*), NDM (*New Delhi metallo- β -lactamase*), DIM (*Dutch Imipenemase*) e

TMB (*Tripoli metallo- β -lactamase*) (Osano *et al.*, 1994; Lauretti *et al.*, 1999; Toleman *et al.*, 2002; Castanheira *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2005; Yong *et al.*, 2007, Sekiguchi *et al.*, 2008; Salabi *et al.*, 2009; Poirel *et al.*, 2009; Yong *et al.*, 2009).

3.2.2.1 Família IMP

Em 1991, Watanabe e colaboradores, descreveram uma enzima transferível da classe B em uma cepa de *P. aeruginosa*, isolada em 1988 no Japão. Os autores caracterizaram esta enzima bioquimicamente, porém não a seqüenciaram e nem a nomearam. Segundo Livermore e Woodford (2000), esta enzima tratava-se da IMP-1, que foi formalmente seqüenciada e nomeada a partir de um isolado de *S. marcescens* isolado, em 1991, no Japão. Durante muitos anos a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita a este país, entretanto, atualmente IMP-1 tem sido encontrada em diversos países e vem sendo isolada de diferentes espécies bacterianas, como *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* entre outros (Tysall *et al.*, 2002; Castanheira *et al.*, 2003; Gales *et al.*, 2003b; Koh *et al.*, 2004).

Existem 26 variantes pertencentes à sub-classe IMP descritas atualmente (Tabela 3.3). Na Itália, em 2000, foi caracterizada uma nova enzima de *A. baumannii* que divergia em 15% na seqüência de nucleotídeos da IMP-1, sendo denominada IMP-2 (Riccio *et al.*, 2000). IMP-3 (previamente denominada MET-1) foi caracterizada a partir de uma *Shigella flexneri* no Japão (O' Hara *et al.*, 1998); IMP-4 foi identificada em isolados de *Acinetobacter* spp. responsáveis por infecções de corrente sanguínea entre 1994 e 1998, em Hong Kong (Chu *et al.*, 2001). Nos anos seguintes várias

enzimas derivadas da IMP foram identificadas em amostras clínicas de Gram negativos em várias regiões geográficas (Queenan; Bush, 2007).

Tabela 3.3. Variantes da família IMP descritas atualmente.

Variante	Espécie	Local	Referência
IMP-1	<i>S. marcescens</i>	Japão	Livermore; Woodford, 2000
IMP-2	<i>A. baumannii</i>	Itália	Riccio <i>et al.</i> , 2000
IMP-3	<i>S. flexneri</i>	Japão	O' Hara <i>et al.</i> , 1998
IMP-4	<i>Acinetobacter</i> spp.	Hong Kong	Chu <i>et al.</i> , 2001
IMP-5	<i>A. baumannii</i>	Portugal	Da Silva <i>et al.</i> , 2002
IMP-6	<i>S. marcescens</i>	Japão	Yano <i>et al.</i> , 2001
IMP-7	<i>P. aeruginosa</i>	Canadá	Gibb <i>et al.</i> , 2002
IMP-8	<i>K. pneumoniae</i>	Taiwan	Yan <i>et al.</i> , 2001 ^a
IMP-9	<i>P. aeruginosa</i>	China	Xiong <i>et al.</i> , 2006
IMP-10	<i>P. aeruginosa</i> e <i>A. xylosoxidans</i>	Japão	Iyobe <i>et al.</i> , 2002
IMP-11	<i>P. aeruginosa</i> e <i>A. baumannii</i>	ND	AB074437, AB074436 ^a
IMP-12	<i>P. putida</i>	Itália	Docquier <i>et al.</i> , 2003
IMP-13	<i>P. aeruginosa</i>	Itália	Toleman <i>et al.</i> , 2003
IMP-14	<i>P. aeruginosa</i>	Tailândia	AY553332 ^a
IMP-15	<i>P. aeruginosa</i>	Tailândia	AY553333 ^a
IMP-16	<i>P. aeruginosa</i>	Brasil	Mendes <i>et al.</i> , 2004
IMP-17	ND	ND	ND
IMP-18	<i>P. aeruginosa</i>	EUA	Hanson <i>et al.</i> , 2006
IMP-19	Bacilos Gram negativos	Japão	AB201263, AB201264, AB201265, AB184976, AB184977 ^a
IMP-20	<i>P. aeruginosa</i>	Japão	AB196988 ^a
IMP-21	<i>P. aeruginosa</i>	Japão	AB204557 ^a
IMP-22	<i>P. fluorescens</i>	ND	Pellegrini <i>et al.</i> , 2009
IMP-23	ND	ND	ND
IMP-24	<i>S. marcescens</i>	Taiwan	Lee <i>et al.</i> , 2008
IMP-25	<i>P. aeruginosa</i>	Coréia	EU541448 ^a
IMP-26	<i>P. aeruginosa</i>	Coréia	EU541448 ^a

Abreviatura: ND, não determinada.

^a Número de acesso no GenBank.

3.2.2.2 Família VIM

Atualmente, são descritas 23 variantes da família VIM (Tabela 3.4), sendo que a primeira enzima desta família foi descrita em Verona, Itália, a partir de uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em 1997. A proteína codificada pelo gene *bla*_{VIM-1} é composta de 266 aminoácidos, e possui pouca similaridade com outras metalo-enzimas, possuindo seu maior índice de identidade (39%) com BCII, e somente de 31% de similaridade com a família do tipo IMP; entretanto, ambas famílias possuem atividades cinéticas similares (Livermore; Woodford, 2000; Walsh *et al.*, 2005). A enzima VIM-2 foi descrita em uma amostra de *P. aeruginosa* na França, em 1996, e apresentava 90% de similaridade com a VIM-1 (Poirel *et al.*, 2000). Em 2001, o gene cromossomal *bla*_{VIM-3} foi identificado em isolados de *P. aeruginosa* em Taiwan (Yan *et al.*, 2001b).

Com exceção das enzimas VIM-12, VIM-19 e VIM-23, que foram descritas em enterobactérias, as outras variantes foram descritas em espécies de *Pseudomonas*. Estas enzimas foram descritas a partir de isolados provenientes de várias regiões geográficas, como, Grécia, Itália, Inglaterra, Turquia, Espanha, Bulgária, Alemanha, França, Índia, Estados Unidos, Colômbia, Argentina, Cingapura e México (Tabela 3.4).

Tabela 3.4. Variantes da família VIM descritas atualmente.

Variante	Espécie	Local	Referência
VIM-1	<i>P. aeruginosa</i>	Itália	Lauretti <i>et al.</i> , 1999
VIM-2	<i>P. aeruginosa</i>	França	Poirel <i>et al.</i> , 2000
VIM-3	<i>P. aeruginosa</i>	Taiwan	Yan <i>et al.</i> , 2001b
VIM-4	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia	Pournaras <i>et al.</i> , 2002
VIM-5	<i>K. pneumoniae</i>	Turquia	Bahar <i>et al.</i> , 2004
VIM-6	<i>P. putida</i>	Cingapura	Koh <i>et al.</i> , 2004
VIM-7	<i>P. aeruginosa</i>	EUA	Toleman <i>et al.</i> , 2004
VIM-8	<i>P. aeruginosa</i>	Colômbia	Crespo <i>et al.</i> , 2004
VIM-9	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	AY524988 ^a
VIM-10	<i>P. aeruginosa</i>	Reino Unido	AY524989 ^a
VIM-11	<i>P. aeruginosa</i>	Argentina	Pasteran <i>et al.</i> , 2005
VIM-12	<i>K. pneumoniae</i>	Grécia	Pournaras <i>et al.</i> , 2005
VIM-13	<i>P. aeruginosa</i>	Espanha	Juan <i>et al.</i> , 2008
VIM-14	<i>P. aeruginosa</i>	ND	EF055455 ^a
VIM-15	<i>P. aeruginosa</i>	Bulgária	Schneider <i>et al.</i> , 2008
VIM-16	<i>P. aeruginosa</i>	Germânia	Schneider <i>et al.</i> , 2008
VIM-17	<i>P. aeruginosa</i>	Grécia	Siarkou <i>et al.</i> , 2009
VIM-18	<i>P. aeruginosa</i>	França	Castanheira <i>et al.</i> , 2009
VIM-19	<i>E. coli</i> e <i>K. pneumoniae</i>	Algeria	Rodriguez-Martinez <i>et al.</i> , 2010
VIM-20	<i>P. aeruginosa</i>	Espanha	GQ414736 ^a
VIM-21	ND	ND	ND
VIM-22	ND	ND	ND
VIM-23	<i>E. cloacae</i>	México	GQ242167 ^a

Abreviatura: ND, não determinada.

^a Número de acesso no GenBank.

3.2.2.3 SPM

Em 2002, foi descrita uma nova sub-classe de MBL, a SPM-1 (São Paulo Metallo- β -lactamase). Esta enzima foi isolada de uma *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de uma paciente de quatro anos hospitalizada no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP (Toleman *et al.*, 2002).

A enzima SPM-1 difere significativamente das seqüências das outras MBLs, apresentando somente 35,5% de similaridade com IMP-1, 32,2% com ImiS, 32,1% com CphA, 30% com BCII e 27% com CcrA, principalmente devido à presença de uma inserção de 24 aminoácidos depois do sítio ativo. Esta inserção é muito flexível e age provavelmente aumentando a ligação com os β -lactâmicos e, subseqüentemente, otimizando a hidrólise destes agentes (Toleman *et al.*, 2002; Walsh *et al.*, 2005).

*Bla*_{SPM-1} parece estar especificamente relacionado à espécie de *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi encontrado em demais patógenos nosocomiais. Como descrito anteriormente, SPM-1 foi encontrada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em 2001, e desde então, amostras produtoras desta enzima foram isoladas em diversas cidades brasileiras, tais como São Paulo, Brasília, Salvador, Fortaleza, Santo André, Londrina, Maringá, Curitiba, Recife, Rio de Janeiro, Porto Alegre e São Luiz (Gales *et al.*, 2003b; Pellegrino *et al.*, 2002; Poirel *et al.*, 2004; Nouér *et al.*, 2005; Vieira *et al.*, 2005; Zavascki *et al.*, 2005), sendo que na maioria destas descrições foi encontrado um perfil clonal predominante, denominado clone SP. A única descrição da produção de SPM-1 fora do Brasil ocorreu em 2010, na Suécia. Entretanto, a amostra de *P. aeruginosa*, em que o gene *bla*_{SPM-1} foi detectado,

foi isolada de um paciente que havia sido atropelado e possuía internação prévia no Hospital Geral Regional, no Recife (Salabi *et al.*, 2010).

3.2.2.4 GIM

Em 2002, cinco isolados de *P. aeruginosa* foram recuperados de diferentes pacientes de um centro médico em Dusseldorf, Alemanha. Estes isolados codificavam uma nova β -lactamase da classe B, denominada GIM-1 (*German imipenemase*). Análises adicionais mostraram que a GIM-1 é composta por 250 aminoácidos e difere em 39-43% da IMP, 28-31% da VIM e 28% da SPM (Castanheira *et al.*, 2004).

Similar à maioria dos genes de MBLs, *bla*_{GIM-1} foi encontrada em um integron de classe 1, inserido em um pequeno plasmídeo de 22 Kb. Este integron também carregava outros três genes de resistência, sendo dois genes de resistência aos aminoglicosídeos, *aacA4* e *aadA1*, e um gene de β -lactamase, *bla*_{OXA-2} (Castanheira *et al.*, 2004).

3.2.2.5 SIM

Lee e colaboradores reportaram em 2005 (Lee *et al.*, 2005), uma nova enzima da classe das MBLs. *Bla*_{SIM-1} foi identificada em sete isolados clínicos de *Acinetobacter baumannii* na Coréia, os quais haviam sido isolados entre setembro de 2003 e novembro de 2004. Pertencente à subclasse B1, esta enzima possui maior homologia com IMP-12 e IMP-9 (69% e 64%, respectivamente), sendo mais divergente quando comparada às outras MBLs. O gene que codifica a enzima SIM-1 foi encontrado como um gene cassete

inserido em um integron, indicando transferência horizontal, uma vez que estes isolados pertencem a distintas linhagens clonais.

3.2.2.6 AIM

A sexta sub-classe de MBLs foi descrita por Yong e colaboradores (2007), a partir de um isolado clínico de *P. aeruginosa* proveniente de um paciente neutropênico internado no Royal Adelaide Hospital, na Austrália, em 2002. Este isolado era resistente à todos os antibióticos, exceto amicacina, aztreonam e colistina. O gene *bla*_{AIM-1} foi encontrado em um plasmídeo associado com uma *ISCR10*, como a SPM-1, o que sugere que esta IS é a responsável pela mobilização deste gene. *Bla*_{AIM-1} possui 915 pares de base e codifica uma proteína de 305 aminoácidos, que possui maior identidade com as MBLs classificadas no grupo B3 (49% e 43% com GlobB e THIN-B, respectivamente), e pouca identidade com as outras MBLs clinicamente relevantes (6,9%, 4,5%, 9% e 4,8% com IMP, VIM, SPM e GIM, respectivamente).

3.2.2.7 KHM

A enzima KHM-1 foi identificada em um *C. freundii* isolado em 1997 de um paciente internado no Hospital Universitário Kyorin, em Tóquio, Japão. Esta amostra apresentava resistência à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, sensibilidade reduzida aos carbapenens e sensibilidade ao aztreonam. Apesar deste isolado carrear um integron de classe 1, com determinantes de resistência aos aminoglicosídeos (*aadA2* e *aac(6')-Iae*),

*bla*_{KHM-1} não estava inserido nele. A análise das sequências flanqueadoras do gene *bla*_{KHM-1} não encontrou homologia com sequências responsáveis por mobilização genética, entretanto uma *open reading frame* (ORF), que apresentava 77% com a proteína hipotética VP1798 do *Vibrio parahaemolyticus*, foi encontrada à jusante do gene *bla*_{KHM-1} (Sekiguchi *et al.*, 2008).

3.2.2.8 NDM

Yong e colaboradores descreveram, em 2009, uma nova sub-classe de MBL. A enzima NDM-1 foi caracterizada em uma *K. pneumoniae* proveniente da urina de um paciente internado em Nova Dehli, mas que tinha morado por muitos anos na Suécia, e que possuía uma internação prévia em um outro hospital indiano, localizado na província de Punjab. Posteriormente à identificação da *bla*_{NDM-1}, este gene também foi encontrado em uma amostra de *E. coli* proveniente de uma amostra de fezes do mesmo paciente. Em 2009, Doumith e colaboradores (2009a) relataram o aparecimento da enzima NDM-1 em diversas regiões do Reino Unido. Esta enzima, primeiramente nomeada como MIM-1 por este grupo, foi detectada em 18 isolados de *K. pneumoniae*, cinco de *E. coli*, um de *E. cloacae*, dois de *C. freundii* e uma *M. morgannii* provenientes de 23 pacientes, dos quais 11 tinham sido previamente hospitalizados na Índia e no Paquistão.

A enzima NDM-1 apresenta maior similaridade com as enzimas VIM-1 e VIM-2, com 32,4%. *Bla*_{NDM-1} foi encontrado entre uma secção de DNA cromossomal de *K. pneumoniae* e uma secção contendo os genes truncados codificadores da sequência de inserção 26 (IS26) e da transposase Tn3. Esta

estrutura estava presente em plasmídeos de 180 e 140 kb de amostras de *K. pneumoniae* e na *E. coli*, respectivamente, o que indica que este gene, provavelmente, foi mobilizado através de um mecanismo de transposição ou replicação por *rolling circle*, uma vez que a sequência de inserção *ISCR1* foi encontrada em ambos plasmídeos (Yong *et al.*, 2009).

3.2.2.9 DIM

A enzima DIM-1 foi descrita em 2009 por Poirel e colaboradores. Esta enzima foi identificada a partir de um isolado clínico de *P. stutzeri* recuperada de um paciente hospitalizado na Holanda com osteomielite tibial crônica. Esta enzima possui maior homologia com a GIM-1 (52%), e 45 e 30% de similaridade com as enzimas das famílias IMP e VIM, respectivamente. O gene *bla*_{DIM-1} foi encontrado como um gene cassete localizado na primeira posição de um integron de classe 1, porém o elemento de 59 pares de base (59be) deste gene encontrava-se truncado com o gene cassete *aadB*. Este integron também possuía o gene *qacH*, que confere resistência aos desinfetantes.

3.2.2.10 TMB

A enzima TMB-1 foi identificada em três amostras isoladas em duas cidades da Líbia, ao norte da África, durante o ano de 2008. Estas amostras foram provenientes de habitats ambientais (*Achromobacter* spp. e *S. maltophilia*) e de um isolado clínico (*P. aeruginosa*) que apresentava sensibilidade apenas à amicacina. O gene *bla*_{TMB-1} codifica uma proteína que

apresenta 69% de similaridade com a IMP-4, e está inserido em uma região de 3.0 kb que contém os genes *Int1*, *bla_{TMB-1}*, *aacA4*, *dhfr* e *bla_{OXA-4}*. Experimentos de hibridização sugerem que este gene é, possivelmente, mediado por plasmídeos (Salabi *et al.*, 2009).

3.2.2.11 Epidemiologia das MBLs

A introdução dos carbapenens na prática clínica representou um grande avanço para o tratamento de infecções graves por bactérias resistentes aos β -lactâmicos (Kahan *et al.*, 1983). O surgimento e a disseminação das MBLs representam um grande risco epidemiológico por duas razões principais: as MBLs conferem resistência não somente aos carbapenens, mas a todos os antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção do aztreonam, e porque os genes que codificam estas enzimas são carregados por elementos genéticos móveis, que permitem a sua mobilização e disseminação entre bactérias Gram negativas, inclusive àquelas pertencentes a outros gêneros e espécies (Jones *et al.*, 2005; Walsh *et al.*, 2005).

Mesmo com as políticas de controle universal de infecções, amostras bacterianas produtoras de MBLs em alguns países já se encontram fortemente estabelecidas. Em 1993, Payne já pronunciava que as MBLs poderiam vir a se tornar um sério problema clínico, e anos depois, há relatos de amostras produtoras de MBLs em mais de 28 países. Essas enzimas já foram descritas na Alemanha, Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Espanha, EUA, França, Grécia, Itália, Japão, Coréia, Polônia, Singapura, Taiwan, Venezuela, entre vários outros países (Walsh *et al.*, 2005).

O programa de vigilância SENTRY documentou um aumento mundial dos índices de ocorrência das MBLs, sendo que a presença destas enzimas eram responsáveis pela resistência ao imipenem em 43,9% dos isolados de *P. aeruginosa* no Brasil (Fritsche *et al.*, 2005). Sader e colaboradores (2005a) realizaram um estudo somente com cepas provenientes da América Latina, e também encontraram resultados semelhantes, sendo que mais de 70% dos isolados que possuíam teste fenotípico positivo para a presença de MBLs provinham de um único hospital brasileiro. Nesta instituição, apesar de terem sido detectados diversos clones produtores de MBLs, havia um clone produtor de SPM-1 predominante.

Um estudo realizado com enterobactérias coletadas nas Américas do Norte e Sul e na Europa, entre 2000 e 2005, revelou que 13,5% das cepas produtoras de carbapenemases carregavam o gene *bla*_{VIM-1} e 10,5% carregavam o gene *bla*_{IMP-1}, sendo que todas elas eram provenientes de países europeus, como a Grécia, a Turquia, a Itália e a Espanha (Castanheira *et al.*, 2008). Entretanto, deve ser salientado que, apesar de enterobactérias produtoras de MBL serem descritas em alguns países europeus e mediterrâneos, a Grécia é o único país que possui uma alta taxa de bactérias produtoras de MBL, possuindo taxas endêmicas de *K. pneumoniae* produtora de VIM-1 (Vatopoulos, 2008).

Na América Latina, já foram encontradas MBLs na Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Venezuela, Porto Rico e México (IMP-1, IMP-6, IMP-16, IMP-18, VIM-1, VIM-2, VIM-8, VIM-11, VIM-23 e SPM-1), principalmente em amostras de *P. aeruginosa*. (Castanheira *et al.*, 2003; Fritsche *et al.*, 2005; Xavier *et al.*, 2006; Bebrone, 2007). No Brasil, a primeira descrição de uma

enterobactéria produtora de MBL ocorreu em 2005, em uma amostra de *K. pneumoniae* isolada de um paciente de 75 anos internado em um hospital universitário da cidade de São Paulo (Lincopan *et al.*, 2005). Posteriormente, outras amostras de enterobactérias produtoras de MBLs foram descritas no Brasil. Entre 2003 e 2005 foram isoladas 6 amostras de *K. pneumoniae* e uma amostra de *Providencia rettgeri* de 6 diferentes hospitais da cidade de São Paulo. Todas as amostras eram produtoras de ESBL e carregavam o gene *bla_{IMP-1}* e, além disso, os seis isolados de *K. pneumoniae* apresentaram o mesmo perfil genotípico através da técnica de ERIC-PCR (Lincopan *et al.*, 2006).

Um estudo que avaliou o contexto genético do gene *bla_{IMP-1}* de 9 amostras de *K. pneumoniae*, incluindo a amostra previamente reportada como a primeira enterobactéria produtora de IMP-1 no Brasil, e outras 8 amostras isoladas de um segundo hospital da cidade de São Paulo, revelou que o gene *bla_{IMP-1}* era carregado em um integron de classe I, o *In86*, que havia sido previamente descrito em amostras de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. isoladas na cidade de São Paulo. Estes resultados sugerem que patógenos como *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. podem ser considerados reservatórios dos genes de MBLs, uma vez que estes genes estão associados a integrons que possuem a capacidade de disseminação interespecíes (Penteado *et al.*, 2009). Entretanto, o gene *bla_{IMP-1}* encontrado em uma amostra de *E. cloacae* isolado em 2005, na cidade de Santos, não estava inserido no *In86*, mas em um integron idêntico ao *In2*, com exceção do gene *bla_{IMP-1}*, o que indica que a aquisição do gene codificador da MBL ocorreu em um evento posterior (Castanheira *et al.*, 2006).

3.2.3 Carbapenemases da classe D

As carbapenemases da classe D ou β -lactamases do tipo OXA (*oxacillin-hydrolyzing*) representam uma das famílias de β -lactamases codificadas por plasmídeos mais prevalentes nos anos 70 e 80. Quando as enzimas do tipo OXA foram classificadas em uma classe molecular diferente das outras serino carbapenemases, elas eram funcionalmente descritas como penicilinases capazes de hidrolizar oxacilina e cloxacilina. Entretanto, esta definição não possui mais valor, uma vez que enzimas descritas recentemente inativam oxacilina e cloxacilina fracamente, e, algumas vezes não possuem atividade hidrolítica frente a estes substratos (Queenan; Bush, 2007; Poirel *et al.*, 2010).

Algumas enzimas da classe D de Ambler também são capazes de hidrolizar os carbapenens. As CHDLs (*carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamases*), além de hidrolizarem as penicilinas, hidrolizam também o imipenem e o meropenem, embora fracamente, e não hidrolizam significativamente as cefalosporinas de amplo espectro e o aztreonam (Tabela 3.2) A atividade das CHDLs é fracamente inibida pelo ácido clavulânico; entretanto, pode ser inibida em diferentes concentrações de cloreto de sódio. Atualmente, existem 9 subgrupos de CHDLs descritos, baseados na sequência de aminoácidos que as codifica: OXA-23, OXA-24, OXA-48, OXA-50, OXA-51, OXA-55, OXA-58, OXA-60 e OXA-62 (Queenan; Bush, 2007; Poirel *et al.*, 2007; Poirel *et al.*, 2010).

As CHDLs são reportadas quase que exclusivamente em isolados de *A. baumannii* de diversas partes do mundo. O único relato da produção da OXA-23 em outro isolado que não *A. baumannii*, foi em um *P. mirabilis* isolado

na França. Entretanto, a enzima OXA-48 tem sido exclusivamente isolada em enterobactérias até o momento. Esta enzima foi identificada em uma *K. pneumoniae* resistente aos carbapenems proveniente da Turquia. Esta enzima possui menos de 46% de similaridade com as outras CHDLs; porém, possui maior atividade hidrolítica contra o imipenem quando comparada com as outras CHDLs. Estudos demonstraram que esta enzima está disseminada pelo território turco, sendo encontrada também em *E. coli* e *C. freundii*. Porém a disseminação da OXA-48 pode ser mais importante que o esperado, já que enterobactérias carreadoras de *bla*_{OXA-48} já foram detectadas no Líbano, no Egito, na França e na Bélgica (Poirel *et al.*, 2007; Queenan; Bush, 2007; Carrër *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010).

3.3 Detecção laboratorial das carbapenemases

A detecção laboratorial de organismos produtores de carbapenemases é uma questão de grande importância para a escolha de esquemas de terapia apropriada e, principalmente, para a implementação de medidas de controle de infecção. Entretanto, a detecção de organismos produtores de carbapenemases encontra uma série de dificuldades, uma vez que ela não pode ser baseada simplesmente no perfil de resistência, e a metodologia é baseada em testes específicos que muitas vezes possuem difícil interpretação (Miriagou *et al.*, 2010).

Devido à disseminação mundial das enterobactérias produtoras de carbapenemases, a partir do ano de 2009, o *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2009a) passou a recomendar a detecção de tais enzimas nas espécies pertencentes a esta família que apresentassem

resistência às cefalosporinas e halos de inibição entre de 19 e 21 mm e entre 16 e 21 mm para ertapenem e meropenem, respectivamente, ou valores de CIMs superiores a 2 µg/mL para os carbapenens, valores ainda pertencentes aos limites de sensibilidade estabelecidos pelo próprio CLSI. Para a detecção de carbapenemases nas amostras que preencherem este critério, o teste recomendado pelo CLSI é o teste de Hodge modificado (CLSI, 2009a).

Esse teste consiste na observação do crescimento da *E. coli* ATCC 25922, inoculada a partir de uma suspensão bacteriana equivalente a 1:10 de uma suspensão 0,5 da escala de MacFaland em uma placa contendo ágar Müller-Hinton, ao redor do halo de inibição de um disco de ertapenem (10 µg), de onde um “traço” da amostra teste é semeado, partindo da borda do disco de antimicrobiano para a extremidade da placa. A observação de uma seta na direção do disco de ertapenem, formado pelo crescimento da *E. coli* ATCC® 25922, indica a produção de carbapenemase pela amostra teste e representa um teste de Hodge positivo.

O teste de Hodge modificado é atualmente o método mais sensível para a detecção de carbapenemases. Em um estudo realizado por Pasteran e colaboradores (2009), todas as amostras produtoras de carbapenemases foram detectadas pelo teste de Hodge (com exceção de duas amostras produtoras de SME que apresentaram resultado inconclusivo devido à inibição que estas causaram à cepa utilizada como indicadora), enquanto que no estudo conduzido por Galani e colaboradores (2008), 4,2% das amostras produtoras de carbapenemases apresentaram resultados falsos negativos. Apesar da boa sensibilidade do teste de Hodge modificado, este teste não é capaz de diferenciar o tipo de carbapenemase envolvida na resistência aos

carbapenens, e existem problemas na interpretação dos resultados do teste de Hodge modificado em amostras com carbapenemases fracas, como no caso das enterobactérias produtoras de MBL.

A falsa positividade do teste de Hodge também está associada com o tamanho do inóculo bacteriano utilizado no teste. Ao utilizar o inóculo padronizado pelo CLSI para o teste (três a cinco colônias), Carvalhães e colaboradores (2009) classificaram 25% dos isolados de *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenens como produtores de carbapenemases. Entretanto, ao utilizar um inóculo pesado (uma alça de 1 µL cheia), a porcentagem de amostras classificadas como produtoras de carbapenemases se elevou para 54%. Este estudo também evidenciou outra limitação do teste de Hodge modificado: este teste não apresenta boa especificidade, resultando em vários resultados falsos positivos para amostras que apresentam sensibilidade reduzida ou que são resistentes aos carbapenens devido à produção de β-lactamases do tipo AmpC e/ou ESBL, principalmente as ESBLs do tipo CTX-M, associada a alterações na permeabilidade da membrana externa. No estudo citado acima, nenhuma das amostras era produtora de carbapenemases, mas 96% apresentavam produção da ESBL do tipo CTX-M (*bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{CTX-M-59}). Enquanto que em outro estudo, onde a prevalência de CTX-M foi baixa, resultados falsos positivos foram encontrados em somente 8,4% das amostras que produziam β-lactamases do tipo AmpC plasmidial ou cromossomal (Galani *et al.*, 2008).

Um teste que tem apresentando boa especificidade para a detecção dos isolados produtores das enzimas do tipo KPC e outras carbapenemases da classe A é o disco combinado utilizando o ácido borônico

como inibidor. Entretanto, em testes onde o ácido borônico é utilizado, deve-se analisar os resultados com cuidado, uma vez que este composto também é utilizado como inibidor das β -lactamases do tipo AmpC (Miriagou *et al.*, 2010). Um estudo realizado por Tsakris e colaboradores (2009), que empregou o teste do disco combinado para a detecção de *K. pneumoniae* produtora de KPC, encontrou 100% de sensibilidade e especificidade quando 400 μ g deste inibidor foi associado aos discos de cefepima, imipenem, meropenem e ertapenem, utilizando como ponto de corte a diferença de 5 mm entre os discos com e sem inibidor. Porém, resultados positivos também foram encontrados em amostras produtoras de β -lactamases do tipo AmpC e ESBL quando os discos de ertapenem e de cefalosporinas foram utilizados. Resultado semelhante foi encontrado em um estudo conduzido por Doi e colaboradores (2008). Apesar de utilizarem um pequeno número de amostras, o ácido borônico, na concentração de 300 μ g por disco, foi capaz de detectar todas as amostras produtoras de KPC quando os discos de ertapenem, meropenem, imipenem e ceftazidima foram utilizados como substratos; e todas as amostras produtoras de β -lactamases do tipo AmpC quando o disco de ertapenem foi utilizado (Miriagou *et al.*, 2010).

Para a detecção de enterobactérias produtoras de MBL, testes fenotípicos baseados na difusão e diluição podem ser empregados. Estes testes incluem a disco aproximação, o disco combinado e o E-test, e utilizam como inibidores agentes quelantes de íons divalentes, como o EDTA (Cornaglia *et al.*, 2007; Miriagou *et al.*, 2010).

O E-test, embora apresente uma boa sensibilidade/especificidade (100/80%) na detecção de amostras produtoras de MBL, deve ser usado com

cautela, uma vez que o valor da CIM de imipenem contida na fita se inicia em 4 µg/mL e a maioria das amostras de enterobactérias produtoras de MBL possuem valores de CIM menores que 4 µg/mL (Campana *et al.*, 2008; Galani *et al.*, 2008). Esta metodologia provou ser inapropriada para a detecção de 31,6% das enterobactérias produtoras de VIM-1 em um estudo conduzido por Galani e colaboradores (2008), pois estas amostras exibiam CIMs para imipenem que seriam inibidas pela menor concentração deste antimicrobiano contido na fita.

Resultados semelhantes foram encontrados em estudos que avaliaram a performance da disco aproximação para a detecção de enterobactérias produtoras de MBL. Estes estudos mostraram que a sensibilidade deste método chega a 100%, enquanto que sua especificidade varia de 85,7% a 91,9%. Para o teste do disco combinado, a associação dos substratos imipenem e ceftazidima com o inibidor EDTA apresentou sensibilidade e especificidade de 94,7% a 100% e 96% a 100%, respectivamente (Galani *et al.*, 2008; Picão *et al.*, 2008), dependendo da concentração de inibidor empregada. Alguns autores têm sugerido que a suplementação do meio de cultura com zinco poderia aumentar a sensibilidade destes métodos; porém, esta modificação não foi completamente avaliada (Miriagou *et al.*, 2010).

Uma das principais preocupações para controlar a propagação das carbapenemases da classe D é a ausência de testes fenotípicos que possam contribuir para o seu fácil reconhecimento, principalmente devido às propriedades enzimáticas das CHDLs. Além disso, a fraca inibição pelo ácido clavulânico e o tazobactam podem classificá-las erroneamente como

pertencentes à classe A. Uma possível opção seria a utilização da inibição cloreto de sódio (NaCl), entretanto a inibição *in vitro* pelo NaCl nem sempre é observada (Miriagou *et al.*, 2010; Poirel *et al.*, 2010).

O surgimento de carbapenemases adquiridas e sua rápida disseminação entre os patógenos Gram negativos, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e enterobactérias constitui um grande desafio ao laboratório clínico. Isto porque este fenômeno não foi acompanhado pela padronização de métodos acurados de detecção fenotípica. Desta maneira, o conhecimento da epidemiologia da produção destas enzimas em isolados clínicos fica comprometido, dificultando a compreensão do real impacto que a produção de carbapenemases poderia desempenhar na terapia antimicrobiana e no controle de infecção hospitalar (Cornaglia *et al.*, 2007).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostras bacterianas

Foram selecionadas para o estudo todas as amostras de enterobactérias isoladas no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP durante os meses de junho e julho de 2008. Estas amostras foram coletadas de maneira prospectiva e foram armazenadas no Banco de Microrganismos do Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC) da Disciplina de Infectologia, UNIFESP/EPM, em caldo tríptico de soja (TSB – Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) com glicerol a 15% (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) a -20° C. Somente uma amostra por paciente foi selecionada para o estudo. As amostras foram retiradas do Banco de Microrganismos e subcultivadas por duas vezes em ágar columbia base (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) suplementado com 5% de sangue de carneiro desfibrinado, para garantir a pureza e a viabilidade das colônias bacterianas, antes da realização dos testes.

4.2 Extração do DNA bacteriano

O material genético bacteriano foi extraído pelo método de fervura. Em um tubo de microcentrífuga foi adicionado 350 µL de água Milli-Q[®] estéril (Millipore, Billerica, EUA) e 3 a 5 colônias bacterianas previamente isoladas em placas de MacConkey (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra). A suspensão foi fervida por 15 minutos e, então, centrifugada por 5 minutos a 12.000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, sendo mantido a 4° C até o momento do uso.

Esta metodologia foi aplicada para a extração do DNA de todas as amostras do estudo, que foram utilizadas como *template* nas reações de PCR realizadas, exceto para a PCR multiplex para a detecção de AmpC plasmidial, que possui metodologia específica para a extração de DNA.

4.3 Identificação dos genes codificadores das MBLs por reação da polimerase em cadeia em tempo real

A pesquisa dos genes codificadores de MBL foi realizada para todas as amostras incluídas no estudo pela técnica de PCR multiplex em tempo real (Mendes *et al*, 2007a). Foram utilizadas como controles positivos as amostras produtoras de IMP-1 (*Klebsiella pneumoniae* A13309), VIM-1 (*Enterobacter cloacae* 75-10433A), SPM-1 (*Pseudomonas aeruginosa* 48-1997A), GIM-1 (*P. aeruginosa* 73-5671) e SIM-1 (*Acinetobacter baumannii* 03-9-T104).

Para a reação da PCR foram preparadas para cada reação, em fluxo laminar, uma mistura contendo 25 µL de *master mix* (Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG with ROX, Invitrogen, Carlsbad, EUA), 15,8 µL de água estéril (Water, Molecular Biology Grade, Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha), 0,5 µL dos iniciadores degenerados VIM, SPM, GIM e SIM, 5 µL do iniciador degenerado IMP e 0,2 µL do iniciador do controle interno da reação. Todos os iniciadores utilizados estavam a uma concentração inicial de 10 µM (Tabela 4.1). A mistura foi mantida a aproximadamente 4^o C durante seu preparo e, após leve agitação 24 µL foi transferido para cada tubo de amplificação, ao qual foi adicionado 1 µL do DNA previamente extraído. As condições para amplificação do DNA foram: desnaturação inicial a 95^o C por 5

minutos, seguidos por 35 ciclos de 94° C por 20 segundos, 53° C por 45 segundos e 60° C por 30 segundos. A etapa de extensão final foi realizada por 10 minutos a 60° C. Após a amplificação, foi adicionada uma curva de *melting* de 60° C a 95° C, com um aumento gradativo de 0,5° C por segundo. A diferenciação dos tipos de MBL foi realizada pela temperatura de *melting* (T_m) dos amplicons (Tabela 4.1). Para a realização do PCR multiplex em tempo real foi utilizado o termociclador *Eppendorf Mastercycler® Realplex4* (Eppendorf, Hamburg, Alemanha).

Tabela 4.1. Iniciadores utilizados na PCR multiplex em tempo real para a detecção de MBL e suas respectivas T_m segundo padronizado por Mendes *et al.*, 2007a.

MBL Gene	Iniciador	Seqüência dos iniciadores (5'-3')	T_m (°C)
<i>bla</i> _{SIM-1}	SIM-F1	CTAAATCGAGAGCCCTGCTTG	80,5
	SIM-R1	CCTTTTCCGCGACCTTGATC	
<i>bla</i> _{SPM-1}	SPM-F1	GTACAAGGGATTTCGGCATCG	83,5
	SPM-R1	TGGCCTGTTCCCATGTGAG	
<i>bla</i> _{VIM-type}	VIMgen-F1	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	87,5-88,5
	VIMgen-R1	AATGCGCAGCACCAGGATAG	
<i>bla</i> _{GIM-1}	GIM-F1	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC	72
	GIM-R1	CGGAACGACCATTTGAATGG	
<i>bla</i> _{IMP-type}	IMPgen-F1	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	76-77,5
	IMPgen-R1	CCAAACYACTASGTTATC	
Controle	16S-8F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	86-87
interno	16S-1493R	ACGGCTACCTTGTTACGACTT	

4.4 Identificação das amostras produtoras carbapenemases do tipo KPC pela técnica de PCR

A presença do gene *bla*_{KPC} foi realizada através da técnica da PCR para todas as amostras incluídas no estudo (Monteiro, 2009). Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe contendo *master mix* (GoTaq[®] Green Master Mix, Promega, Madison, EUA), água estéril e iniciadores da reação a uma concentração final de 1 μ M (KPC-F, TCGCTAAACTCGAACAGG e KPC-R, TTAAGTCCCGTTGACGCCCAATCC). A solução mãe foi mantida a aproximadamente 4^o C durante seu preparo e, após leve agitação, 19 μ L foi transferido para cada tubo de amplificação, que já continha 1 μ L do DNA bacteriano.

As condições utilizadas no termociclador (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) para amplificação do DNA foram: desnaturação a 94^o C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94^o C por 1 minuto, 52^o C por 1 minuto e 72^o C por 1 minuto. A etapa de extensão final foi realizada por 10 minutos a 72^o C. Após amplificação do DNA, a revelação do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% (Ultrapure[™] Agarose, Invitrogen[®], Carlsbad, EUA) contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio, seguida por visualização sob luz ultravioleta.

4.5 Detecção das amostras com redução da sensibilidade ou resistência aos carbapenens

O teste de triagem foi realizado pela técnica de ágar diluição de acordo com as recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2006) para todas as amostras incluídas no estudo, a fim de triar as amostras que apresentam redução da sensibilidade aos carbapenens. Foram utilizadas as seguintes concentrações para cada antimicrobiano: 1, 2 e 4 µg/mL para imipenem (Merck Sharp, Nova Jersey, EUA) e meropenem (Astra Zeneca, Londres, Inglaterra); e 1 e 2 µg/mL para ertapenem (Merck Sharp, Clermont-Ferrand, França). Para o controle de qualidade, foram incluídas nos testes de sensibilidade as amostras da *American Type Culture Collection* (ATCC), *E. coli* ATCC 25922 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

As soluções estoque dos antimicrobianos a serem utilizados foram preparadas no dia da realização do teste. A partir da concentração da solução estoque, foram realizadas diluições seriadas do respectivo antimicrobiano a fim de se obter uma concentração 20 vezes superior à concentração a ser testada. Posteriormente, 1 mL desta solução foi adicionada a tubos contendo 19 mL de ágar Müeller-Hinton (Oxoid®, Basingstoke, Inglaterra), fundido previamente e estabilizados em banho-maria a 56° C. Após homogeneização, o conteúdo foi vertido em placas de Petri de 90 x 15 mm, descartáveis e previamente identificadas.

Para cada amostra, uma suspensão contendo aproximadamente 10⁸ unidades formadoras de colônia (UFC)/mL (escala 0,5 de McFarland) foi preparada em solução salina (NaCl 0,9% – Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Esta solução foi, então, diluída em água destilada estéril na

proporção de 1:10, resultando em um inóculo de aproximadamente 10^7 UFC/mL. Trezentos microlitros desta suspensão bacteriana foi transferido para a base do inoculador de Steers, o qual dispensa 1 a 3 μ L da suspensão bacteriana, de cada amostra, na superfície do ágar de maneira simultânea, resultando em um inóculo final de 10^4 UFC/mL.

As placas foram deixadas à temperatura ambiente até a absorção do inóculo pelo ágar. A leitura foi realizada após incubação por 18 horas a 35° C e a concentração inibitória mínima foi definida como sendo a menor concentração de cada antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano.

A redução da sensibilidade aos carbapenens foi identificada naquelas amostras que apresentaram CIMs maiores ou igual a 2 μ g/mL para meropenem e/ou ertapenem de acordo com os critérios do CLSI (CLSI, 2009a).

4.6 Avaliação dos mecanismos de resistência das amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens

4.6.1 Avaliação do perfil de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos

O perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi determinado, pela técnica de ágar diluição, somente para os isolados que apresentaram CIMs maiores ou igual a 2 μ g/mL para meropenem e/ou ertapenem no teste de triagem. Os agentes antimicrobianos testados e suas respectivas concentrações foram: aztreonam (2-256 μ g/mL, Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA), ceftazidima (2-256 μ g/mL, Strides Arcolab, Bangalore, Índia),

cefepima (2-256 µg/mL, Bristol-Myers Squibb, Nova York, EUA), cefoxitina (2-256 µg/mL, Eurofarma, São Paulo, Brasil), ceftriaxona (2-256 µg/mL, EMS S/A, Hortolândia, Brasil), ertapenem (0,5-256 µg/mL, Merck Sharp, Clermont-Ferrand, França), imipenem (1-256 µg/mL, Merck Sharp, Nova Jersey, EUA), meropenem (1-256 µg/mL, Astra Zeneca, Londres, Inglaterra), piperacilina/tazobactam (2-256 µg/mL, Novafarma, Goiás, Brasil) e ciprofloxacina (0,25-64 µg/mL, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Alemanha). Para o controle de qualidade, foram incluídas no teste de sensibilidade as amostras de *E. coli* ATCC 25922, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa* ATCC 27853.

Para a realização da ágar diluição foi seguida a mesma metodologia utilizada para o teste de ágar screening para os carbapenens, que encontra-se descrita no tópico 4.5. Após o resultado final, as amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) aos antimicrobianos testados de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI para microrganismos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (CLSI, 2009a).

4.6.2 Teste de hidrólise enzimática

O teste de hidrólise foi realizado segundo Picão e colaboradores (2009) com modificações, e foi utilizado com objetivo detectar se as amostras classificadas como produtoras de carbapenemases pelo teste de triagem eram capazes de hidrolisar os carbapenens e as cefalosporinas de amplo espectro. Foram utilizadas como controle positivo as amostras de *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* KOZ-Ban2, produtora de GES-5, e *K. pneumoniae* A28006 e A13309, produtoras de KPC-2 e IMP-1, respectivamente, e como controle negativo, a amostra de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

A preparação do inóculo bacteriano foi realizada após o crescimento em placas de ágar MacConkey por 18 horas. Com o auxílio da alça de semeadura, 10 a 15 colônias isoladas de cada amostra foram transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 500 μL de tampão de amostra, que continha 1 mM de Tris-HCl (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA) e 1 mM de ZnSO_4 (Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha). Este inóculo foi então ultrasonicado por 30 segundos quatro vezes (Sonics Vibra CellTM; Newtown, EUA), e a seguir centrifugado por 15 minutos à 4°C e 13.000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e as amostras mantidas no gelo até o momento do ensaio

As soluções de antimicrobianos foram preparadas pesando-se 3 mg de meropenem e ertapenem, 6 mg de imipenem e 5 mg de cefepima, e diluindo-as em 1 mL de água MilliQ estéril a fim de se obter uma leitura espectrofotométrica em torno de 1 a 1,5 unidades de absorvância, a um comprimento de onda de 299 nm, 295 nm e 260 nm para imipenem e meropenem, ertapenem e cefepima, respectivamente.

Para o teste, foi adicionado a uma cubeta de quartzo 940 μL de tampão de amostra e 50 μL do extrato protéico. Esta mistura foi homogeneizada através de inversão e logo depois sua leitura de absorvância foi zerada. A este, foi adicionado 10 μL do respectivo antimicrobiano, e, após nova homogeneização, o monitoramento da absorvância foi realizada no espectrofotômetro *Biomate 5 UV Visible* (Termo Spectronic, Cambridge, Inglaterra) por 5 minutos. A diminuição gradativa da absorvância e valores negativos de variação de absorvância ($\Delta\text{abs}/\text{min}$, calculada através da diferença entre o valor de absorvância final e absorvância inicial após os 5

minutos) foram considerados resultados positivos de hidrólise do agente β -lactâmico pelo extrato proteico.

4.6.3 Detecção fenotípica de carbapenemases pelo teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado foi realizado para a detecção da produção de carbapenemases entre as amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens. O teste foi realizado utilizando os discos de imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g) e ertapenem (10 μ g) (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra). Para o controle positivo do teste de Hodge foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* A26006 carreadora do gene *bla*_{KPC} (Monteiro *et al.*, 2009), e como controle negativo foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* ATCC 700603.

Para a realização do teste de Hodge modificado, a cepa de *E. coli* ATCC 25922 foi inoculada em uma placa de ágar Müller-Hinton, de acordo com a metodologia preconizada pelo CLSI para o teste de disco difusão (CLSI, 2009b). O disco de antimicrobiano β -lactâmico a ser testado foi colocado no centro da placa, e duas ou três colônias bacterianas da amostra a ser testada foram estriadas sob a placa de Müller-Hinton com a ajuda de uma alça, começando 5 mm após a extremidade do disco (Figura 4.1), até a periferia da placa. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas a 35°C.

O teste foi considerado positivo quando houve o crescimento da amostra de *E. coli* ATCC 25922 na área de encontro da bactéria-teste com o halo de inibição do disco utilizado, indicando a hidrólise do antimicrobiano pela bactéria-teste e assim, possivelmente, a produção de uma carbapenemase (CLSI, 2009a).

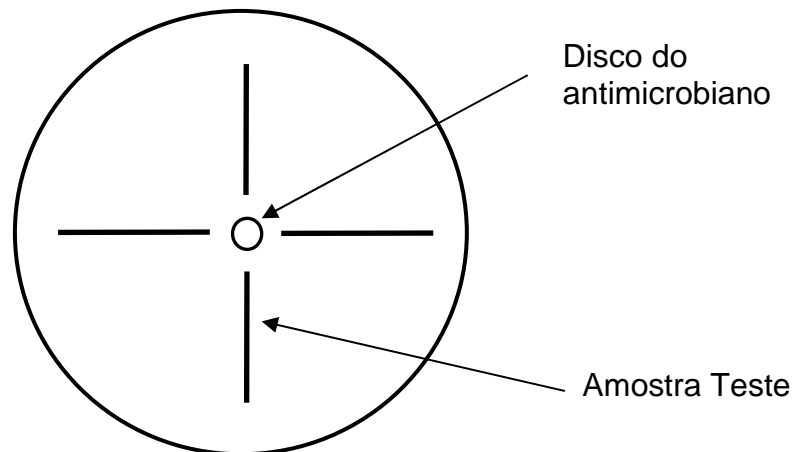


Figura 4.1. Placa modelo do teste de Hodge modificado utilizada para a detecção fenotípica da produção de carbapenemase.

4.6.4 Detecção fenotípica de AmpC plasmidial pelo teste tri-dimensional modificado

O teste tri-dimensional modificado para detecção de AmpC plasmidial foi realizado segundo o proposto por Coudron e colaboradores (2000). Como controles positivos foram utilizadas as cepas *E. coli* transconjugante 200 *bla*_{FOX-5} e *E. coli* transconjugante C600 R96D *bla*_{MIR-1}.

Para a obtenção do extrato bruto de β -lactamases, 10 colônias bacterianas foram inoculadas em 10 mL de caldo TSB. Após uma incubação por aproximadamente 18 horas sob agitação a 37°C, a suspensão bacteriana foi centrifugada por 15 minutos a 3000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o centrifugado ressuspenso em 1 mL de tampão de amostra. Essa suspensão bacteriana foi, então, ultrasonicada por quatro vezes. O produto sonicado foi transferido para tubo de microcentrifuga e centrifugado novamente por 3 minutos a 4° C e 13000 rpm. O sobrenadante foi transferido

para um novo tubo e as amostras foram mantidas no gelo até o momento do ensaio.

Para o teste tri-dimensional, uma placa de Müller-Hinton foi inoculada com a cepa de *E. coli* ATCC 25922, de acordo com a metodologia preconizada pelo CLSI, para o teste de disco difusão (CLSI, 2009b). Um disco de cefoxitina 30 µg (Oxoid[®], Basingstoke, Inglaterra) foi colocado no centro da placa e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi estéril, o ágar foi cortado começando 5 mm após a extremidade do disco até a periferia da placa. Nesse corte foi pipetado de 25 a 30 µL do extrato bruto de β-lactamases, iniciando pela área próxima ao disco em direção à periferia da placa. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas à 35° C. O teste foi considerado positivo quando houve o crescimento da amostra ATCC 25922 na área de encontro do corte no ágar com o halo de inibição da cefoxitina, indicando, dessa maneira, a hidrólise da cefoxitina e a possível produção de AmpC.

4.6.5 Identificação dos genes codificadores de AmpC plasmidial

4.6.5.1 PCR multiplex

A PCR multiplex foi empregada para a detecção dos genes *cmv*, *mir*, *acc*, *act*, *mox*, *lat*, *fox* e *dha* de acordo com a técnica descrita por Perez-Perez e Hanson (2002).

Após a obtenção de colônias puras, uma colônia de cada amostra foi inoculada em 5 mL caldo de TSB. Os tubos foram incubados a 37° C por 12

horas, sob agitação. Um mililitro e meio da suspensão bacteriana foi transferido para um tubo de microcentrífuga, o qual foi centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o centrifugado ressuspensão em 500 μ L de água MilliQ estéril. As células foram então lisadas por aquecimento à 95° C por 10 minutos. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para reação de PCR. Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe contendo GoTaq® Green Master Mix; água estéril; 0,6 mM dos iniciadores MPCMY1-F, MPCMY1-R, MPCMY2-F, MPCMY2-R, MPDHA-F e MPDHA-R; 0,5 Mm dos iniciadores MPACC-F, MPACC-R, MPMAC-F e MPMAC-R; e 0,4 mM dos iniciadores MPFOX-F e MPFOX-R. A solução mãe foi mantida em aproximadamente 4° C durante seu preparo e, após leve agitação, 24 μ L dessa solução foi transferido para cada tubo de amplificação, contendo 1 μ L do DNA alvo. Na Tabela 4.2 estão descritos os iniciadores utilizados para detecção dos genes *bla*_{CMY}, *bla*_{MOX}, *bla*_{MIR}, *bla*_{ACC}, *bla*_{ACT}, *bla*_{LAT}, *bla*_{FOX} e *bla*_{DHA}.

As condições de termociclagem foram: desnaturação inicial a 94° C por 3 minutos, seguida por 25 ciclos de desnaturação a 94° C por 30 segundos, anelamento a 64° C por 30 segundos e extensão a 72° C por 1 minuto. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72° C por 7 minutos. A revelação do produto amplificado foi feita com eletroforese em gel de agarose a 2% contendo 0,5 μ g/mL de brometo de etídio e visualização sob luz ultravioleta.

Foram utilizadas cepas produtoras de β -lactamases plasmidiais como controles positivos. Entre elas: *E. coli* transconjugante pBL23 *bla*_{LAT-1}, *E. coli* transconjugante 200 *bla*_{FOX-5}, *E. coli* transconjugante C600 R96D *bla*_{MIR-1}, *Morganella morganii* *bla*_{DHA-1} e *Hafnia Alvei* A7.307 *bla*_{AAC}. As cepas de *E. coli*

ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controles negativos.

4.6.5.2 PCR convencional

A identificação da presença dos genes *bla*_{MIR} e *bla*_{ACT} pela técnica de PCR foi realizada na amostra detectada genotipicamente pelo PCR multiplex como produtora de pAmpC.

As condições de preparo da reação da PCR seguiram a descrita anteriormente para a detecção da carbapenemase do tipo KPC. A sequência dos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 4.3. Após amplificação do DNA, a revelação do produto amplificado foi feita por eletroforese em gel de agarose a 1% e visualização sob luz ultravioleta.

Tabela 4.2. Iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de β -lactamases do tipo AmpC pela PCR multiplex de acordo com a técnica de Perez-Perez e Hanson, 2002.

Gene Alvo	Iniciadores	Seqüência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>bla</i> _{MOX1-2} , <i>bla</i> _{CMY1} , <i>bla</i> _{CMY8-11} , <i>bla</i> _{CMY19}	MPCMY-1F	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT	520
	MPCMY-1R	CACATTGACATAGGTGTGGTGC	
<i>bla</i> _{CMY2-7} , <i>bla</i> _{CMY12-16} , <i>bla</i> _{CMY18} , <i>bla</i> _{CMY21-24} , <i>bla</i> _{CMY26-33} , <i>bla</i> _{CMY36-37} , <i>bla</i> _{LAT1-4}	MPCMY-2F	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA	462
	MPCMY-2R	TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	
<i>bla</i> _{DHA-1-3}	MPDHA-1F	AACTTTCACAGGTGTGCTGGGT	405
	MPDHA-1R	CCGTACGCATACTGGCTTTGC	
<i>bla</i> _{ACC1-2}	MPACC-F	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA	346
	MPACC-R	TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	
<i>bla</i> _{MIR1-4} , <i>bla</i> _{ACT1-3}	MPMAC-F	TCGGTAAAGCCGATGTTGCGG	302
	MPMAC-R	CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	
<i>bla</i> _{FOX1-7}	MPFOX-F	AACATGGGGTATCAGGGAGATG	190
	MPFOX-R	CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	

4.6.6 Detecção fenotípica de ESBL

Para a realização da detecção fenotípica da produção de ESBL foram utilizadas as metodologias da disco-aproximação (Jarlier *et al.*, 1988) e do disco combinado. Foi preparada uma suspensão bacteriana com turbidez correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Após homogeneização, a

suspensão foi semeada em duas placas de ágar Müller-Hinton utilizando swab estéril. Para a técnica da disco-aproximação, foram dispensados os discos de aztreonam (30µg), ceftriaxona (30µg), ceftazidima (30µg) e cefepima (30µg) a uma distância de 25 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina/ácido clavulânico (30µg/10µg), que foi colocado no centro da placa. Para a técnica do disco combinado, foram dispensados os discos de ceftazidima (30µg), ceftazidima/ácido clavulânico (30/10µg), cefepima (30µg), cefepima/ácido clavulânico (30/10µg), cefotaxima (30µg) e cefotaxima/ácido clavulânico (30/10µg). Os discos sem combinação e o disco de amoxicilina/ácido clavulânico utilizados foram os da Oxoid[®] (Basingstoke, Inglaterra), enquanto os discos de ceftazidima, cefepima e cefotaxima associados ao ácido clavulânico foram os da BioRad[®] (Marnes-La-Coquette, França). As placas foram incubadas por 18 a 24 horas, em temperatura de 35°C.

O teste da disco-aproximação foi considerado positivo para a produção de ESBL quando houve o aparecimento de deformações do halo de inibição ou o de uma zona fantasma entre o substrato e o inibidor; enquanto que para o disco combinado, foram consideradas amostras produtoras de ESBL aquelas que apresentaram uma diferença maior ou igual a 5 mm entre os halos de inibição do disco contendo somente o antimicrobiano, comparado com aquele contendo o antimicrobiano e o inibidor. Para o controle de qualidade, foram incluídas nos testes de detecção fenotípica a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603, produtora de ESBL, e a cepa de *E. coli* ATCC 25922, como controle negativo.

4.6.7 Amplificação dos genes codificadores de ESBL e dos genes codificadores das proteínas de membrana externa

A detecção dos genes codificadores das ESBLs TEM, CTX, SHV e GES e das proteínas de membrana externa, OmpK35 e OmpK36 para *K. pneumoniae*, foi realizado pela técnica da PCR (como previamente descritos por Monteiro, 2009). A preparação da solução mãe foi realizada igualmente a reação da PCR para a detecção da carbapenemase do tipo KPC, como descrito anteriormente. A sequência dos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 4.3.

As condições de ciclagem foram desnaturação a 94° C por 10 minutos, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 94° C, 1 minuto na temperatura de anelamento específica de cada par de iniciadores, e tempo de extensão de acordo com o par de iniciadores utilizado a 72° C (Tabela 4.3). A etapa de extensão final foi realizada por 10 minutos à 72° C. Após a amplificação do DNA, a revelação do produto amplificado foi realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio seguida por visualização sob luz ultravioleta.

Foram utilizadas como controle positivo da reação da PCR, cepas caracterizadas geneticamente pelo laboratório ALERTA (Universidade Federal de São Paulo - Disciplina de Infectologia - UNIFESP) como produtoras de β-lactamases e como controle negativo uma alíquota da solução mãe sem DNA (Tabela 4.4).

Tabela 4.3. Sequência dos iniciadores utilizados para a amplificação dos genes codificadores de ESBL, AmpC plasmidial e de proteínas de membrana externa e suas respectivas temperaturas de anelamento e tempo de extensão.

Iniciadores	Sequência (3'-5')	Temperatura de anelamento	Tempo de extensão
ACT F	CTGCTGCTCAGCACCTC	52° C	1 min
ACT R	AGCGCGCTCAAATACGG		
MIR F	TCCCTAAGCTGTGCCCTG	52° C	1 min
MIR R	TACTGCAGCGCGTCGAG		
TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	52° C	1 min
TEM R	CTGACAGTTACCAATGCTTA		
CTX F	CGCTTTGCGATGTGCAG	52° C	1 min
CTX R	ACCGCGATATCGTTGGT		
SHV F	ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC	61° C	1 min
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC		
GES F	TCACGCACTATTACTGGC	52° C	1 min
GES R	TATTTGTCCGTGCTCAGG		
OmpK 35 F	CAGACACCAAACCTCATCAATGG	52° C	5 min
OmpK 35 R	AGAATTGGTAAACGATACCCACG		
OmpK 36 F	CAGCACAATGAATATAGCCGAC	52° C	5 min
OmpK 36 R	GCTGTTGTGTCGTCAGCAGGTTG		

Tabela 4.4. Amostras bacterianas e seus respectivos genes, utilizadas como controles positivos na técnica de PCR.

Amostra	Gene	Referência
<i>K. pneumoniae</i> A28006	<i>Bla</i> _{KPC-2}	Monteiro <i>et al.</i> , 2009
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> KOZ-Ban2	<i>Bla</i> _{GES-5}	Picão <i>et al.</i> , 2010
<i>K. pneumoniae</i> Heliop 6	<i>Bla</i> _{TEM-1}	Carvalhães <i>et al.</i> , 2010
<i>K. pneumoniae</i> HIAEt 4	<i>Bla</i> _{CTX-2}	Carvalhães <i>et al.</i> , 2010
<i>K. pneumoniae</i> Heliop 6	<i>Bla</i> _{SHV-11}	Carvalhães <i>et al.</i> , 2010
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> KOZ-Ban2	<i>ompK35</i>	Picão <i>et al.</i> , 2010
<i>K. pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i> KOZ-Ban2	<i>ompK36</i>	Picão <i>et al.</i> , 2010

4.6.8 Reação de seqüenciamento e interpretação dos resultados

Os produtos de PCR foram purificados a partir do gel de agarose com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. O DNA obtido foi determinado por densidade utilizando um espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer, Wilmington, EUA) e, então, 70 ng de DNA foram submetidas à reação preparatória para o seqüenciamento com o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, EUA). Ao término da reação de PCR, o produto foi precipitado para a eliminação dos d-dNTPs marcados não incorporados à reação. Após a precipitação e lavagem com etanol, o produto foi ressuspenso em formamida (Hi-Di™ Formamide, Applied Biosystems, Foster City, EUA) e colocado no aparelho *ABI PRISM 3130* -

Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, EUA).

As seqüências de DNA obtidas e as seqüências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa *Lasergene Software Package* (DNASTAR, Madison, EUA) e, então, submetidas à comparação com bases de dados de nucleotídeos disponíveis na Internet, FASTA e BLAST (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

4.7 Avaliação da similaridade genética

A avaliação da similaridade genética das amostras que apresentaram sensibilidade reduzida aos carbapenens foi realizada através da ribotipagem automatizada, utilizando o aparelho *RiboPrinter[®] Microbial Characterization System* (Qualicon, Wilmington, Estados Unidos).

Após o crescimento das amostras, o inóculo bacteriano foi realizado em 200 µL de tampão de amostra (*Sample Buffer* – Qualicon, Wilmington, Estados Unidos) com o auxílio de um bastão plástico descartável. Trinta microlitros desta suspensão foi então transferida para um tubo cônico, apropriado para introduzir as amostras no aparelho. Na etapa seguinte, foi realizado o tratamento térmico das amostras para inativar as nucleases presentes e preparar as células para a lise. Para a realização deste tratamento, ciclos de aquecimento e resfriamento foram realizados segundo o programa da unidade de tratamento térmico (*Heat Treatment Station*), que é um equipamento que acompanha o aparelho de ribotipagem.

Após o tratamento térmico, 5 µl dos reagentes de lise A e B (Qualicon, Wilmington, Estados Unidos) foram adicionados a cada amostra

para iniciar a ruptura da membrana das células. Em seguida as amostras foram inseridas no aparelho *RiboPrinter*[®] e processadas. No aparelho, as seguintes etapas automatizadas foram realizadas: (1) preparo do DNA, que compreende a extração e fragmentação do DNA; (2) separação e transferência do DNA, realizada através de uma corrida em gel de eletroforese seguida de um *southern blotting*; (3) processamento da membrana, onde os fragmentos do DNA foram expostos a um tratamento químico-enzimático com uma sonda de DNA, derivada do RNA ribossomal de uma *E. coli* e um marcador quimioluminescente, que revelou os fragmentos hibridizados; (4) detecção, onde as imagens das membranas foram capturadas por uma máquina fotográfica, inserida no sistema, e transferidas eletronicamente para o computador acoplado ao aparelho. No computador a imagem de cada gel foi tratada e comparada com o banco de dados para a caracterização das cepas. Cinco marcadores de peso molecular foram distribuídos no gel, permitindo que cada coluna, representando os dados da amostra, fosse normalizada baseada na posição e intensidade das bandas, de acordo com um marcador de peso molecular (Hollis *et al.*, 1999).

Coeficientes de similaridade foram calculados pelo sistema de computação acoplado ao aparelho, baseando-se na posição e no peso relativo das bandas. Todos os isolados que apresentaram coeficientes de similaridade iguais ou maiores que 0,93 (93%) foram classificados com o mesmo ribogruppo. Aqueles que apresentaram coeficientes de similaridade $\leq 0,92$ foram considerados isolados diferentes com padrões de ribotipagem distintos (Bruce, 1996).

4.8 Tipagem plasmidial

A tipagem dos grupos de incompatibilidade plasmidial foi realizada para 46 amostras de enterobactérias escolhidas de forma aleatória, sendo 20 *E. coli*, 9 *K. pneumoniae*, 6 *P. mirabilis*, 4 *Enterobacter* spp., 2 *Providencia* spp., e uma amostra das respectivas espécies: *Citrobacter* spp., *K. oxytoca*, *M. morgannii*, *S. sonnei* e *S. marcescens*, além das amostras que apresentarem sensibilidade reduzida aos carbapenems. Também foram tipados plasmídeos de 7 amostras produtoras de MBL, sendo 1 amostra produtora de VIM-1 (*E. cloacae* 75-10433A) e 6 amostras produtoras de IMP-1 (*K. pneumoniae* A13309, *S. marcescens* 185, *E. cloacae* 199, *A. baumannii* 48-5227, *P. aeruginosa* P6318 e *P. aeruginosa* P9043).

A metodologia utilizada para a tipagem plasmidial foi realizada de acordo com os estudos publicados por Caratolli e colaboradores (2005) e por Götz e colaboradores (1996) com algumas modificações. Utilizando as duas metodologias foi possível a tipagem de 19 grupos de incompatibilidade plasmidial através de 5 reações multiplex e outras 6 reações simples de PCR (Tabela 4.5). Os grupos e os respectivos iniciadores utilizados encontram-se na Tabela 4.6.

Para cada reação multiplex, foi preparada em fluxo laminar, uma mistura contendo 12,5 µL de GoTaq[®] Green Master Mix, 8,5 µL de água estéril e os iniciadores da reação de cada multiplex a uma concentração final de 0,2 µM. A mistura foi mantida à 4^o C durante seu preparo e, após leve agitação, 24 µL foi transferido para cada tubo de amplificação, onde foi adicionado 1 µL do DNA bacteriano previamente extraído. A reação de PCR simples foi preparada de forma similar, porém somente com um conjunto de iniciadores e um volume

final de reação de 20 µL.

As condições da ciclagem foram: 5 minutos a 94° C, seguidos de 35 ciclos de 1 minuto de denaturação a 94° C, 1 minuto de anelamento com a temperatura específica dos iniciadores utilizados em cada reação (Tabela 4.6) e 1 minuto de extensão a 72° C. O passo de extensão final foi realizado por 10 minutos a uma temperatura de 72° C. Os produtos amplificados foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio seguida por visualização sob luz ultravioleta.

Tabela 4.5. Grupos de incompatibilidade plasmidiais tipados em cada reação de PCR de acordo com as metodologias descritas por Caratolli e colaboradores (2005) e por Götz e colaboradores (1996).

Reação de PCR	Grupos de incompatibilidade plasmidiais envolvidos
Multiplex A	HI 1, HI 2 e I 1
Multiplex B	X, L/M e N
Multiplex C	FIA, FIB e W
Multiplex D	Y, P e FIC
Multiplex E	A/C, T e FIIAs
Simples F	F _{repB}
Simples G	K
Simples H	B/O
Simples I	Q
Simples J	Q
Simples L	Q

Tabela 4.6. Grupos de incompatibilidade, sequências dos iniciadores, temperaturas de anelamento e seus respectivos tamanhos de amplicon dos iniciadores utilizados para a tipagem plasmidial das amostras estudadas.

Grupo de Incompatibilidade	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
HI 1	HI1 FW	GGAGCGATGGACTTTCAGTAC	471	60° C	Caratolli et al, 2005
	HI1 RV	TGCCGTTTCACCTCGTGAGTA			
HI 2	HI2 FW	TTTCTCCTGAGTCACCTGTTAACAC	644	60° C	Caratolli et al, 2005
	HI2 RV	GGCTCACTACCGTTGTCATCCT			
I 1	I1 FW	CGAAAGCCGGACGGCAGAA	139	60° C	Caratolli et al, 2005
	I1 RV	TCGTCGTTCCGCCAAGTTCGT			
X	X FW	AACCTTAGAGGCTATTTAAGTTGCTGAT	376	60° C	Caratolli et al, 2005
	X RV	TGAGAGTCAATTTTTATCTCATGTTTTAGC			
L/M	L/M FW	GGATGAAAACATCAGCATCTGAAG	785	60° C	Caratolli et al, 2005
	L/M RV	CTGCAGGGGGCGATTCTTTAGG			
N	N FW	GTCTAACGAGCTTACCGAAG	559	60° C	Caratolli et al, 2005
	N RV	GTTTCAACTCTGCCAAGTTC			
FIA	FIA FW	CCATGCTGGTTCTAGAGAAGGTG	462	60° C	Caratolli et al, 2005
	FIA RV	GTATATCCTTACTGGCTTCCGCAG			
FIB	FIB FW	GGAGTTCTGACACACGATTTTCTG	702	60° C	Caratolli et al, 2005
	FIB RV	CTCCCGTCGCTTCAGGGCATT			
W	W FW	CCTAAGAACAACAAGCCCCCG	242	60° C	Caratolli et al, 2005
	W RV	GGTGCGCGGCATAGAACCGT			
Y	Y FW	AATTCAAACAACACTGTGCAGCCTG	765	60° C	Caratolli et al, 2005
	Y RV	GCGAGAATGGACGATTACAAAACCTT			

Tabela 2. Continuação.

Grupo de Incompatibilidade	Iniciadores	Sequência (5'-3')	Tamanho do amplicon (pb)	Temperatura de anelamento	Referência
P	P FW	CTATGGCCCTGCAAACGCGCCAGAAA	534	60° C	Caratolli et al, 2005
	P RV	TCACGCGCCAGGGCGCAGCC			
FIC	FIC FW	GTGAACTGGCAGATGAGGAAGG	262	60° C	Caratolli et al, 2005
	FIC RV	TTCTCCTCGTCGCCAAACTAGAT			
A/C	A/C FW	GAGAACCAAAGACAAAGACCTGGA	465	60° C	Caratolli et al, 2005
	A/C RV	ACGACAAACCTGAATTGCCTCCTT			
T	T FW	TTGGCCTGTTTGTGCCTAAACCAT	750	60° C	Caratolli et al, 2005
	T RV	CGTTGATTACACTTAGCTTTGGAC			
FIAs	FIAs FW	CTGTCGTAAGCTGATGGC	270	60° C	Caratolli et al, 2005
	FIAs RV	CTCTGCCACAAACTTCAGC			
F _{repB}	F _{repB} FW	TGATCGTTTAAGGAATTTTG	270	52° C	Caratolli et al, 2005
	F _{repB} RV	GAAGATCAGTCACACCATCC			
K	K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	160	60° C	Caratolli et al, 2005
	K RV	TCTTTCACGAGCCCGCCAAA			
B/O	K/B FW	GCGGTCCGAAAGCCAGAAAAC	159	60° C	Caratolli et al, 2005
	B/O RV	TCTGCGTTCGCCAAGTTCGA			
Q	<i>repB</i> 1	TCGTGGTCGCGTTCAAGGTACG	1.160	62° C	Götz et al, 1996
	<i>repB</i> 2	CTGTAAGTCGATGATCTGGGCGTT			
	<i>oriV</i> 1	CTCCCGTACTAACTGTCACG	436	57° C	Götz et al, 1996
	<i>oriV</i> 2	ATCGACCGAGACAGGCCCTGC			
	<i>oriT</i> 1	TTCGCGCTCGTTGTTCTTCGAGC	191	57° C	Götz et al, 1996
	<i>oriT</i> 2	GCCGTTAGGCCAGTTTCTCG			

5. RESULTADOS

5.1 Amostras bacterianas

Foram estudadas 450 amostras de enterobactérias isoladas pelo Setor de Microbiologia do Laboratório Central do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP durante os meses de junho (n=247) e julho (n=203) de 2008. Entre as enterobactérias isoladas, *E. coli* foi a mais prevalente (45,5%), seguida por *K. pneumoniae* (21,1%), *P. mirabilis* (14,7%) e *Enterobacter* spp. (10,0%) (Tabela 5.1). As amostras foram oriundas de várias unidades médicas, podendo ser divididas genericamente em amostras provenientes do pronto-socorro (27,6%), da UTI geral e pediátrica (20,5% e 1,3%), unidades clínicas e cirúrgicas (17,6% e 5,3%), ambulatórios (17,3%), Instituto de Oncologia Pediátrica (3,3%) e outras unidades médicas (4,4%). Não puderam ser determinadas as unidades médicas de 12 amostras, representando 2,7% do total de isolados.

A Figura 5.1 ilustra a distribuição das amostras de enterobactérias pelo seu sítio de isolamento. O trato urinário (51%) foi o sítio corpóreo onde as enterobactérias foram mais frequentemente isoladas, seguido pela corrente sanguínea (14,4%). A espécie mais isolada na urina foi a *E. coli* (69,4%), enquanto que, na corrente sanguínea, *E. coli* e a *K. pneumoniae* foram ambas igualmente isoladas (29,2%).

Tabela 5.1. Distribuição das amostras bacterianas estudadas, de acordo com a espécie.

Microrganismo	N (%)
<i>Escherichia coli</i>	205 (45,5)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	95 (21,1)
<i>Proteus mirabilis</i>	66 (14,7)
<i>Enterobacter</i> spp.	45 (10,0)
<i>Serratia</i> spp.	13 (2,9)
<i>Citrobacter</i> spp.	8 (1,8)
<i>Morganella morganii</i>	8 (1,8)
<i>Klebsiella oxytoca</i>	5 (1,1)
<i>Providencia</i> spp.	4 (0,9)
<i>Shigella sonnei</i>	1 (0,2)

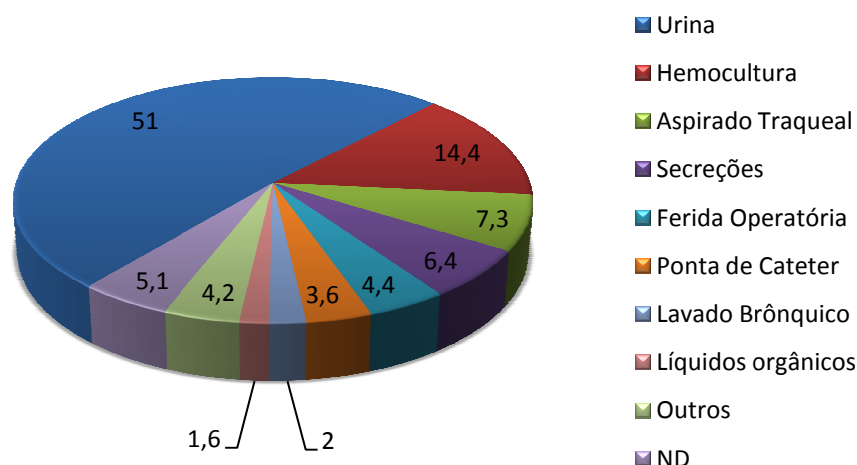


Figura 5.1. Distribuição (em porcentagem) das amostras incluídas no estudo por sítio de isolamento. ND, não determinado.

5.2 Teste de triagem

Apesar do CLSI recomendar que a detecção da produção de carbapenemases seja investigada somente nas amostras de enterobactérias que possuam redução da sensibilidade a ertapenem e a meropenem, neste estudo, três agentes carbapenêmicos, imipenem, meropenem e ertapenem, foram utilizados no teste de triagem para seleção das amostras que apresentassem redução da sensibilidade aos carbapenens. A sensibilidade aos carbapenens foi alta para os três antimicrobianos testados (Tabela 5.2). Para o meropenem, 99,3% das amostras apresentaram CIMs dentro dos valores caracterizados como sensíveis pelo CLSI, entretanto, 1,6% das amostras apresentaram redução da sensibilidade ao meropenem (CIMs ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$). Quanto ao ertapenem, a sensibilidade geral foi de 98%, com 2,4% das amostras apresentando redução da sensibilidade a este antimicrobiano.

Considerando somente o ertapenem e o meropenem, 2,9% do total de amostras (n=13), foram consideradas como amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens. Destas amostras, 84,6% foram classificadas pelo ertapenem, enquanto que somente 53,8% foram classificadas pelo meropenem (Tabela 5.3).

Ao analisarmos o resultado frente ao imipenem, 9,1% (n=41) das amostras apresentaram CIMs ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$, sendo classificadas como amostras com sensibilidade reduzida ao imipenem. Entretanto estes resultados não foram levados em consideração devido ao fato de que algumas espécies possuem CIMs elevados para este antimicrobiano naturalmente, como pode ser observado neste estudo, onde 61% das amostras com sensibilidade reduzida ao imipenem pertenciam às espécies de *P. mirabilis*, *M. morgannii* e *Providencia* spp. como já era esperado.

Além destas espécies, 8,8% dos *Enterobacter* spp., 7,7% das *Serratia* spp. e 2,4% das *E. coli* apresentaram sensibilidade reduzida ao imipenem. Entretanto, estes isolados não foram incluídos no grupo de amostras que apresentam sensibilidade reduzida aos carbapenens, pois, segundo os critérios do CLSI para a realização da pesquisa de carbapenemases, somente devem ser considerados os resultados obtidos para ertapenem e meropenem, aos quais estes isolados foram sensíveis.

Tabela 5.2. Porcentagens das amostras bacterianas inibidas nas respectivas concentrações de carbapenems testadas.

Espécies	N	Imipenem (N)				Meropenem (N)				Ertapenem (N)		
		≤ 1 ^a	2 ^a	4 ^a	> 4 ^a	≤ 1 ^a	2 ^a	4 ^a	> 4 ^a	≤ 1 ^a	2 ^a	> 2 ^a
<i>E. coli</i>	205	97,6 (200)	1,0 (2)	1,4 (3)	0,0	100,0 (205)	0,0	0,0	0,0	100,0 (205)	0,0	0,0
<i>K. pneumoniae</i>	95	96,8 (92)	0,0	1,1 (1)	2,1 (2)	95,7 (91)	2,1 (2)	1,1 (1)	1,1 (1)	93,7 (89)	0,0	6,3 (6)
<i>P. mirabilis</i>	66	71,3 (47)	12,1 (8)	13,6 (9)	3,0 (2)	100,0 (66)	0,0	0,0	0,0	98,5 (65)	1,5 (1)	0,0
<i>Enterobacter</i> spp.	45	88,9 (40)	8,9 (4)	2,2 (1)	0,0	100,0 (45)	0,0	0,0	0,0	95,6 (43)	2,2 (1)	2,2 (1)
<i>Serratia</i> spp.	13	84,6 (11)	7,7 (1)	0,0	7,7 (1)	92,3 (12)	0,0	0,0	7,7 (1)	92,3 (12)	0,0	7,7 (1)
<i>Citrobacter</i> spp.	8	100,0 (8)	0,0	0,0	0,0	87,5 (7)	12,5 (1)	0,0	0,0	100,0 (8)	0,0	0,0
<i>M. morgannii</i>	8	50,0 (4)	0,0	37,5 (4)	12,5 (1)	100,0 (8)	0,0	0,0	0,0	100,0 (8)	0,0	0,0
<i>K. oxytoca</i>	5	80,0 (4)	0,0	0,0	20,0 (1)	80,0 (4)	0,0	0,0	20,0 (1)	80,0 (4)	0,0	20,0 (1)
<i>Providencia</i> spp.	4	50,0 (2)	0,0	50,0 (2)	0,0	100,0 (4)	0,0	0,0	0,0	100,0 (4)	0,0	0,0
<i>S. sonnei</i>	1	100,0 (1)	0,0	0,0	0,0	100,0 (1)	0,0	0,0	0,0	100,0 (1)	0,0	0,0
Todas as espécies	450	90,9 (409)	3,3 (15)	4,2 (19)	1,6 (7)	98,4 (443)	0,7 (3)	0,2 (1)	0,7 (3)	97,6 (439)	0,4 (2)	2 (9)

^a Valores em µg/mL.

Tabela 5.3. Amostras apresentando sensibilidade reduzida aos carbapenes pelo teste de triagem.

Amostra	CIM obtida pelo teste de triagem ($\mu\text{g/mL}$)		
	Imipenem	Meropenem	Ertapenem
<i>K. pneumoniae</i> A33.735	≤ 1	≤ 1	> 2
<i>K. pneumoniae</i> A34.057	4	2	> 2
<i>K. pneumoniae</i> A34.074	≤ 1	2	≤ 1
<i>K. pneumoniae</i> A34.089	> 4	4	> 2
<i>K. pneumoniae</i> A34.248	≤ 1	≤ 1	> 2
<i>K. pneumoniae</i> A34.297	≤ 1	≤ 1	> 2
<i>K. pneumoniae</i> A34.455	> 4	> 4	> 2
<i>K. oxytoca</i> A34.833	> 4	> 4	> 2
<i>Enterobacter</i> spp. A35.002	≤ 1	≤ 1	> 2
<i>Enterobacter</i> spp. A35.060	2	≤ 1	> 2
<i>Citrobacter</i> spp. A34.730	≤ 1	2	≤ 1
<i>Serratia</i> spp. A34.390	> 4	> 4	> 2
<i>P. mirabilis</i> A35.003	≤ 1	≤ 1	2

5.3 Detecção dos genes codificadores de MBL e KPC

A identificação dos genes que codificam as MBL foi realizada para todas as amostras pela técnica de PCR multiplex em tempo real. A Figura 5.2 ilustra as T_m das amostras utilizadas como controles. Nenhum dos genes codificadores de MBL foram detectados nas amostras avaliadas. Os genes codificadores de KPC também não foram detectados pela técnica de PCR convencional entre as amostras testadas.

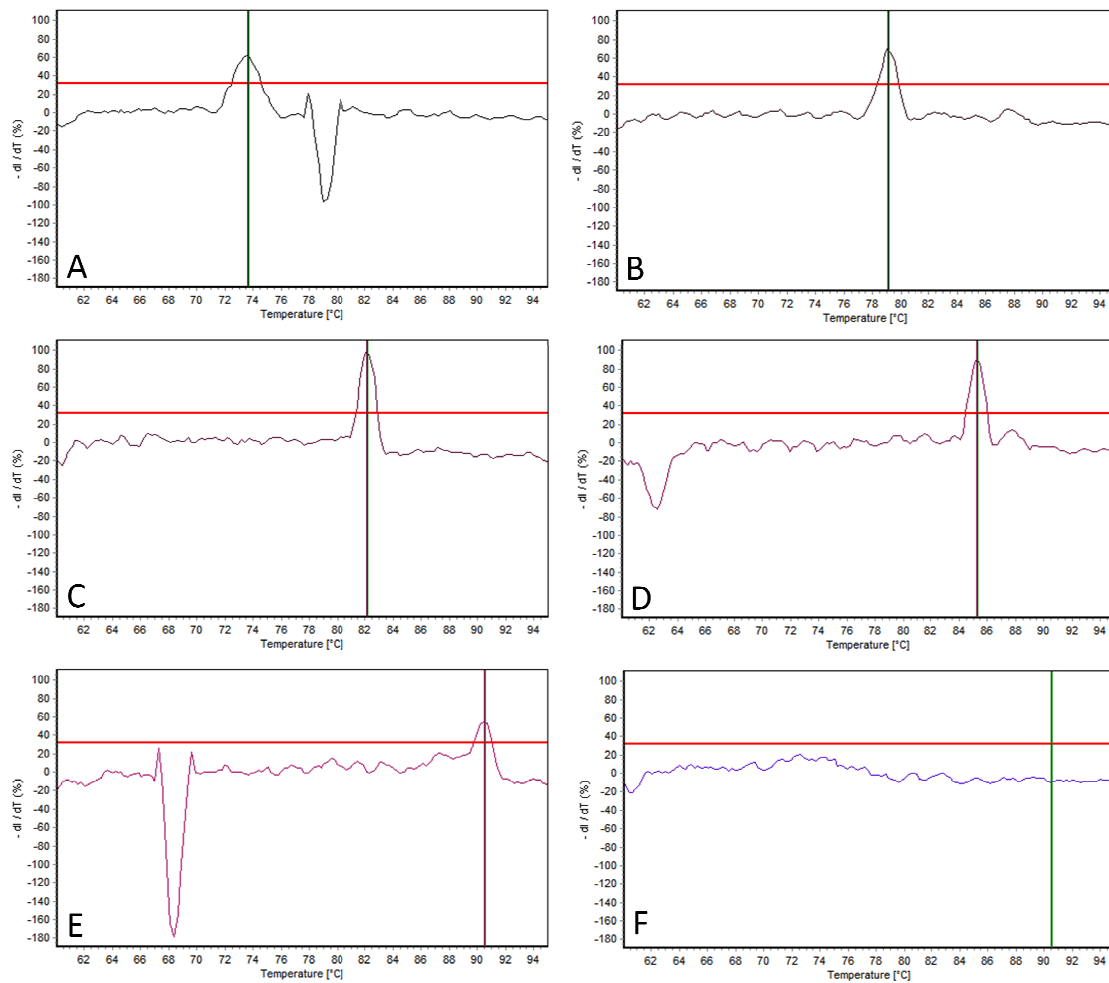


Figura 5.2. T_m das amostras controles utilizadas na reação de PCR em tempo real. A: *P. aeruginosa* 73-5671 produtora de GIM-1; B: *K. pneumoniae* A13309 produtora de IMP-1; C: *A. baumannii* 03-9-T104 produtora de SIM-1; D: *P. aeruginosa* 48-1997A produtora de SPM-1; E: *E. cloacae* 75-10433A produtora de VIM-1; F: Branco.

5.4 Avaliação dos mecanismos de resistência das amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens

5.4.1 Ágar diluição

A ágar diluição foi realizada para as 11 das 13 amostras que apresentaram CIMs maiores ou igual a 2 µg/mL para meropenem ou ertapenem no teste de triagem pois duas amostras (*K. oxytoca* A34.833 e *Enterobacter* spp. A35.060) tornaram-se inviáveis durante a realização do estudo.

Das amostras submetidas à ágar diluição para a confirmação do resultado obtido pelo teste de triagem, somente cinco amostras de *K. pneumoniae* (45,5%) confirmaram possuir sensibilidade reduzida a ertapenem, sendo que todas as amostras, incluindo estas, obtiveram CIM ≤ 1 µg/mL para os outros dois carbapenens utilizados no teste de triagem. Entre as seis amostras que não confirmaram a resistência aos carbapenens, duas apresentaram resistência às cefalosporinas, sendo uma *K. pneumoniae* (A34.089) e um *Enterobacter* spp. (A35.002); e quatro amostras apresentaram sensibilidade a todos os antimicrobianos testados pela ágar diluição. Entre estas amostras estavam uma *K. pneumoniae* (A34.074), uma *Serratia* spp. (A34.390), um *Citrobacter* spp. (A34.730) e um *P. mirabilis* (A35.003).

Os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos das onze amostras que foram triadas por apresentar sensibilidade reduzida aos carbapenens encontram-se na Tabela 5.4. A maior porcentagem de sensibilidade foi obtida para a cefepima (63,6%), seguida pela ceftazidima, ciprofloxacina e

piperacilina/tazobactam (54,5%), ceftriaxona (45,5%), aztreonam (36,4%) e cefoxitina (27,3%).

As cinco amostras de *K. pneumoniae* que confirmaram a sensibilidade reduzida aos carbapenens, obtiveram CIMs para ertapenem entre 4 e 8 µg/mL. A resistência às cefalosporinas nestas amostras foi alta, com exceção da *K. pneumoniae* A34.455, que apresentou resistência intermediária à cefoxitina, e também ao monobactâmico aztreonam. Com exceção do isolado *K. pneumoniae* A34.455, todas as amostras com sensibilidade reduzida ao ertapenem foram resistentes à ciprofloxacina, enquanto que entre as amostras que não confirmaram a resistência aos carbapenens, somente uma amostra não foi sensível a este antimicrobiano (*K. pneumoniae* A34.089, CIM 2 µg/mL) (Tabela 5.5).

Para os demais experimentos realizados neste estudo somente foram incluídas as cinco amostras de *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenens e as duas amostras que apresentaram resistência às cefalosporinas.

Tabela 5.4. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das onze amostras de enterobactérias com sensibilidade reduzida aos carbapenens pelo teste de triagem.

Antimicrobianos	% por categoria ^a		µg/mL	
	Sensível	Resistente	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Imipenem	100,0	0	≤ 1	≤ 1
Meropenem	100,0	0	≤ 1	≤ 1
Ertapenem	54,5	27,3	≤ 1	8
Ceftazidima	54,5	45,5	8	256
Ceftriaxona	45,5	45,5	32	> 256
Cefepima	63,6	36,4	≤ 2	> 256
Cefoxitina	27,3	45,5	16	> 256
Aztreonam	36,4	54,4	32	> 256
Piperacilina/Tazobactam	54,5	9,1	16	64
Ciprofloxacina	54,5	36,4	≤ 0,25	> 64

^a A porcentagem de sensibilidade e resistência foi calculada de acordo com os limites estabelecidos pelo CLSI (2009a).

Tabela 5.5. Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos β-lactâmicos das amostras que confirmaram a redução da sensibilidade ao ertapenem.

Amostra	MER ^a	ERT ^a	CAZ ^a	CRO ^a	CEF ^a	FOX ^a	AZT ^a	P/T ^a	CIP ^a
<i>K. pneumoniae</i> A33.735	≤ 1	4	256	128	8	> 256	> 256	32	32
<i>K. pneumoniae</i> A34.455	≤ 1	4	4	4	≤ 2	16	16	4	≤ 0,25
<i>K. pneumoniae</i> A34.057	≤ 1	8	256	> 256	> 256	32	> 256	64	16
<i>K. pneumoniae</i> A34.248	≤ 1	8	256	> 256	256	32	> 256	64	> 64
<i>K. pneumoniae</i> A34.297	≤ 1	8	256	> 256	> 256	32	> 256	64	> 64

Abreviaturas: MER, meropenem; ERT, ertapenem; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; CEF, cefepima; FOX, cefoxitina; AZT, aztreonam; P/T, piperacilina/tazobactam; CIP, ciprofloxacina.

^a Valores em µg/mL.

5.4.2 Teste de hidrólise enzimática

Nenhuma das amostras submetidas ao teste de hidrólise apresentou atividade hidrolítica contra os carbapenens, entretanto, quatro amostras de *K. pneumoniae* foram capazes de hidrolisar cefepima. Três destas amostras (*K. pneumoniae* A34.057, A34.248 e A34.297) demonstraram resistência ao ertapenem (CIM, 8 µg/mL) e às demais cefalosporinas testadas, com exceção da piperacilina/tazobactam (CIM, 64 µg/mL), entretanto, a amostra de *K. pneumoniae* A34.089 apresentou sensibilidade ao ertapenem e a ceftazidima; porém, resistência à ceftriaxona, à cefepime e ao aztreonam.

5.4.3 Detecção fenotípica pelo teste de Hodge modificado

O teste de Hodge modificado foi realizado utilizando como substrato os discos de meropenem e ertapenem, de acordo com as recomendações do CLSI (2009a). A performance do disco de imipenem também foi avaliada. A produção de carbapenemases não foi detectada pelo teste de Hodge modificado em nenhuma das amostras avaliadas.

5.4.4 Detecção da produção de β -lactamases do tipo AmpC plasmidial

Para a detecção da produção de β -lactamases do tipo AmpC plasmidial foram realizados testes fenotípicos (teste tridimensional modificado) e genotípicos (PCR multiplex). Dentre as sete amostras testadas, somente um isolado de *Enterobacter* spp. foi detectado fenotipicamente pelo teste tridimensional como produtor de β -lactamase do tipo AmpC (Figura 5.3).

Não houve detecção de AmpC plasmidial pela técnica de PCR multiplex nas seis amostras previamente classificadas como não produtoras de AmpC plasmidial pelo teste tridimensional. A amostra de *Enterobacter* spp. A35.002, fenotipicamente identificada como produtora de AmpC pelo teste tridimensional, apresentou um amplicon de aproximadamente 302 pb. Através do PCR convencional, constatou-se a presença do gene codificador da enzima ACT. A amostra produtora de ACT apresentava resistência à cefoxitina (CIM, > 256 $\mu\text{g/mL}$), à ceftazidima (CIM, 64 $\mu\text{g/mL}$) e ao aztreonam (CIM, 32 $\mu\text{g/mL}$), mas sensibilidade à cefepima (CIM, ≤ 2 $\mu\text{g/mL}$) e aos carbapenens (CIMs ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$).

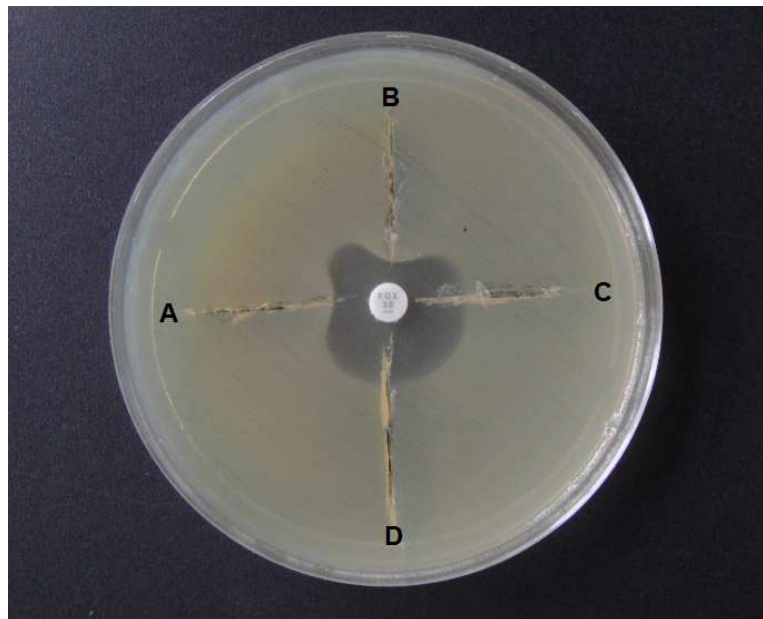


Figura 5.3. Teste tridimensional. A) *Enterobacter* spp. A35.002, B) *E. coli* transconjugante C600 R96D *bla*_{MIR-1}, C) *K. pneumoniae* ATCC 700603, D) *K. pneumoniae* A34.455.

5.4.5 Detecção da produção de β -lactamases do tipo ESBL

A detecção fenotípica da produção de ESBL foi realizada por dois métodos diferentes, a disco-aproximação e o disco combinado. Pela técnica de disco-aproximação, somente duas amostras foram classificadas como produtoras de ESBL, a *K. pneumoniae* 34.089, que não apresentou sensibilidade reduzida aos carbapenens, e a *K. pneumoniae* A33.735, que possuía sensibilidade reduzida aos carbapenens. Entretanto, pela técnica do disco combinado, cinco amostras foram classificadas como produtoras de ESBL, as duas primeiramente classificadas pela disco-aproximação e mais três amostras de *K. pneumoniae* (A34.057, A34.248 e A34.297) (Tabela 5.6).

A detecção dos genes codificadores de β -lactamases do tipo ESBL foi realizada pela técnica da PCR convencional somente para as sete amostras que apresentaram resistência às cefalosporinas pela ágar diluição, independente do resultado do teste fenotípico. Um ou mais genes codificadores de β -lactamases foram detectadas nestas amostras, como pode ser observado nas Tabelas 5.6 e 5.7. Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} foram detectados em 2, 3 e 4 amostras, respectivamente. O gene *bla*_{GES} não foi detectado em nenhuma das amostras avaliadas.

Dados preliminares do seqüenciamento dos genes codificadores de ESBL mostraram que os genes *bla*_{CTX} encontrados pertencem ao grupo da CTX-M-15 (apresentam 100% de similaridade tanto com a CTX-M-15, quanto com a CTX-M-28). Dentre as seqüências dos genes codificadores de SHV, somente a proveniente da amostra de *K. pneumoniae* A33.735 não foi seqüenciada, as demais seqüências analisadas apresentam 100% de similaridade com dois subtipos desta enzima, a SHV-1 e a SHV-11. Ambos subtipos são classificados na classe 2b, não possuindo amplo espectro de atividade.

Dentre os seqüenciamentos dos genes *bla*_{TEM}, a enzima TEM-1 foi identificada na amostra de *K. pneumoniae* A33.735, enquanto que na amostra de *K. pneumoniae* A34.089 o seqüenciamento não conseguiu diferenciar se os genes eram codificadores de TEM-1 ou TEM-150.

Tabela 5.6. Resultados obtidos nos testes de detecção fenotípica e genotípica de β -lactamases do tipo ESBL.

Amostra	Disco- aproximação	Disco combinado			Genes
		CAZ	CEF	CTX	
<i>K. pneumoniae</i> A33.735	+	+	-	-	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{TEM}
<i>K. pneumoniae</i> A34.057	-	+	+	+	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX}
<i>K. pneumoniae</i> A34.089	+	-	+	+	<i>bla</i> _{TEM}
<i>K. pneumoniae</i> A34.248	-	+	+	+	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX}
<i>K. pneumoniae</i> A34.297	-	+	+	+	<i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX}
<i>K. pneumoniae</i> A34.455	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter</i> spp. A35.002	-	-	-	-	<i>bla</i> _{ACT}

Abreviaturas: CAZ, ceftazidima; CEF, cefepima; CTX, cefotaxima.

Tabela 5.7. Perfil de sensibilidade e determinantes de resistência identificados nas 7 amostras de enterobactérias com resistência às cefalosporinas.

Amostra	µg/mL							pAmpC	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX}	<i>bla</i> _{SHV}	Hidrólise	<i>ompK35</i>	<i>ompK36</i>
	ERT	CAZ	CRO	CEF	FOX	AZT	P/T					Cefepima		
<i>K. pneumoniae</i> A34.057	8	256	> 256	> 256	32	> 256	64	-	-	+	+	+	<i>IS1</i>	Tamanho conservado
<i>K. pneumoniae</i> A34.248	8	256	> 256	256	32	> 256	64	-	-	+	+	+	<i>IS1</i>	Tamanho conservado
<i>K. pneumoniae</i> A34.297	8	256	> 256	> 256	32	> 256	64	-	-	+	+	+	<i>IS1</i>	Tamanho conservado
<i>K. pneumoniae</i> A33.735	4	256	128	8	> 256	> 256	32	-	+	-	+	-	Ausência	Ausência
<i>K. pneumoniae</i> A34.455	4	4	4	≤ 2	16	16	4	-	-	-	-	-	Ausência	Ausência
<i>K. pneumoniae</i> A34.089	≤ 0,5	8	> 256	128	16	32	128	-	+	-	-	+	ND	ND
<i>Enterobacter</i> spp. A35.002	≤ 0,5	64	> 256	≤ 2	> 256	32	16	ACT	-	-	-	-	ND	ND

Abreviaturas: ERT, ertapenem; CAZ, ceftazidima; CRO, ceftriaxona; CEF, cefepima; FOX, cefoxitina; AZT, aztreonam; P/T, piperacilina/tazobactam; pAmpC, β-lactamase do tipo AmpC plasmidial; ND, não determinado.

5.4.6 Detecção dos genes codificadores das proteínas de membrana externa

A detecção dos genes codificadores das proteínas de membrana externa foi realizada para as cinco amostras de *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenems. Entre estas amostras foram observados dois perfis de amplificação para os genes *ompK35* e *ompK36*: (i) produto de amplificação superior a 2000 pb para o gene *ompK35* e produto de amplificação com tamanho esperado (1000 pb) para o gene *ompK36* (A34.057, A34.248 e A34.297); e (ii) ausência de produto de amplificação para *ompK35* e *ompK36* (amostras A33.735 e A34.455). Resultados preliminares do seqüenciamento dos amplicons revelaram que os genes *ompK35* de tamanho alterado apresentavam uma sequência de inserção, a IS1. Entretanto, o seqüenciamento dos genes *ompK36* não foram conclusivos quanto à presença de mutações que levassem a um códon prematuro de terminação da tradução.

5.5 Avaliação da similaridade genética

A avaliação da similaridade genética foi realizada para as seis amostras de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência às cefalosporinas pela técnica de ribotipagem automatizada. Foi identificada a presença de um mesmo ribogrupo (222-300-S-1) em três das seis amostras avaliadas (A34.057, A34.248 e A34.297). Os demais isolados foram classificados em diferentes ribogrupos, não provenientes de uma linhagem comum.

5.6 Tipagem plasmidial

Foi realizada a detecção de 19 grupos de incompatibilidade plasmidiais pela técnica descrita por Caratolli e colaboradores (2005) e Götz e colaboradores (1996). A tipagem plasmidial foi realizada para 46 amostras sensíveis aos carbapenens escolhidas de forma aleatória. Também foi realizada a tipagem dos plasmídeos das sete amostras que apresentaram sensibilidade reduzida aos carbapenens ou resistência às cefalosporinas pela ágar diluição.

A Tabela 5.8 contém os resultados obtidos para as amostras testadas. A tipagem dos grupos de incompatibilidade detectou a presença dos replicons I1, FIA, FIB, FIC, FrepB, FIIs, P, K/B, N, L/M, A/C e Q em 22 (41,5%) amostras. As demais amostras (n=31) apresentaram PCR negativo para todos os replicons testados, entre elas, todas as amostras de *Enterobacter* spp., *K. oxytoca*, *M. morgani* e *Providencia* spp.

O replicon mais freqüente foi o FrepB, sendo encontrado em 54,5% das amostras positivas, seguido pelo FIB (36,4%), I1 e FIA (22,7%), P e FIIs (13,6%), FIC, L/M e A/C (9,1%) e N, Q e K/B (4,5%). Somente sete amostras apresentaram um único replicon, enquanto as demais apresentaram associações de dois a quatro replicons. A associação mais comumente encontrada foi entre os replicons FIB e FrepB. Ambos estavam presentes em 36,4% das amostras tipadas (Tabela 5.8).

Quando as amostras controles, produtoras de MBL (n=7, *E. cloacae* 75-10433A produtora de VIM-1 e *K. pneumoniae* A13309, *S. marcescens* 185, *E. cloacae* 199, *A. baumannii* 48-5227, *P. aeruginosa* P6318 e *P. aeruginosa* P9043 produtoras de IMP-1) foram avaliadas, somente o

conteúdo plasmidial de duas delas, *S. marcescens* 185 e *E. cloacae* 199, puderam ser tipadas pela técnica utilizada. Estas amostras apresentaram o replicon Q. O replicon A/C também pode ser observado para a amostra de *E. cloacae* 199. Estes resultados indicam que possivelmente o gene codificador da enzima IMP-1 seja carregado pelo plasmídeo pertencente ao grupo de incompatibilidade Q.

Tabela 5.8. Grupos de incompatibilidade plasmidial presente nas amostras testadas.

Perfil de Sensibilidade aos Carbapenems	Banco	Espécie	Inc/rep
Sensíveis	A33.943	<i>Citrobacter</i> spp.	I1, FIA, FrepB
	A33.734	<i>E. coli</i>	FIA, FIB, FrepB
	A33.737	<i>E. coli</i>	FrepB
	A33.799	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB
	A33.873	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB, P, K/B
	A33.897	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB, P
	A34.024	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB
	A34.067	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB
	A34.311	<i>E. coli</i>	FIB, FrepB
	A34.416	<i>E. coli</i>	I1
	A34.434	<i>E. coli</i>	FIA, FrepB
	A34.725	<i>E. coli</i>	I1, FrepB
	A34.012	<i>K. pneumoniae</i>	I1, FIA, FIBs
	A34.086	<i>K. pneumoniae</i>	P
	A34.249	<i>K. pneumoniae</i>	I1, FIA, FIBs, N
	A34.672	<i>K. pneumoniae</i>	L/M
	A34.178	<i>P. mirabilis</i>	A/C
	A34.430	<i>P. mirabilis</i>	FIC
	A34.582	<i>P. mirabilis</i>	FIC
	A33.970	<i>S. sonnei</i>	A/C, Q
	A34.006	<i>S. marcescens</i>	FIB, FrepB
Sensibilidade Reduzida	A34.089	<i>K. pneumoniae</i>	L/M, FIBs
Cepas controles	199	<i>E. cloacae</i>	Q, A/C
produtoras de MBL	185	<i>S. marcescens</i>	Q

6. DISCUSSÃO

O aumento no nível de resistência aos antimicrobianos rotineiramente usados contra bactérias responsáveis por infecções relacionadas à assistência à saúde tem sido um grave e crescente problema global. A pressão seletiva causada pelo uso de antimicrobianos, bem como falhas no controle da disseminação de patógenos resistentes no meio ambiente hospitalar, têm sido responsabilizados pelo surgimento global da resistência bacteriana aos antimicrobianos (Masterton, 2009).

A emergência e a disseminação de ESBLs têm comprometido o uso das cefalosporinas de espectro ampliado para o tratamento empírico de infecções em pacientes hospitalizados causadas por vários gêneros de enterobactérias. Como conseqüência, o uso terapêutico dos carbapenens aumentou significativamente, e em alguns hospitais, bacilos Gram negativos resistentes aos carbapenens começaram a surgir (Castanheira *et al.*, 2008). Os carbapenens são antimicrobianos β -lactâmicos com forte atividade frente a diversas bactérias Gram positivas, Gram negativas e anaeróbicas e, frequentemente, são utilizados como último recurso para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram negativos multirresistentes. O surgimento e a disseminação da resistência adquirida aos carbapenens representam um grande problema para a terapia e controle de infecções. Portanto, investigações dos mecanismos moleculares responsáveis por tal resistência são extremamente importantes porque podem delinear estratégias de controle que evitem a disseminação de tais mecanismos e também podem ajudar no

desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas que possuam diferentes alvos de ação.

Apesar dos crescentes relatos de enterobactérias produtoras de carbapenemases, a resistência global aos carbapenens ainda é baixa. O programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) que analisou cepas isoladas de 15 centros médicos localizados nos Estados Unidos durante os anos de 1999 a 2008, constatou que 97,3% das enterobactérias eram sensíveis ao meropenem, e que as taxas de resistência foram constantemente baixas durante os 10 anos do estudo (Rhomberg; Jones, 2009). Dados europeus de 2007 mostraram que 99,4% e 98,3% das enterobactérias apresentaram sensibilidade ao meropenem e imipenem, respectivamente (Turner, 2009), confirmando que a resistência aos carbapenens ainda não é freqüente entre as enterobactérias.

Segundo Andrade e colaboradores (2008), entre as três enterobactérias mais frequentemente isoladas entre 2003 a 2008 no Brasil, *E. coli* foi a única que apresentou 100% de sensibilidade aos carbapenens. Este resultado também foi encontrado neste estudo. Ainda segundo Andrade, para os outros dois gêneros com maior prevalência, *Enterobacter* spp. somente apresentou diminuição da sensibilidade para o ertapenem (92,6%), enquanto que, entre as amostras de *Klebsiella* spp., a porcentagem de sensibilidade ao ertapenem, meropenem e imipenem foi de 96%, 98,5% e 99,6%, respectivamente. Dados encontrados neste estudo mostram que o ertapenem foi o carbapenem que apresentou menor sensibilidade (98%) entre as enterobactérias avaliadas, sendo que a menor taxa de sensibilidade ao ertapenem foi encontrado para *Klebsiella* spp. (94,7%) e *Enterobacter* spp.

(97,8%). A única espécie que apresentou diminuição da sensibilidade ao meropenem foi *Klebsiella* spp. (99%).

O CLSI preconiza o uso do ertapenem e do meropenem no teste de triagem para a detecção de carbapenemases em enterobactérias. O imipenem não deve ser utilizado, pois algumas espécies bacterianas, como *Proteus* spp., *Morganella* spp. e *Providencia* spp., possuem naturalmente CIMs mais altas aos carbapenens e podem ser falsamente classificadas como produtoras de carbapenemases. Este fato pode ser observado neste trabalho, onde, apesar de apresentarem 98,4% de sensibilidade ao imipenem, 9,1% dos isolados foram classificadas como amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens quando este agente foi utilizado no teste de triagem, enquanto que o meropenem e ertapenem classificaram somente 1,6% e 2,4% das amostras.

Mesmo com o aumento da descrição de enterobactérias produtoras de carbapenemases mundialmente, não houve uma grande variação no perfil de sensibilidade aos carbapenens nos últimos anos, principalmente porque estes determinantes de resistência, na maioria das vezes, causam somente uma pequena elevação nas CIMs dos carbapenens. Em um estudo realizado somente com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas nos Estados Unidos, aproximadamente dois-terços das amostras apresentavam sensibilidade ao imipenem e meropenem (Endimiani *et al.*, 2009), resultado muito semelhante com dados encontrados no Brasil, onde 61,5% e 38,5% das *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases mantinham sensibilidade ao imipenem e meropenem, respectivamente (Nicoletti *et al.*, 2009).

Entretanto, em um estudo do programa de vigilância SENTRY, realizado com amostras isoladas da América do Sul, América do Norte e da Europa, foi constatado que a sensibilidade aos carbapenens, imipenem, meropenem e ertapenem, entre as amostras de enterobactérias produtoras de carbapenemases eram bem mais baixas: 37,5%, 32,7% e 7,7%, respectivamente (Castanheira *et al.*, 2008). Contudo, este estudo não realizou experimentos para verificar se alterações na permeabilidade da membrana externa destas bactérias poderiam contribuir para as altas CIMs obtidos nestas amostras.

Os dados apresentados acima foram obtidos tanto pela metodologia de microdiluição em caldo como pela ágar diluição, técnicas que são pouco empregadas em laboratórios de microbiologia clínica. A grande maioria dos laboratórios brasileiros utiliza a técnica de disco difusão, onde a pequena elevação da CIM nas amostras produtoras de carbapenemases geralmente não pode ser observada. Nestes casos, a produção de carbapenemases geralmente só é detectada se houver a associação de mecanismos que alterem a permeabilidade da membrana externa da bactéria, e assim levem a uma resistência completa.

Devido à possibilidade de haver a produção de carbapenemases sem que as CIMs dos carbapenens estivessem dentro dos critérios de resistência estabelecidos pelo CLSI, a partir do ano de 2009, este documento passou a recomendar a detecção da produção de carbapenemases, pelo teste de Hodge modificado, em enterobactérias, quando estas apresentassem halos de inibição para ertapenem e meropenem entre 19-21 mm e 16-21 mm, respectivamente, ou CIM para estes antimicrobianos igual ou superior a 2

$\mu\text{g/mL}$. Neste trabalho, o teste de Hodge modificado foi utilizado para detectar se a sensibilidade reduzida aos carbapenens, detectada pelo teste de triagem, era causada pela produção de carbapenemases. O teste apresentou boa acurácia, pois não detectou a produção de carbapenemases em nenhuma das amostras. De fato, foi observado que a redução da sensibilidade aos carbapenens estava somente relacionada à produção de ESBL associada à alteração das proteínas de membrana externa. Além disso, tem sido observado que o percentual de falsa positividade do teste de Hodge modificado aumenta quando são testadas amostras produtoras de ESBL do tipo CTX-M (Galani *et al.*, 2008; Carvalhaes *et al.*, 2010). Já neste estudo, o teste de Hodge não apresentou tais resultados falso-positivos quando amostras produtoras de CTX-M foram testadas.

Devido ao fato de que a produção de carbapenemases muitas vezes não eleva a CIMs dos carbapenens, a detecção de amostras produtoras de carbapenemases do tipo KPC e MBL foi realizada para todas as amostras incluídas no estudo. O gene codificador destas enzimas não foi identificado em nenhuma das amostras estudadas.

As enzimas do tipo KPC cada vez mais têm sido reportadas entre enterobactérias e, atualmente, correspondem ao principal determinante de resistência aos carbapenens nesta família (Queenan; Bush, 2007). Esta enzima, originalmente descrita nos Estados Unidos, encontrava-se inicialmente restrita a este país, porém já existem vários relatos da produção de KPC em diversas localidades, com situações endêmicas descritas nos Estados Unidos, Israel, Grécia e na província de Zhejiang, na China (Nordmann *et al.*, 2009).

Nos Estados Unidos, a enzima KPC encontra-se amplamente disseminada, sendo endêmica principalmente na costa leste. Um estudo realizado com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas de dez hospitais da área de Nova Iorque, revelou que das 95 amostras avaliadas, 78 pertenciam ao mesmo ribogruppo, evidenciando uma disseminação clonal destas amostras (Bratu *et al.*, 2005). Fato que pode ser comprovado quando uma amostra, isolada em Tel Aviv, Israel, apresentou o mesmo perfil genotípico de cepas americanas, sugerindo que estas cepas foram disseminadas por meio de pacientes e/ou viajantes entre Israel e Estados Unidos (Navon-Venezia *et al.*, 2006; Navon-Venezia *et al.*, 2009).

Estudos realizados com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 comprovaram que este gene já estava circulante no Brasil desde o ano de 2005, tendo sido encontrados em cepas isoladas nos estados de São Paulo e de Santa Catarina (Pavez *et al.*, 2009; Zavascki *et al.*, 2009b). Posteriormente, amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foram relatadas em dois hospitais do Rio de Janeiro e em Recife, e estavam relacionadas à pequenos surtos ocorridos no ambiente hospitalar. Em ambos os trabalhos, foram encontrados dois perfis de PFGE indicando que houve tanto uma disseminação inter-pacientes do mesmo isolado, como transferência horizontal deste determinante de resistência (Monteiro *et al.*, 2009; Peirano *et al.*, 2009). Em 2009, um estudo que analisou 32 amostras de *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenens constatou que 34,4% destas amostras eram produtoras de KPC-2. As *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 foram isoladas de quatro hospitais localizados em dois estados brasileiros, sendo três hospitais de São Paulo e 1 de Porto Alegre (Nicoletti *et al.*, 2009).

Também em Porto Alegre ocorreu a primeira descrição no Brasil da produção de KPC-2 em isolados não pertencentes ao gênero *Klebsiella*. Duas amostras de *E. cloacae* produtores de KPC-2, pertencentes ao mesmo clone, foram descritas em duas cidades do Rio Grande do Sul distantes cerca de 110 km (Zavascki *et al.*, 2009a).

O gene *bla*_{KPC} tem sido geralmente identificado em plasmídeos que variam em tamanho e estrutura, entretanto sua localização cromossomal já foi descrita em algumas amostras (Nordmann *et al.*, 2009). *Bla*_{KPC} não está associado a integrons, mas está inserido em transposons do tipo 3 (Tn3-like), como o Tn4401. Apesar de *bla*_{KPC} não ser encontrado em integrons, os plasmídeos contendo este gene geralmente carregam determinantes de resistência aos aminoglicosídeos além de outros genes codificadores de β -lactamases (Naas *et al.*, 2008; Nordmann *et al.*, 2009).

Estes relatos são motivos de grande preocupação, pois mostram uma crescente disseminação do gene *bla*_{KPC-2} em amostras isoladas de cidades brasileiras com localização geográfica distintas e distantes entre si, um evento que pode se tornar endêmico no Brasil como ocorre com isolados de *P. aeruginosa* produtoras de SPM-1. Apesar deste trabalho não ter encontrado enterobactérias produtoras de KPC no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP nas amostras isoladas em 2008, a partir do ano de 2009, este gene começou a ser detectado em amostras de *K. pneumoniae* provenientes do Hospital São Paulo e do Hospital do Rim e Hipertensão, distantes por apenas duas quadras. Estudos de relação genética entre estes isolados ainda não foram realizados, entretanto o fato destes dois hospitais compartilharem, muitas vezes, do mesmo quadro funcional e da assistência aos mesmos pacientes, e estarem

localizados muito próximos aumenta a chances de acontecer uma disseminação clonal.

Outro país onde a produção da enzima KPC por enterobactérias constitui uma situação endêmica é a Grécia. Um estudo nacional que avaliou a produção de KPC por amostras de *K. pneumoniae* provenientes de 40 hospitais representativos de todo o país, mostrou que 77% das amostras triadas como possíveis produtoras de carbapenemases possuíam o gene *bla*_{KPC-2}, sendo que destas amostras, aproximadamente 96% eram geneticamente relacionadas (Giakoupi *et al.*, 2009). Outros estudos reportaram o aparecimento da enzima KPC-2 em outros países da Europa, como França e Noruega, os quais possuíam relação epidemiológica aos isolados da Grécia (Samuelsen *et al.*, 2009; Barbier *et al.*, 2010).

Outra grande preocupação que acomete a Grécia é a endemicidade também de bacilos Gram negativos produtores de MBL. Em enterobactérias, as MBLs, principalmente as do tipo VIM-1, foram descritas em várias espécies, como *K. pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *M. morgannii*, *P. mirabilis* e *E. coli* (Galani *et al.*, 2007; Vatopoulos, 2008). Psychogiou e colaboradores (2008) avaliaram a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de MBL em três hospitais de Atenas. Neste estudo, 178 *K. pneumoniae* isoladas de corrente sanguínea, independente do perfil de sensibilidade, foram testadas e 37,6% carregavam o gene *bla*_{VIM-1}. Outros genes codificadores de MBL não foram detectados. A análise do perfil genético destas amostras revelou que vários clones distintos eram responsáveis pela disseminação inter e intra-hospitalar, em contraste com os resultados obtidos por Ikonomidis e colaboradores (2005), que revelou que os 27 isolados de *K. pneumoniae*

produtoras de VIM-1 isoladas de dois dos maiores hospitais gregos pertenciam ao mesmo clone.

Segundo Tsakris e colaboradores (2007), a transmissão dos genes codificadores de MBL também pode ser observada em amostras provenientes de infecções comunitárias. Entretanto, apesar das amostras deste estudo (*P. mirabilis* produtores de VIM-1) terem sido isoladas de pacientes com infecção do trato urinário diagnosticadas fora do ambiente hospitalar, todos os pacientes (n=12) haviam sido previamente internados para tratamento de patologias das vias urinárias, sendo que o tempo médio da alta hospitalar antes da apresentação no ambulatório com ITU foi de 43,7 dias, indicando que, na verdade, a aquisição destas cepas possivelmente ocorreu no ambiente hospitalar, não caracterizando assim a aquisição comunitária destas amostras.

Poucos relatos de enterobactérias produtoras de MBL foram descritos no Brasil. Somente a enzima do tipo IMP-1 foi encontrada em várias amostras de *K. pneumoniae*, e em isolados únicos de *P. rettgeri*, *S. marcescens* e *E. cloacae* (Castanheira *et al.*, 2006; Lincopan *et al.*, 2006; Picão *et al.*, 2008). Com exceção do *E. cloacae*, que foi isolado em Santos, e da *S. marcescens*, isolada em Marília, as demais amostras foram recuperadas de hospitais da cidade São Paulo. A grande preocupação deste trabalho foi avaliar se as amostras de enterobactérias do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP também carregavam este determinante de resistência, uma vez que a produção de MBL em bacilos Gram negativos não fermentadores da glicose no Hospital São Paulo é alta, e os métodos fenotípicos para a detecção de MBL em enterobactérias não possuem boa acurácia, já que as amostras com este determinante de resistência parecem ser sensíveis aos carbapenems.

Um estudo realizado com amostras de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem isoladas entre 1997 e 2006 verificou um aumento gradativo no aparecimento de MBL no decorrer dos anos. Do total de amostras estudadas, 32% eram produtoras de MBL, sendo a *bla*_{SPM-1} o gene mais prevalente (86,5%), enquanto que a *bla*_{IMP-1} somente surgiu a partir do ano de 2004 (Nicoletti, 2007). Outro estudo também realizado com amostras de *P. aeruginosa* provenientes de infecções de corrente sanguínea isoladas no Hospital São Paulo em 2005, revelou que 25% delas eram produtoras de MBL, sendo que a enzima IMP-1 estava presente em somente um isolado (Xavier, 2008).

Outro fator que nos levou a pesquisar a presença de MBL em enterobactérias provenientes do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP foi a detecção de *K. pneumoniae* produtoras de IMP-1 no Hospital do Servidor Público Estadual, distante cerca de seis quadras do Hospital São Paulo (Penteado *et al.*, 2009). Nestas amostras, o gene *bla*_{IMP-1} era carregado no integron In86, mesmo integron encontrado em *Acinetobacter* spp. produtores de IMP-1 isolados no Hospital São Paulo (Mendes *et al.*, 2007b). Entretanto, nenhuma amostra de enterobactéria proveniente do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP apresentou produto de amplificação para os genes codificadores de MBL pesquisados.

Uma das possibilidades para a não disseminação do gene *bla*_{IMP-1} entre as amostras de enterobactérias do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP seria a de que este gene estaria inserido em um plasmídeo incompatível com aqueles já presentes nestas amostras. A incompatibilidade plasmidial é definida como a incapacidade de dois plasmídeos co-residentes habitarem a mesma célula bacteriana, ou seja, se a introdução de um segundo

plasmídeo desestabilizar a manutenção do primeiro eles são classificados como incompatíveis (Novick, 1987). A incompatibilidade ocorre devido ao compartilhamento de um ou mais elementos da replicação plasmidial ou dos sistemas de divisão, e a perda de um plasmídeo devido à incompatibilidade é frequentemente consequência da interferência na habilidade do plasmídeo em corrigir as prováveis flutuações no seu número de cópias. Atualmente, cerca de 30 grupos de incompatibilidade plasmidiais já foram reconhecidos em enterobactérias (Novick, 1987; Carattoli, 2009).

Somente 10% dos isolados de cada espécie foram selecionados para a análise do grupo de incompatibilidade plasmidial. Os grupos de incompatibilidade plasmidial de amostras produtoras de MBL de várias espécies também foram tipados para posterior comparação. A caracterização dos grupos de incompatibilidade plasmidial só pode ser determinada para 41,5% das amostras selecionadas e para somente duas das sete amostras sabidamente produtoras de MBL. Uma crítica atribuída à metodologia empregada neste trabalho é que existem diversos grupos de incompatibilidade plasmidiais e somente os 19 principais tipos foram testados. A melhor metodologia para determinar se um dado plasmídeo é incompatível com outro seria a realização de experimentos de conjugação ou transformação. Nestes procedimentos, o plasmídeo contendo o gene da MBL seria transferido para uma bactéria não produtora de MBL, e se o plasmídeo contendo o gene da MBL permanecesse na bactéria receptora, este plasmídeo seria compatível com os demais presentes na amostra (Taylor *et al.*, 2004).

Somente em duas amostras produtoras de MBL foi possível realizar a tipagem plasmidial, *S. marcescens* 185 e *E. cloacae* 199, ambas

produtoras de IMP-1. Estas amostras apresentaram um plasmídeo pertencente ao grupo de incompatibilidade Q (IncQ), além da presença de um plasmídeo do grupo IncA/C na amostra de *E. cloacae*. Estes resultados sugerem que, provavelmente, este plasmídeo do grupo IncQ seja o responsável pela mobilização do gene *bla*_{IMP-1}. Contudo, experimentos de hibridização são necessários para a confirmação desta hipótese, uma vez que genes codificadores de MBL até o momento não foram descritos neste grupo de incompatibilidade.

Miró e colaboradores (2010) realizaram um estudo onde avaliaram o grupo de incompatibilidade presente em 12 amostras de enterobactérias produtoras de VIM-1 isoladas na Espanha. Somente para uma amostra de *E. cloacae* o grupo de incompatibilidade IncHI2 pode ser determinado. Em outro estudo, também realizado com 25 amostras de enterobactérias isoladas entre 2005 e 2006 na Espanha, o grupo de incompatibilidade plasmidial foi determinado para 14 amostras de *K. pneumoniae* e uma *E. coli* (IncI1) e para 3 dos 7 *E. cloacae* (IncHI2) (Tato *et al.*, 2007). Estes estudos indicam que a disseminação da *bla*_{VIM-1} na Espanha esta associada à diferentes grupos de incompatibilidade e que podem ser transferíveis para diversas espécies de enterobactérias.

Em contraste com os resultados descritos na Espanha, a análise dos plasmídeos codificadores de *bla*_{VIM-1} isolados de enterobactérias provenientes da Grécia revelaram uma grande variedade de perfis de restrição entre plasmídeos isolados da mesma espécie, e também perfis de restrição similares em plasmídeos isolados de diferentes espécies. Em pelo menos um trabalho, a análise do grupo de incompatibilidade revelou que plasmídeos

carreadores do gene *bla*_{VIM-1} pertenciam ao grupo IncN (Psichogiou *et al.*, 2008).

A análise do grupo de incompatibilidade plasmidial para amostras produtoras de carbapenemases já foi realizada por diversos autores, sendo que os grupos de incompatibilidade L/M, A/C, HI2, P, N, I1 e W foram os associados aos genes codificadores de MBL (Carattoli, 2009). Entretanto, como observado neste estudo, alguns trabalhos não conseguiram determinar o grupo de incompatibilidade presente em amostras produtoras de MBL.

Existem poucos trabalhos que realizaram a tipagem plasmidial em amostras produtoras de KPC. Cai e colaboradores (2008) tiparam os plasmídeos de 32 isolados clínicos de enterobactérias (21 *S. marcescens*, 10 *K. pneumoniae* e uma *E. coli*) produtores de KPC-2. Eles observaram que o plasmídeo carreador da *bla*_{KPC-2} era o mesmo em todos os isolados, entretanto o grupo de incompatibilidade não pode ser determinado. A primeira descrição do grupo de incompatibilidade de um plasmídeo carreador do gene *bla*_{KPC-2} foi em um estudo em que o plasmídeo isolado de uma *K. pneumoniae*, que continha duas cópias do gene *bla*_{KPC-2}, foi totalmente seqüenciado, e constatou-se que o mesmo pertencia ao grupo IncN. O único trabalho que conseguiu tipar plasmídeos de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas da Grécia, Estados Unidos, Israel, Colômbia e Brasil ainda não foi publicado (Cuzon *et al.*, 2010). Neste trabalho, os plasmídeos provenientes das amostras da Grécia e Estados Unidos pertenciam ao grupo IncFII, os plasmídeos provenientes das amostras do Brasil e da Colômbia pertenciam ao grupo IncL/M, e o plasmídeo proveniente de uma amostra da Colômbia e das amostras de Israel pertenciam ao grupo IncN. Apesar de Cuzon e

colaboradores conseguirem tipar algumas amostras brasileiras, a amostra coletada no Hospital São Paulo também não foi tipável pela metodologia utilizada.

Entre os plasmídeos tipados no presente estudo o grupo de incompatibilidade F foi o mais freqüente. Plasmídeos pertencentes ao grupo IncF são plasmídeos de baixo número de cópias e que frequentemente possuem mais de um replicon. Nestes casos, um dos replicons é altamente conservado, enquanto o outro pode sofrer mutações (Caratolli, 2009). Estudos demonstraram que mutações nos genes regulatórios do gene da replicase do grupo IncF pode mudar a compatibilidade deste replicon. Assim, muitas vezes, vários subtipos do grupo IncF podem estar associados, como ocorre em 85,7% das amostras estudadas que possuem plasmídeos deste grupo. Além disso, os grupos de incompatibilidade F são amplamente distribuídos em *E. coli* e parecem estar bem adaptados a esta espécie (Marcadé *et al.*, 2009).

Para melhor compreender a correlação do grupo de incompatibilidade presente nestas amostras, seria necessária a realização de experimentos para a detecção de ESBL, uma vez que os grupos de incompatibilidade encontrados nas amostras deste estudo geralmente estão associados à plasmídeos carreadores de ESBL, principalmente às do tipo CTX-M e TEM. Em dois estudos realizados com amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* foram encontradas diversas associações entre grupos de incompatibilidade plasmidial e a produção de determinado tipo de β -lactamase, sendo que os plasmídeos dos grupos de incompatibilidade A/C foram mais frequentemente associados com a produção das enzimas do tipo TEM e IncF às enzimas do tipo CTX-M. O grupo de incompatibilidade da maioria dos

plasmídeos codificadores do gene *bla_{SHV}* pertenceu à um grupo de incompatibilidade desconhecido, entretanto, nos plasmídeos tipados, este gene estava mais frequentemente associado aos grupos IncF e Inc11 (Diestra *et al.*, 2009; Marcadé *et al.*, 2009).

Do total de amostras incluídas neste estudo, apenas 2,9% (n=13) apresentaram sensibilidade reduzida aos carbapenens. A confirmação da sensibilidade reduzida aos carbapenens e o perfil de sensibilidade aos demais antimicrobianos β -lactâmicos foi realizada para 11 amostras, pois a amostra *K. oxytoca* A34.833 e *Enterobacter* spp. A35.060 não puderam ser recuperadas do Banco de Microrganismos. Das 11 amostras, somente 5 confirmaram redução da sensibilidade ao ertapenem, entretanto permaneceram sensíveis ao imipenem e meropenem.

A sensibilidade reduzida ao ertapenem nas cinco amostras de *K. pneumoniae* não envolveu a produção de outros tipos de carbapenemases, como por exemplo, a produção das enzimas do tipo GES ou OXA, que são raramente encontradas. No Brasil, a enzima GES-5 somente foi relatada em amostras de *P. aeruginosa* isoladas em São Luís e em São Paulo, e, recentemente, a primeira descrição de uma *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* produtora de tal enzima foi relatada em São Paulo. Esta amostra apresentava resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos testados, inclusive aos carbapenens, à ciprofloxacina e à amicacina. A produção da enzima GES-5 nesta amostra estava associada com alteração em ambas proteínas de membrana externa, OmpK35 e OmpK36. (Fonseca *et al.*, 2007; Picão *et al.*, 2009; Picão *et al.*, 2010)

A não produção de enzimas do tipo carbapenemase nas amostras deste estudo pode ser confirmada através do teste de hidrólise. Nenhuma das cinco amostras apresentou atividade hidrolítica frente ao ertapenem, entretanto, quando cefepima foi utilizada como substrato, três amostras apresentaram resultado positivo, indicando uma provável produção de ESBL. Observando o perfil de sensibilidade destas amostras pudemos constatar a redução de duas diluições na CIM de piperacilina/tazobactam em relação às outras cefalosporinas testadas, com exceção da cefoxitina, que não é um substrato das ESBL. A realização da PCR para a amplificação dos genes codificadores de β -lactamases e proteínas de membrana externa revelou que as três amostras possuíam genes codificadores das enzimas CTX-M e SHV, e todas apresentavam alteração no tamanho esperado do amplicon para a detecção do gene da porina OmpK35 por PCR. Resultados parciais obtidos do seqüenciamento destes produtos de PCR, indicam a presença de uma sequência de inserção no gene codificador desta porina (IS1), enquanto resultados preliminares do seqüenciamento do gene *ompK36* foram inconclusivos quanto à presença de um códon prematuro de terminação da tradução. Estas três amostras foram classificadas sob um mesmo ribogrupo.

A amostra de *K. pneumoniae* A33.735, que foi classificada em um ribogrupo diferente das amostras acima, também possui sensibilidade aos carbapenens devido à produção de uma ESBL (*bla*_{SHV}-like) associada à perda tanto da OmpK35 quanto da OmpK36. Interessantemente, esta amostra não apresentou hidrólise à cefepima, resultado concordante com a CIM desta droga, que se encontra dentro do limite de sensibilidade. Entretanto, o teste fenotípico para a detecção de ESBL foi positivo para esta amostra, indicando

que a SHV produzida por ela é uma ESBL que não hidrolisa cefepima, ou esta amostra produz alguma outra ESBL não pesquisada neste trabalho.

Atualmente na literatura existem vários relatos de resistência aos carbapenems devido à produção de ESBL ou β -lactamases do tipo AmpC plasmidial associadas a alteração da permeabilidade da membrana externa. Leavitt e colaboradores (2009) analisaram uma grande coleção de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas em seis hospitais israelenses. A resistência ao ertapenem nestes isolados foi de 3,7% e ocorria devido a produção de múltiplas β -lactamases associadas à ausência da expressão da OmpK36. A resistência ao ertapenem devido à associação da produção de β -lactamases com alteração na permeabilidade da membrana externa também foi observada por Doumith e colaboradores (2009b) onde amostras de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. isoladas de 21 laboratórios de microbiologia do Reino Unido foram estudadas.

A perda das proteínas de membrana externa pode ocorrer devido a diversos fatores, como: (i) mutações pontuais ou, mais frequentemente, interrupções devido à inserção de sequências de DNA nos genes que as codificam, e que levam a uma terminação prematura da tradução da proteína; (ii) mutações pontuais na região promotora, possivelmente afetando o processo de transcrição; e (iii) mecanismos ainda não identificados que atuam na tradução protéica ou que previnem a inserção da porina na membrana externa bacteriana. Segundo Doumith e colaboradores (2009b) qualquer um destes processos pode ocorrer em amostras de enterobactérias que apresentam resistência aos carbapenems devido à produção concomitante de ESBL. No estudo de Doumith e colaboradores (2009b), a inserção dos genes

codificadores das porinas nas amostras em que as mesmas encontravam-se inativas reverteu a resistência aos carbapenems, onde CIMs para ertapenem inicialmente > 32 µg/mL caíram para 0,25 µg/mL, evidenciando a grande contribuição das proteínas de membrana externa nesta resistência.

A amostra de *K. pneumoniae* A34.455 foi a única amostra com sensibilidade reduzida ao ertapenem em que não foram detectados genes codificadores de ESBL, assim como ausência de hidrólise à cefepima. O perfil de sensibilidade desta amostra difere das outras três *K. pneumoniae* com sensibilidade reduzida ao ertapenem por apresentar diminuição da sensibilidade somente à cefepima e aztreonam. Nesta amostra, ambas as porinas (OmpK35 e OmpK36) não foram amplificadas pela técnica de PCR, e talvez esta seja a razão do perfil de sensibilidade apresentado por esta amostra.

Outras duas amostras inicialmente triadas como isolados com sensibilidade reduzida aos carbapenems, porém que não foram confirmadas pela ágar diluição, apresentaram resistência às cefalosporinas. Entre estas amostras, o isolado de *K. pneumoniae* A34.089 apresentava hidrólise positiva para cefepima e codificava uma ESBL do tipo TEM. A resistência às cefalosporinas na amostra de *Enterobacter* spp. A35.002 ocorre devido à produção da β-lactamases do tipo AmpC, como evidenciado pelo teste tridimensional. A detecção da cefalosporinase ACT nesta amostra não caracteriza a produção de uma enzima do tipo AmpC plasmidial pois as enzimas do tipo ACT, frequentemente descritas em *K. pneumoniae*, possuem 98% de similaridade com os genes *ampC* presentes do cromossomo de espécies de *Enterobacter* (Bradford *et al.*, 1997; Rottman *et al.*, 2002).

O design dos antimicrobianos carbapenêmicos foi inspirado no produto natural tienamicina, produzido pelo *Streptomyces cattleya*, microrganismo habitante do solo. Devido à prevalência dessas amostras no solo é lógico esperar que enzimas capazes de degradar estas β -lactamases iriam ser produzidas por microrganismos ambientais tais como *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*, bactérias com MBL bem caracterizadas, o que daria uma vantagem seletiva para o crescimento destas espécies ambientais. (Queenan; Bush, 2007). A transferência destes mecanismos para bactérias causadoras de importantes infecções hospitalares é causa de grande preocupação na comunidade científica.

A produção de determinada carbapenemase pode conferir um particular fenótipo de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos dependendo da espécie bacteriana, do nível de expressão, do tipo e variante da enzima, e da presença ou ausência de mecanismos associados, como por exemplo, alterações na permeabilidade da membrana externa e a co-produção de outra β -lactamase (Miriagou *et al.*, 2010). Portanto é de extrema importância que os laboratórios de microbiologia clínica conheçam os mecanismos de resistência mais prevalentes em sua região e implementem testes para a detecção de tais mecanismos, com o objetivo de ajudar principalmente os serviços de controle de infecções hospitalares a evitar a disseminação de bactérias que possuam estes mecanismos de resistência.

7. CONCLUSÃO

1. Não foram encontrados isolados de enterobactérias produtores de carbapenemases no complexo Hospital São Paulo/UNIFESP durante os meses de junho e julho de 2008.
 2. Pelo teste de triagem aos carbapenens, 98%, 98,4% e 99,3% das enterobactérias foram sensíveis ao ertapenem, imipenem e meropenem, respectivamente. Entretanto, utilizando os critérios estabelecidos pelo CLSI, 2,9% das amostras apresentaram sensibilidade reduzida aos carbapenens.
 3. A sensibilidade reduzida aos carbapenens foi confirmada em somente cinco amostras de *K. pneumoniae*. Entre elas foram detectados dois mecanismos distintos de resistência aos carbapenens: (i) associação da produção de ESBL do tipo CTX-M e SHV com alteração da permeabilidade da membrana externa; e (ii) somente alteração na permeabilidade da membrana externa, com a perda das porinas OmpK35 e OmpK36.
 4. A Ribotipagem automatizada evidenciou a predominância de uma linhagem comum entre as amostras com sensibilidade reduzida aos carbapenens.
-

5. A hipótese da não transferência dos genes codificadores de MBL devido à incompatibilidade dos plasmídeos carreadores de tais genes e os plasmídeos naturalmente presentes nas enterobactérias isoladas do complexo Hospital São Paulo/UNIFESP não pode ser confirmada porque os isolados clínicos e as amostras controles produtoras de MBL possuíam plasmídeos não tipáveis pelas técnicas utilizadas (Caratolli *et al.*, 2005 e Götz *et al.*, 1996).
-

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1980; 289(1036):321-331.

Andrade SS, Sader HS, Barth AL, Ribeiro J, Zoccoli C, Pignatari ACC, Gales AC. Antimicrobial susceptibility of Gram negative bacilli isolate in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008). *Braz J Infect Dis* 2008; 12(Suppl 2):S3-9.

Bahar G, Mazzariol A, Koncan R, Mert A, Fontana R, Rossolini GM, Cornaglia G. Detection of VIM-5 metallo- β -lactamase in a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Turkey. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54(1): 282-283.

Barbier F, Ruppé E, Giakkoupi P, Wildenberg L, Lucet J, Vatopoulos A, Wolff M, Andremont A. Genesis of a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after in vivo transfer from an imported Greek strain. *Euro Surveill* 2010; 15(1): 19457.

Bebrone C. Metallo- β -lactamases (classification, activity, genetic organization, structure, zinc coordination) and their superfamily. *Biochem Pharmacol* 2007; 74(12): 1686-1701.

Bradford PA, Urban C, Mariano N, Projan SJ, Rahal JJ, Bush K. Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC β -lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41(3): 563-569.

Bratu S, Tolaney P, Karumudi U, Quale J, Mooty M, Nichani S, Landman D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(1): 128-132.

Bruce JL. Automated system rapidly identifies and characterizes microorganisms in food. *Food Technology* 1996; 50: 77-81.

Bush K. Excitement in the β -lactamase arena. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24(6):831-836.

Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39(6):1211-1233.

Bush K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin Infect Dis* 2001; 32(7):1085-1089.

Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen GX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(6): 2014-2018.

Campana EH, Picão RC, Nicoletti AG, Girardello R, Andrade SS, Gales AC. Comparison of E-testTM and combined disk for detection of metallo- β -lactamase-producing isolates. Abstracts of the Eighteen European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2008: Barcelona, Espanha. Basel, Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63(3):219-228.

Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6): 2227-2238.

Carrër A, Poirel L, Yilmaz M, Akan AO, Feriha C, Cuzon G, Matar G, Honderlick P, Nordmann P. Spread of OXA-48-encoding plasmid in Turkey and beyond. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1369-1373.

Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(2):249-251.

Castanheira M, Mendes RE, Murphy TA, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Characterization of mobile elements carrying metallo- β -lactamase (M β L) genes, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-16}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM-2} from Latin American medical centers: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 43., 2003, Chicago. **Anais...** Washington: American Society for Microbiology, 2003. p. 153.

Castanheira M, Toleman MA, Schmidt JF, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12): 4654-4661.

Castanheira M, Mendes RE, Picão RC, Pinto FP, Machado A, Walsh TR, Gales AC. Genetic analysis of a multidrug resistant (MDR) *Enterobacter cloacae* producing IMP-1 metallo- β -lactamase (MBL). In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46., 2006, San Francisco. **Anais...** Washington: American Society for Microbiology, 2006.

Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activity of tigecycline and other broad spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(2):570-573.

Castanheira M, Bell JM, Turnidge JD, Mathai D, Jones RN. Carbapenem resistance among *Pseudomonas aeruginosa* strains from India: evidence for nationwide endemicity of multiple metallo-beta-lactamase clones (VIM-2, -5, -6, and -11 and the newly characterized VIM-18). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(3): 1225-1227.

Chu YW, Afzal-Shah M, Houang ET, Palepou MI, Lyon DJ, Woodford N, Livermore DM. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(3): 710-714.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard- Seventh Edition M07-A7. 2006. Wayne.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: Nineteenth informational supplement M100-S19. 2009a. Wayne.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; Approved standard – Tenth edition M02-A10. 2009b. Wayne.

Cornaglia G, Akova M, Amicosante G, Cantón R, Cauda R, Docquier JD, Edelstein M, Frère JM, Fuzi M, Galleni M, Giamarellou H, Gniadkowski M, Koncan R, Libisch B, Luzzaro F, Miriagou V, Navarro F, Nordmann P, Pagani L, Peixe L, Poirel L, Souli M, Tacconelli E, Vatopoulos A, Rossolini GM; ESCMID Study Group for Antimicrobial Resistance Surveillance (ESGARS). Metallo- β -lactamases as emerging resistance determinants in Gram-negative pathogens: open issues. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29(4):380-388.

Coudron PE, Moland ES, Thomson KS. Occurrence and detection of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates at a veterans medical center. *J Clin Microbiol* 2000; 38(5):1791-1796.

Crespo MP, Woodford N, Sinclair A, Kaufmann ME, Turton J, Glover J, Velez JD, Castañeda CR, Recalde M, Livermore DM. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing VIM-8, a novel metallo- β -lactamase, in a tertiary care center in Cali, Colombia. *J Clin Microbiol* 2004; 42(11): 5094-5101.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Navon-Venezia S, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *K. pneumoniae* producing β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. Submetido ao *Emerging Infectious Disease* em 2010.

Da Silva GJ, Correia M, Vital C, Ribeiro G, Sousa JC, Leitão R, Peixe L, Duarte A. Molecular characterization of *bla*_{IMP-5}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 215(1): 33-39.

Diekema DJ, Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Winokur PL, Gales AC, Sader HS, Kugler K, Beach M. Survey of bloodstream infections due to gram-negative bacilli: frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility of isolates collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997. *Clin Infect Dis* 1999; 29(3): 595-607.

Diestra K, Juan C, Curiao T, Moyá B, Miró E, Oteo J, Coque TM, Pérez-Vázquez M, Campos J, Cantón R, Oliver A, Navarro F; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI), Spain. Characterization of plasmids encoding *bla*_{ESBL} and surrounding genes in Spanish clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 60-66.

Docquier JD, Riccio ML, Mugnaioli C, Luzzaro F, Endimiani A, Toniolo A, Amicosante G, Rossolini GM. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(5): 1522-1528.

Doi Y, Potoski BA, Adams-Haduch JM, Sidjabat HE, Pasculle AW, Paterson DL. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type beta-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol* 2008; 46(12): 4083-4086.

Doumith M, Warner M, Weinbren M, Livermore DM, Woodford N. Dissemination of a novel metallo- β -lactamase, NDM-1 (MIM-1) in diverse Enterobacteriaceae in the UK. In: Annual Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49., 2009a, San Francisco. Anais... Washington: American Society for Microbiology, 2009.

Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. Clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2009b; 63(4): 659-667.

Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J, Oethinger M, Paterson DL, Adams MD, Jacobs MR, Diekema DJ, Hall GS, Jenkins SG, Rice LB, Tenover FC, Bonomo RA. Characterization of *bla*_{KPC}-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(3): 427-437.

Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM. *Enterobacteriaceae*: Introduction and Identification. In: Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: ASM Press, 2007. p.649-669.

Fonseca EL, Vieira VV, Cipriano R, Vicente AC. Emergence of *bla*_{GES-5} in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(3): 576-577.

Fritsche TR, Sader HS, Toleman MA, Walsh TR, Jones RN. Emerging metallo- β -lactamase-mediated resistances: a summary report from the worldwide SENTRY antimicrobial surveillance program. *Clin Infect Dis* 2005; 41(Suppl 4): S276-278.

Galani I, Souli M, Koratzanis E, Koratzanis G, Chryssouli Z, Giamarellou H. Emerging bacterial pathogens: *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes* and *Proteus mirabilis* clinical isolates harbouring the same transferable plasmid coding for metallo- β -lactamase VIM-1 in Greece. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59(3): 578-579.

Galani E, Rekatsina PD, Hatzaki D, Plachouras D, Souli M, Giamarellou H. Evaluation of different laboratory tests for the detection of metallo- β -lactamase production in Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(3):548-553.

Gales AC, Tognim MC, Reis AO, Jones RN, Sader HS. Emergence of an IMP-like metallo-enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003a; 45(1): 77-79.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003b; 52(4): 699-702.

Giakoupi P, Maltezou H, Polemis M, Pappa O, Saroglou G, Vatopoulos A, The Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. *Euro Surveill* 2009; 14(21): 1-5.

Gibb AP, Tribuddharat C, Moore RA, Louie TJ, Krulicki W, Livermore DM, Palepou MF, Woodford N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(1): 255-258.

Götz A, Pukall R, Smit E, Tietze E, Prager R, Tschäpe H, van Elsas JD, Smalla K. Detection and Characterization of broad-host-range plasmids in environmental bacteria by PCR. *Appl Environ Microbiol* 1996; 62(7):2621-2628.

Hanson ND, Hossain A, Buck L, Moland ES, Thomson KS. First occurrence of a *Pseudomonas aeruginosa* isolate in the United States producing an IMP metallo-beta-lactamase, IMP-18. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(6): 2272-2273.

Hollis RJ, Bruce JL, Fritschel SJ, Pfaller MA. Comparative evaluation of an automated ribotyping instrument versus pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological investigation of clinical isolates of bacteria. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34(4): 263-268.

Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I, Sofianou D, Tsakris A, Mantzana P, Pournaras S, Maniatis AN. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo-β-lactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; 43(10): 5344-5347.

Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A, Yomoda S, Okubo T, Nakamura A, O'Hara K. Detection of a variant metallo-β-lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6): 2014-2016.

Jarlier V, Nicolas MH, Fournier G, Philippon A. Extended broad-spectrum β-lactamases conferring transferable resistance to newer β-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev Infect Dis* 1988; 10(4):867-878.

Jones RN, Biedenbach DJ, Sader HS, Fritsche TR, Toleman MA, Walsh TR. Emerging epidemic of metallo-β-lactamase-mediated resistances. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2005; 51(2): 77-84.

Juan C, Beceiro A, Gutiérrez O, Albertí S, Garau M, Pérez JL, Bou G, Oliver A. Characterization of the new metallo- β -lactamase VIM-13 and its integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(10): 3589-3596.

Kahan FM, Kropp H, Sundelof JG, Birnbaum J. Thienamycin: development of imipenem-cilastatin. *J Antimicrob Chemother* 1983; 12(Suppl D): 1-35.

Koh TH, Wang GC, Sng LH. IMP-1 and a novel metallo- β -lactamase, VIM-6, in fluorescent pseudomonads isolated in Singapore. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(6): 2334-2336.

Kotsakis SD, Papagiannitsis CC, Tzelepi E, Legakis NJ, Miriagou V, Tzouvelekis LS. GES-13, a β -lactamase variant possessing a lys-104 and asn-170 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3): 1331-1333.

Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, Pauw E, Amicosante G, Frere JM, Galleni M. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(4): 902-906.

Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, Cornaglia G, Amicosante G, Fontana R, Rossolini, GM. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integronborne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43(7): 1584-1590.

Leavitt A, Chmelnitsky I, Colodner R, Ofek I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Ertapenem resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J Clin Microbiol* 2009; 47(4): 969-974.

Lee SH, Jeong SH. Nomenclature of GES-type extended-spectrum β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(5): 2148-2150.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(11): 4485-4491.

Lee MF, Peng CF, Hsu HJ, Chen YH. Molecular characterization of the metallo- β -lactamase genes in imipenem-resistant Gram-negative bacteria from a university hospital in southern Taiwan. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 32(6): 475-480.

Lincopan N, McCulloch JA, Reinert C, Cassettari VC, Gales AC, Mamizuka EM. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J Clin Microbiol* 2005; 43(1): 516-519.

Lincopan N, Leis R, Vianello MA, Araújo MRE, Ruiz AS, Mamizuka EM. Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. *J Med Microbiol* 2006; 55(Pt 11):1611-1613.

Livermore DM. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8(4):557-584.

Livermore DM, Woodford N. Carbapenemases: a problem in waiting? *Curr Opin Microbiol* 2000; 3(5): 489-495.

Marcadé G, Deschamps C, Boyd A, Gautier V, Picard B, Branger C, Denamur E, Arlet G. Replicon typing of plasmids in *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(1): 67-71.

Masterton RG. The new treatment paradigm and the role of carbapenems. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(2): 105-110.

Mendes RE, Toleman A, Ribeiro J, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Integron carrying a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12): 4693-4702.

Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC, Pignatari ACC, Tufik S. Rapid detection and identification of metallo- β -lactamase-encoding genes by Real-Time PCR assays and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007a; 45(2):544-547.

Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA, Sader HS, Jones RN, Walsh TR. Characterization of an integron carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac*(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007b; 51(7): 2611-2614.

Miriagou V, Cornaglia G, Edelstein M, Galani I, Giske CG, Gniadkowski M, Malamou-Lada E, Martinez-Martinez L, Navarro F, Nordmann P, Peixe L, Pournaras S, Rossolini GM, Tsakris A, Vatopoulos A, Cantón R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance. *Clin Microbiol Infect* 2010; 16: 112-122.

Miró E, Segura C, Navarro F, Sorlí L, Coll P, Horcajada JP, Alvarez-Lerma F, Salvadó M. Spread of plasmids containing the *bla*_{VIM-1} and *bla*_{CTX-M} genes and the *qnr* determinant in *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(4): 661-665.

Monteiro J. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos β-lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil. 145 f. Dissertação (Doutorado em Ciências), Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(1):333-334.

Moubareck C, Brémont S, Conroy MC, Courvalin P, Lambert T. GES-11, a novel integron-associated GES variant in *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3579-3581.

Murphy TA, Simm AM, Toleman MA, Jones RN, Walsh TR. Biochemical characterization of the acquired metallo-β-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47(2): 582-587.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(4): 1257-1263.

Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(9): 3098-3101.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y; Israeli KPC Kpn Study Group. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2): 818-820.

Nicoletti, AG. Avaliação da evolução temporal da presença de metalo- β -lactamase em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas no Hospital São Paulo no período de 1997 a 2006. 86 f. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Metodista de São Paulo, São Bernardo do Campo, 2007.

Nicoletti AG, Picão RC, Santos AF, Xavier DE, Fehlberg LCC, Gales AC. *Klebsiella pneumoniae* non-susceptible to carbapenems (KPN-NSC) in Brazil: What are the mechanisms behind? In: Annual Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49., 2009, San Francisco. Anais... Washington: American Society for Microbiology, 2009.

Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8(6):321-331.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-236.

Nouér SA, Nucci M, Oliveira MP, Pellegrino FLPC, Moreira BM. Risk factors for acquisition of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(9): 3663-3667.

Novick RP. Plasmid incompatibility. *Microbiol Rev* 1987; 51(4): 381-395.

O'Hara K, Haruta S, Sawai T, Tsunoda M, Iyobe S. Novel metallo- β -lactamase mediated by a *Shigella flexneri* plasmid. *FEMS Microbiol Lett* 1998; 162(2): 201-206.

Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R, Ohta M, Horii T, Ito H, Yoshimura F, Kato N. 1994. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(1): 71-78.

Pasteran F, Faccone D, Petroni A, Rapoport M, Galas M, Vázquez M, Procopio A. Novel variant *bla*_{VIM-11} of the metallo- β -lactamase *bla*_{VIM} family in a GES-1 extended-spectrum- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(1): 474-475.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2009; 47(6): 1631-1639.

Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 2006; 34(Suppl 1):S20-28.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(6): 2702.

Payne DJ. Metallo- β -lactamase – a new therapeutic challenge. *J Med Microbiol* 1993; 39(2): 93-99.

Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC, Khushi T, Proctor D, Pearson SC, Reid R. Inhibition of metallo- β -lactamases by a series of thiol ester derivatives of mercaptophenylacetic acid. *FEMS Microbiol Lett* 1997a; 157(1): 171-175.

Payne DJ, Bateson JH, Gasson BC, Proctor D, Khushi T, Farmer TH, Tolson DA, Bell D, Skett PW, Marshall AC, Reid R, Ghosez L, Combret Y, Marchand-Brynaery J. Inhibition of metallo- β -lactamases by a series of mercaptoacetic acid thiol ester derivatives. *Antimicrob Agents Chemother* 1997b; 41(1): 135-140.

Peirano G, Seki LM, Passos VLV, Pinto MCFG, Guerra LR, Assensi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(2):265-268.

Pellegrino FLPC, Teixeira LM, Carvalho MGS, Nouér AS, Oliveira MP, Sampaio JLM, Freitas ADF, Ferreira ALP, Amorim ELT, Riley LW, Moreira BM. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol* 2002; 40(7):2420-2424.

Pellegrini C, Mercuri PS, Celenza G, Galleni M, Segatore B, Sacchetti E, Volpe R, Amicosante G, Perilli M. Identification of *bla*_{IMP-22} in *Pseudomonas* spp. in urban wastewater and nosocomial environments: biochemical of a new IMP metallo-enzyme variant and its genetic location. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(5): 901-908.

Penteado AP, Castanheira M, Pignatari ACC, Guimarães T, Mamizuka EM, Gales AC. Dissemination of *bla*_{IMP-1}-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr23*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63(1): 87-91.

Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol* 2002; 40(6):2153-2162.

Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, Gales AC. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM-producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46(6):2028-2037.

Picão RC, Poirel L, Gales AC, Nordmann P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(9): 3908-3913.

Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65(4): 796-797.

Poirel L, Naas T, Nicolas D, Collet L, Bellais S, Cavallo JD, Nordmann P. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(4): 891-897.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(9): 2598-2603.

Poirel L, Magalhaes M, Lopes M, Nordmann P. Molecular analysis of metallo-beta-lactamase gene *bla*_{SPM-1}-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(4): 1406-1409.

Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2(5):501-512.

Poirel L, Rodriguez-Martinez J, Naiemi NA, Debets-Ossenkopp Y, Nordmann P. Characterization of *bla*_{DIM-1}, a novel integron-located metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. Abstracts of the Nineteenth European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 2009: Helsinki, Finland. Basel, Switzerland: European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Abstract O-309, p. S69.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 24-38.

Pournaras S, Tsakris A, Maniati M, Tzouvelekis LS, Maniatis AN. Novel variant *bla*_{VIM-4} of the metallo- β -lactamase gene *bla*_{VIM-1} in a clinical strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(12): 4026-4028.

Pournaras S, Ikonomidis A, Tzouvelekis LS, Tokatlidou D, Spanakis N, Maniatis AN, Legakis NJ, Tsakris A. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49(12): 5153-5156.

Psichogiou M, Tassios PT, Avlami A, Stefanou I, Kosmidis C, Platsouka E, Paniara O, Xanthaki A, Toutouza M, Daikos GL, Tzouvelekis LS. Ongoing epidemic of *bla*_{VIM-1}-positive *Klebsiella pneumoniae* in Athens, Greece: a prospective survey. *J Antimicrob Chemother* 2008; 61(1): 59-63.

Queenam AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20(3):440-458.

Rhomberg PR, Jones RN. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 65(4): 414-426.

Riccio ML, Franceschini N, Boschi L, Caravelli B, Cornaglia G, Fontana R, Amicosante G, Rossolini GM. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44(5): 1229-1235.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(3):1354-1357.

Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Fortineau N, Poirel L. VIM-19, a metallo- β -lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 471-476.

Rottman M, Benzerara Y, Hanau-Berçot B, Bizet C, Philippon A, Arlet G. Chromosomal *ampC* genes in *Enterobacter* species other than *Enterobacter cloacae*, and ancestral association of the ACT-1 plasmid-encoded cephalosporinase to *Enterobacter asburiae*. *FEMS Microbiol Lett* 2002; 210(1): 87-92.

Sader SH, Castanheira M, Mendes RE, Toleman M, Walsh TR, Jones RN. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Int J Antimicrob Agents* 2005a; 25(1): 57-61.

Sader HS, Reis AO, Silbert S, Gales AC. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. *Clin Microbiol Infect* 2005b; 11(1):73-76.

Salabi AE, Toleman M, Walsh TR. Novel subclass of a group B1 metallo- β -lactamase, TMB-1, in clinical and non-clinical Gram-negative bacteria from Libya. In: Annual Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49., 2009, San Francisco. Anais... Washington: American Society for Microbiology, 2009.

Salabi AE, Toleman MA, Weeks J, Bruderer T, Frei R, Walsh TR. First report of the metallo- β -lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54(1): 582.

Samuelsen Ø, Naseer U, Tofteland S, Skutlaberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63(4): 654-658.

Schneider I, Keuleyan E, Rasshofer R, Markovska R, Queenan AM, Bauernfeind A. VIM-15 and VIM-16, two new VIM-2-like metallo- β -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Bulgaria and Germany. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(8): 2977-2979.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a Novel Plasmid-Mediated Metallo- β -Lactamase from a *Citrobacter freundii* Clinical Isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(11): 4194-4197.

Siarkou VI, Vitti D, Protonotariou E, Ikonomidis A, Sofianou D. Molecular epidemiology of outbreak-related *Pseudomonas aeruginosa* strains carrying the novel variant *bla*_{VIM-17} metallo- β -lactamase gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(4): 1325-1330.

Tato M, Coque TM, Ruíz-Garbajosa P, Pintado V, Cobo J, Sader HS, Jones RN, Baquero F, Cantón R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of *Enterobacteriaceae* infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? *Clin Infect Dis* 2007; 45(9): 1171-1178.

Taylor DE, Gibreel A, Lawley TD, Tracz DM. Antibiotic resistance plasmids. In: Funnel BE, Phillips GJ. *Plasmid biology*. Washington: ASM Press, 2004. p. 473-492.

Tognim MCB, Gales AC, Penteado AP, Silbert S, Sader HS. Dissemination of IMP-1 metallo- β -lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2006; 27(7): 742-747.

Toleman MA, Simm AM, Murphy TA, Gales AC, Biedenbach DJ, Jones RN, Walsh TR. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. *J Antimicrob Chemother* 2002; 50(5): 673-679.

Toleman MA, Biedenbach D, Bennett D, Jones RN, Walsh TR. Genetic characterization of a novel metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-13}, harboured by a novel Tn5051-type transposon disseminating carbapenemase genes in Europe: report from the SENTRY worldwide antimicrobial surveillance programme. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52(4): 583-590.

Toleman MA, Rolston K, Jones RN, Walsh TR. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(1): 329-332.

Tsakris A, Ikonomidis A, Poulou A, Spanakis N, Pournaras S, Markou F. Transmission in the community of clonal *Proteus mirabilis* carrying VIM-1 metallo- β -lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(1): 136-139.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62(6): 1257-1260.

Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad-spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; 63(2): 217-222.

Tysall L, Stockdale MW, Chadwick PR, Palepou MF, Towner KJ, Livermore DM, Woodford N. IMP-1 carbapenemase detected in an *Acinetobacter* clinical isolate from the UK. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49(1): 217-218.

Vatopoulos A. High rates of metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Greece – a review of the current evidence. *Euro Surveill* 2008; 13(4): 8023.

Vieira VV, Fonseca EL, Vicente ACP. Metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Clin Microbiol Infect* 2005; 11(11): 937.

Vourli S, Giakkoupi P, Miriagou V, Tzelepi E, Vatopoulos AC, Tzouvelekis LS. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 234(2):209-213.

Yan JJ, Ko WC, Wu JJ. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001a; 45(8): 2368-2371.

Yan JJ, Hsueh PR, Ko WC, Luh KT, Tsai SH, Wu HM, Wu JJ. Metallo- β -lactamases in clinical *Pseudomonas* isolates in Taiwan and identification of VIM-3, a novel variant of the VIM-2 enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 2001b; 45(8): 2224-2228.

Yano H, Kuga A, Okamoto R, Kitasato H, Kobayashi T, Inoue M. Plasmid-encoded metallo- β -lactamase (IMP-6) conferring resistance to carbapenems, especially meropenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45(5): 1343-1348.

Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh T R. A novel subgroup metallo- β -lactamase (MBL), AIM-1 emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) from Australia. In: Annual Intescience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47., 2007, Chigaco. Anais... Washington: American Society for Microbiology, 2007

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel

erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(12): 5046-5054.

Xavier DE, Gales AC, Mendes RE, Pignatari ACC, Filho LS, Cirilo LF, Castanheira M. IMP-18-producing *Pseudomonas aeruginosa* (PSA): increasing diversity of mobile metallo-beta-lactamase (MBL) in Brazil. In: Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 46., 2006, San Francisco. Anais... Washington: American Society for Microbiology, 2006. p. 110.

Xiong J, Hynes MF, Ye H, Chen H, Yang Y, M'zali F, Hawkey PM. *bla*IMP-9 and its association with large plasmids carried by *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the People's Republic of China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1): 355-358.

Wachino J, Doi Y, Yamane K, Shibata N, Yagi T, Kubota T, Arakawa Y. Molecular characterization of a cephamycin-hydrolyzing and inhibitor-resistant class A beta-lactamase, GES-4, possessing a single G170S substitution in the omega-loop. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(8): 2905-2910.

Walsh TR, Toleman MA, Poirel L, Nordmann P. Metallo- β -lactamase: the quiet before the storm? *Clin Microbiol Rev* 2005; 18(2): 306-325.

Walther-Rasmussen J, Hoiby N. Class A carbapenemases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 60(3):470-482.

Wang Z, Fast W, Valentine AM, Benkovic SJ. Metallo- β -lactamase: structure and mechanism. *Curr Opin Chem Biol* 1999; 3(5): 614-622.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsushashi S. Transferable Imipenem Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35(1): 147-151.

Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MFI, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(2):557-562.

Woodford N, Tiemo PM, Young K, Tysall L, Palepou MFI, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Komblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48(12):4793-4799.

Zavascki AP, Gaspareto PB, Martins AF, Gonçalves AL, Barth AF. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a Teaching Hospital in Southern Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2005; 56(6): 1148-1151.

Zavascki AP, Machado AB, Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli W, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009a; 34(3): 286-288.

Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Barth AL. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: A widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis* 2009b [Epub ahead of print].

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)