

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

MIRLA BORGHI

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA
RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS NÃO SUSCEPTÍVEIS
AOS CARBAPENÊMICOS**

VITÓRIA
2017

MIRLA BORGHI

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA
RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS NÃO SUSCEPTÍVEIS
AOS CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr Ricardo Pinto Schuenck

VITÓRIA
2017

MIRLA BORGHI

**EPIDEMIOLOGIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DA
RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS EM
ENTEROBACTÉRIAS NÃO SUSCEPTÍVEIS
AOS CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 20 de Fevereiro de 2017.

Prof. Dr. Ricardo Pinto Schuenck
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientador

Prof^a. Dr^a. Flávia de Paula
Universidade Federal do Espírito Santo

Prof^a. Dr^a. Marinella Silva Laport
Universidade Federal do Rio de Janeiro

VITÓRIA
2017

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus, pois sem Ele nada disso seria possível. Pela força e serenidade nos momentos que mais precisei.

Aos meus pais que apoiaram a minha decisão de seguir na área acadêmica, mesmo sabendo de todas as dificuldades que poderiam aparecer. Muito obrigada pelo dom da vida, por todo carinho, dedicação, educação e amor mais que incondicional em todos os momentos da minha vida. Ao meu irmão Michel, que mesmo de longe, sei que sempre se preocupou comigo. Obrigada pelo carinho, compreensão e amizade. Aos meus familiares por toda compreensão, apoio e incentivo.

Ao meu namorado, Pedro por estar ao meu lado sempre, por me ajudar a resolver diversos problemas, pelas nossas conversas, por ser companheiro, pelos conselhos, paciência e por todo tempo e amor dedicados a mim. Muito obrigada!

Aos meus amigos do mestrado que foram fundamentais nessa caminhada, onde dividimos conhecimentos, desesperos e felicidades. Muito obrigada por todo apoio.

Aos meus amigos do LabCAS e RESBAC, por dividirem comigo todas as alegrias, ansiedades, por todas as dúvidas sanadas, paciência e por ajudarem no meu crescimento pessoal e profissional durante esses dois anos. Aos professores e secretários da Coordenação de Pós-graduação de Biotecnologia - UFES, os quais contribuíram para a minha formação acadêmica e auxílio nas diversas dúvidas que surgiram.

Ao professor Ricardo Pinto Schuenck, por ter me aceitado como membro da sua equipe de pesquisa, pela orientação e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por seus conselhos e ensinamentos.

Às agências financiadoras, que permitiram que esse projeto fosse realizado: Universidade Federal do Espírito Santo, Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Ao Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN-SESA) pela parceria no fornecimento das amostras bacterianas.

RESUMO

A resistência cada vez mais ampla aos antimicrobianos beta-lactâmicos em espécies da família *Enterobacteriaceae* tem se tornado um grave problema de saúde pública. Do ponto de vista epidemiológico, a produção de carbapenemases merece destaque devido ao seu grande potencial de disseminação mundial. O presente estudo teve como objetivo determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos, detectar genes de resistência aos beta-lactâmicos e analisar o polimorfismo genético das amostras de enterobactérias não susceptíveis aos carbapenêmicos isoladas de diversos materiais clínicos obtidos de pacientes atendidos em hospitais da Grande Vitória. Para avaliar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado o teste de difusão em ágar e o teste de gradiente para determinação da concentração mínima inibitória. Para detecção dos genes de resistência aos beta-lactâmicos foi realizada a técnica de PCR e o polimorfismo genético foi analisado pelas técnicas de PFGE e MLST. As espécies incluídas no estudo foram: *Klebsiella pneumoniae* (n=47), *Serratia marcescens* (n=14), *Enterobacter cloacae* (n=4), *Enterobacter gergoviae* (n=1) e *Citrobacter freundii* (n=1). Essas amostras foram encaminhadas pelo Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN) onde foram previamente analisadas e identificadas como resistentes a pelo menos um carbapenêmico. A maioria das amostras apresentou um perfil de multirresistência em relação aos 25 antimicrobianos analisados, destacando a resistência a polimixinas e tigeciclina. Todas as amostras apresentaram o gene *bla*_{KPC} e a associação entre os genes de carbapenemases com genes de ESBL foi observada em todas as amostras. O perfil genético de resistência prevalente (34%) englobava os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-Mgp1}. Através da análise por PFGE, foi observada a prevalência de dois pulsotipos entre as amostras de *K. pneumoniae*: kpA (40,42%) e kpB (19,14%). Já o pulsotipo smA foi encontrado em 13 das 14 das amostras de *S. marcescens*. As quatro amostras de *E. cloacae* apresentaram pulsotipos distintos. Através da técnica de MLST, realizada em 14 amostras de *K. pneumoniae*, o ST437 e ST340 foram os mais encontrados. O ST437 foi identificado na maioria (6\7) das amostras do pulsotipo kpB e o ST340 em todas as amostras do pulsotipo kpA (3\3). O ST628, ST37 e ST394 foram identificados nos pulsotipos kpD, kpO e kpH, respectivamente. O ST628 e o ST394 foram descritos pela primeira vez no Brasil.

Palavras-chave: Enterobactérias. Carbapenemases. Resistência. Genotipagem.

ABSTRACT

The resistance to beta-lactams in *Enterobacteriaceae* is an important public health problem. The carbapenemase production can be highlighted due to its great potential for worldwide dissemination. This study aims to determine the antimicrobial resistance profile, to detect beta-lactam resistance genes and to analyze the genetic polymorphism of carbapenems non-susceptible *Enterobacteriaceae* isolated from several clinical specimens obtained from patients of hospitals at Grande Vitória. The agar diffusion and gradient tests were used to evaluate the susceptibility profile and to determine the minimum inhibitory concentration. PCR technique was performed for detection of the genes that confer resistance to beta-lactams and the genetic polymorphism was analyzed by PFGE and MLST techniques. The species included in this study were: *Klebsiella pneumoniae* (n=47), *Serratia marcescens* (n=14), *Enterobacter cloacae* (n=4), *Enterobacter gergoviae* (n=1) e *Citrobacter freundii* (n=1). These isolates were provided by the Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN) and presented resistance to at least one carbapenem. The isolates presented a multiresistance profile against the 25 antimicrobials tested. All isolates carried the *bla*_{KPC} and the association between the carbapenemase genes and the ESBL genes was observed in all of them. The most prevalent resistance genetic profile (34%) comprised of the genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-Mgp1}. The PFGE analysis showed the prevalence of two pulsotypes in *K. pneumoniae* isolates: kpA (40.42%) e kpB (19.14%). The pulsotype smA was found in 13 of 14 *S. marcescens* isolates. The four *E. cloacae* isolates showed different pulsotypes. MLST technique was performed in 14 isolates of *K. pneumoniae* and ST437 and ST340 were the most prevalent. ST437 was identified on the majority (6/7) of isolates from the kpB pulsotype and ST340 was found on all isolates from pulsotype kpA (3/3). ST628, ST37 and ST394 were identified in the pulsotypes kpD, kpO and kpH, respectively. ST628 and ST394 were described for the first time in Brazil.

Key words: *Enterobacteriaceae*. Carbapenemases. Resistance. Genotyping

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos antimicrobianos beta-lactâmicos.....	8
Figura 2: Características epidemiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de KPC.....	15
Figura 3: Características epidemiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de NDM.....	16
Figura 4: Características epidemiológicas de <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de OXA-48.....	18
Figura 5: Ação da colistina sobre a membrana bacteriana.....	20
Figura 6: Figura representativa da estrutura populacional de <i>Klebsiella pneumoniae</i> através de <i>multilocus sequence typing</i> (MLST), representada graficamente pelo eBURST.....	25
Figura 7: Estrutura populacional do complexo clonal CC258.....	25
Figura 8: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> deste estudo.....	39
Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 14 amostras de <i>Serratia marcescens</i> deste estudo.....	40
Figura 10: Teste de determinação das concentrações mínimas inibitórias utilizando as fitas com gradientes crescentes de concentração do antimicrobiano.....	45
Figura 11: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	46
Figura 12: Foto ilustrativa dos produtos da PCR para detecção dos genes de resistência.....	48
Figura 13: Pulsotipos e subtipos das 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal.....	49
Figura 14: Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	49
Figura 15: Pulsotipos e subtipos das 14 amostras de <i>Serratia marcescens</i> obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal (PFGE).....	50
Figura 16: Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (16B), <i>Enterobacter cloacae</i> (122B e 123B) e <i>Serratia marcescens</i> (14B, 18B, 27B, 44B, 54B, 61B, 73B, 74B e 86B).....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das beta-lactamases.....	12
Tabela 2: Condições específicas para a detecção dos genes utilizados nas reações de PCR multiplex e simples.....	32
Tabela 3: Oligonucleotídeos iniciadores específicos e genes alvos utilizados para realização das reações de PCR da técnica de <i>multilocus sequence typing</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	34
Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento dos genes <i>pgi</i> e <i>infB</i> do <i>multilocus sequence typing</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	35
Tabela 5: Espécies, fonte de isolamento e tipo de hospital de isolamento das 67 enterobactérias analisadas neste estudo.....	37
Tabela 6: Teste de gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias realizado para as 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, colistina, polimixina B, tigeciclina e amicacina.....	42
Tabela 7: Teste de gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias realizado para as 14 amostras de <i>Serratia marcescens</i> utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, tigeciclina e amicacina.....	43
Tabela 8: Teste de gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias, realizado para as quatro amostras de <i>Enterobacter cloacae</i> utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, colistina, amicacina, tigeciclina e polimixina B.....	44
Tabela 9: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	47
Tabela 10: Resultados do “ <i>multilocus sequence type</i> ” das 14 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	52
Tabela 11: Associação entre os pulsotipos encontrados e o perfil de resistência das 47 amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACT-1 - do inglês *AmpC-beta-lactamase type*

AMC - Amoxicilina-clavulanato

AMI - Amicacina

AMP - Ampicilina

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATCC - Coleção Norte Americana de Micro-organismos (do inglês *American Type Culture Collection*)

ATM - Aztreonam

BHI - Ágar de infusão de cérebro-coração (do inglês *Brain Heart Infusion Agar*)

BrCAST - Comitê Brasileiro de Análise de Susceptibilidade Antimicrobiana (do inglês *Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*)

C. freundii - *Citrobacter freundii*

CAZ - Ceftazidima

CC - Complexo clonal

CDC - Centros de Controle e Prevenção de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

CFO - Cefoxitina

CFZ - Cefazolina

CIP - Ciprofloxacina

CLO - Cloranfenicol

CLSI - Instituto de Normas Laboratoriais e Clínicas (do inglês *Clinical and Laboratory Standards Institute*)

CMI - Concentração mínima inibitória

CMY-2 - do inglês *cephamycin-hydrolyzate beta-lactamase*

CPM - Cefepima

CTX - Cefotaxima

CTX-M - Beta-lactamase Cefotaximase

DHA-1 - do inglês *Dhahran Hospital in Saudi Arabia*

DNA - ácido desoxirribonucléico

E. cloacae - *Enterobacter cloacae*

E. gergoviae - *Enterobacter gergoviae*

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético (do inglês *Ethylene Diamine Tetracetic acid*)

ERT - Ertapenem

ESBL - Beta-Lactamases de Espectro Estendido (do inglês *extended-spectrum beta-lactamases*)

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

EUA - Estados Unidos da América (do inglês *United States of America*)
GEN - Gentamicina
GES - do inglês *Guiana extended spectrum beta-lactamase*
H₂S - Gás sulfídrico
HCl - Ácido clorídrico
IMI - do inglês *imipenem-hydrolyzing β-lactamase*
IMP - do inglês *Pseudomonas imipenem resistant*
IPM - Imipenem
K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*
KPC - *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo
LEV - Levofloxacina
LPS - Lipopolissacarídeo
MDR - Resistência à múltiplas drogas (do inglês *multidrug resistance*)
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
MLST - Tipagem de sequência de multilocus (do inglês *Multilocus sequence typing*)
MPM - Meropenem
NaCl - Cloreto de sódio
NDM - do inglês *New Delhi Metallo-beta-lactamase*
NIT - Nitrofurantoína
NOR - Norfloxacina
OFX - Ofloxacina
OXA - Oxacilinase
pb - Pares de bases
PBP - Proteína ligante de penicilina (do inglês *penicillin binding protein*)
PCR - Reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction*)
PFGE - Eletroforese em campo pulsado (do inglês *pulsed field gel electrophoresis*)
pH - Potencial de hidrogênio
PIT - Piperacilina-tazobactam
PRL - Piperacilina
Rede RM - Rede de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços da Saúde
RNA - Ácido ribonucléico
rpm - Rotações por minuto
S. marcescens - *Serratia marcescens*

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

SDS - Dodecil sulfato de sódio
SFC - Carbapenemase *Serratia fonticola*
SHV - Beta-lactamase *Sulphydryl variable*
SLV - Variante de locus único (do inglês *single locus variant*)
SME - Enzima *Serratia marcescens*
ST - Tipo de sequência (do inglês *sequence type*)
SUS - Sistema Único de Saúde
SUT - Trimetoprima-sulfametoxazol
TAC - Ticarcilina-clavulanato
TBE - Tampão Tris-borato EDTA
TE - Tampão Tris-EDTA
TEM - Beta-lactamase Temoneira
TET - Tetraciclina
TOB - Tobramicina
Tris -Tris (hidroximetil)aminometano
TSB - Caldo de soja triptona (do inglês *Tryptone Soya Broth*)
UFES - Universidade Federal do Espírito Santo
UTI - Unidade de terapia intensiva
UTIN - Unidade de terapia intensiva neonatal
VIM - do inglês *metallo-beta-lactamase encoded by integron Verona*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	3
2.1.1. <i>Klebsiella</i> spp.....	4
2.1.2. <i>Serratia</i> spp.....	5
2.2. Resistência aos beta-lactâmicos.....	7
2.3. Produção de beta-lactamases.....	11
2.4. Epidemiologia das infecções causadas por <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	22
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivos gerais.....	27
3.2. Objetivos específicos.....	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1. Aspectos éticos e amostras bacterianas	28
4.2. Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	29
4.3. Detecção dos genes codificadores de resistência através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	31
4.4. Análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico das amostras com uso de enzimas de restrição <i>Xba</i> I e <i>Sma</i> I e separação em gel por eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	32
4.5. Análise do polimorfismo genético através de <i>multilocus sequence typing</i> (MLST).....	34
5. RESULTADOS.....	37
5.1. Amostras bacterianas.....	37
5.2. Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	38
5.3. Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI).....	41
5.4. Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases através da técnica de reação em cadeia de polimerase.....	45
5.5. Avaliação da diversidade genotípica através da técnica de digestão do DNA cromossômico com enzima de restrição e posterior eletroforese em campo pulsado (PFGE).....	48
5.6. Tipagem molecular através do MLST.....	51
5.7. Relação entre os pulsotipos e subtipos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases...	53
6. DISCUSSÃO	55
7. CONCLUSÕES.....	66
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	68

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A resistência bacteriana aos antimicrobianos atualmente disponíveis está aumentando em um ritmo alarmante, tornando-se um grave problema de saúde pública mundial. Ao mesmo tempo, a redução no desenvolvimento de novos antimicrobianos limita as opções terapêuticas das infecções por bactérias multirresistentes. Desse modo, a "época de ouro", na qual a medicina moderna salva vidas através de tratamento antimicrobiano está ameaçada, reavivando memórias da era pré-antibiótico e aumentando as preocupações sobre uma era pós-antibiótica. Essa era, em que infecções comuns podem levar a morte do paciente, é uma possibilidade muito real para o século 21 (NATHAN; CARS, 2014).

O desenvolvimento da resistência é um processo evolutivo normal para os micro-organismos, mas é acelerada pela pressão seletiva exercida pela utilização generalizada de antimicrobianos. De acordo com o relatório publicado pelo Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos Estados Unidos da América (CDC-EUA), três grupos de micro-organismos representam uma ameaça urgente à saúde pública: *Clostridium difficile*, *Neisseria gonorrhoeae* e *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (ERC). De acordo com o relatório publicado pelo CDC, no ano de 2013, as ERC, incluindo as espécies *K. pneumoniae* e *E.coli*, foram resistentes a maioria dos antimicrobianos disponíveis e quase 50% dos pacientes que desenvolveram infecções sanguíneas causadas por esses micro-organismos vieram a óbito (CDC, 2013).

A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é particularmente grave devido à elevada mortalidade e reduzido número de opções terapêuticas disponíveis (NORDMANN; CORNAGLIA, 2012). Em um estudo, realizado entre os anos de 2010 e 2011 em três grandes hospitais italianos, envolvendo 125 pacientes apresentando infecções de corrente sanguínea causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC, observou-se uma taxa de mortalidade de 41,6% (TUMBARELLO et al., 2012). Os carbapenêmicos, por serem antimicrobianos com um amplo espectro de ação, são utilizados, principalmente, para tratar pacientes com infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes (JEON et al., 2015). Em alguns países, a eficácia desses antimicrobianos contra infecções causadas por *K. pneumoniae* está comprometida devido a alta resistência dessa espécie a esse fármaco (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Nota Técnica 01/2013: “Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes” (ANVISA, 2013a), destacou a importância de todos os serviços de saúde e laboratórios no Brasil utilizarem os mesmos procedimentos e critérios interpretativos para a detecção de carbapenemases. Essa correta detecção é fundamental para o controle da disseminação desse tipo de mecanismo de resistência, que só poderá ser alcançado com um grande esforço multidisciplinar, que inclui, além de outras medidas, detecção precoce de pacientes colonizados, implementação de precauções de contato e de tratamento adequado.

O governo dos EUA divulgou um documento, denominado “Estratégias Nacionais de Combate às Bactérias Resistentes aos Antibióticos” que consistia em: (1) uso racional de antimicrobianos na saúde e na agricultura; (2) fortalecer os esforços nacionais de vigilância da saúde para combater a resistência; (3) uso de testes diagnósticos rápidos e inovadores para identificação e caracterização de bactérias resistentes; (4) acelerar a pesquisa básica e aplicada e o desenvolvimento de novos antibióticos, outras terapêuticas e vacinas; (5) melhorar a colaboração internacional para vigilância e pesquisa de desenvolvimento de novos antibióticos (www.whitehouse.gov/ondcp/national-drug-control-strategy).

Com o surgimento e disseminação de estirpes multirresistentes, a necessidade de novos agentes antimicrobianos é mais urgente do que nunca. A aprovação de novos fármacos antimicrobianos pelo *Food and Drug Administration* dos Estados Unidos (FDA) diminuiu em mais de 50% no período de 1993 a 2002 (SPELLBERG et al., 2004). Entre janeiro de 2010 e dezembro de 2015 foram aprovados pelo FDA apenas oito novos antimicrobianos (DEAK et al., 2016).

Nesse contexto, o Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana (LabCAS - UFES), onde foi desenvolvido o presente trabalho, atua, dentre outros projetos, em estudos relacionados à resistência e epidemiologia de bactérias de importância médica. A presente dissertação é parte da parceria do LabCAS com o Laboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo (LACEN). Esse projeto visou, principalmente, estudar o perfil das amostras de enterobactérias não susceptíveis aos carbapenêmicos circulantes nos hospitais da Grande Vitória tanto do ponto de vista da epidemiologia molecular como de resistência, visando contribuir, dentre outras coisas, para a adoção de medidas eficazes contra a disseminação desses agentes.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é formada por um grande grupo de bacilos Gram-negativos e é constituída, atualmente, por 44 gêneros e 176 espécies bacterianas (<http://www.bacterio.net/enterobacteriaceae.html>). As bactérias dessa família possuem motilidade variável, não formam esporos e são anaeróbias facultativas. Suas necessidades nutricionais são simples, fermentam a glicose com ou sem a formação de gás, a maioria reduz o nitrato, é produtora de catalase (exceto *Shigella dysenteriae*) e é oxidase-negativa, exceto *Plesiomonas*, gênero recentemente incorporado à família *Enterobacteriaceae*. A ausência da atividade da enzima citocromo oxidase é uma característica importante, pois é um teste simples que diferencia as enterobactérias de outros bacilos Gram-negativos (FARMER et al., 2007).

As enterobactérias são ubíquas na natureza, podem ser encontradas no solo, na água, na vegetação e fazem parte da microbiota normal da maioria dos animais, incluindo o homem. Alguns micro-organismos (ex.: *Salmonella* spp., *Shigella* spp.) são associados a doenças humanas, enquanto outros (ex. *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) são comensais e podem causar infecções oportunistas. As infecções mais comuns variam de cistite a septicemia, pneumonia, meningite e infecções associadas a dispositivos médicos (NORDMANN; DORTET; POIREL, 2012). *Enterobacteriaceae* se disseminam facilmente entre os seres humanos através de mãos, água e alimentos contaminados e tem uma propensão para adquirir material genético através de transferência horizontal de genes mediada, principalmente, por plasmídeos e transposons (STOKES; GILLINGS, 2011). Essa combinação de fatores que favorecem a disseminação dessas bactérias é a razão pela qual a resistência aos antimicrobianos em *Enterobacteriaceae* é de extrema importância para terapia clínica.

De acordo com a ANVISA, 80% ou mais de todos os Gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica pertencem à família *Enterobacteriaceae*, sendo que a maior parte está relacionada a infecções urinárias e septicemias (ANVISA, 2013b). Os gêneros e espécies dessa família de maior importância clínica são: *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*,

Enterobacter spp. e *Citrobacter* spp..

2.1.1 *Klebsiella* spp.

O gênero *Klebsiella* foi nomeado por Trevisan no ano de 1885, em homenagem ao bacteriologista alemão Edwin Klebs. A primeira espécie de *Klebsiella* foi descrita em um bacilo encapsulado isolado de paciente com rinoscleroma e foi denominada então como *Klebsiella rhinoscleromatis* por Trevisan em 1887 (<http://www.bacterio.net/klebsiella.html>).

Atualmente, são descritas 15 espécies de *Klebsiella* e 5 subespécies (<http://www.bacterio.net/klebsiella.html>), sendo a espécie mais prevalente em infecções humanas a *Klebsiella pneumoniae*, responsável por mais de 70% das infecções (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). A espécie de *K. pneumoniae* apresenta três subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*.

K. pneumoniae colonizam, mais frequentemente, o trato gastrointestinal, a pele e a nasofaringe, sendo responsáveis por infecções graves na comunidade, como pneumonia necrotizante, abscessos piogênicos no fígado e endoftalmite (BROBERG; PALACIOS; MILLER, 2014). Durante a década de 1970, *K. pneumoniae* tornou-se uma importante causa de infecções nosocomiais, especialmente infecções do trato urinário (ITU), do trato respiratório e sanguíneas (DAIKOS et al., 2014).

O tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* tem sido complicado pela emergência da resistência antimicrobiana, especialmente a partir da década de 1980 (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Atualmente, as escolhas terapêuticas para o tratamento de infecções nosocomiais causadas por *K. pneumoniae* tornaram-se desafiadoras (GIROMETTI et al., 2014).

Um estudo de revisão intitulado de “*Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends – SMART*” monitorou a susceptibilidade *in vitro* a diversos agentes antimicrobianos de bacilos Gram-negativos coletados de hospitais em todo o mundo ao longo de dez anos (2002 à 2011). Esse estudo demonstrou que 20 a 80% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes aos antimicrobianos de primeira linha, incluindo as cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (MORRISSEY et al., 2013). Especialmente preocupante é a resistência emergente aos carbapenêmicos, uma vez que esses agentes são, frequentemente, a última

linha de terapêutica eficaz disponível para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* resistente a múltiplos fármacos (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório intitulado “Resistência antimicrobiana: relatório global de vigilância” (WHO, 2014), o qual focou na resistência aos antimicrobianos em sete diferentes bactérias responsáveis por infecções da corrente sanguínea, diarreia, pneumonia e gonorréia. Esse relatório mostrou que *K. pneumoniae* é uma das principais causas de infecções nosocomiais. Em alguns países, devido à resistência, os carbapenêmicos não poderiam ser utilizados para o tratamento de mais da metade das infecções por esse agente (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

Um estudo realizado pelo SENTRY (Programa Global de Monitoramento da Resistência Antimicrobiana) com 12.811 amostras bacterianas coletadas de centros médicos latino-americanos (Argentina, Brasil, Chile e México) demonstrou que 44,5% dos isolados foram bacilos Gram-negativos e a espécie *K. pneumoniae* foi a terceira bactéria mais prevalente (12,3%) relacionada a infecções sanguíneas (GALES et al., 2012)

De acordo com dados do CDC-EUA, estima-se que das 140.000 infecções causadas por enterobactérias nos Estados Unidos a cada ano, cerca de 9.300 são causadas por ERC, sendo que *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos é a prevalente (11%) (CDC, 2013).

No Brasil, dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, obtidos no período de janeiro a dezembro de 2014, em amostras isoladas de infecções primárias da corrente sanguínea de pacientes internados em UTIs de 1.692 hospitais brasileiros, mostraram que 68,5% foram identificados como bastonetes Gram-negativos e as espécies mais frequentemente isoladas foram: *K. pneumoniae* (14,2%), *Acinetobacter* spp. (12,9%), *P. aeruginosa* (10,8%), *E. coli* (7,4%), *Enterobacter* spp. (6%) e *Serratia* spp. (2,2%) (ANVISA, 2015).

2.1.2 *Serratia* spp..

O gênero *Serratia* pode ser distinguido de outros gêneros de enterobactérias pela produção de três enzimas: DNase, lipase e gelatinase (GIRI et al., 2004).

Algumas espécies produzem um pigmento vermelho, chamado de prodigiosina ou 2-metil-3-amil-6-metoxiprodigioseno (WILLIAMS & QADRI, 1980).

A taxonomia de *S. marcescens* é um pouco complexa e parte dessa complexidade foi devido às incertezas sobre as primeiras descrições do micro-organismo por alguns estudiosos (MAHLEN, 2011). Em 1823, Bizio nomeou o micro-organismo com pigmentação avermelhada, que foi observado em uma polenta, como *S. marcescens*. Já em 1848, Ehrenberg nomeou uma bactéria móvel isolada de um alimento como "*Monas prodigiosa*". No ano de 1904, Fortineau nomeou uma bactéria com essas mesmas características de *Erythrobacillus pyosepticus*. No entanto, através das análises de Breed & Breed e dos editores do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* o nome *Serratia marcescens* prevaleceu sobre os demais, visto que se tratava da mesma espécie bacteriana (BREED & BREED, 1924; BERGEY et al., 1923). Atualmente, o gênero *Serratia* é composto por 19 espécies e 4 subespécies (<http://www.bacterio.net/serratia.html>).

S. marcescens é um agente causador de infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonia, meningite, bacteremia, infecções do trato urinário, endocardite, conjuntivite e infecções de sítio cirúrgico. Nos hospitais, essas espécies sobrevivem e crescem em ambientes úmidos e, comumente, não colonizam o intestino humano, bexiga, trato respiratório superior e pele (VETTER et al., 2016).

Diferentes fontes ambientais para *S. marcescens* foram descritos como focos de infecção, incluindo contaminação de dispositivos médicos, soluções intravenosas e tópicas, sabonete líquido e ar condicionado (GUPTA et al., 2014; RABIER et al., 2008; UDUMAN et al., 2002).

Infecção cutânea causada por *S. marcescens* é rara e, geralmente, ocorre em indivíduos imunocomprometidos, sendo tipicamente graves e associadas à taxas significativas de morbidade e mortalidade. Os fatores de virulência que conduzem à infecções causadas por *S. marcescens* não são totalmente compreendidos, mas os principais contribuintes incluem: proteases, exotoxinas e a formação de biofilme (FOURNIER et al., 2016).

S. marcescens tornou-se uma importante causa de infecções nosocomiais nas últimas duas décadas (HEJAZI; FALKINER, 1997). Essas bactérias, geralmente, são relatadas como uma causa de surtos, especialmente em unidades de tratamento intensivos neonatais (UTIN) (CASOLARI et al., 2013; DAWCZYNSKI et al., 2016). Os prematuros tem um risco particularmente elevado de sepse causada por *S.*

marcescens (BARTELS et al., 2007). Os procedimentos invasivos, a administração de antibióticos e os fatores de risco relacionados ao paciente, como baixo peso ao nascer, baixa idade gestacional e imaturidade, são fatores de risco bem conhecidos para infecções graves por *S. marcescens* (POLILLI et al., 2011). Anderson e colaboradores (2008) relataram que pacientes de UTIN que são colonizados com *S. marcescens* apresentam uma taxa de infecção significativamente maior (17%) do que crianças colonizadas com outros patógenos, como *Enterobacter cloacae* (2,4%) ou *Klebsiella pneumoniae* (3,7%) (ANDERSON et al., 2008).

Um trabalho realizado nos EUA em UTINs demonstrou que *S. marcescens* foi agente causador de 11% a 16% de todas as infecções da corrente sanguínea causada por bactérias Gram-negativas (VOELZ et al., 2010). Entre janeiro e dezembro de 2005 foi realizado um estudo da incidência de *S. marcescens* em uma UTIN de um hospital de Gaza, Palestina. Esse estudo demonstrou que *S. marcescens* foi detectada no sangue de 159 casos confirmados de septicemia nosocomial e 70 (44%) neonatos morreram devido à infecção causadas por esse agente (AL JAROUSHA et al., 2008). Lima et al. (2011), em um estudo realizado no Brasil, mostraram que os principais focos associados a surtos por *S. marcescens* são o aparelho digestivo, respiratório, urinário, perineo de recém-nascidos e as unhas de adultos e trabalhadores da área de saúde (LIMA et al., 2011).

2.2 Resistência aos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos possuem como mecanismos de ação a inibição da síntese da parede celular bacteriana. A camada de peptidoglicano da parede celular é uma malha rígida formada pela alternância de duas subunidades, ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina, sendo que as subunidades glicídicas são ligadas por transglicosidases. Um pentapeptídeo é ligado a cada unidade de N-acetilmurâmico e ligações cruzadas de aminoácidos (D-alanina-D-alanina) presentes no pentapeptídeo são catalisadas por enzimas chamadas de transpeptidases. A última fase da síntese da parede bacteriana consiste na formação de tetrapeptídeos a partir de pentapeptídeos (mediante a perda de um dos aminoácidos terminais). O anel beta-lactâmico apresenta uma estrutura similar a região D-alanina-D-alanina a qual se unem essas enzimas e, então, é capaz de se unir a elas de forma covalente e impedir a formação da parede

celular. Sem a parede celular, a bactéria fica exposta ao meio ambiente e morre devido a mudanças da pressão osmótica. Portanto, para que os beta-lactâmicos possam atuar, é preciso que as bactérias estejam em fase de multiplicação, pois é neste momento em que ocorre a síntese da parede celular (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

Os beta-lactâmicos apresentam ação bactericida lenta, com atividade dependente do tempo e, geralmente, possuem uma boa distribuição e reduzida toxicidade. São caracterizados pela presença do anel beta-lactâmico em sua estrutura molecular e as associações de diferentes cadeias lineares aos anéis provocam uma mudança nas propriedades do composto, resultando nas quatro classes de beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas (Figura 1). Dentro de cada classe, pequenas alterações moleculares são capazes de modificar as características dos antimicrobianos, entre elas, o seu espectro de ação, afinidade por receptores e resistência às beta-lactamases (SUÁREZ; GUDIOL, 2009).

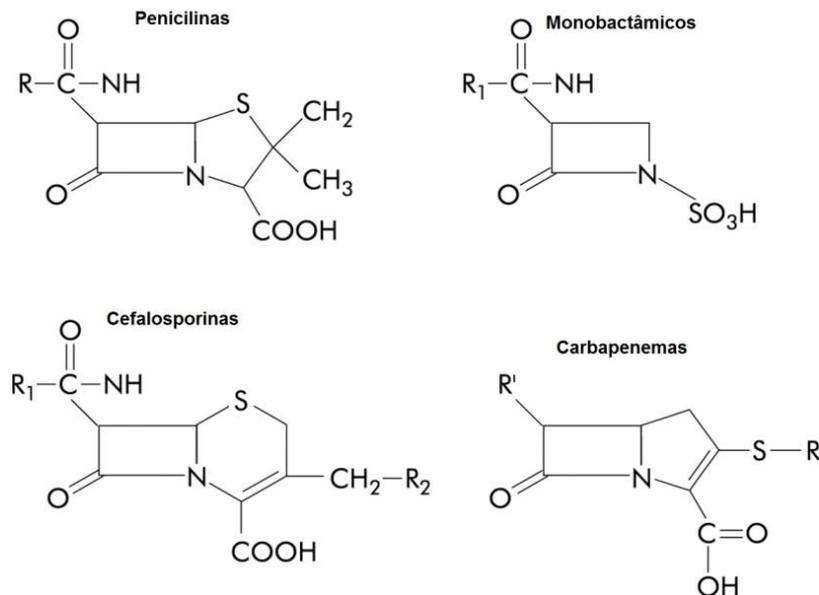


Figura 1: Estrutura dos antimicrobianos beta-lactâmicos. Fonte: WILLIAMS, 1999.

Na década de 1920, Alexander Fleming descobriu, acidentalmente, o primeiro beta-lactâmico, a penicilina. Fleming observou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* era impedido na presença do fungo *Penicillium notatum* (SUÁREZ; GUDIOL, 2009). Sua primeira publicação como benzilpenicilina descreve uma substância que era instável em solução aquosa, mas que poderia servir como um antisséptico. Somente em 1940, Ernst Chain conseguiu obter um extrato estável de penicilina.

Desde então, diversos tipos de penicilina foram desenvolvidas com espectro de ação variável como: penicilina ácida, penicilina G (benzopenicilina), penicilina G benzatina, penicilina N, penicilina O e penicilina V. A penicilina G foi o primeiro beta-lactâmico a ser usado clinicamente, mais frequentemente para tratar infecções por estreptococos (BUSH; BRADFORD, 2016). A penicilina V, ainda é utilizada via oral no tratamento de infecções leves causadas por amostras sensíveis de *Streptococcus* spp. (POTTEGÅRD et al., 2015). Por possuírem um espectro de ação restrito, atualmente, as penicilinas não são indicadas para o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de beta-lactamases, uma vez que são hidrolisadas pelas mesmas. No entanto, ampicilina, amoxicilina, penicilina G e penicilina V ainda usadas para o tratamento de amostras sensíveis de *Streptococcus* spp. do grupo A e de *Treponema pallidum*, duas das poucas espécies bacterianas que não produzem beta-lactamases (SCHAAR et al., 2014).

As cefalosporinas foram descobertas na década de 1950 por Giuseppe Brotzu durante seus estudos que envolviam a microbiota presente em esgoto. As cefalosporinas foram originalmente isoladas de um fungo denominado *Cephalosporium*, que apresentava atividade inibitória contra diversas espécies bacterianas, incluindo *Salmonella* Typhi, causadora da febre tifóide (GREENWOOD, 2007). A partir desse momento, foram desenvolvidas novas cefalosporinas com uma melhor atividade e propriedades farmacocinéticas, utilizadas para tratar infecções causadas por patógenos de grande interesse médico e produtores de penicilinas, como *S. aureus*. Atualmente, existem seis classes de cefalosporinas, de primeira a sexta geração (BUSH; BRADFORD, 2016). As cefalosporinas mais utilizadas na prática clínica são as de primeira geração, como a cefazolina. As de segunda geração, como cefuroxima, possuem como característica uma estrutura química mais estável e uma boa biodisponibilidade oral. Já as cefalosporinas de terceira e quarta geração, como ceftazidima e cefepime, respectivamente, ainda são eficazes, em muitos casos, para o tratamento de infecções graves causadas por bactérias Gram-negativas (BUSH; BRADFORD, 2016)

Os carbapenêmicos foram descobertos na década de 1970 através da identificação de um composto chamado de *thienamycin* como um potente antimicrobiano de largo espectro. Devido a sua instabilidade química, foram feitas modificações em sua estrutura molecular, dando origem a um composto mais estável, conhecido como imipenem (GREENWOOD, 2007). Atualmente, os

principais antimicrobianos dessa classe são o imipenem, meropenem e ertapenem. Carbapenêmicos se destacam pela sua estabilidade e seu amplo espectro de ação, hidrolizando a maioria das beta-lactamases, com exceção das carbapenemases emergentes encontradas em bactérias Gram-negativas (NORDMANN, 2014).

A classe dos monobactâmicos foi inicialmente descrita com a observação da produção de beta-lactâmicos monocíclicos por cepas de *Chromobacterium violaceum*, *Acetobacter* spp. e *Agrobacterium radiobacter* em 1981 (GREENWOOD, 2007). O aztreonam é o único antimicrobiano dessa classe que obtem aprovação regulamentar para ser utilizado na terapêutica. Esse fármaco possui um alto grau de estabilidade e o seu alvo é, especificamente, a atividade aeróbica das bactérias Gram-negativas, incluindo *P. aeruginosa* (SYKES et al., 1982).

A pressão seletiva, causada pelo uso de milhões de toneladas de antimicrobianos nos últimos 70 anos, contribuiu para que grande parte das bactérias patogênicas se tornassem resistentes aos antimicrobianos comumente usados para tratá-las. A rápida evolução da resistência bacteriana pode ser observada claramente em relação aos antimicrobianos da classe dos beta-lactâmicos (LAXMINARAYAN et al., 2013). Cerca de 1000 beta-lactamases, que são enzimas que inativam esses antimicrobianos, foram identificadas desde os anos 1990 (DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência bacteriana surge como consequência de mutações cromossômicas, aquisição de elementos genéticos móveis e pressão exercida pelo uso de antimicrobianos. Os genes de resistência podem ser encontrados no cromossomo e, cada vez mais, em elementos extracromossômicos transmissíveis. Os clones resistentes, por conseguinte, estão se disseminando rapidamente em todo o mundo. Esta propagação é facilitada pela transmissão de genes entre espécies, falta de saneamento básico e higiene nas comunidades e hospitais (LAXMINARAYAN et al., 2013).

Atualmente, os beta-lactâmicos são os antimicrobianos mais utilizados na prática clínica. Cada nova classe de beta-lactâmico tem-se desenvolvido no sentido de aumentar o espectro de atividade ou para abordar os mecanismos de resistência específicos que surgiram na população bacteriana (BUSH; BRADFORD, 2016).

A resistência aos beta-lactâmicos está em constante crescimento, especialmente em bactérias Gram-negativas (LÓPEZ-FABAL et al., 2015); (VASOO; BARRETO; TOSH, 2015). O mecanismo de resistência prevalente entre os

patógenos Gram-negativos é a produção de beta-lactamases (LIVERMORE, 2012).

2.3 Produção de beta-lactamases

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolizar os antimicrobianos beta-lactâmicos e são umas das principais causas da resistência bacteriana às penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Essas enzimas são classificadas de acordo com a sua funcionalidade ou pela sua estrutura molecular. De acordo com a classificação de Bush, Jacob e Medeiros, as beta-lactamases são classificadas em quatro grupos funcionais (1 a 4) baseadas no substrato das enzimas e seus inibidores (BUSH; FISHER, 2011). Já de acordo com Ambler, a classificação molecular é dividida de A a D, devido a homologia das sequências de aminoácidos, na qual as enzimas do grupo A, C e D são serino-beta-lactamases, ou seja, possuem o aminoácido serina no sítio ativo da enzima; enquanto que as enzimas da classe B possuem zinco (Zn^{2+}) no sítio ativo, sendo consideradas metalo-beta-lactamases (AMBLER, 1980). Essas classificações estão detalhadas na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1. Classificação das beta-lactamases.

Grupo Funcional Bush-Jacob	Classe Molecular	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P.aeruginosa</i> e <i>E.coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2a	A	PC1 e outras penicilinases de <i>Staphylococcus</i> spp.	Penicilinases produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. E <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26.	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas das primeiras gerações, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA	Cefalosporinases inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, LI, NDM-1, VIM-1	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

Fonte: adaptado de BUSH e FISHER (2011).

As beta-lactamases mais abundantes fazem parte do grupo funcional 2 e classe molecular A, com mais de 550 enzimas descritas (PHILIPPON; SLAMA; LABIA, 2016). Essas enzimas englobam as penicilinases, a maioria das beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e as serino-carbapenemases (BUSH; FISHER, 2011).

A resistência bacteriana por produção de ESBLs é mediada por plasmídeos e confere resistência contra penicilinas, cefalosporinas de primeira, segunda e terceira

gerações e aztreonam, mas apresentam ação diminuída por inibidores de beta-lactamases, como ácido-clavulânico, sulbactam ou tazobactam (CALBO; GARAU, 2015). As ESBLs mais frequentemente descritas são do tipo CTX-M, TEM e SHV (BAJPAI et al., 2017). A enzima TEM é a mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas e foi primeiramente descrita em uma amostra de *E. coli*, no ano de 1965, em Atenas, oriunda de uma paciente chamada de Temoneira, por isso, foi chamada de TEM. As enzimas do tipo SHV são as mais encontradas em *K. pneumoniae* e a sua denominação se refere a “sulfhydryl variável” (PATERSON; BONOMO, 2005). A primeira CTX-M (hidroliza a cefotaxima, originando seu nome) foi isolada na Argentina, Bolívia e Paraguai em 1989, a partir de um surto em neonatos causado por *Salmonella* Typhymurium (GUZMAN-BLANCO; CASELLAS; SADER, 2000).

Um estudo realizado na China, no período de 2013 a 2014, incluindo amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBLs demonstrou que 98,8% (396/401) dessas enterobactérias albergavam o gene *bla*_{CTX-M} (QUAN et al., 2016). Com o surgimento da variante alélica CTX-M-15, no ano 2000, e sua rápida emergência como uma das ESBLs mais presentes em epidemias por *E. coli* tem gerado um grande reservatório genético, a partir do qual, outras espécies podem adquirir esse gene de resistência (OTEO et al., 2009). Atualmente, a prevalência mundial de *K. pneumoniae* produtoras CTX-M-15 é o resultado da disseminação de clones epidêmicos e da disseminação de diferentes plasmídeos portadores de múltiplos mecanismos de resistência (CALBO; GARAU, 2015). Um estudo epidemiológico, realizado no Brasil no período de 2006 a 2009, com 57 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC demonstrou a presença dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} em 74%, 91% e 67% das amostras, respectivamente (SEKI et al., 2011).

As carbapenemases classe A incluem as enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), IMI (*imipenem-hydrolyzing beta-lactamase*), SME (*Serratia marcescens* enzima), SFC (*Serratia fonticola* carbapenemase), NMC-A (*class A non-metallo* carbapenemase) e algumas enzimas GES (*Guiana extended-spectrum beta-lactamase*) e são mais frequentemente encontradas em amostras da família *Enterobacteriaceae* (LEE, 2006).

Desde a sua primeira descrição em 1996, proveniente de uma amostra de *K. pneumoniae* isolada no leste dos EUA, as KPCs são as carbapenemases da classe A mais frequentemente encontradas (YIGIT et al., 2001). No Brasil, o primeiro relato de KPC foi em Recife, em 2006 (MONTEIRO et al., 2009), mas logo houve relatos no Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2009), São Paulo (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009) e em outros Estados brasileiros, incluindo o Espírito Santo (PEREIRA et al., 2013). As enzimas KPCs são codificadas por plasmídeos e as bactérias que produzem essas enzimas são, normalmente, susceptíveis a apenas alguns antimicrobianos, tais como: colistina, aminoglicosídeos e tigeciclina (LEE et al., 2016). A disseminação endêmica dessas bactérias produtoras de KPC foi relatada em um estudo de revisão, onde foi demonstrada a sua presença em diversos países do mundo como: EUA, China, Itália, Polônia, Grécia, Israel, Argentina, Colômbia e Taiwan (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Estudos epidemiológicos recentes, realizados por Lee e colaboradores (2016), mostram a disseminação global de *K. pneumoniae* produtoras de KPC (Figura 2). Os surtos hospitalares envolvendo amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPCs afetam, principalmente, pacientes com infecções graves e estão associadas a um alto risco de morte (TUMBARELLO et al., 2015). Em UTIs, a presença de KPC também tem sido associada com aumento da mortalidade (CHANG et al., 2015).

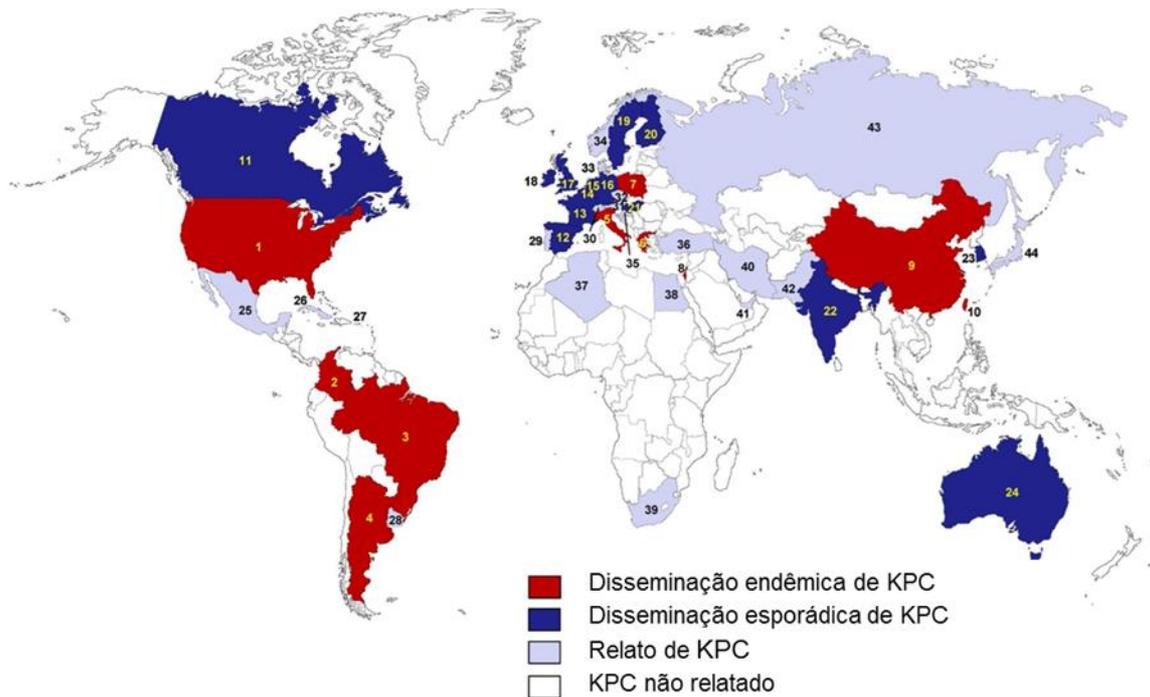


Figura 2. Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de KPC. (1) EUA; (2) Colômbia; (3) Brasil; (4) Argentina; (5) Itália; (6) Grécia; (7) Polônia; (8) Israel; (9) China; (10) Taiwan; (11) Canadá; (12) Espanha; (13) França; (14) Bélgica; (15) Países Baixos; (16) Alemanha; (17) Reino Unido; (18) Irlanda; (19) Suécia; (20) Finlândia; (21) Hungria; (22) Índia; (23) Coreia do Sul; (24) Austrália; (25) México; (26) Cuba; (27) Porto Rico; (28) Uruguai; (29) Portugal; (30) Suíça; (31) Áustria; (32) República Checa; (33) Dinamarca; (34) Noruega; (35) Croácia; (36) Turquia; (37) Argélia; (38) Egito; (39) África do Sul; (40) Irã; (41) Emirados Árabes Unidos; (42) Paquistão; (43) Rússia; (44) Japão. Adaptado de LEE et al. (2016).

Carbapenemases de classe B, também chamadas de metalo-beta-lactamases (MBLs), incluem as enzimas da família VIM (*Verona integron–encoded metallo-beta-lactamase*), IMP (*Pseudomonas imipenem-resistant*), SPM-1 (São Paulo metallo-beta-lactamase) e o grupo emergente NDM (*New Delhi metallo-beta-lactamase*) e tem sido encontradas em amostras de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e membros da família *Enterobacteriaceae* (THOMSON, 2010). As MBLs são capazes de hidrolizar penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos; mas não tem a capacidade de hidrolisar o aztreonam, não são inibidas por inibidores de beta-lactamases e são sensíveis a quelantes como o EDTA, por possuírem um átomo de zinco divalente em seu sítio alvo (JEON et al., 2015). Entre elas, a NDM é uma das carbapenemases mais clinicamente significativas. A NDM-1 foi detectada pela primeira vez em 2008 em amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* em um paciente que retornava da Índia para a Suécia (YONG et al., 2009). Até o momento, foram atribuídas 15 variantes de NDM (JEON et al., 2015) e a maioria delas originadas da

Ásia (NORDMANN; POIREL, 2014). Desde 2008, *K. pneumoniae* produtoras de NDM se disseminaram em muitos países, como está demonstrado na Figura 3 (LEE et al., 2016). Os primeiros relatos do gene *bla*_{NDM} no Brasil foram de amostras de *Providencia rettgeri* e de *Enterobacter hormaechei* isoladas no Rio Grande do Sul em 2012 e 2013 (CARVALHO-ASSEF et al., 2013, CARVALHO-ASSEF et al., 2014). No ano de 2016, foi relatado pela primeira vez o gene *bla*_{NDM} em amostras de *K. pneumoniae* no Brasil (FERREIRA et al., 2016).

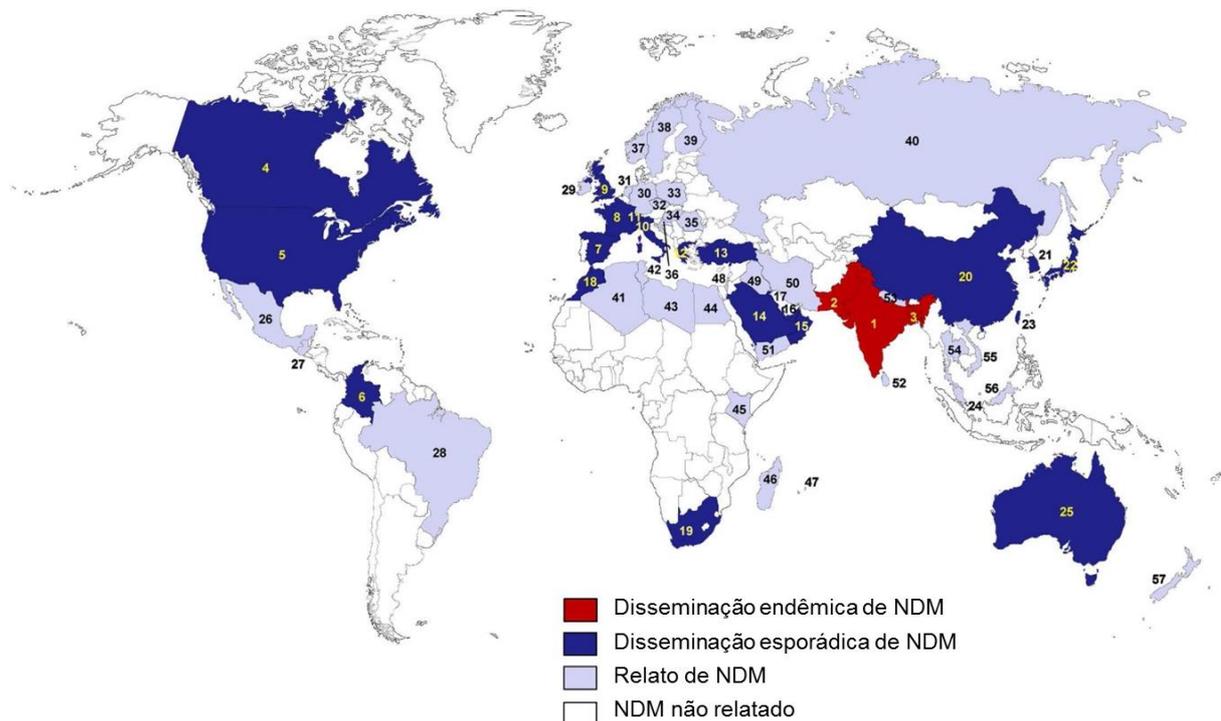


Figura 3. Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM. (1) Índia; (2) Paquistão; (3) Bangladesh; (4) Canadá; (5) EUA; (6) Colômbia; (7) Espanha; (8) França; (9) Reino Unido; (10) Itália; (11) Suíça; (12) Grécia; (13) Turquia; (14) Arábia Saudita; (15) Omã; (16) Emirados Árabes Unidos; (17) Kuwait; (18) Marrocos; (19) África do Sul; (20) China; (21) Coreia do Sul; (22) Japão; (23) Taiwan; (24) Singapura; (25) Austrália; (26) México; (27) Guatemala; (28) Brasil; (29) Irlanda; (30) Alemanha; (31) Países Baixos; (32) República Checa; (33) Polônia; (34) Hungria; (35) Romênia; (36) Croácia; (37) Noruega; (38) Suécia; (39) Finlândia; (40) Rússia; (41) Argélia; (42) Tunísia; (43) Líbia; (44) Egito; (45) Quênia; (46) Madagascar; (47) Maurícia; (48) Israel; (49) Iraque; (50) Irã; (51) Iêmen; (52) Sri Lanka; (53) Nepal; (54) Tailândia; (55) Vietnã; (56) Malásia, (57) Nova Zelândia. Adaptado de LEE et al. (2016).

As enzimas de classe C, conhecidas como AmpC beta-lactamases, são as ACT-1 (*AmpC-beta-lactamase type*), DHA-1 (*Dhahran Hospital in Saudi Arabia*),

CMY-2 (*cephamycin-hydrolyzate beta-lactamase*) e CMY-10 e foram identificadas em *Enterobacteriaceae* (MAMMERI et al., 2010). Geralmente, possuem localização cromossomal, mas também já foram encontradas em plasmídeos (DIESTRA et al., 2011; KIM et al., 2006). São enzimas resistentes a penicilinas, cefalosporinas, mas não a cefalosporinas de quarta geração, como o cefepime (BUSH & FISHER, 2011).

A família das oxacilinases (OXA) faz parte das enzimas da classe D, que são assim chamadas, pois hidrolizam isoxazolilpenicilinas (oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina) (JEON et al., 2015). Apenas algumas variantes, das mais de 300 enzimas da classe D já descritas, possuem efetivamente atividade de carbapenemase. Com base na sua sequência de aminoácidos, elas foram recentemente reclassificadas em 12 subgrupos: OXA-23, OXA-24/40, OXA-48, OXA-51, OXA-58, OXA-134a, OXA-143, OXA-211, OXA-213, OXA-214, OXA-229 e OXA-235 (JEON et al., 2015).

As enzimas da família OXA-48-like (OXA-48, -162, -163, -181, -204, -232 e -370) são as mais prevalentes e possuem uma melhor capacidade de hidrolisar o imipenem (Jeon et al., 2015). A OXA-48 foi identificada pela primeira vez em *K. pneumoniae* na Turquia em 2001 (POIREL et al., 2004) e, atualmente, é observada em diversas regiões do mundo (Figura 4) (LEE et al., 2016). No Brasil, uma nova variante alélica foi descrita, OXA-370, em amostra de *E. hormaechei* isolada no Rio Grande do Sul (SAMPAIO et al., 2014). Recentemente, foi detectada essa mesma variante em três espécies de enterobactérias no Rio de Janeiro (PEREIRA et al., 2015).

Bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases, normalmente, são resistentes a várias classes de antibióticos importantes (ex.: fluoroquinolonas) com isso, antimicrobianos, tais como polimixina B, colistina (polimixina E), fosfomicina e tigeciclina são os agentes de último recurso para o tratamento dos pacientes com infecções causadas por esses patógenos (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Um estudo realizado por Tumbarello e colaboradores demonstrou que a terapia combinada é muitas vezes recomendada para potencializar a morte bacteriana e prevenir o risco de desenvolvimento de resistência. As combinações de carbapenêmicos com tigeciclina e colistina são eficazes no tratamento de infecções causadas *K. pneumoniae* produtoras de KPC. As combinações que incluíram meropenem foram associadas com taxas de sobrevivência significativamente mais elevadas quando as amostras apresentavam CMI ≤ 8 mg/L desse fármaco (TUMBARELLO et al., 2015).

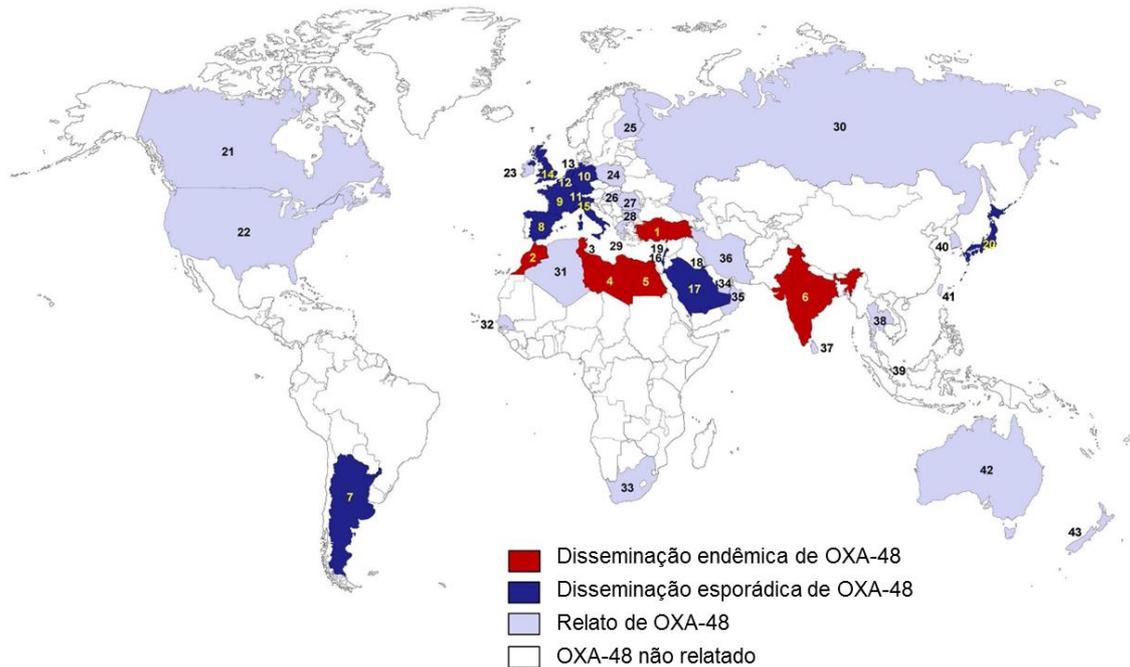


Figura 4. Características epidemiológicas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de OXA-48. (1) Turquia; (2) Marrocos; (3) Tunísia; (4) Líbia; (5) Egito; (6) Índia; (7) Argentina; (8) Espanha; (9) França; (10) Alemanha; (11) Suíça; (12) Bélgica; (13) Países Baixos; (14) Reino Unido; (15) Itália; (16) Israel; (17) Arábia Saudita; (18) Kuwait; (19) Líbano; (20) Japão; (21) Canadá; (22) EUA; (23) Irlanda; (24) Polônia; (25) Finlândia; (26) Hungria; (27) Romênia; (28) Bulgária; (29) Grécia; (30) Rússia; (31) Argélia; (32) Senegal; (33) África do Sul; (34) Emirados Árabes Unidos; (35) Omã; (36) Irã; (37) Sri Lanka; (38) Tailândia; (39) Singapura; (40) Coreia do Sul; (41) Taiwan; (42) Austrália; (43) Nova Zelândia. Adaptado de LEE et al. (2016).

O rápido aumento da prevalência de bactérias Gram-negativas resistentes a fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, bem como a todos os beta-lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, monobactam, cefalosporinas e penicilinas de amplo espectro, levou à reconsideração das polimixinas como uma opção terapêutica válida (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015).

As polimixinas foram descobertas há cerca de 60 anos. Embora existam cinco principais polimixinas (A, B, C, D e E), apenas duas (polimixina B e colistina - polimixina E) são utilizadas na prática clínica. Sua administração sistêmica foi utilizada para tratar infecções causadas por bactérias Gram-negativas durante os anos de 1960 e 1970. No entanto, esses antimicrobianos foram gradualmente dispensados para tratamento na década de 1980, devido a relatos de efeitos tóxicos graves, principalmente, para o rim e sistema nervoso (FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006).

A colistina foi isolada pela primeira vez no Japão em 1947 por Ito-Kagawa e Koyama, de uma bactéria formadora de esporos chamada *Bacillus polymyxa* subsp. *colistinus* encontrada no solo (ITO-KAGAWA; KOYAMA, 1980). Foi utilizada, inicialmente, como uma formulação intravenosa na década de 1950 (LI et al., 2005). Durante as décadas seguintes, a colistina foi utilizada no tratamento de vários tipos de infecções, incluindo diarreias infecciosas e infecções do trato urinário. Além disso, as polimixinas tem sido utilizadas em formulações tópicas para infecções oculares e de ouvidos e em tratamentos de descontaminação seletiva do intestino (FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006). No entanto, as altas taxas de toxicidade associadas ao uso de polimixinas levou à sua substituição por novos antimicrobianos, como gentamicina e carbenicilina, dois agentes mais seguros e eficazes (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015).

A colistina é um antibiótico polipeptídico da família das polimixinas, com massa molecular de 1750 Da, constituído por um heptapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral tripeptídica acilada no terminal N por uma cauda de ácido graxo. A hidrofobicidade do segmento N-terminal de glicol é responsável pela toxicidade inerente e influencia a atividade antimicrobiana da colistina (BRINK et al., 2014).

O efeito bactericida da colistina é extremamente rápido, mas o mecanismo exato pelo qual a colistina pode eliminar células bacterianas não está totalmente elucidado (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015). As bactérias Gram-negativas são caracterizadas pela presença de uma membrana externa. A função protetora da membrana externa baseia-se, principalmente, na presença de constituintes de lipopolissacarídeos (LPS) na superfície da célula, o que limita a penetração de antimicrobianos hidrofóbicos e/ou alto peso molecular. O LPS polianiónico possui carga negativa e confere integridade e estabilidade à membrana externa bacteriana. O mecanismo de ação proposto da colistina sobre as bactérias Gram-negativas ocorre através da seguinte forma: ligação inicial por interações eletrostáticas entre o anel policatiônico de colistina e os componentes da membrana celular externa, causando o deslocamento, de forma competitiva, dos íons cálcio (Ca^{2+}) e magnésio (Mg^{2+}) presentes nos grupos fosfato do LPS, que atuam como estabilizadores de membrana. Desse modo, ocorre a perturbação da membrana e a perda de conteúdos celulares, levando a morte bacteriana (Figura 5) (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015).

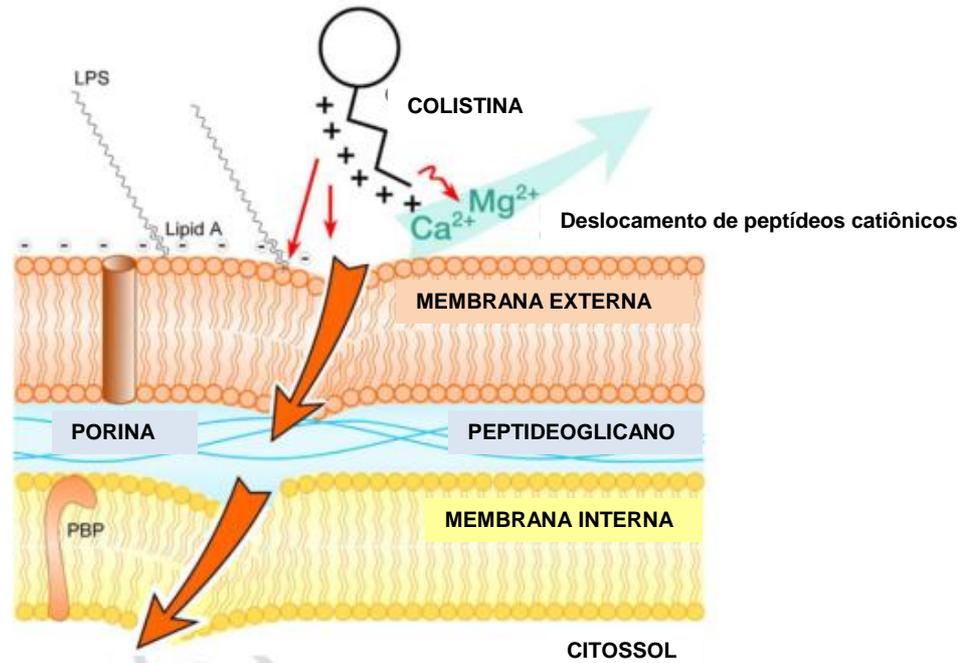


Figura 5: Ação da colistina sobre a membrana bacteriana. A estrutura catiônica da colistina liga-se às moléculas de lipopolissacárido aniônico (LPS) deslocando cálcio e magnésio da membrana celular externa de bactérias Gram-negativas, levando a alterações de permeabilidade no envelope celular e vazamento de conteúdos celulares. Ao ligar-se à porção do lipídeo A do LPS, a colistina também tem uma atividade anti-endotoxina. Fonte: BIALVAEI et al. (2015).

O processo de morte mediada pela colistina não é dependente da atividade metabólica bacteriana e isto pode ser um fator contribuinte para o desenvolvimento lento de resistência. Além de conduzir a uma perda citoplasmática, esta ligação pode ter um efeito neutralizante nas propriedades biológicas das endotoxinas (LANDMAN et al., 2008). A endotoxina de bactérias Gram-negativas é a porção do lipídeo A, onde a colistina se liga promovendo uma neutralização e, diminuindo a capacidade da endotoxina de induzir ao choque através da liberação de citocinas. Porém, esse mecanismo ainda não está totalmente elucidado (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015).

Uma forma de resistência à colistina está relacionada a modificações do LPS através de diversas rotas. É comumente observada a desestabilização da membrana externa devido ao remodelamento de LPS causado por mudanças do sistema de dois componentes PhoPQ e PmrAB. O locus *pmr* é um sistema de transdução de sinal auto-regulado, ao qual, além de ser um sensor-quinase e regulador de resposta, também inclui uma etanolamina transferase. A etanolamina contribui para a resistência à colistina através da sua adição ao lipídeo A, o que reduz a carga negativa da membrana bacteriana e, desse modo, diminui a ligação da colistina, que

apresenta carga positiva (BIALVAEI; SAMADI KAFIL, 2015).

O primeiro relato de um mecanismo de resistência à colistina, mediado por plasmídeo (pHNSHP45) contendo o gene *mcr-1*, foi observado no ano de 2015 na China. Este estudo aconteceu durante um projeto de vigilância sobre a resistência antimicrobiana em animais e alimentos, onde foi observado um grande aumento da resistência à colistina. A partir da análise molecular dessas amostras, o gene *mcr-1* foi detectado em uma amostra de *E.coli* isolada de suíno (LIU et al., 2016). Um estudo recente mostrou que o plasmídeo que transporta o gene *mcr-1* codifica uma enzima fosfoetanolamina transferase, a qual catalisa a adição de fosfoetanolamina ao lípido A (ROSSI et al., 2016b). O primeiro relato brasileiro de um plasmídeo carreando o gene *mcr-1* foi realizado em São Paulo em uma amostra de *E. coli* pertencente ao ST101 (FERNANDES et al., 2016).

Estudos moleculares e bioquímicos demonstraram que a inativação insercional do gene *mgrB*, que codifica um regulador de feedback negativo do sistema de sinalização PhoPQ, pode ser responsável pela resistência à colistina em *K. pneumoniae* (CANNATELLI et al., 2014).

Um estudo de revisão realizado por Lee e colaboradores (2016) mostrou que o surgimento de resistência à colistina em *K pneumoniae* produtoras de KPC tem sido relatada em muitos países, incluindo Itália, EUA, Grécia, Hungria e Turquia. Um estudo nacional foi realizado entre 2010 e 2014 com 33.765 bacilos Gram-negativos provenientes de 9 hospitais de São Paulo. Essas amostras foram testadas quanto à resistência à colistina e observou-se que 4% (1.346 isolados) das amostras foram resistentes à colistina, com CMI's variando de 2 a > 32 mg/L. Neste estudo, verificou-se uma tendência do aumento das taxas de resistência à colistina entre os membros da família *Enterobacteriaceae*, de 6,6% (111 isolados) em 2010 para 9,4% (383 isolados) em 2014 (ROSSI et al., 2016a).

A resistência adquirida a colistina já foi relatada em algumas enterobactérias, porém, alguns micro-organismos como *Proteus* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Edwardsiella tarda* possuem resistência intrínseca à esse fármaco (FALAGAS; KASIAKOU, 2005).

A tigeciclina, um derivado da minociclina, é o primeiro membro da classe das glicilciclina e atua como um inibidor da síntese protéica ao bloquear a interação do aminoacil-tRNA com o sítio A do ribossomo (ROSE; RYBAK, 2006). Um estudo de revisão realizado no ano de 2005, demonstrou que a tigeciclina foi muito eficaz contra

bactérias resistentes a outras classes de antimicrobianos, incluindo as quinolonas e os beta-lactâmicos (PANKEY, 2005). Porém, devido ao uso aumentado da tigeciclina para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC, vem sendo observado um aumento da resistência à tigeciclina (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2014). Estudos epidemiológicos envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de KPC realizados na Grécia demonstraram um aumento das taxas de resistência à tigeciclina, de 11,3% (34/301) no período de 2004 a 2010 (ZAGORIANOU et al., 2012) para 17,9% (39/257) em 2014 (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados em Roma por Capone e colaboradores no período de 2010 a 2011, onde 20,4% (21/97) das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC apresentaram resistência à tigeciclina. No Brasil, um estudo realizado por Bartollete e colaboradores (2016) com 62 amostras de *K. pneumoniae* resistentes à carbapenêmicos, isoladas no período de 2014 à 2015, demonstrou que 27,8% das amostras foram resistentes a tigeciclina (BARTOLLETTI et al., 2016)

A hiperprodução de bombas de efluxo, como a AcrAB e a superexpressão de *ramA*, um regulador positivo do sistema de efluxo AcrAB, parecem ser os principais fatores para a diminuição da sensibilidade de amostras de *K. pneumoniae* à tigeciclina (SUN et al., 2013).

2.4 Epidemiologia das infecções causadas por *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos

A resistência bacteriana aos antimicrobianos tornou-se uma importante fonte de preocupação para a saúde pública. As enterobactérias estão entre os patógenos humanos mais comuns e a resistência das espécies dessa família aos carbapenêmicos tem sido cada vez mais relatada em âmbito mundial desde a sua primeira identificação há mais de 20 anos (NORDMANN, 2014).

De acordo com Nordmann e Poirel (2014), as principais características que favorecem a disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases são: alta densidade populacional, falta de higiene, pressão seletiva relacionada ao uso excessivo ou mau uso de antimicrobianos e mobilidade populacional (NORDMANN; POIREL, 2014).

As metodologias de tipagem molecular, que se baseiam em diferenças na sequência ou na organização do DNA genômico tem sido muito utilizadas para a identificação dos clones circulantes. A metodologia de padrão de fragmentação do DNA cromossômico e separação em gel por eletroforese de campo pulsado (PFGE) é uma técnica muito utilizada para a tipagem de diversas espécies bacterianas. Porém, baseia-se em padrões de fragmentação de banda de DNA em gel de agarose e é de difícil comparação inter-laboratorial. Sendo assim, a metodologia do *multilocus sequence typing* (MLST), que tem por base a análise de sequências de genes conservados do DNA bacteriano e não em padrões de bandas, é capaz de fornecer resultados que podem ser comparados com estudos em qualquer região do mundo, sem envolver critérios interpretativos. Desse modo, essa metodologia é mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de amostras não relacionadas geograficamente (VIMONT et al., 2008).

Um amplo estudo de revisão, realizado por Munoz-Price et al. (2013), demonstrou que infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC estão intimamente relacionadas aos membros do complexo clonal 258 (CC258), que é predominante em várias partes do mundo (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

O ST11, que pertence ao CC258, foi um dos primeiros genótipos pandêmicos de *K. pneumoniae* identificados (DAMJANOVA et al., 2008). Amostras com ST11 abrigam uma ampla gama de carbapenemases, incluindo KPC, NDM, OXA-48, VIM e IMP (PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015). Um estudo molecular foi realizado entre 2012 a 2013 com 54 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de NDM na Polônia. Os autores demonstraram que todos os 16 isolados de diferentes pulsotipos que foram submetidos ao MLST pertenciam ao ST11, indicando a disseminação local desta linhagem (BARANIAK et al., 2016). Na Espanha, um grande surto foi iniciado em 2013 por uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de OXA-48, pertencente ao ST11. Essa amostra foi, primeiramente, isolada de uma paciente idosa em um pronto socorro. Em seguida, a amostra foi gradualmente sendo disseminada em todo o hospital, afetando 44 pacientes internados em diferentes setores (BRANAS et al., 2015). Outro estudo sobre a epidemiologia molecular de enterobactérias produtoras de OXA-48 nos países europeus e norte-africanos, realizado entre 2001 e 2011, indicou que o ST101 era o mais comumente observado em isolados de *K. pneumoniae*, seguido por ST395 e ST15 (POTRON et al., 2013).

A Figura 6, apresenta os principais genótipos de *K. pneumoniae*

disseminados em todo mundo. O CC258, conhecido por sua ampla disseminação, é composto por 43 STs, entre eles, 16 possuem um único alelo *tonB* em comum (*tonB*-79), que é principalmente encontrado no ST258 e em seus “*single locus variant*” (SLV). Filogeneticamente, os membros do CC258-*tonB*79 estão estreitamente relacionados (Figura 7) (CHEN et al., 2014).

No Brasil, foi realizado um estudo epidemiológico envolvendo 113 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC provenientes de diversas regiões. Esse trabalho demonstrou a prevalência do ST437, ST340 e ST11. O ST11 e ST340 foram encontrados nas regiões Centro-Oeste, Sudeste e Nordeste (ST11 no CE, DF, GO, MG, PE, RJ e ST340 em AL, DF, ES, PI). Já o ST437, foi encontrado nas regiões Sul (SC), Sudeste (ES e RJ) e Nordeste (CE) (PEREIRA et al., 2013). Outro estudo brasileiro foi realizado por Andrade e colaboradores (2014) com sete amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, quinolonas e polimixina B, isolados de um hospital de São Paulo, no período de dezembro de 2012 a fevereiro de 2013. As sete amostras foram caracterizadas como ST11 e apresentaram os genes de resistência *bla*_{KPC-2}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{OXA-9} e *qnrS* (ANDRADE et al., 2014).

Um estudo de revisão mostrou que o ST258 é frequentemente observado em países europeus e nos EUA (LEE et al., 2016). Já o ST11 é, predominantemente, associado com a disseminação de *K. pneumoniae* produtora de KPC na Ásia, particularmente, na China (YANG et al., 2013) e Taiwan (TSENG et al., 2015). Munoz-Price e colaboradores (2013) descreveram amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC pertencentes ao ST11 também em diversos países da América Latina.

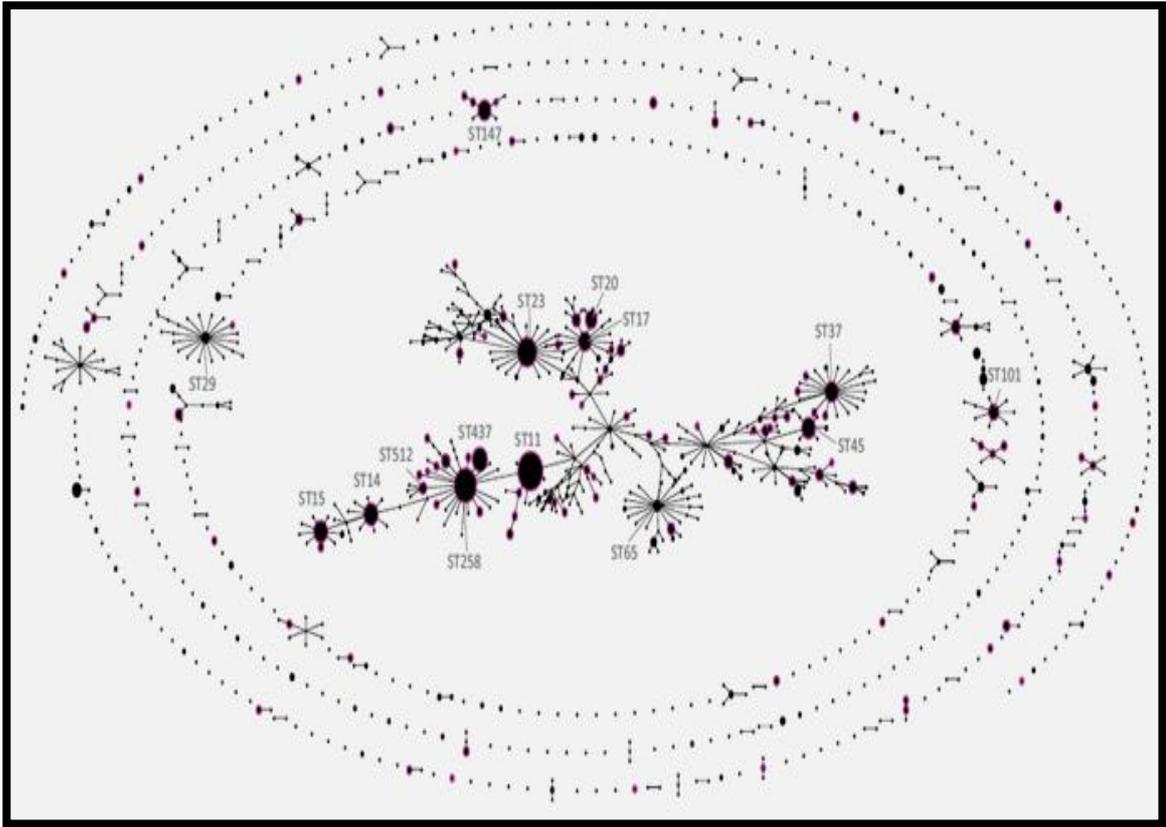


Figura 6: Figura representativa da estrutura populacional de *Klebsiella pneumoniae* através de “multilocus sequence typing” (MLST), representada graficamente pelo eBURST. Fonte: CHEN et al. (2014).

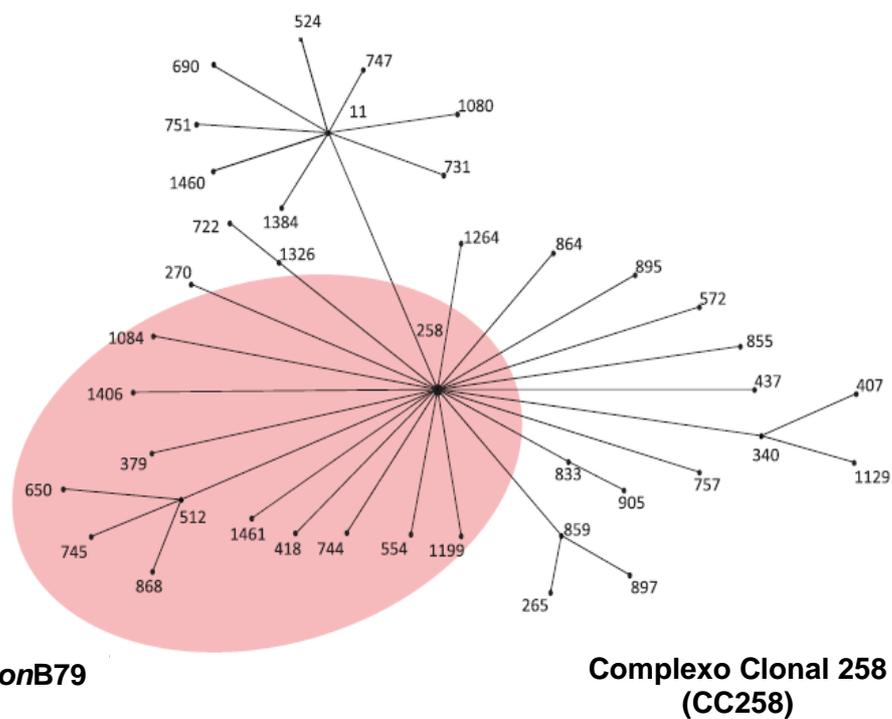


Figura 7: Estrutura populacional do complexo clonal 258. O sombreado rosa destaca os STs do cluster CC258-tonB79. Fonte: CHEN et al. (2014).

Desta forma, por tudo anteriormente exposto, a relevância do nosso estudo está associada com a crescente disseminação e carência de dados epidemiológicos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos em nossa região. Devido ao fato das infecções causadas por essas bactérias serem de difícil tratamento, a detecção precoce da resistência antimicrobiana, caracterização dos genes de resistência e o controle da disseminação destes micro-organismos no ambiente hospitalar são de grande relevância para as Instituições de saúde.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais:

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos, detectar os genes de resistência aos beta-lactâmicos e analisar o polimorfismo genético das amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos isoladas de pacientes atendidos em hospitais da Grande Vitória-ES.

3.2 Objetivos específicos:

- Determinar o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos utilizados na rotina clínica das amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos;
- Detectar genes que codificam as principais beta-lactamases através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR);
- Avaliar o polimorfismo genético das amostras de *Enterobacteriaceae* através da técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE);
- Identificar o *sequence type* das amostras de *K. pneumoniae* através da técnica de *multilocus sequence typing* (MLST).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos e amostras bacterianas

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo sob parecer nº 707.303 de 30/07/2014.

Os micro-organismos do presente estudo foram isolados durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa “Epidemiologia molecular e investigação de genes de resistência em bactérias multirresistentes isoladas em hospitais da Grande Vitória”, financiado pelo EDITAL CNPQ/MS-Decit/SESA/FAPES Nº 10/2013 – PPSUS. Esse trabalho foi realizado em colaboração com o Laboratório Central do Espírito Santo (LACEN-ES) da Secretária Estadual de Saúde (SESA).

O LACEN recebe amostras bacterianas de hospitais de todo Estado do Espírito Santo e, particularmente para esse estudo, as amostras de enterobactérias detectadas como não susceptíveis aos carbapenêmicos (imipenem, ertapenem ou meropenem) através do teste de difusão a partir do disco e/ou na determinação da concentração mínima inibitória (CMI) foram enviadas ao Laboratório de Biologia Molecular e Virulência Bacteriana do Departamento de Patologia – UFES para o desenvolvimento do presente trabalho.

Após o envio ao nosso laboratório, as amostras foram transferidas para o meio ágar-sangue (Plast Labor, Brasil) e incubadas a 35°C, por até 48 horas, para análise da pureza e, em seguida, estocadas a -20°C em meio TSB (caldo de soja triptona, Himedia, Índia) acrescido de 20% de glicerol para os testes descritos a seguir.

Foram incluídas neste estudo 67 amostras, sendo 47 de *Klebsiella pneumoniae*, 14 de *Serratia marcescens*, quatro de *Enterobacter cloacae*, uma amostra de *Citrobacter freundii* e uma de *Enterobacter gergoviae* provenientes de diversos materiais clínicos de pacientes atendidos em hospitais públicos e privados da Grande Vitória no período entre abril e novembro de 2014.

4.2 Testes de susceptibilidade aos antimicrobianos

a) Teste de difusão a partir do disco (*Brazilian Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing – BrCAST, 2016 e Clinical and Laboratory Standards Institute – CLSI, 2016*)

A fim de determinar o perfil de susceptibilidade das 67 amostras de *Enterobacteriaceae*, foram testados, pelo método de difusão a partir do disco, 25 antimicrobianos distintos preconizados pelo CLSI (2016). Os antimicrobianos testados foram: ampicilina (10µg), piperacilina (30µg), cefazolina (30µg), ceftazidima (30µg), ceftazidima (30µg), cefepime (30µg), cefotaxima (30µg), aztreonam (30µg), meropenem (10µg), ertapenem (10µg), imipenem (10µg), gentamicina (10µg), tobramicina (10µg), amicacina (30µg), levofloxacina (5µg), ciprofloxacina (5µg), sulfametoxazol/trimetropim (25µg), tetraciclina (30µg), amoxicilina-clavulanato (30µg), piperacilina-tazobactam (110µg), ticarcilina-clavulanato (85µg), cloranfenicol (30µg), norfloxacina (10µg), ofloxacina (5µg), nitrofurantoina (300µg).

O procedimento iniciou-se com a semeadura das amostras em ágar sangue e incubação a 35 °C durante 18-24 h. Posteriormente, as colônias foram suspensas em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland, correspondendo a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Esta solução, por sua vez, foi semeada em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories, EUA), com o auxílio de um *swab* a fim de se obter um crescimento homogêneo em toda superfície do ágar. Em seguida, os discos de antimicrobianos foram colocados sobre o meio de cultura. Após 18-24 horas de incubação a 35 °C foi realizada a leitura do teste. Para a interpretação dos testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram utilizados os critérios preconizados no BrCAST, 2016, exceto para os antimicrobianos, cefazolina, amoxicilina-clavulanato, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato e tetraciclina, que foram usados critérios de acordo com o CLSI, 2016.

A amostra padrão *E. coli* ATCC 25922 foi utilizada como controle do teste.

b) Teste de determinação da concentração mínima inibitória (CMI):

Para as amostras de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, a determinação das CMIs foi realizada pelos testes de gradiente com fitas com concentrações

crescentes dos antimicrobianos: E-test[®] (Biomérieux, França) e M.I.C.E[®] (Oxoid, Reno Unido). Para os antimicrobianos ertapenem, colistina e polimixina B foi utilizado o E-test[®] enquanto que para o imipenem, meropenem, tigeciclina e amicacina foi utilizado o M.I.C.E[®]. Foram seguidos os critérios interpretativos preconizados pelo BrCAST, 2016.

O procedimento iniciou-se com a semeadura das amostras em ágar sangue e incubação a 35 °C durante 18-24 h. Posteriormente, as colônias foram suspensas em solução salina 0,9% (p/v) até atingir um padrão de turvação de 0,5 da escala McFarland, correspondendo a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Esta solução, por sua vez, foi semeada em ágar Müeller-Hinton (Difco Laboratories), com o auxílio de um *swab* a fim de se obter um crescimento homogêneo em toda superfície do ágar. Em seguida, foram colocadas as fitas com concentrações crescentes de cada antimicrobiano sobre o meio de cultura. Após o período de incubação (18-24 horas a 35 °C), a leitura foi realizada para determinação da CMI, que foi obtida com o ponto de intersecção entre a fita e a zona de inibição do crescimento do micro-organismo, que assume a forma elíptica.

A determinação das CMIs através da microdiluição em caldo, segundo CLSI (2016), foi realizada nas amostras de *E. cloacae*, *E. gergoviae* e *C. freundii* para os antimicrobianos tigeciclina (Sigma, EUA), polimixina B (Sigma), colistina (Sigma), imipenem (Sigma), ertapenem (Sigma), meropenem (Sigma) e amicacina (Sigma). Polimixina B e colistina não foram utilizados para determinação das CMIs nas amostras de *S. marcescens*, pois as mesmas possuem resistência intrínseca.

As amostras bacterianas foram, inicialmente, semeadas em ágar-sangue, por 18-24h, a 35°C. O crescimento antimicrobiano foi, então, dissolvido em solução salina 0,9% (p/v) para obtenção do padrão de turvação 0,5 da escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Em seguida, foi realizada uma diluição 1:20 (v/v) em solução salina 0,9%, para se conseguir uma concentração de 5×10^6 UFC/mL. Posteriormente, essa suspensão foi inoculada no caldo Mueller-Hinton cátion ajustado (Difco Laboratories), a fim de se obter uma concentração final de 5×10^5 UFC/mL. A partir de então, foram inoculadas em microplacas com 96 poços contendo concentrações crescentes do antimicrobiano, variando de 0,125 a 32 µg/mL. Posteriormente, as placas foram incubadas por 18h à 35°C. A leitura do teste foi realizada de acordo com os valores do BrCAST (2016). Foi utilizada a amostra *E. coli* ATCC 25922 como controle do teste.

4.3 Detecção dos genes codificadores de resistência através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA bacteriano foi extraído utilizando o “Kit Wizard® Genomic DNA Purification” de acordo com as informações do fabricante (Promega, EUA). O DNA extraído foi mantido a 4°C para realização de testes moleculares.

Após a extração do DNA, foram realizadas reações de PCR multiplex e simples, para a detecção das sequências gênicas. As reações foram realizadas de acordo com os trabalhos de Dallene e colaboradores (2010) para todos os genes pesquisados, exceto para o gene *bla_{NDM}* que foi feita segundo Poirel e colaboradores (2011). A técnica descrita por Dallene e colaboradores (2010) permite, através de reações de PCR-multiplex, investigar a presença das principais beta-lactamases produzidas por bactérias Gram-negativas e foi desenvolvida a partir do alinhamento e similaridade entre as variantes do mesmo grupo de enzimas.

As condições específicas para a detecção dos genes estão descritas na Tabela 2.

A mistura da reação de PCR para detecção de cada um dos genes foi preparada em um volume final de 50 µL, contendo 1 µL de DNA (~25 ng), tampão da enzima (10 mM Tris-HCL, 50 mM KCl, pH 8.3), 25 mM de MgCl₂, os oligonucleotídeos iniciadores nas concentrações descritas na Tabela 2, 200 µM de cada deoxinucleotídeos trifosfatados (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Thermo Scientific, EUA) e 2U de Taq DNA polimerase (Thermo Scientific).

A amplificação dos fragmentos foi realizada em um termociclador (Veriti – Applied Biosystems, Life Technologies, Estados Unidos). Para as condições de amplificação foram utilizados: 10 minutos a 94°C para desnaturação inicial, seguido de 30 ciclos de 40 segundos a 94°C para desnaturação, 40 segundos na temperatura de anelamento ótima para cada reação, segundo descrito na Tabela 2, e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 7 min a 72°C.

Após a amplificação, os produtos das PCRs foram analisados em eletroforese de gel de agarose a 1,5% em tampão TBE 0,5X (Tris 0,89 M, ácido bórico 0,89 M, EDTA 2,5 mM, pH 8,2). Após corrida eletroforética (6V/cm), o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem foi

capturada por um fotodocumentador (MiniBIS Pro, Uniscience, Brasil). Como marcador de tamanho molecular foi utilizado o 100 pb DNA *ladder* (Invitrogen, EUA).

Tabela 2: Condições específicas para a detecção dos genes utilizados nas reações de PCR multiplex e simples.

PCR	Genes alvos	T.A*	Tamanhos dos produtos (pb)	Concentração de cada <i>primer</i> (µM)
Multiplex I	- variantes TEM (incluindo TEM-1 e TEM-2)	60° C	800	0,4 For 0,4 Rev
	- variantes SHV		713	0,4 For 0,4 Rev
	- OXA-1-like (OXA-1, OXA-4, OXA-30)		564	0,4 For 0,4 Rev
Multiplex II	- CTX-M grupo1 (incluindo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-15)	60° C	689	0,4 For 0,4 Rev
	- CTX-M grupo2		404	0,2 For 0,2 Rev
	- CTX-M grupo9		561	0,4 For 0,4 Rev
Multiplex III	- GES (GES 1 a 9)	57° C	399	0,4 For 0,4 Rev
	- OXA48-LIKE		281	0,4 For 0,4 Rev
Multiplex IV	- variantes IMP (exceto IMP-9, IMP-16, IMP-22, IMP-25)	55° C	139	0,5 For 0,5 Rev
	- variantes VIM		390	0,5 For 0,5 Rev
	- KPC (KPC 1 a 5)		538	0,2 For 0,2 Rev
CTX-M- gp _{8\25}	- CTX-M grupo 8\25 (CTX-M-8, CTX-M-25, CTX-M- 26, CTX-M-39, CTX-M-41)	60° C	326	0,4 For 0,4 Rev
NDM	- NDM1	52° C	621	0,5 For 0,5 Rev

* - Temperatura de anelamento.

4.4 Análise do padrão de fragmentação do DNA cromossômico das amostras com uso das enzimas de restrição *Xba*I e *Sma*I e separação em gel por eletroferese de campo pulsado (PFGE)

A análise do polimorfismo genético das amostras incluídas no estudo foi realizada através da fragmentação do DNA genômico e eletroforese em gel de

campo pulsado utilizando a enzima de restrição *Xba*I (Thermo Scientific) para todas as enterobactérias, exceto *S. marcescens* cuja enzima de restrição utilizada foi a *Sma*I (Sigma) (DURMAZ et al., 2009).

Para a extração de DNA total, as amostras foram semeadas em ágar sangue e incubados a 35°C por 24 horas. Após obter um crescimento bacteriano puro, as colônias foram suspensas em 1 mL de tampão CSB (EDTA 0,5M, TRIS-HCl 1M pH 8) até atingir um padrão de turvação 4,0 da escala McFarland. Em seguida, 200 µL da suspensão foram transferidos para um microtubo e foram adicionados à suspensão de células, 200 µL de agarose a 2% em CSB (agarose *low melting* Promega, EUA) e SDS 1% (Sigma). A mistura foi homogeneizada e distribuída em moldes.

Após a solidificação dos blocos de agarose contendo DNA bacteriano (plugs), os mesmos foram transferidos para tubos plásticos descartáveis e estéreis contendo 500 µL de solução CLS-1 (EDTA 0,5M pH 8, TRIS-HCl 1M pH 8), 25 µL Lisozima (50 mg/µL) e 15 µL de Proteinase K (50 mg/µL) e incubados a 37°C por 1 hora. Após a incubação, foi removida a solução de lise e adicionados 500 µL da solução CLS-2 (EDTA 0,5M e Sarcozil) e, em seguida, adicionados 4 µL de Proteinase K (50 mg/µL) e incubado a 55°C por 2 horas. Logo após, foi retirada toda a solução de lise e os blocos foram lavados três vezes com 2 mL de água ultra pura estéril pré-aquecida (50°C), homogeneizado e incubado por 15 minutos a 50°C e três vezes com 2 mL de tampão TE pH 7,6 (TRIS-HCl 1M pH 7,5 e EDTA 0,5M pH 8, com ajuste do pH final para 7,6) a 50°C por 15 minutos. Foi removida toda a solução de lavagem e adicionados 3 mL de tampão TE pH 7,6.

Para a realização da digestão enzimática, um fragmento correspondente a um terço de um bloco foi transferido para um microtubo contendo 100 µL da solução tampão da enzima de restrição com BSA (1X) e incubada a 37°C por 30 minutos. Após a incubação, o tampão foi removido e adicionou-se 90 µL de água ultra pura estéril, 10 µL de solução tampão 10X da enzima de restrição e 4 µL da enzima *Xba*I\ *Sma*I (40 U). Em seguida, foram incubadas a 37°C por 2 horas. Os fragmentos de restrição foram separados em gel de agarose 1% (Biorad - EUA) preparada em TBE 0,5X (Tris Borato EDTA), através de eletroforese de campo pulsado, utilizando o sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, EUA). Foram utilizadas as seguintes condições para a eletroforese: tempo de pulso crescente de 5 a 30 segundos, por 20 horas a 6 V/cm, na temperatura de 14°C. Foi utilizado como padrão de tamanho molecular o

marcador 50 - 1.000 kb *Lambda Ladder PFGE Marker* (New England Biolabs) nas corridas de eletroforese em gel de agarose. Em seguida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience, Brasil).

A análise dos genótipos foi realizada através de inspeção visual e foram classificadas de acordo com os critérios de Van Belkum e colaboradores (2007), sendo consideradas amostras do mesmo pulstipo com até quatro bandas de diferença.

4.5 Análise do polimorfismo genético através de *multilocus sequence typing* (MLST)

a) Amplificação por PCR

De acordo com a análise dos dados obtidos por PFGE, foram selecionadas amostras representativas dos pulstipos prevalentes de *K. pneumoniae* e também amostras que apresentaram-se resistentes à colistina, polimixinaB e/ou tigeciclina para serem processadas pelo MLST para a definição do “sequence typing”(ST).

Tabela 3. Oligonucleotídeos iniciadores específicos e genes alvos utilizados para realização das reações de PCR da técnica de *multilocus sequence typing* de *Klebsiella pneumoniae*.

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados	Amplicon (pb)
<i>rpoB</i>	rpoB : F : Vic3 GGCGAAATGGCWGAGAACCA	501
	rpoB : R : Vic2 GAGTCTTCGAAGTTGTAACC	
<i>gapA</i>	gapA : F : 173 TGAAATATGACTCCACTCACGG	450
	gapA : R : 181 CTTCAGAAGCGGCTTTGATGGCTT	
<i>mdh</i>	mdh : F : 130 CCCAACTCGCTTCAGGTTTCAG	477
	mdh : R : 867 CCGTTTTTCCCCAGCAGCAG	
<i>pgi</i>	pgi : F : 1R GAGAAAAACCTGCCTGTACTGCTGGC	432
	pgi : R : 1F CGCGCCACGCTTTATAGCGGTTAAT	
<i>phoE</i>	phoE : F :604.1 ACCTACCGCAACACCGACTTCTTCGG	420
	phoE : R :604.2 TGATCAGAACTGGTAGGTGAT	
<i>infB</i>	infB : 1F CTCGCTGCTGGACTATATTCG	318
	infB : 1R CGCTTTCAGCTCAAGAACTTC	
<i>tonB</i>	tonB : 1F CTTTATACCTCGGTACATCAGGTT	414
	tonB : 2R ATTCGCCGGCTGRGCRGAGAG	

A PCR para detecção desses genes foi preparada em um volume final de 25 µL contendo 1 µL de DNA cromossômico contendo, aproximadamente, 25 ng (extraído conforme tópico 4.3) e 20 pmoles de cada oligonucleotídeo iniciador. Para as condições de amplificação dos genes *rpoB*, *infB*, *mdh*, *pgi*, *phoE* foram utilizados 35 ciclos de 2 minutos a 94°C, 20 segundos a 94°C, para desnaturação, 30 segundos a 50°C para anelamento e 30 segundos a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 5 min a 72°C. Para os genes *tonB* e *gapA* as temperaturas de anelamento utilizadas foram 45°C e 60°C, respectivamente.

Após a amplificação por PCR, a quantificação aproximada dos fragmentos gerados foi realizada através de eletroforese em gel de agarose (Invitrogen) a 2% em TBE 0,5X, utilizando como marcador o *Low DNA Mass ladder* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 6V/cm, por 1 hora. Após a corrida, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 µg/mL) (Hexapur, Holanda) e sua imagem foi capturada em fotodocumentador ultravioleta (MiniBIS Pro, Uniscience, Brasil).

b) Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados através do “kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System” (Promega, EUA). Para o sequenciamento, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados foram os mesmos usados para a reação de amplificação, exceto para os genes *infB* e *pgi*, indicados na Tabela 4 (DIANCOURT et al., 2005).

Tabela 4: Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para o sequenciamento dos genes *pgi* e *infB* do *multilocus sequence typing* de *Klebsiella pneumoniae*.

Gene alvo	Oligonucleotídeos iniciadores	Amplicon (pb)
<i>pgi</i>	<i>pgi</i> : 2FCTGCTGGCGCTGATCGGCAT	420
	<i>pgi</i> : 2R TTATAGCGGTTAATCAGGCCGT	
<i>infB</i>	<i>infB</i> : 2 ACTAAGGTTGCCTCCGGCGAAGC	318

Os produtos purificados foram sequenciados no sequenciador ABI 3730 *DNA Analyser* (Life Technologies - Applied Biosystems), do Centro de Pesquisas sobre o Genoma Humano e Células-Tronco, no setor de sequenciamento de DNA na

Universidade de São Paulo (USP).

A análise das sequências obtidas foi realizada com auxílio do software Chromas (versão 2.6.1). Para a análise da composição das sequências obtidas foi utilizado o *BioEdit Sequence Alignment Editor* (versão 7.2.5). Posteriormente, essas sequências foram comparadas com as sequências já disponíveis no banco de dados de MLST de *K. pneumoniae* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) para a determinação de cada um dos números dos alelos e, conseqüentemente, a descrição de cada ST.

5 RESULTADOS

5.1 Amostras bacterianas

As 67 amostras de enterobactérias foram provenientes de 16 hospitais (11 públicos e cinco privados) da Grande Vitória, sendo 56 de hospitais públicos (83,6%) e 11 (16,4%) de hospitais privados. Foram analisadas seis diferentes espécies de enterobactérias, sendo *K. pneumoniae* a mais prevalente (70,15%, n=47), seguida por *S. marcescens* (20,9%, n=14), conforme demonstrado na Tabela 5. As amostras bacterianas foram isoladas de diferentes materiais clínicos, sendo a maioria proveniente de sangue (23,8%) e urina (22,4%).

Tabela 5: Espécies, fonte de isolamento e tipo de hospital de isolamento das 67 enterobactérias analisadas neste estudo.

Espécies (nº de amostras)	Fonte de isolamento (nº de amostras)	Hospital (nº de amostras)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (47)	Urina (13)	11 Hospitais Públicos (40)
	Sangue (12)	05 Hospitais Privados (7)
	Ponta de catéter (7)	
	Secreções (5)	
	Aspirado traqueal (2)	
	Swab retal (3)	
	Abscesso hepático (1)	
	Fragmento ósseo (1)	
	Líquido peritoneal (1)	
	Swab de ferida (1)	
	Swab nasal (1)	
<i>Serratia marcescens</i> (14)	Ponta de catéter (4)	06 Hospitais Públicos (13)
	Sangue (3)	01 Hospital Privado (1)
	Aspirado traquel (2)	
	Fragmento ósseo (1)	
	Líquor (1)	
	Líquido peritoneal (1)	
	Swab de ferida sacral (1)	
<i>Enterobacter cloacae</i> (4)	Swab retal (3)	02 Hospitais Públicos (3)
	Urina (1)	01 Hospital Privado (1)
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	Secreção de abscesso (1)	01 Hospital Privado (1)
<i>Enterobacter gergoviae</i> (1)	Sangue (1)	01 Hospital Privado (1)

5.2 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

A Figura 8 apresenta os perfis de susceptibilidade obtidos pelo teste de difusão a partir do disco para os 25 antimicrobianos. Todas as 47 amostras de *K. pneumoniae* apresentaram resistência plena às penicilinas testadas (piperacilina e ampicilina). No que se refere a classe dos carbapenêmicos (imipenem, ertapenem e meropenem), todas as amostras foram plenamente resistentes ou apresentaram resistência intermediária ao ertapenem, enquanto que para o imipenem e meropenem, 32 (68,0%) e 37 (78,7%) foram resistentes (resistência plena ou intermediária), respectivamente.

Em relação às cefalosporinas, todas as amostras foram resistentes à cefazolina e cefepime, 78,7% à cefoxitina e 93,6% à ceftazidima. Das 47 amostras, acima de 85% foram resistentes aos antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas (levofloxacina, ciprofloxacina e norfloxacina). Em relação à tetraciclina, 66% (31\47) foram resistentes a esse fármaco. Entre as amostras resistentes aos antimicrobianos beta-lactâmicos com presença de inibidor de beta-lactamase, 46 (97,9%) foram resistentes à amoxicilina-clavulanato, 44 (93,6%) resistentes à piperaciclina-tazobactam e 100% resistentes à ticarcilina-clavulanato. Em relação aos outros agentes antimicrobianos, 44 (93,6%) amostras foram resistentes à ofloxacina, 34 (72,3%) amostras foram resistentes ao cloranfenicol, 35 (74,5%) amostras foram resistentes à nitrofurantoina e 43 (91,5%) amostras foram resistentes ao trimetoprima-sulfametoxazol. Do total das amostras, 17 (36,2%) foram resistentes à ampicilina, 29 (61,7%) resistentes à gentamicina e 40 (85,1%) resistentes à tobramicina. Das 47 amostras testadas, 46 (97,9%) foram resistentes ao aztreonam.

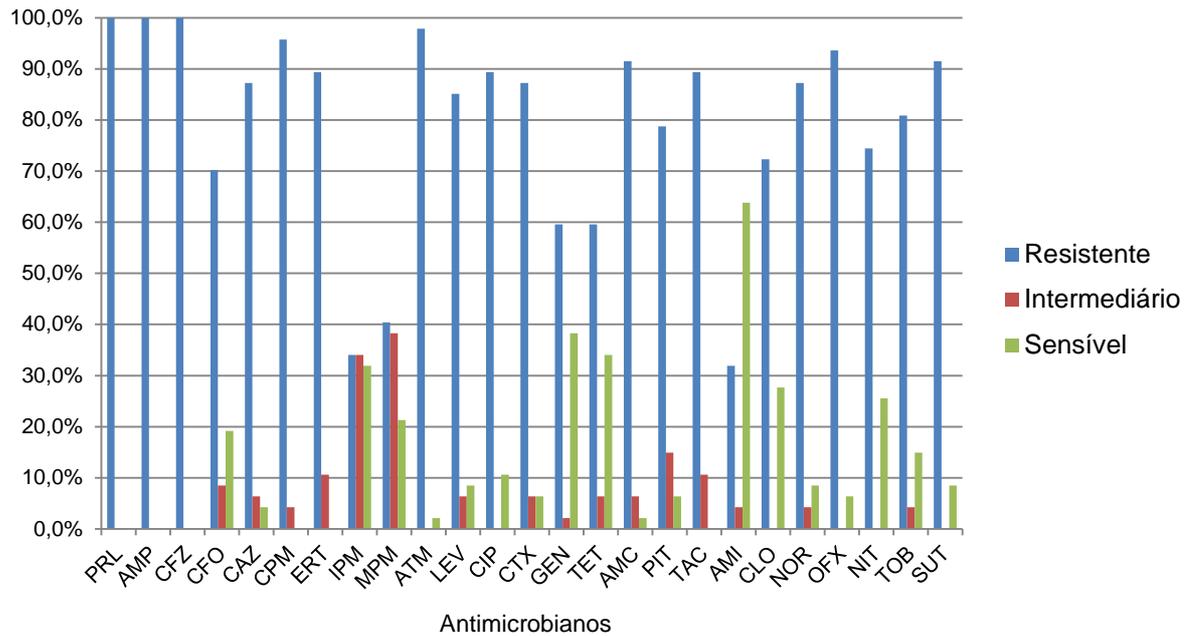


Figura 8: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae* deste estudo. PRL – Piperacilina; AMP – Ampicilina; CFZ – Cefazolina; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; ATM – Aztreonam; LEV – Levofloxacina; CIP – Ciprofloxacina; CTX – Cefotaxima; GEN – Gentamicina; TET – Tetraciclina; AMC – Amoxicilina-clavulanato; PIT – Piperacilina-tazobactam; TAC – Ticarcilina-clavulanato; AMI – Amicacina; CLO – Cloranfenicol; NOR – Norfloxacina; OFX – Ofloxacina; NIT – Nitrofurantoina; TOB – Tobramicina; SUT – Trimetoprima-sulfametoxazol.

Entre as 14 amostras de *S. marcescens* foi encontrado um percentual de resistência superior a 90% em relação aos antimicrobianos piperacilina, ampicilina, cefazolina, cefoxitina e ticarcilina-clavulanato (Figura 9). Todas as amostras foram resistentes à tetraciclina e à norfloxacina. Apenas duas amostras (14,3%) foram resistentes à amicacina, enquanto que todas as amostras foram sensíveis à gentamicina. Do total de amostras analisadas, 11 (78,6%) foram resistentes à cefepime e à levofloxacina, seis (42,8%) à ciprofloxacina, 13 (92,9%) à amoxicilina-clavulanato, 12 (85,7%) à nitrofurantoina, 12 (85,7%) à piperacilina-tazobactam, sete (50%) ao trimetoprim-sulfametoxazol, 12 (85,7%) ao aztreonam e 13 (92,9%) à ofloxacina.

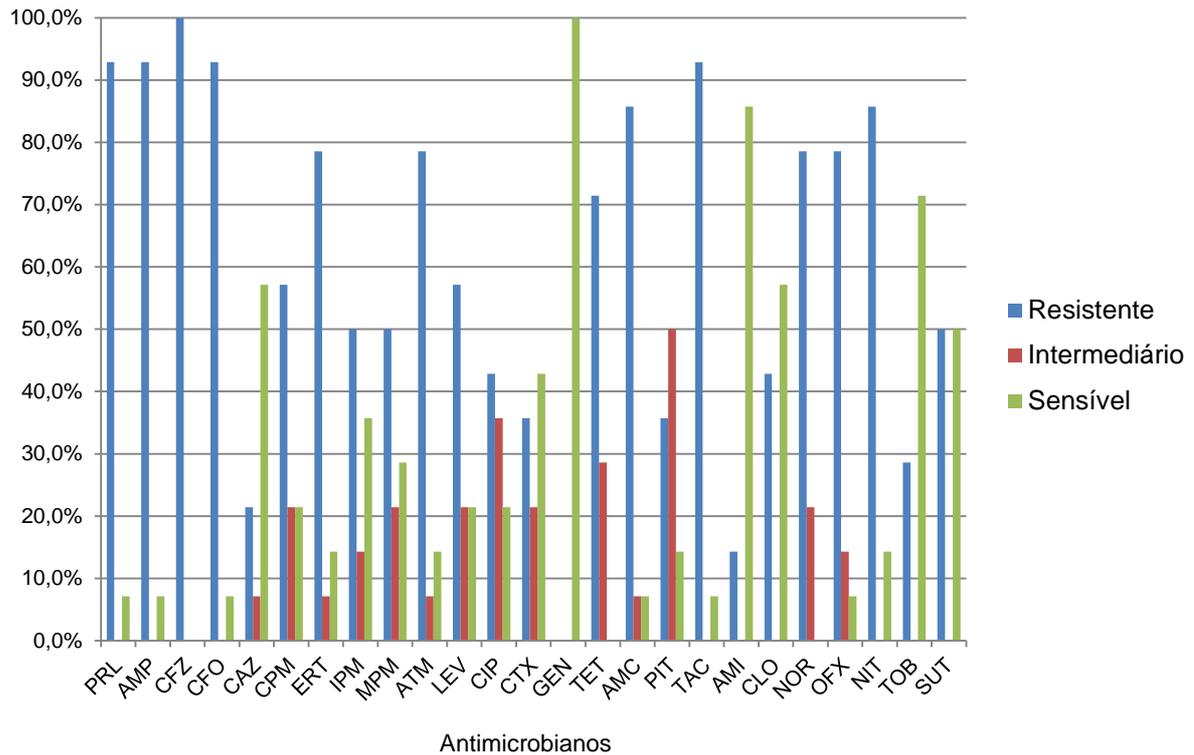


Figura 9: Perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 14 amostras de *Serratia marcescens* deste estudo. PRL – Piperacilina; AMP – Ampicilina; CFZ – Cefazolina; CFO – Cefoxitina; CAZ – Ceftazidima; CPM – Cefepima; ERT – Ertapenem; IPM – Imipenem; MPM – Meropenem; ATM – Aztreonam; LEV – Levofloxacina; CIP – Ciprofloxacina; CTX – Cefotaxima; GEN – Gentamicina; TET – Tetraciclina; AMC – Amoxicilina-clavulanato; PIT – Piperacilina-tazobactam; TAC – Ticarcilina-clavulanato; AMI – Amicacina; CLO – Cloranfenicol; NOR – Norfloxacina; OFX – Ofloxacina; NIT – Nitrofurantoina; TOB – Tobramicina; SUT – Trimetoprima-sulfametoxazol.

Nas quatro amostras de *E. cloacae* analisadas, em relação aos carbapenêmicos, três amostras (75%) foram resistentes ao ertapenem e duas ao imipenem e meropenem. Uma amostra foi sensível, pelo método de difusão a partir do disco, a todos os carbapenêmicos avaliados, contudo, entrou no estudo por apresentar o gene *bla_{KPC}*, como será demonstrado a seguir. Todas as amostras foram resistentes aos antimicrobianos ampicilina, cefazolina, cefoxitina, aztreonam e amoxicilina-clavulanato. Das quatro amostras, três (75%) foram resistentes à piperacilina, ceftazidima, cefotaxima, piperacilina-tazobactam, ticarcilina-clavulanato e trimetoprim-sulfametoxazol, uma amostra apresentou resistência à levofloxacina e amicacina, três foram resistentes à cefepime e duas à tobramicina e tetraciclina. Todas as amostras foram sensíveis aos antimicrobianos ciprofloxacina, gentamicina, cloranfenicol e nitrofurantoína.

A amostra de *C. freundii* foi resistente a 24 dos 25 antimicrobianos testados, sendo sensível apenas à amicacina.

A amostra de *E. gergoviae* apresentou-se resistente a 21 antimicrobianos testados e foi sensível apenas à amicacina, ofloxacina, levofloxacina e nitrofurantoína.

5.3 Determinação das concentrações mínimas inibitórias (CMI)

As tabelas a seguir apresentam as variações das CMIs dos antimicrobianos analisados para todas as amostras de enterobactérias incluídas no nosso estudo.

O teste de gradiente para a determinação das CMIs dos antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, colistina, amicacina, tigeciclina e polimixina B foi realizado para todas as amostras de *K. pneumoniae* (Tabela 6). Dentre os sete antimicrobianos testados, observou-se que 34 (72,3%) das 47 amostras foram resistentes ao ertapenem, sendo que 14 amostras apresentaram CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$. Em relação ao meropenem, 24 (51%) amostras foram resistentes, sendo que 17 amostras apresentaram CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$ e para o imipenem, 25 (53,2%) amostras foram resistentes. Deve ser destacado que para esses dois antimicrobianos um elevado número de amostras apresentou CMIs próximas ao ponto de corte de sensibilidade (2 $\mu\text{g/mL}$). Em relação à polimixina B, quatro amostras apresentaram CMI > 2 $\mu\text{g/mL}$, sendo consideradas resistentes. Quanto à colistina, cinco (10,6%) amostras foram resistentes, apresentando CMI > 2 $\mu\text{g/mL}$. Porém, conforme podemos observar na Tabela 6, as CMIs de quatro amostras ficaram próximas ao ponto de corte, ficando entre 1-2 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à tigeciclina, 20 (42,5%) amostras foram resistentes e apresentaram CMI ≥ 2 $\mu\text{g/mL}$. Em relação à amicacina, 12 (25,5%) amostras foram resistentes, sendo nove amostras com CMI ≥ 32 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 6: Teste de gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias realizado para as 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae* utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, colistina, polimixina B, tigeciclina e amicacina.

Antimicrobianos	Concentrações mínimas inibitórias (µg/mL) (número de amostras)															
	≤ 0,125	0,25	0,38	0,5	0,75	1,0	1,5	2	3	4	6	8	12	16	24	≥32
Ertapenem	-	-	9	2	2	3	3	6	4	1	2	1	-	-	-	14
Meropenem	4	3	-	3	-	3	-	10	-	5	-	2	-	-	-	17
Imipenem	-	8	-	4	-	6	-	4	-	6	-	1	-	1	-	17
Colistina	-	27	8	1	2	2	1	1	-	1	-	-	2	-	2	-
Polimixina B	-	4	28	7	3	-	1	-	-	-	1	1	2	-	-	-
Amicacina	-	2	-	6	-	3	-	8	-	11	-	5	-	3	-	9
Tigeciclina	-	-	-	3	-	24	-	13	-	6	-	1	-	-	-	-

* - os números em vermelho representam as amostras dentro da faixa de resistência ou resistência intermediária, segundo o BrCAST (2016), de cada antimicrobiano.

Foram realizados dois testes para a determinação da susceptibilidade aos carbapenêmicos, polimixinas, amicacina e tigeciclina: o teste de difusão a partir do disco (DD) e o teste gradiente para a determinação da CMI (TG). Comparando esses dois métodos, foi observada uma discrepância entre os resultados obtidos através do DD e TG, principalmente em relação aos carbapenêmicos. Para o ertapenem, 11 amostras consideradas resistentes através do DD foram sensíveis pelo TG. Para o meropenem, 15 amostras apresentaram-se resistentes através do DD e sensíveis pelo TG, enquanto que duas amostras foram consideradas sensíveis pelo DD e resistentes pelo TG. Em relação ao imipenem, 10 amostras foram consideradas resistentes através do DD e sensíveis pelo TG e três amostras foram consideradas sensíveis pelo DD e resistentes pelo TG.

Em relação às 14 amostras de *S. marcescens*, observou-se que 13 (92,8%) foram resistentes ao ertapenem, sendo que 9 apresentaram CMI ≥ 32 µg/mL. A única amostra sensível apresentou CMI de 0,5 µg/mL. Em relação ao meropenem e imipenem, observou-se que 85,7% e 78,5%, respectivamente, foram resistentes, sendo que 10 amostras apresentaram CMI ≥ 32 µg/mL para ambos antimicrobianos. Em relação à tigeciclina, duas (14,3%) amostras foram resistentes e apresentaram CMI de 2 µg/mL e 4 µg/mL. Além disso, seis amostras apresentaram CMI de 1 µg/mL, próxima ao ponto de corte para esse antimicrobiano. Em relação à

amicacina, apenas uma amostra apresentou resistência, com CMI igual a 16 µg/mL. Não foram realizados testes de determinação da CMI para às polimixinas (polimixina B e colistina) nas amostras de *S. marcescens*, pois as mesmas possuem resistência intrínseca.

Tabela 7. Teste de gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias realizado para as 14 amostras de *Serratia marcescens* utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, tigeciclina e amicacina.

Antimicrobianos	Concentrações mínimas inibitórias (µg/mL) (número de amostras)															
	≤ 0,125	0,25	0,38	0,5	0,75	1,0	1,5	2	3	4	6	8	12	16	24	≥32
Ertapenem	-	-	-	1	-	-	2	-	-	-	1	-	1	-	-	9
Meropenem	-	1	-	-	-	1	-	-	-	2	-	-	-	-	-	10
Imipenem	-	-	-	1	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	10
Amicacina	-	-	-	3	-	8	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-
Tigeciclina	-	-	-	6	-	6	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-

* - os números em vermelho representam as amostras dentro da faixa de resistência ou resistência intermediária, segundo o BrCAST (2016), de cada antimicrobiano.

Comparando os métodos de DD e de TG realizados para todas as amostras de *S. marcescens*, foi observado que em relação ao ertapenem, apenas uma amostra apresentou resultados divergentes entre os métodos, sendo considerada sensível pelo método de DD e resistente através do TG. Três amostras foram sensíveis ao meropenem pelo DD e resistentes através do TG, enquanto que uma amostra foi considerada resistente pelo DD e sensível pelo TG. No que diz respeito ao imipenem, quatro amostras foram consideradas sensíveis através DD e resistentes pelo TG e uma amostra foi considerada resistente pelo DD e sensível pelo TG.

Entre as quatro amostras de *E. cloacae*, observou-se que três amostras foram resistentes ao ertapenem e uma amostra foi resistente ao imipenem (CMI ≥ 32 µg/mL). Três amostras foram resistentes ao meropenem e apresentaram CMI entre 8 e ≥ 32 µg/mL. No que se refere à polimixina B, apenas uma amostra foi resistente (CMI >32 µg/mL) enquanto que em relação à colistina, duas amostras foram resistentes, ambas apresentando CMI >32 µg/mL. Todas as amostras foram sensíveis à amicacina e tigeciclina, apresentando CMI ≤8 µg/mL e CMI ≤ 1 µg/mL,

respectivamente.

Tabela 8. Teste gradiente para a determinação das concentrações mínimas inibitórias, realizado para as quatro amostras de *Enterobacter cloacae* utilizando os antimicrobianos ertapenem, meropenem, imipenem, colistina, ampicilina, tigeciclina e polimixina B.

Antimicrobianos	Concentrações mínimas inibitórias (µg/mL) (número de amostras)															
	≤ 0,125	0,25	0,38	0,5	0,75	1,0	1,5	2	3	4	6	8	12	16	24	≥32
Ertapenem	1	-	-	-	-	1	-	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Meropenem	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	1
Imipenem	-	-	-	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Colistina	-	-	1	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	2
Polimixina B	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
Tigeciclina	1	1	-	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilina	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-

* - os números em vermelho representam as amostras dentro da faixa de resistência ou resistência intermediária, segundo o BrCAST (2016), de cada antimicrobiano.

Comparando os métodos para detecção da resistência nas amostras de *E. cloacae* foi observado que, em relação ao meropenem, uma amostra foi considerada sensível através do DD e resistente através do TG e, quanto ao imipenem, uma amostra foi considerada resistente através do DD e sensível pelo TG.

A única amostra de *Citrobacter freundii* mostrou-se resistente ao imipenem e meropenem, apresentando CMI de 4 µg/mL para ambos antimicrobianos, enquanto que para o ertapenem a CMI foi >32 µg/mL. Em relação à colistina, a amostra apresentou-se resistente (CMI >32 µg/mL) e foi sensível à polimixina B (0,5 µg/mL), tigeciclina (0,25 µg/mL) e ampicilina (4 µg/mL).

A amostra de *Enterobacter gergoviae* apresentou-se resistente ao imipenem, ertapenem e meropenem com CMI >32 µg/mL, foi sensível à colistina, polimixina B, tigeciclina e ampicilina, apresentando CMI ≤ 1 µg/mL em todos os casos.

Em relação às amostras de *C. freundii* e *E. gergoviae* não foi observado nenhuma discordância entre os testes de DD e TG.

Um fato comumente observado no estudo foi a presença de colônias satélites no halo de inibição, muitas vezes dificultando a leitura do TG, como podemos observar na Figura 10.

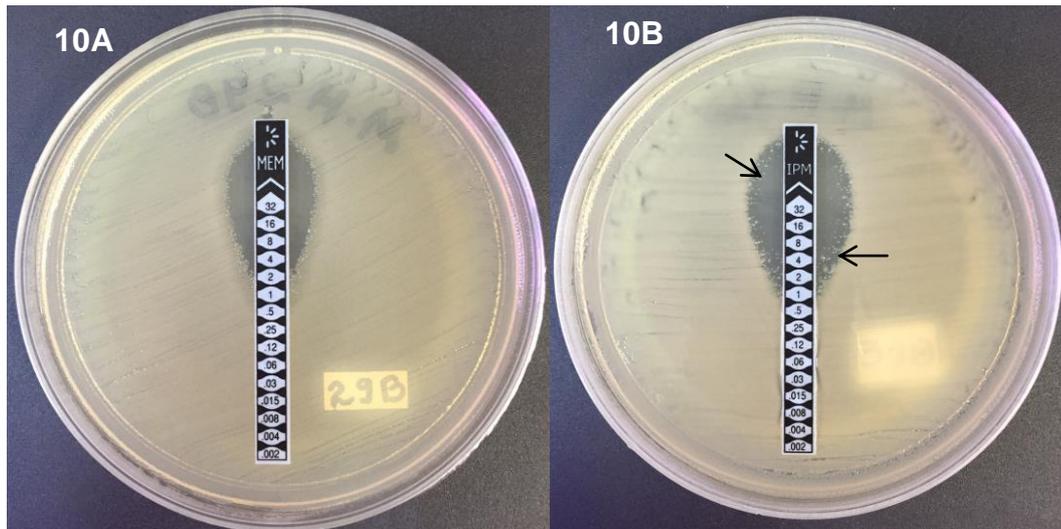


Figura 10: Teste de determinação das concentrações mínimas inibitórias utilizando as fitas com gradientes crescentes de concentração do antimicrobiano (TG). 10A: crescimento homogêneo na zona de intersecção do crescimento bacteriano e a fita de meropenem. 10B: amostras com crescimento disperso próximo à zona de intersecção com a fita de imipenem (setas).

5.4 Detecção dos genes codificadores de beta-lactamases através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR).

A pesquisa dos genes codificadores das beta-lactamases CTX-M (grupos 1, 2, 9 e 8/25), SHV, TEM, OXA-1, KPC, IMP, VIM, OXA-48-like, GES e NDM foi realizada em todas as 47 amostras de *K. pneumoniae* (Figura 11).

Todas as amostras apresentaram o gene *bla*_{KPC}. O gene *bla*_{CTX-M-gp1} foi encontrado em 72% (n=34) das amostras, sendo a variante do grupo CTX-M prevalente, seguido do *bla*_{CTX-M-gp9} com 15% (n=7) e *bla*_{CTX-M-gp2} com 6% (n=3). Não foi encontrado nenhum gene *bla*_{CTX-M-gp8/25} entre as 47 amostras estudadas. O gene *bla*_{SHV} foi encontrado em 96% (n=45) das amostras e o gene *bla*_{TEM} em 51% (n=24) enquanto que o gene *bla*_{OXA-1} foi encontrado em 45% (n=21) das amostras. Não foram detectados os genes *bla*_{OXA-48}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}.

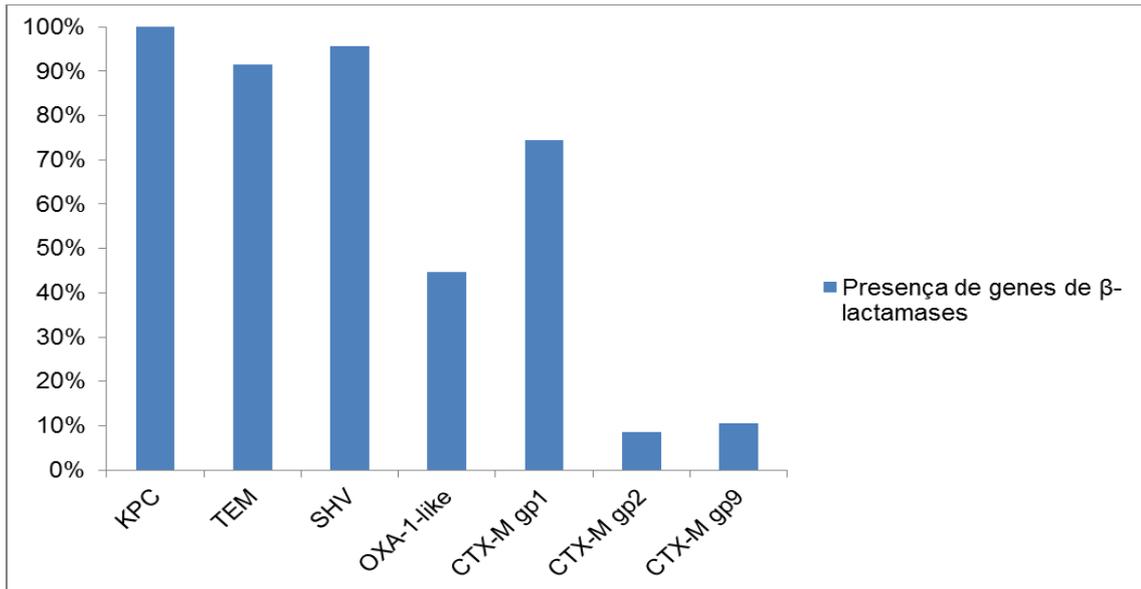


Figura 11: Presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae*.

A Tabela 9 apresenta o perfil das amostras de *K. pneumoniae* em relação aos genes codificadores de beta-lactamases. Foi observado que 16 amostras (34%) apresentaram o perfil genético P1, caracterizado por apresentar os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1}. O segundo perfil mais frequente (P2) albergava os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-Mgp1} e foi encontrado em 13 amostras. O perfil P3, caracterizado pela presença da maior quantidade de genes: *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1} e *bla*_{CTX-Mgp9}, foi encontrado em apenas três amostras.

Tabela 9: Perfil da presença dos genes codificadores de beta-lactamases encontrados nas 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae*.

Perfil genético de resistência	Número de amostras	Genes codificadores de beta-lactamases						
		<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA-1-like}	<i>bla</i> _{CTXM-gp1}	<i>bla</i> _{CTXM-gp2}	<i>bla</i> _{CTXM-gp9}
P1	16	+	+	+	+	+	-	-
P2	13	+	+	+	-	+	-	-
P3	3	+	+	+	+	+	-	+
P4	3	+	+	+	-	-	-	-
P5	3	+	+	+	-	-	+	-
P6	2	+	-	+	-	-	-	-
P7	1	+	+	+	+	-	-	-
P8	1	+	+	-	-	-	-	-
P9	1	+	-	+	+	+	-	-
P10	1	+	-	+	-	+	-	-
P11	1	+	+	-	-	-	+	-
P12	1	+	+	+	-	+	-	+
P13	1	+	+	+	-	-	-	+

Todas as 14 amostras de *S. marcescens* e as quatro amostras de *E. cloacae* apresentaram coexistência dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{TEM}, estando ausentes os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{GES}, *bla*_{NDM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{VIM}. Nestas amostras não foram realizadas as pesquisas dos genes *bla*_{CTX-M-gp1}, *bla*_{CTX-M-gp9}, *bla*_{CTX-M-gp2} e *bla*_{CTX-M-gp8/25}, pois não obtivemos sucesso na padronização da técnica, mesmo após várias tentativas.

Na amostra de *C. freundii* e de *E. gergoviae* foram identificados os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-M-gp1} em ambos os casos. Não foram identificados os outros genes pesquisados.

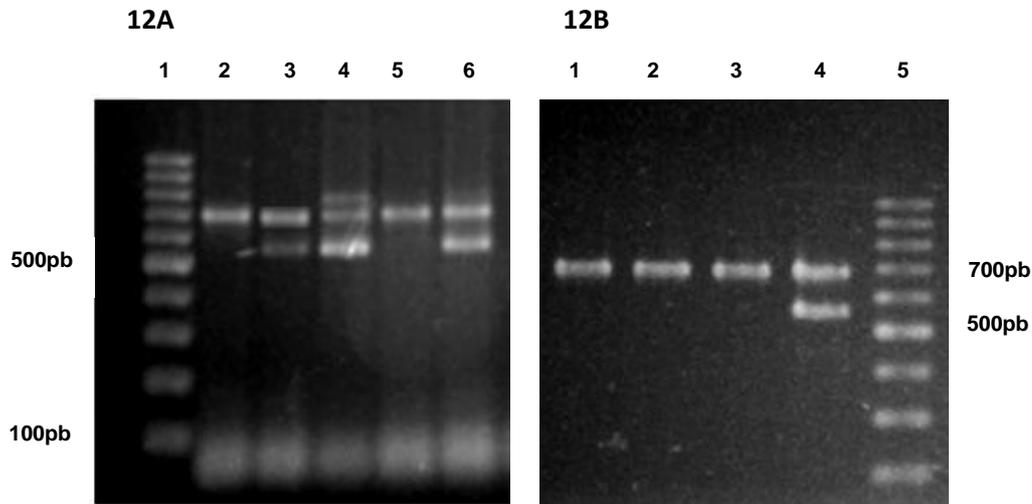


Figura 12: Foto ilustrativa dos produtos da PCR para detecção dos genes de resistência. 12A: *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{OXA1-LIKE}*. 1: marcador de tamanho molecular 100 pb; Linha 2 e 5: amostras albergando o genes *bla_{SHV}*; linhas 3 e 6: amostras albergando os genes *bla_{OXA1-LIKE}* e *bla_{SHV}*; linha 4: amostra albergando os genes *bla_{OXA1-LIKE}*, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*. 12B: Foto ilustrativa dos produtos da PCR para detecção dos genes *bla_{CTX-M gp1}*, *bla_{CTX-M gp2}* e *bla_{CTX-M gp9}*. Linhas 1, 2 e 3: amostras albergando o gene *bla_{CTX-M gp1}*, linha 4: amostra albergando os genes *bla_{CTX-M gp1}* e *bla_{CTX-M gp9}*, linha 5: marcador de tamanho molecular 100 pb.

5.5 Avaliação da diversidade genotípica através da técnica de digestão do DNA cromossômico com enzima de restrição e posterior eletroforese em campo pulsado (PFGE).

A caracterização genotípica por análise da fragmentação do DNA cromossômico (PFGE) realizado nas 47 amostras de *K. pneumoniae* revelou a presença de 15 pulsotipos distintos (nomeados de kpA até kpO) (Figura 13). Os três grupos clonais mais prevalentes foram o kpA com 40,42% (19/47) das amostras, seguido do kpB com 19,1% (9/47) e kpC com 8,5% (4/47). Os pulsotipos kpD, kpE e kpF apresentaram duas amostras em cada grupo e os demais (kpG até kpO), apresentaram apenas uma amostra em cada grupo. Os subtipos de kpA prevalentes foram o A1 com 42,1% (8/19) e o A2 com 15,7% (3/19) das amostras. Já o subtipo de kpB prevalente foi o B1 com 33,35 (3/9) e em relação ao subtipo de kpC, o prevalente foi o C1, com 75% (3/4) das amostras.

Figura 13 apresenta os pulsotipos e subtipos encontrados nas 47 amostras de *K. pneumoniae* incluídas neste estudo. A Figura 14 evidencia alguns dos padrões de fragmentação do DNA cromossômico encontrados.

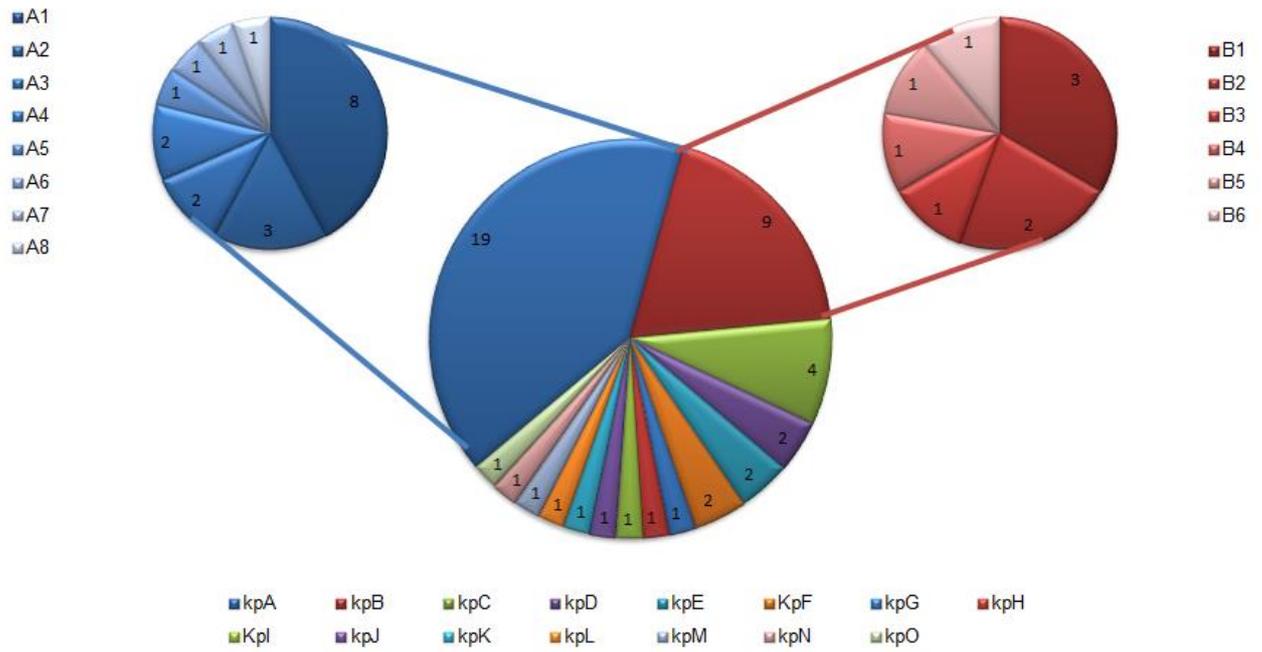


Figura 13: Pulsotipos e subtipos das 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae* obtidos por meio da fragmentação do DNA cromossomal.

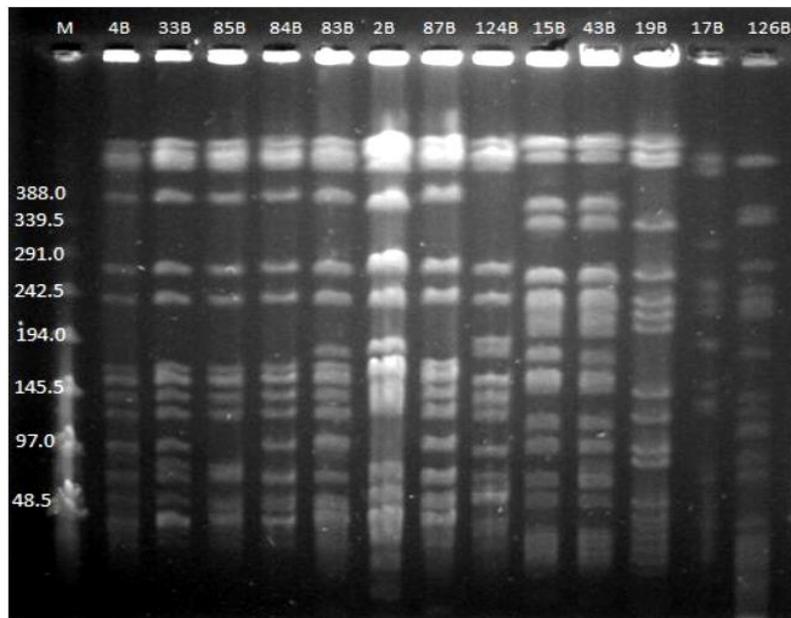


Figura 14: Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando alguns dos padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *Klebsiella pneumoniae*. M – Marcador de tamanho molecular.

Quando foram analisadas as características genóticas das 20 amostras de *K. pneumoniae* resistentes à tigeciclina foi observado que quatro (20%) apresentavam o pulsotipo kpA, sete (35%) o pulsotipo kpB e quatro (20%) o kpC. Os pulsotipos kpE, kpH, kpL, kpM e kpO apresentaram uma amostra cada.

Em relação às polimixinas, as cinco amostras resistentes à colistina apresentaram os pulsotipos kpB (duas amostras), kpD (duas amostras) kpO (uma amostra). Com exceção de uma amostra, todas as outras apresentaram resistência tanto à colistina quanto à polimixina B. Assim, houve uma amostra do genótipo kpB que foi resistente à colistina e sensível à polimixina B.

Dentre as 14 amostras de *S. marcescens*, houve uma grande similaridade genética entre elas, sendo detectados apenas dois pulsotipos (smA e smB). O pulsotipo smA foi o prevalente, sendo encontrado em 13 das 14 amostras. Apenas uma amostra apresentou um pulsotipo distinto (smB). Dentre as amostras do pulsotipo smA, o subtipo A1 foi o mais frequente, sendo encontrado em sete (50%) amostras (Figura 15).

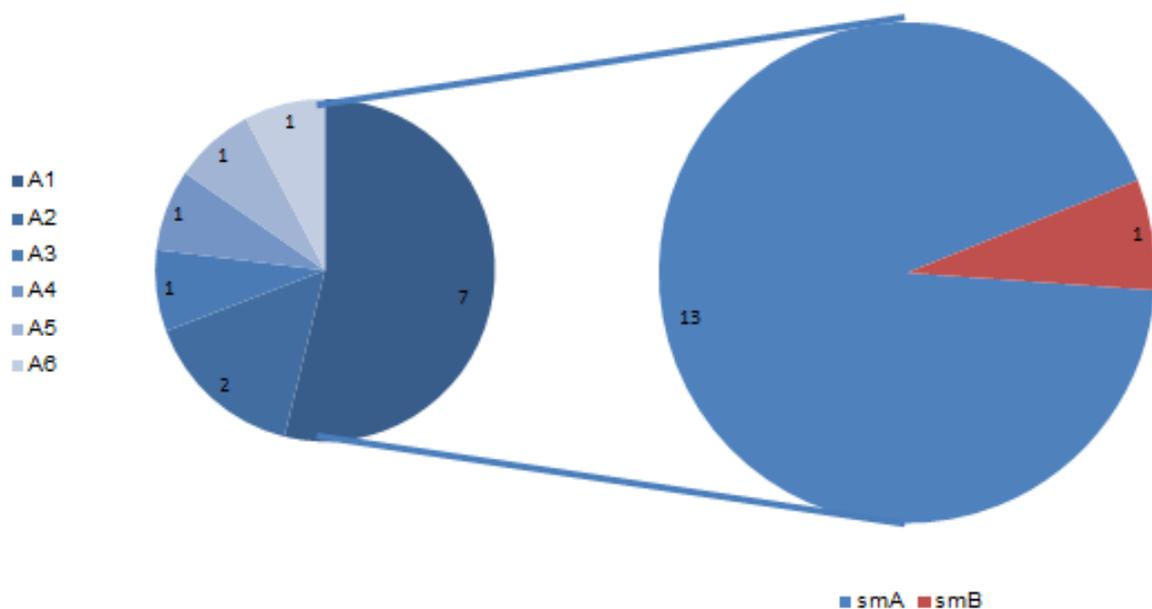


Figura 15: Pulsotipos e subtipos das 14 amostras de *Serratia marcescens* obtidos por meio da análise do padrão de fragmentação do DNA cromossomal (PFGE).

A Figura 16 apresenta doze padrões de fragmentação do DNA cromossômico de algumas amostras de *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*.

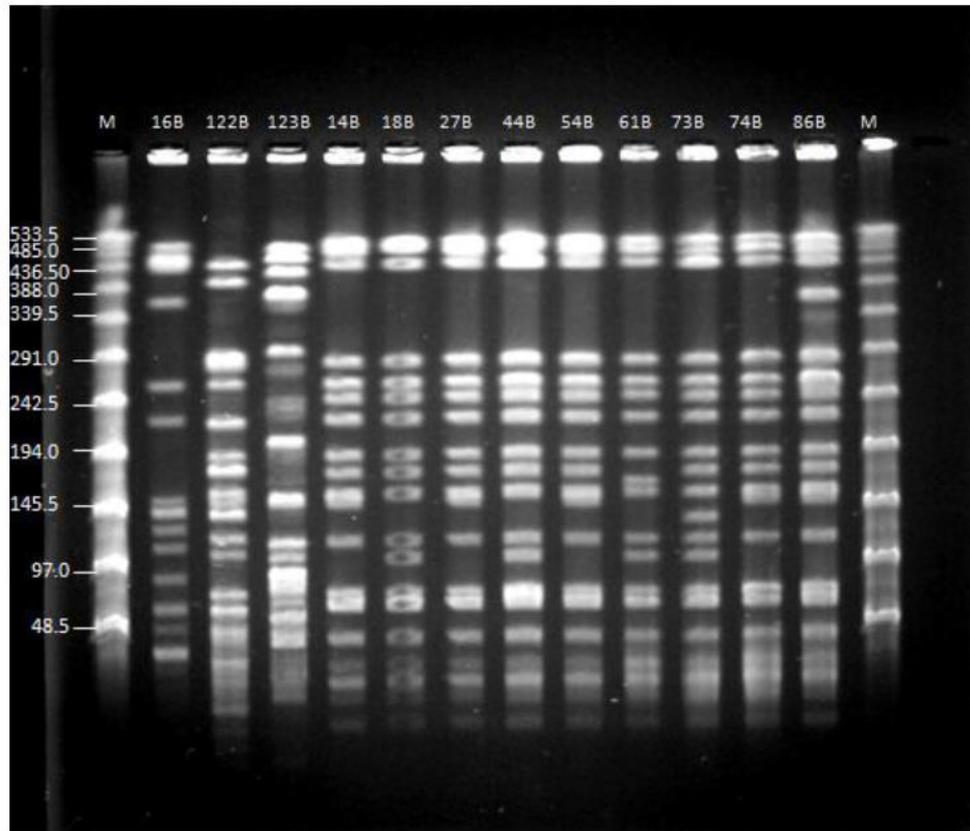


Figura 16: Foto ilustrativa da eletroforese de campo pulsado (PFGE) evidenciando os padrões de fragmentação do DNA cromossômico das amostras de *Klebsiella pneumoniae* (16B), *Enterobacter cloacae* (122B e 123B) e *Serratia marcescens* (14B, 18B, 27B, 44B, 54B, 61B, 73B, 74B e 86B). M – Marcador de tamanho molecular.

Analisando as quatro amostras de *E. cloacae* incluídas no estudo, foi observado que elas não apresentam relação genotípica, uma vez que o perfil de fragmentação foi, consideravelmente, diferente entre elas, com diferença superior a cinco bandas de restrição.

Evidentemente, a caracterização genotípica através da análise de fragmentação do DNA cromossômico não foi realizada para *C. freundii* e *E. gergoviae*, pois foram analisadas nesse estudo apenas uma amostra de cada espécie.

5.6 Tipagem molecular através do *multilocus sequence typing* (MLST)

Devido ao número mais expressivo de amostras no presente estudo e uma vez que essa técnica ainda não foi descrita para *S. marcescens*, o MLST foi

realizado apenas nas amostras de *K. pneumoniae*. A seleção das amostras de *K. pneumoniae* submetidas ao teste de MLST foi feita a partir da análise da tipagem genética por PFGE. Foram selecionadas amostras representativas dos pulsotipos prevalentes e também amostras que apresentaram-se resistentes à colistina, polimixinaB e/ou tigeciclina. Assim, foram selecionadas 14 amostras (Tabela 10). Observou-se que todas as amostras do pulsotipo kpA pertenciam ao ST340. Já em relação ao pulsotipo kpB, apenas uma amostra (subtipo B5) apresentou o ST11, enquanto que as demais pertenciam ao ST437. Todas as duas amostras do pulsotipo kpD apresentaram o ST628. Já os pulsotipos kpH e kpO, apresentaram o ST394 e ST37, respectivamente. O gene onde foi observado um maior número de alelos diferentes foi o *tonB* (seis alelos).

O complexo clonal 258, foi prevalente, sendo encontrado em 10\14 (71,4%) amostras analisadas.

Foram observados dois complexos clonais entre os seis STs encontrados. O CC258 inclui os STs: ST437, ST340 e ST11 e o CC69 inclui o ST394. Os demais STs (ST628 e ST37) não foram associados a nenhum complexo clonal descrito.

Tabela 10: Resultados do *multilocus sequence typing* das 14 amostras de *Klebsiella pneumoniae*.

Amostra	Pulsotipo	Subtipo	ST*	CC**	Perfil alélico						
					<i>gapA</i>	<i>infB</i>	<i>mdh</i>	<i>pgi</i>	<i>phoE</i>	<i>tonB</i>	<i>rpoB</i>
35B	kpA	A1	340	258	3	3	1	1	1	18	1
124B	kpA	A3	340	258	3	3	1	1	1	18	1
88B	kpA	A6	340	258	3	3	1	1	1	18	1
4B	kpB	B1	437	258	3	3	1	1	1	31	1
84B	kpB	B1	437	258	3	3	1	1	1	31	1
87B	kpB	B1	437	258	3	3	1	1	1	31	1
33B	kpB	B2	437	258	3	3	1	1	1	31	1
83B	kpB	B3	437	258	3	3	1	1	1	31	1
85B	kpB	B4	437	258	3	3	1	1	1	31	1
2B	kpB	B5	11	258	3	3	1	1	1	4	1
15B	kpD	D1	628	nd [#]	2	60	11	1	4	24	8
43B	kpD	D1	628	nd	2	60	11	1	4	24	8
17B	kpH	H1	394	69	2	9	2	1	13	82	1
126B	kpO	O1	37	nd	2	9	2	1	13	16	124

*ST – “sequence type”; **CC – complexo clonal; [#]nd – não descrito

5.7 Relação entre os pulsotipos e subtipos de *Klebsiella pneumoniae* detectados e a presença dos genes codificadores de beta-lactamases.

A Tabela 11 apresenta a associação dos pulsotipos e subtipos detectados nas amostras de *K. pneumoniae* e os seus perfis de genes de resistência. Foi observada a presença de 13 perfis de resistência diferentes entre as 47 amostras analisadas. As 19 amostras do pulsotipo kpA apresentaram cinco perfis de resistência distintos (P1, P2, P3, P10 e P13). Foi observado que todas as amostras deste perfil apresentaram o gene *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, exceto uma amostra pertencente ao P10, onde não foi detectado do gene *bla*_{TEM}. Entre as nove amostras pertencentes ao pulsotipo kpB, foram encontrados cinco perfis (P1, P2, P6, P7 e P9) e nenhuma amostra apresentou os genes *bla*_{CTX-Mgp2} e *bla*_{CTX-Mgp9}. Em relação às quatro amostras pertencentes pulsotipo kpC, todas apresentaram o mesmo perfil (P1). As amostras pertencentes ao pulsotipo kpE foram as únicas amostras de *K. pneumoniae* que não apresentaram o gene *bla*_{SHV}. O gene *bla*_{CTX-Mgp2} foi detectado em apenas três pulsotipos (kpD, kpE e kpH) e dois perfis (P5 e P11) e o *bla*_{CTX-Mgp9} apenas nos pulsotipos kpA e kpO.

Tabela 11: Associação entre os pulsotipos encontrados e o perfil de resistência das 47 amostras de *Klebsiella pneumoniae*.

Pulsotipo (Nº de amostras)	Subtipo (Nº de amostras)	ST	Perfil (Nº de amostras)	Genes codificadores de beta-lactamases						
				<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{OXA1-like}	<i>bla</i> _{CTXM gp1}	<i>bla</i> _{CTXM gp2}	<i>bla</i> _{CTXM gp9}
kpA (19)	A1 (8)	340	P2 (7)	+	+	+	-	+	-	-
			P10 (1)	+	-	+	-	+	-	-
	A2 (3)	340	P1 (3)	+	+	+	+	+	-	-
	A3 (2)		P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-
	A4 (2)		P13 (1)	+	+	+	-	-	-	+
			P3 (2)	+	+	+	+	+	-	+
	A5 (1)		P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-
	A6 (1)		P3 (1)	+	+	+	+	+	-	+
	A7 (1)		P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
A8 (1)	P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-		
kpB (9)	B1 (3)	437	P1 (2)	+	+	+	+	+	-	-
			P9 (1)	+	-	+	+	+	-	-
	B2 (2)	437	P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-
			P7 (1)	+	+	+	+	-	-	-
	B3 (1)	437	P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
	B4 (1)	437	P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
	B5 (1)	11	P6 (1)	+	-	+	-	-	-	-
	B6 (1)		P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-
kpC (4)	C1 (3)		P1 (3)	+	+	+	+	+	-	-
	C2 (1)		P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
kpD (2)	D1 (2)	628	P5 (2)	+	+	+	-	-	+	-
kpE (2)	E1 (2)		P8 (1)	+	+	-	-	-	-	-
			P11 (1)	+	+	-	-	-	+	-
kpF (2)	F1 (2)		P1 (2)	+	+	+	+	+	-	-
kpG (1)	G1 (1)		P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
kpH (1)	H1 (1)	394	P5 (1)	+	+	+	-	-	+	-
kpI (1)	I1 (1)		P6 (1)	+	-	+	-	-	-	-
kpJ (1)	J1 (1)		P4 (1)	+	+	+	-	-	-	-
kpK (1)	K1 (1)		P1 (1)	+	+	+	+	+	-	-
kpL (1)	L1 (1)		P4 (1)	+	+	+	-	-	-	-
kpM (1)	M1 (1)		P2 (1)	+	+	+	-	+	-	-
kpN (1)	N1 (1)		P4 (1)	+	+	+	-	-	-	-
kpO (1)	O1 (1)	37	P12 (1)	+	+	+	-	+	-	+

* o símbolo "+" indica presença do gene codificador de beta-lactamase, enquanto que o símbolo "-" refere-se à ausência do mesmo.

6 DISCUSSÃO

Membros da família *Enterobacteriaceae* estão entre os patógenos humanos mais comuns, causando infecções tanto na comunidade quanto em ambientes hospitalares. Como consequência, são globalmente responsáveis por altas taxas de morbidade e mortalidade.

No presente estudo, foram analisadas 67 amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC), sendo *K. pneumoniae* e *S. marcescens* as prevalentes. Um estudo realizado em Minas Gerais com 111 pacientes apresentando infecções por ERC durante o período de 2014 a 2015, revelou que a espécie mais encontrada foi *K. pneumoniae* (77,13%) (ROSSI et al., 2016b). Em nosso trabalho, os principais locais de isolamento foram o sangue (25%) e a urina (22%). Um estudo realizado na França, em pacientes com infecções causadas por enterobactérias, demonstrou que os dois sítios de infecções mais frequentes também foram o trato urinário (66%) e o sangue (10%) (ROBIN et al., 2016). No Brasil, *K. pneumoniae* é a espécie de enterobactéria mais frequente (14,2%) em casos de infecções primárias da corrente sanguínea, segundo a Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2015). Um estudo brasileiro, realizado em 127 pacientes com infecções causadas por ERC, apontou que 44,4% das infecções foram provenientes do trato urinário (CARRILLHO et al., 2016). Altas taxas de mortalidade em pacientes com infecções no trato urinário (30,1%) e sanguíneas (38,5%) também foram constatadas após um levantamento sobre casos de infecções causadas por ERC na Grécia, EUA, Brasil, Itália e Espanha (TZOUVELEKIS et al., 2014).

Na década de 1990, as enterobactérias começaram a desenvolver resistência às cefalosporinas, até então os fármacos de primeira linha, pela aquisição de enzimas beta-lactamases de espectro estendido. Em consequência, a utilização de cefalosporinas foi restringida, enquanto os carbapenêmicos que permaneceram mais eficazes tiveram de ser utilizados com maior frequência (CHALOVICH; EISENBERG, 2013).

Os carbapenêmicos são os antimicrobianos de espectro mais amplo utilizados no tratamento de infecções graves desde a década de 1980, sendo muitas vezes, o último recurso utilizado na prática clínica para o tratamento de infecções causadas

por bactérias multirresistentes (MDR). As ERCs se tornaram uma ameaça para a saúde pública devido à rápida propagação mundial, à propensão para a resistência a múltiplos fármacos e à alta taxa mortalidade, sobretudo em infecções da corrente sanguínea (CDC, 2013; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016). A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias está principalmente associada à produção de carbapenemases, como a KPC, que possuem uma grande capacidade de disseminação através de elementos genéticos móveis (GUPTA et al., 2011).

A redução da eficácia dos antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções comuns acelerou nos últimos anos e, atualmente, estamos na iminência de uma era pós-antibiótica (LAXMINARAYAN et al., 2013). A mortalidade por infecções causadas por bactérias multirresistentes foi estimada em 50.000 mortes por ano apenas nos EUA e na Europa (TEILLANT et al., 2015). O previsto é que alcance 10 milhões até 2020, um número maior do que o projetado para doenças neoplásicas (O'NEILL, 2014). De acordo com o CDC - EUA, estima-se que, anualmente, 140.000 infecções causadas por *Enterobacteriaceae* são notificadas nos Estados Unidos, sendo que, cerca de 9.000 são causadas por ERC (CDC, 2013).

No Brasil, a resistência antimicrobiana em enterobactérias é um problema grave que necessita de ações urgentes, que incluam medidas de controle de infecções mais rigorosas e o uso mais criterioso de antimicrobianos (SAMPAIO; GALES, 2016).

Uma publicação recente analisou, no período de 2011 a 2015, 3.085 amostras de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes de 10 hospitais privados de São Paulo, sendo a maioria de hemoculturas. O trabalho mostrou um aumento surpreendente na taxa de resistência aos carbapenêmicos, de 6,8% em 2011 para 35,5% em 2015. É importante notar que o *bla*_{KPC-2} foi detectado em 96,2% das amostras resistentes aos carbapenêmicos e houve disseminação clonal inter e intra-hospitalar (BARTOLLETTI et al., 2016).

Além da resistência aos carbapenêmicos, geradas, principalmente, pela presença da enzima KPC, altas taxas de resistência vem sendo observadas para diferentes classes de antimicrobianos, principalmente em relação às cefalosporinas, quinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos (HIRSCH; TAM, 2010). No presente estudo também foram observadas elevadas taxas de resistência bacteriana às diferentes classes de antimicrobianos testados. Destacadamente, as amostras de *K.*

pneumoniae apresentaram um alto percentual de resistência em relação às quinolonas (85%), aminoglicosídeos (60%), sulfonamidas (90%) e cefalosporinas (75%).

Atualmente, os antimicrobianos tigeciclina e polimixinas são muito utilizados na terapêutica das infecções causadas por ERC (BOWERS; HUANG, 2016). A polimixina E (colistina) é um dos agentes de último recurso utilizados no tratamento de infecções causadas por esses patógenos. Foi introduzida pela primeira vez em 1950, mas seu uso foi substituído em maior parte por aminoglicosídeos, devido aos seus efeitos adversos relacionados a neurotoxicidade e nefrotoxicidade (CHALOVICH; EISENBERG, 2013). Devido a isso, um estudo evidenciou que a utilização de polimixinas na prática clínica só deve ser considerada quando a bactéria envolvida na infecção for resistente à outros antimicrobianos (FALAGAS; MICHALOPOULOS, 2006).

As amostras incluídas neste estudo, *C. freundii*, *E. cloacae* e *K. pneumoniae* apresentaram resistência às polimixinas. Como *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos tem se tornado endêmica no Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016), polimixinas tem sido amplamente utilizadas no tratamento de infecções causadas por esses micro-organismos. O primeiro relato sobre resistência à polimixina B em enterobactérias no Brasil foi em 2006. Nesse período onde havia pouca utilização desse antimicrobiano, a taxa de resistência encontrada correspondia à 0,5% em *E. coli*, 1,8% em *K. pneumoniae* e 16,7% em *Enterobacter* spp. (GALES; JONES; SADER, 2006). Em 2013, Pereira e colaboradores (2013) relataram uma taxa de 9,7% de resistência à polimixina B em 113 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC isoladas de diversos Estados brasileiros (PEREIRA et al., 2013). Um recente estudo com 3.085 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos isoladas de 10 hospitais privados de São Paulo, entre 2011 e 2015 demonstrou um aumento crescente na resistência à polimixina B no período de 2011 (0%) e 2015 (27,1%) (BARTOLLETTI et al., 2016).

A resistência à colistina, mediada por plasmídeo contendo o gene *mcr-1*, foi identificada pela primeira vez em amostras de animais na China em novembro de 2015 (LIU et al., 2016). Em abril de 2016, foi relatado nos Estados Unidos o isolamento de uma amostra de *E. coli* contendo o gene *mcr-1* e o gene *bla_{NDM-5}* de um paciente com infecções recorrentes do trato urinário. Este foi o primeiro relato nos EUA de um isolado clínico com resistência à colistina e à carbapenêmicos,

destacando a importância dos esforços de vigilância ativa para esses microrganismos (MEDIAVILLA et al., 2016). Vários surtos causados por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e polimixinas tem sido relatados, principalmente na Europa, e representam uma ameaça emergente (GISKE, 2015; LEE et al., 2016). Recentemente, o gene *mcr-1* foi detectado em uma amostra clínica de *E. coli* pertencente ao ST101 no Nordeste do Brasil. Os autores encontraram o gene localizado no plasmídeo *IncX4* (FERNANDES et al., 2016). Esse fato é extremamente preocupante pelo potencial de disseminação dessas amostras. Em nosso estudo, em todas as amostras que apresentaram-se resistentes à colistina foi realizada a pesquisa do gene *mcr-1* por PCR. Contudo, esse gene não foi encontrado em nenhuma delas (dados não mostrados).

Um outro antimicrobiano utilizado para o tratamento de infecções causadas por ERC é a tigeciclina. Esse antimicrobiano foi o primeiro membro disponível comercialmente das glicilciclinas, uma nova classe de agentes antimicrobianos. Seus principais efeitos colaterais incluem: pancreatite, elevações extremas de fosfatase alcalina e, principalmente, náuseas (ROSE; RYBAK, 2006).

Em nosso estudo, a resistência a tigeciclina foi observada em amostras das espécies de *S. marcescens* (14,3%, n=2) e *K. pneumoniae* (42,5%, n=20). Esta última, apresentou um percentual de resistência relativamente alto se comparado com outros estudos. Em um estudo, realizado durante o período de 2011 até 2014 pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY na América Latina, foram incluídas 193 amostras de ERC, onde observou-se que apenas 2,6% das amostras apresentaram resistência a tigeciclina. Os valores de CMI observados variavam de 0,25 a 0,5 µg/mL (SADER et al., 2016). Um outro estudo, realizado no Canadá, incluiu 823 amostras de ERC e foi observado que 18,4% das amostras foram resistentes a tigeciclina (MATASEJE et al., 2016). Nos Estados Unidos, um estudo entre os anos de 2011 e 2013, mostrou que a resistência à tigeciclina em amostras de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos ocorreu após o tratamento de monoterapia com esse fármaco (VAN DUIN et al., 2014). De modo geral, um estudo global de vigilância em larga escala mostrou que a taxa de resistência a tigeciclina é inferior a 10% entre enterobactérias em todo o mundo (HOBAN et al., 2015). Em nosso estudo, várias amostras resistentes à tigeciclina tiveram seus testes realizados tanto pela técnica de microdiluição em caldo como pelo teste de gradiente e os resultados se mantiveram em todos os casos. Esse fato é extremamente

preocupante devido a possibilidade da disseminação desse tipo de amostra no ambiente hospitalar.

Os antimicrobianos da classe dos aminoglicosídeos, como a gentamicina e amicacina, são, ocasionalmente, usados para o tratamento de ERC (MORRIL et al., 2015). A gentamicina, geralmente, é o aminoglicosídeo com um maior espectro de ação contra *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, porém, a amicacina pode ser mais ativa contra outras espécies de ERC (MORRIL et al., 2015). Apesar das ERC possuírem uma susceptibilidade variável aos aminoglicosídeos, ao se observar a sua atividade *in vitro*, podem ser excelentes opções para o tratamento de infecções causadas por ERC (BOWERS; HUANG, 2016). Em nosso trabalho, a resistência a amicacina foi observada nas amostras de *S. marcescens* (14,3%) e em *K. pneumoniae* (36,2%). Na literatura, taxas variadas de resistência a esse antimicrobiano foram relatadas. Um estudo realizado em São Paulo com 47 amostras de ERC isoladas no período de Março a Outubro de 2013, demonstrou que 8,5% das amostras foram resistentes à amicacina (SEIBERT et al., 2014). Um outro estudo foi realizado por Alves e Behar, no período de 2009 a 2012, em Porto Alegre, com 77 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC e demonstrou que apenas 2,5% das amostras foram resistentes à amicacina (ALVES; BEHAR, 2013). Um amplo estudo realizado pelo SENTRY, entre os anos de 2000 a 2005, com 50.881 amostras de enterobactérias demonstrou que a amicacina foi o terceiro composto mais ativo *in vitro*, com uma taxa global de resistência de 26,7%, sendo menos efetivo apenas que a tigeciclina e polimixina B (CASTANHEIRA et al., 2008).

Em nosso estudo, foram realizados dois testes para a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos, o disco de difusão (DD) e o teste gradiente para a determinação da CMI (TG). A determinação da CMI foi realizada apenas para os antimicrobianos de maior importância clínica: carbapenêmicos, polimixinas, tigeciclina e amicacina. No caso dos carbapenêmicos avaliados, foi observado que houve divergência entre os resultados obtidos pelos dois métodos, principalmente em relação às amostras de *K. pneumoniae*. Essa discordância entre os testes também foi observada em outros estudos que avaliaram a susceptibilidade de bactérias produtoras de KPC. Vários autores afirmam que esse problema é inerente às amostras bacterianas que expressam níveis variáveis de resistência a carbapenêmicos e que inóculos abaixo dos valores recomendados também podem interferir nos resultados (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; VADING et al., 2011).

Isto demonstra a importância e a dificuldade de uma detecção acurada da resistência aos carbapenêmicos pelos laboratórios clínicos.

As 67 amostras de enterobactérias analisadas neste estudo também foram submetidas a testes genotípicos a fim de detectar a presença dos principais genes codificadores de beta-lactamases. Observou-se que 100% das amostras eram portadoras do gene da carbapenemase KPC (*bla_{KPC}*). Enterobactéria produtora de KPC foi isolada pela primeira vez de um paciente da Carolina do Norte (EUA) em 2001 (YIGIT et al., 2001). Posteriormente, surtos e transmissões envolvendo micro-organismos produtores de KPC foram relatados, predominantemente no norte dos EUA (BRATU et al., 2005, 2007). Atualmente, o gene *bla_{KPC}* está disseminado no mundo todo, sendo mais prevalente em amostras da espécie *K. pneumoniae* (LEE et al., 2016). No Brasil, o primeiro relato da detecção de KPC foi publicado em 2009 em amostras de *K. pneumoniae* provenientes de quatro pacientes da cidade do Recife (MONTEIRO et al., 2009). A disseminação da produção de KPC-2 foi relatada mais tarde em São Paulo (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Posteriormente, a KPC-2 foi descrita em muitas espécies de *Enterobacteriaceae* em regiões de todo o Brasil (SAMPAIO; GALES, 2016). Cerca de 20 variantes alélicas de KPC foram descritas, porém, no Brasil, KPC-2 é a única variante detectada até o momento (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/beta-lactamase-data-resources>).

Além da KPC, as principais carbapenemases identificadas em enterobactérias são as enzimas de classe B (metaloenzimas) e classe D (OXA-48-like) (NORDMANN, 2014). Uma das metalo-beta-lactamases mais relatadas é a NDM-1, descrita pela primeira vez em 2009 em um paciente hospitalizado na Suécia depois de voltar de Nova Deli (YONG et al., 2009). Essa enzima espalhou-se amplamente no subcontinente indiano, sendo considerada endêmica na Índia, Paquistão e Bangladesh (NORDMANN; POIREL, 2014). Um estudo de revisão recente identificou que essas enzimas estão disseminadas em várias regiões do mundo (LEE et al., 2016). Comparando com a disseminação de KPC, que foi detectada no Brasil após 10 anos da sua descrição inicial, as amostras produtoras de NDM-1 foram detectadas mais brevemente, indicando um grande potencial para a disseminação (SAMPAIO; GALES, 2016). As carbapenemases do tipo OXA-48 foram identificadas, principalmente, nos países do Mediterrâneo e do Sul da Europa com uma rápida propagação (NORDMANN, 2014). Desde 2003, a disseminação endêmica dessas bactérias tem sido relatada em países como Turquia, Marrocos,

Líbia, Egito, Tunísia e Índia (NORDMANN; POIREL, 2014). Estudos demonstram que a prevalência de OXA-48 entre amostras de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases na Espanha e França é elevada, 74% e 78%, respectivamente (PALACIOS-BAENA et al., 2016; ROBERT et al., 2014). No Brasil, foi identificada uma nova variante alélica de OXA-48, a OXA-370, no estado do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, em amostras de *Enterobacter hormaechei* (PEREIRA et al., 2015; SAMPAIO et al., 2014). Em nosso trabalho não foram identificados os genes *bla_{NDM}* e *bla_{OXA-48}*.

Além da presença dos genes de carbapenemases, foram pesquisados nas amostras incluídas no nosso estudo, genes de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) que são frequentemente encontrados em enterobactérias. Diversos tipos de ESBLs são descritos na literatura, porém, os tipos TEM, SHV e CTX-M são os mais prevalentes (BAJPAI et al., 2017).

Em nosso estudo, o gene *bla_{SHV}* foi encontrado somente nas amostras de *K. pneumoniae* (96%). Esse alto percentual também foi identificado em diversos outros trabalhos. Um estudo realizado no Irã, com 41 amostras de *K. pneumoniae*, demonstrou que o gene de ESBL prevalente foi o *bla_{SHV}*, presente em 70,7% das amostras (KOMIJANI; BOUZARI; RAHIMI, 2016). Um outro estudo realizado no Brasil, avaliou a presença do gene *bla_{SHV}* em 52 amostras de *K. pneumoniae* e observou que 66% apresentavam esse gene (VERAS et al., 2011).

Até o final da década de 1990, infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL, frequentemente, eram relacionadas às enzimas SHV e TEM. Contudo, com o surgimento das enzimas CTX-M, a epidemiologia mudou drasticamente, sendo essas encontradas em diversas regiões do mundo e se tornando o tipo de enzima de ESBL mais prevalente em alguns locais (CALBO; GARAU, 2015). Dentre as variantes alélicas de CTX-M, CTX-M-15 e CTX-M-14 são as mais encontradas (CANTÓN; COQUE, 2006).

Nesse estudo, o gene *bla_{CTX-M}* foi detectado nas espécies de *K. pneumoniae*, *C. freundii* e *E. gergoviae*. Nas 47 amostras de *K. pneumoniae*, o gene *bla_{CTX-M}* do grupo 1 (*bla_{CTX-M-1}*, *bla_{CTX-M-3}* e *bla_{CTX-M-15}*) foi encontrado em 72% (n=34) das amostras, o gene *bla_{CTX-M}* do grupo 2 (gene *bla_{CTX-M-2}*) em 6% (n=3) das amostras e *bla_{CTX-M}* grupo 9 (*bla_{CTX-M-9}* e *bla_{CTX-M-14}*) em 15% (n=7) das amostras. Já nas amostras de *C. freundii* e *E. gergoviae* foi detectada apenas a enzima CTX-M-grupo 1.

Semelhante ao que ocorreu em nosso trabalho, um artigo de revisão, que avaliou diversas publicações do Brasil sobre ESBL, descreveu a enzima CTX-M-2 como a variante prevalente, sendo que também foi detectada no maior número de diferentes espécies de enterobactérias (SAMPAIO; GALES, 2016). Outro estudo sobre a prevalência de genes de ESBL no Brasil, realizado em 1.827 amostras de enterobactérias no período de 2003 a 2008 no Paraná, demonstrou que 21,3% das amostras apresentavam genes de ESBLs, sendo o CTX-M-2 o mais encontrado (58,7%) (NOGUEIRA et al., 2015). Em outros locais do mundo, outras variantes predominam. Estudo realizado na França com 200 enterobactérias produtoras de ESBL demonstrou que a enzima CTX-M foi a mais prevalente (90%), sendo que a variante alélica mais encontrada foi a CTX-M-15 (46,5%), seguido de CTX-M-1 (15,5%) e CTX-M-14 (15%) (ROBIN et al., 2016). Um outro estudo, conduzido na China, demonstrou que as variantes do gene *bla*_{CTX-M} estão distribuídas no país de forma variada, porém, a variante CTX-M-15 foi predominante na maioria das regiões (QUAN et al., 2016).

A associação de genes codificadores de ESBL com carbapenemases do tipo KPC tem sido comumente observadas em amostras de *K. pneumoniae* (ANDRADE et al., 2011). O perfil genético de resistência mais predominante entre as amostras de *K. pneumoniae* incluídas no nosso estudo foi o P1, caracterizado pela presença dos genes codificadores de beta-lactamases *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1}, seguido de P2 *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-Mgp1}. A associação desses genes também foi observada em um estudo realizado por Martinez e colaboradores (2014) em que amostras de *K. pneumoniae* albergaram múltiplos genes de ESBL em combinação com *bla*_{KPC-2} (MARTINEZ; SANCHEZ; MATTAR, 2014). Estudos indicam que a frequente associação entre genes codificadores de ESBL e KPC em amostras de *K. pneumoniae* podem ser derivados da aquisição de plasmídeos transmissíveis portadores de *bla*_{KPC-2} por amostras endêmicas locais ou plasmídeos carreadores de *bla*_{ESBL} por clones epidêmicos com KPC (ANDRADE et al., 2011; CURIAO et al., 2010). Essa associação também foi observada em outras espécies de enterobactérias. Um estudo brasileiro, realizado por Tavares e colaboradores (2015), com 83 amostras de enterobactérias produtoras de KPC (exceto *K. pneumoniae*) isoladas no período de 2009 à 2011, demonstrou que a associação de KPC com genes de ESBLs foi encontrada em 53% das amostras (45,8% produtoras de TEM, 6% produtoras de SHV e 22,9% produtoras de CTX-M) (TAVARES et al.,

2015). Estudo realizado na China por Li e colaboradores (2011) detectou amostras de enterobactérias que apresentavam o gene *bla*_{KPC} e os genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{CTX-M-14} e *bla*_{SHV-7} associados (LI et al., 2011)

Enterobactérias, destacadamente, a espécie *K. pneumoniae*, como dito anteriormente, se tornou um grande problema de saúde pública, visto que seus mecanismos de resistência encontram-se disseminados. Sendo assim, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre as amostras podem auxiliar na compreensão da disseminação de resistência bacteriana. Deste modo, a metodologia do PFGE, foi realizada nas 14 amostras de *S. marcescens* e foi observada a presença de um pulsotipo prevalente (smA - 92,8%). Esses resultados demonstram um alto grau de similaridade entre essas amostras. Apesar de um número pequeno de amostras, pode-se observar a disseminação do mesmo pulsotipo resistente a carbapenêmicos entre diferentes Instituições. Esses resultados não foram observados nas quatro amostras de *E. cloacae*, onde todas apresentaram um perfil de fragmentação diferente, demonstrando que são amostras de origens genéticas distintas.

Em relação às 47 amostras de *K. pneumoniae* incluídas no estudo, foram identificados 15 pulsotipos distintos (kpA até kpO). No entanto, o pulsotipo prevalente (kpA) foi encontrado em 40,42% das amostras, indicando a presença de possíveis surtos com a disseminação desse clone no diferentes hospitais.

O MLST é uma técnica mais adequada para investigações epidemiológicas de longos períodos e de amostras não relacionadas geograficamente (VIMONT et al., 2008). No nosso estudo, o MLST foi realizado apenas para as amostras de *K. pneumoniae*. Foi observada a prevalência do CC258, presente em 66,6% (10\14) das amostras de *K. pneumoniae* analisadas, albergando genes pertencentes aos perfis genéticos de resistência mais prevalentes: P1 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1}), P2 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-Mgp1}) e P3 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1} e *bla*_{CTX-Mgp9}).

Em um estudo, realizado por Pereira e colaboradores (2013), foram analisadas 113 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC de diversos estados brasileiros e observou-se a presença de 22 pulsotipos. A técnica de MLST foi realizada em 39 amostras representantes de cada pulsotipo relatado por PFGE e também foram encontrados 22 STs. Esse mesmo estudo identificou que os STs mais prevalentes foram os ST437, ST340 e ST11, corroborando os nossos

resultados. Esses STs pertencem CC258, que é disseminado em várias regiões do mundo e albergam vários genes relevantes, tais como: *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}, *bla*_{OXA-48-like}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} (LEE et al., 2016; MUNOZ-PRICE et al., 2013).

Duas amostras do nosso estudo pertencem ao ST628 e apresentaram o perfil de resistência P2 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-Mgp1}). Esse ST foi descrito pela primeira vez por Dolejska e colaboradores em amostras de *K. pneumoniae* isoladas de hospitais da República Checa que apresentavam os genes *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{TEM} (DOLEJSKA et al., 2012). É importante destacar que o ST628, até o presente momento, não foi descrito em nenhuma região do Brasil, sendo esse, o primeiro relato em nosso país.

Em um estudo realizado na China, em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC, foi relatada a presença do ST37 (YANG et al., 2013) que também foi detectado na Croácia (BEDENIC et al., 2012), Itália (ORSI et al., 2011) e Espanha (DIESTRA et al., 2011). Esse ST, amplamente distribuído pelo mundo e muitas vezes associado a surtos, é caracterizado pelo alto nível de resistência aos beta-lactâmicos apresentando os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-M-gp1} (LOPEZ-CAMACHO et al., 2014). Em nosso estudo foi encontrada uma amostra pertencente ao ST37 e a mesma apresentava os genes pertencentes ao perfil prevalente P1 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1}) semelhante aos resultados descritos anteriormente.

Uma outra amostra de nosso estudo apresentou o ST394 e foi caracterizada por apresentar o perfil P1 (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-Mgp1}). Interessantemente, esse ST ainda não foi relacionado a infecções humanas e no banco de dados de STs de *K. pneumoniae* (<http://bigsd.b.pasteur.fr/klebsiella/klebsiella.html>) a única amostra depositada com esse ST é proveniente de pássaros selvagens da Oceania albergando o gene *bla*_{IMP}. Deve-se destacar que nesse trabalho foram encontrados dois STs: ST628 e ST394, que até o momento, não foram descritos no Brasil.

Um fator que pode contribuir significativamente para a disseminação de micro-organismos multirresistentes é a globalização. O intercâmbio de pessoas, seja por turismo, conflitos em seus países, trabalho ou qualquer outro motivo, são fatores importantes para a aquisição e dispersão de enterobactérias multirresistentes, especialmente quando são visitados locais onde esses micro-organismos são endêmicos (VAN DER BIJ; PITOUT, 2012).

Os resultados obtidos no nosso estudo envolvendo enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos demonstram a importância do constante monitoramento dos mecanismos de resistência e da vigilância epidemiológica nas instituições de saúde, a fim de caracterizar os principais perfis de resistência aos antimicrobianos e detectar os micro-organismos circulantes em cada Instituição.

7 CONCLUSÕES

Ao final deste trabalho, pode-se concluir que:

- As amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos incluídas neste estudo apresentaram percentual significativo de resistência aos antimicrobianos considerados de último recurso, como colistina e tigeciclina, fato preocupante devido às limitações de opções terapêuticas.
- A resistência à tigeciclina em *K. pneumoniae* foi observada em amostras de oito pulsotipos distintos, demonstrando uma capacidade preocupante dessa espécie em se tornar resistente a esse fármaco.
- As amostras analisadas apresentaram uma baixa taxa de resistência aos antimicrobianos amicacina e gentamicina, indicando que estes permanecem como uma boa opção de tratamento.
- As discrepâncias ocorridas entre os testes de difusão a partir do disco e o teste de gradiente com concentrações crescentes do antimicrobiano, sobretudo para a detecção da resistência aos carbapenêmicos, demonstraram a dificuldade dessa detecção, bem como a importância da utilização de mais de um método fenotípico para esse fim e/ou do uso de métodos moleculares.
- Constatou-se a disseminação do gene *bla*_{KPC} e sua associação com genes codificadores de ESBL em todas as amostras do nosso estudo. A associação mais prevalente ocorreu em amostras de *K. pneumoniae* albergando os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{CTX-Mgp1}. Esses genes mostraram-se amplamente disseminados nessa espécie.
- A genotipagem das amostras de *K. pneumoniae* demonstrou a circulação de um genótipo resistente a carbapenêmicos predominante (kpA) em nossa região.

- Mesmo com um número reduzido de amostras analisadas, a presença de um único pulsotipo de *S. marcescens* em 13 das 14 amostras demonstrou a circulação de um único genótipo entre as Instituições de nosso Estado, indicando transmissão inter-hospitalar.
- Os dois principais genótipos (kpA e kpB) de *K. pneumoniae* pertencem, respectivamente, ao ST340 e ST437, integrantes do complexo clonal altamente disseminado no Brasil e com muitos genes de resistência, o CC258, demonstrando a circulação desse nas Instituições de nosso Estado.
- Os ST394 e ST628 de *K. pneumoniae*, encontrados no nosso trabalho, foram descritos pela primeira vez no Espírito Santo e no Brasil. Deve ser destacado o fato do ST628 ter sido descrito nas duas amostras resistentes às polimixinas do genótipo kpD, o que torna ainda mais preocupante a sua disseminação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL JAROUSHA, A. M. K. et al. An outbreak of *Serratia marcescens* septicaemia in neonatal intensive care unit in Gaza City, Palestine. **Journal of Hospital Infection**, v. 70, n. 2, p. 119–126, 2008.
- ALVES, A. P.; BEHAR, P. R. P. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de KPC em um hospital terciário do sul do Brasil. **Revista da AMRIGS, Porto Alegre**, v. 57, n. 3, p. 213–218, 2013.
- AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.
- ANDERSON, B. et al. Molecular and descriptive epidemiology of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* in hospitalized infants. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 29, n. 3, p. 250–255, 2008.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *blaKPC-2* by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 55, n. 7, p. 3579–3583, 2011.
- ANDRADE, L. N. et al. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 7, p. 2530–2535, 2014.
- ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013. **Câmara Técnica De Resistência Microbiana Em Serviços De Saúde**, p. 1–22, 2013a.
- ANVISA. Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde. Módulo 9: Infecções Virais. p. 150, 2013b.
- ANVISA. Brasília, 31 de dezembro de 2015. n. 2014, 2015.

BAJPAI, T. et al. Prevalence of TEM, SHV, and CTX - M beta - lactamase genes in the urinary isolates of a tertiary care hospital. **Avicenna Journal of Medicine** |, v. 7, n. 1, p. 12–16, 2017.

BARANIAK, A. et al. NDM-producing *Enterobacteriaceae* in Poland, 2012-14: Inter-regional outbreak of *Klebsiella pneumoniae* ST11 and sporadic cases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 1, p. 85–91, 2016.

BARTELS, D. B. et al. Nosocomial infection in small for gestational age newborns with birth weight <1500 g: a multicentre analysis. **Archives of disease in childhood. Fetal and neonatal edition**, v. 92, n. 6, p. F449–F453, 2007.

BARTOLLETI, F. et al. Polymyxin B resistance in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*, São Paulo, Brazil. v. 22, n. 10, p. 1849–1851, 2016.

BEDENIC, B. et al. First report of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Croatia. **Journal of Chemotherapy**, v. 24, p. 237–239, 2012.

BIALVAEI, A. Z.; SAMADI KAFIL, H. Colistin, mechanisms and prevalence of resistance. **Current medical research and opinion**, v. 7995, p. 1–54, 2015.

BOWERS, D. R.; HUANG, V. Emerging Issues and treatment strategies in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). **Current Infectious Disease Reports**, v. 18, n. 12, p. 48, 2016.

BRANAS, P. et al. Molecular epidemiology of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Madrid: Successful establishment of an OXA-48 ST11 clone. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 46, n. 1, p. 111–116, 2015.

BRATU, S. et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City. **American Medical Association**, v. 165, n. 12, p. 1430–1435, 2005.

BRATU, S. et al. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-

borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 44, n. 7, p. 972–5, 2007.

BRINK, A. J. et al. Multicomponent antibiotic substances produced by fermentation: Implications for regulatory authorities, critically ill patients and generics. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 1–6, 2014.

BROBERG, C. A.; PALACIOS, M.; MILLER, V. L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. **F1000Prime reports**, v. 6, n. 1, p. 64, 2014.

BUSH, K.; BRADFORD, P. A. β -lactams and β -lactamase inhibitors: An Overview. **Cold Spring Harbor Perspectives Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1–22, 2016.

BUSH, K.; FISHER, J. F. Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new beta-lactamases from gram-negative bacteria. **Annual Reviews Microbiol**, v. 65, n. 1, p. 455–478, 2011.

CALBO, E.; GARAU, J. The changing epidemiology of hospital outbreaks due to ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*: the CTX-M-15 type consolidation. **Future Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 1063–1075, 2015.

CAMPOS, A. C. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K pneumoniae*: A systematic review. **American Journal of Infection Control**, v. 44, n. 11, p. 1374-1380, 2016.

CANNATELLI, A. et al. MgrB inactivation is a common mechanism of colistin resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* of clinical origin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5696–5703, 2014.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466–475, 2006.

CARRILLHO, C. M. D. et al. Colistin-resistant *Enterobacteriaceae* infections: Clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 87, n. 2, p. 253-257, 2016.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. A. et al. Detection of NDM-1-, CTX-M-15-, and qnrB4-producing *Enterobacter hormaechei* isolates in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2475–2476, 2014.

CARVALHO-ASSEF, A. P. D. ALINCOURT et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 12, p. 2956–2957, 2013.

CASOLARI, C. et al. *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit: Two long-term multiclone outbreaks in a 10-year observational study. **New Microbiologica**, v. 36, n. 4, p. 373–383, 2013.

CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p. 570–573, 2008.

CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. **Current**, v. 1, n.1, p. 5-112, 2013.

CHALOVICH, J. M.; EISENBERG, E. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: A menace to our most vulnerable patients. **Cleve Clin J Med.**, v. 257, n. 5, p. 2432–2437, 2013.

CHANG, Y. Y. et al. Clinical features of patients with carbapenem nonsusceptible *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in intensive care units: A nationwide multicenter study in Taiwan. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 48, n. 2, p. 219–225, 2015.

CHEN, L. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 12, p. 686–696, 2014.

CURIAO, T. et al. Emergence of *bla*KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1608–1614, 2010.

DAIKOS, G. L. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections: Lowering mortality by antibiotic combination schemes and the role of carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 2322–2328, 2014.

DALLENNE, C. et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 3, p. 490–495, 2010.

DAMJANOVA, I. et al. Expansion and country wide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005 - The new “MRSA”? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n. 5, p. 978–985, 2008.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417–433, 2010.

DAWCZYNSKI, K. et al. Intensified colonisation screening according to the recommendations of the German Commission for Hospital Hygiene and Infectious Diseases Prevention (KRINKO): identification and containment of a *Serratia marcescens* outbreak in the neonatal intensive care . **Infection**, v. 44, n. 6, p. 739–746, 2016.

DEAK, D. et al. Progress in the fight against multidrug-resistant bacteria? A review of U.S. food and drug administration–approved antibiotics, 2010–2015. **Annals of Internal Medicine**, v. 165, n. 5, p. 363-372 , 2016.

DIANCOURT, L. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 4178–4182, 2005.

DIESTRA, K. et al. Multiclonal epidemic of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing DHA-1 in a Spanish hospital. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 7, p. 1032–1036, 2011.

DOLEJSKA, M. et al. Dissemination of IncFIK-type plasmids in multiresistant CTX-M-15-producing *Enterobacteriaceae* isolates from children in hospital paediatric oncology wards. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 40, n. 6, p. 510–515, 2012.

DURMAZ, R. et al. The optimization of a rapid pulsed-field gel electrophoresis protocol for the typing of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 62, n. 5, p. 372–377, 2009.

FALAGAS, M. E.; KASIAKOU, S. K. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 40, n. 9, p. 1333–1341, 2005.

FALAGAS, M.; MICHALOPOULOS, A. Polymyxins: old antibiotics are back. **The Lancet**, v. 367, n. 1, p. 633–634, 2006.

FERNANDES, M. R. et al. First Report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a human infection in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p. 6415–6417, 2016.

FERREIRA, A. M. et al. First report of a clinical isolate of New Delhi metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 1, p. 73–74, 2016.

FOURNIER, J. B. et al. *Serratia marcescens* Bullous Cellulitis in a splenectomized

patient: A case report and review of the literature. **International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 15, n. 2, p. 161–168, 2016.

GALES, A. C. et al. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: Results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 4, p. 354–360, 2012.

GALES, A. C.; JONES, R. N.; SADER, H. S. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 12, n. 4, p. 315–321, 2006.

GIRI, A. V et al. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. **BioMed Central Microbiology**, v. 4, n. 1, p. 11, 2004.

GIROMETTI, N. et al. *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: epidemiology and impact of inappropriate empirical therapy. **Medicine (Baltimore)**, v. 93, n. 17, p. 298–309, 2014.

GISKE, C. G. Contemporary resistance trends and mechanisms for the old antibiotics colistin, temocillin, fosfomicin, mecillinam and nitrofurantoin. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 10, p. 899–905, 2015.

GUPTA, N. et al. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 1, p. 60–67, 2011.

GUPTA, N. et al. Outbreak of *Serratia marcescens* bloodstream Infections in patients receiving parenteral nutrition prepared by a compounding pharmacy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 59, n. 1, p. 1–8, 2014.

GUZMAN-BLANCO, M.; CASELLAS, J. M.; SADER, H. S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin America. The giant is awakening. **Infectious Disease**

Clinics of North America, v. 14, n. 1, p. 67–81, 2000.

HEJAZI, A.; FALKINER, F. *Serratia marcescens*. v. 49, n. 4, p. 303–310, 1997.

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

HOBAN, D. J. et al. Global in vitro activity of tigecycline and comparator agents: Tigecycline evaluation and surveillance Trial 2004–2013. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 27, 2015.

ITO-KAGAWA, M.; KOYAMA, Y. Selective cleavage of a peptide antibiotic, colisitine by colistinase. **The Journal of Antibiotics**, v. 33, n. 12, p. 1551-1555, 1980.

JEON, J. H. et al. Structural basis for carbapenem-hydrolyzing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9654–9692, 2015.

KIM, J. Y. et al. Structural basis for the extended substrate spectrum of CMY-10, a plasmid-encoded class C beta-lactamase. **Molecular Microbiology**, v. 60, n. 4, p. 907–916, 2006.

KOHLER, J. et al. In vitro activities of the potent, broad-spectrum carbapenem MK-0826 (L-749,345) against broad-spectrum beta-lactamase-and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* clinical isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 5, p. 1170–6, 1999.

KOMIJANI, M.; BOUZARI, M.; RAHIMI, F. Detection and characterization of a novel lytic bacteriophage (vB-KpneM-Isf48) against *Klebsiella pneumoniae* isolates from infected wounds carrying antibiotic-resistance genes (TEM, SHV, and CTX-M). **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v.1, n.1, p 1-9, 2016.

LANDMAN, D. et al. Polymyxins revisited. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 21, n.

3, p. 449–465, 2008.

LAXMINARAYAN, R. et al. Antibiotic resistance-the need for global solutions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057–1098, 2013.

LEE, C. R. et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 1, p. 1–30, 2016.

LEE, J. H. L. AND S. H. Carbapenem resistance in Gram-negative pathogens: emerging non-metallo-carbapenemases. **Research Journal of Microbiology**, v. 1, n.1, p. 1-22, 2006.

LI, G. et al. Novel genetic environment of the plasmid-mediated KPC-3 gene detected in *Escherichia coli* and *Citrobacter freundii* isolates from China. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 4, p. 575–580, 2011.

LI, J. et al. Evaluation of colistin as an agent against multi-resistant Gram-negative bacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 25, n. 1, p. 11–25, 2005.

LIMA, K. V. B. et al. Surto de infecção neonatal a partir de clone endêmico de *Serratia marcescens*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 1, p. 106–109, 2011.

LIU, Y. Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism *mcr-1* in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 161–168, 2016.

LIVERMORE, D. M. Current epidemiology and growing resistance of Gram- Negative pathogens. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 27, n. 2, p. 128–142, 2012.

LOPEZ-CAMACHO, E. et al. Genomic analysis of the emergence and evolution of

multidrug resistance during a *Klebsiella pneumoniae* outbreak including carbapenem and colistin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. 632–636, 2014.

LÓPEZ-FABAL, M. F. et al. Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identifying respiratory bacterial pathogens: a fast and efficient method. **Revista española de quimioterapia: publicación oficial de la Sociedad Española de Quimioterapia**, v. 28, n. 5, p. 242–6, 2015.

MAHLEN, S. D. *Serratia* infections: From military experiments to current practice. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 755–791, 2011.

MAMMERI, H. et al. Phenotypic and biochemical comparison of the carbapenem-hydrolyzing activities of five plasmid-borne AmpC β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4556–4560, 2010.

MARTINEZ, P.; SANCHEZ, L.; MATTAR, S. Carbapenemase KPC-2 in ESBL-producing *Enterobacteriaceae* from two clinics from Villavicencio, Colombia. **The Brazilian of Journal Infectious Diseases**, v. 8, n. 1, p. 100–101, 2014.

MATASEJE, F. L. et al. Carbapenem-producing *Enterobacteriaceae* in Canada: Results from the Canadian nosocomial infection surveillance program, 2010-2014. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 11, p. 6784-6794, 2016.

MEDIAVILLA, J. R. et al. Colistin- and carbapenem-resistant *Escherichia coli* harboring *mcr-1* and *bla*NDM-5, causing a complicated urinary tract infection in a patient from the United States. **American Society for Microbiology**, v. 7, n. 4, p. 5–8, 2016.

MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p. 333–334, 2009.

MORRIL, H. J. et al. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 1–8, 2015.

MORRISSEY, I. et al. A review of ten years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. **Pharmaceuticals (Basel)**, v. 6, n. 11, p. 1335–1346, 2013.

MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 785–796, 2013.

NATHAN, C.; CARS, O. Antibiotic resistance - problems, progress, and prospects. **The New England Journal Of Medicine**, v. 371, n. 19, p. 1761– 1763, 2014.

NOGUEIRA, K. DA S. et al. Distribution of extended-spectrum beta-lactamase types in a Brazilian tertiary hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 2, p. 162–169, 2015.

NORDMANN, P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 2, p. 51–56, 2014.

NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: A call for action! **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 5, p. 411–412, 2012.

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

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: Here is the storm! **Trends in Molecular Medicine**, v. 18, n. 5, p. 263–272, 2012.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 821–830, 2014.

O'NEILL, J. Antimicrobial Resistance : Tackling a crisis for the health and wealth of nations. **Review on Antimicrobial Resistance**, v.1, n.1, p. 1–16, 2014.

ORSI, G. B. et al. Risk factors and clinical significance of ertapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients. **Journal of Hospital Infection**, v. 78, n. 1, p. 54–58, 2011.

OTEO, J. et al. Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1, 11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, n. 3, p. 524–528, 2009.

PALACIOS-BAENA, Z. R. et al. Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain. **Journal of Infection**, v. 72, n. 2, p. 152–160, 2016.

PANKEY, G. A. Tigecycline. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 3, p. 470–480, 2005.

PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS, M. et al. The role of colonization pressure in the dissemination of colistin or tigecycline resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients. **Infection**, v. 42, n. 5, p. 883–890, 2014.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum beta-lactamases : a Clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 265–268, 2009.

PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: Spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 2, p. 312–316, 2013.

PEREIRA, P. S. et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4453–4456, 2015.

PHILIPPON, A.; SLAMA, P.; LABIA, R. A structure-based classification of class A beta-lactamases, a broadly diverse family of enzymes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 29, n. 1, p. 29–57, 2016.

PITOUT, J. D. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 10, p. 5873–5884, 2015.

POIREL, L. et al. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15–22, 2004.

POLILLI, E. et al. Rapidly controlled outbreak of *Serratia marcescens* infection/colonisations in a neonatal intensive care unit, Pescara general hospital, Pescara, Italy, april 2011. **Eurosurveillance**, v. 16, n. 24, p. 5–7, 2011.

POTRON, A. et al. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* over a 11-year period, 2001 to 2011. **Eurosurveillance**, v. 18, n. 31, p. 1-14, 2013.

POTTEGÅRD, A. et al. Use of antibiotics in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 34, n. 2, p. 16–22, 2015.

POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Drug Resistance Updates**, v. 29, n. 1, p. 30–46, 2016.

QUAN, J. et al. High prevalence of ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in community-onset bloodstream infections in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 7, n. 1, p. 1830, 2016.

RABIER, V. et al. Hand washing soap as a source of neonatal *Serratia marcescens* outbreak. **Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics**, v. 97, n. 10, p. 1381–1385, 2008.

ROBERT, J. et al. Incidence rates of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* clinical isolates in France: A prospective nationwide study in 2011-12. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 10, p. 2706–2712, 2014.

ROBIN, F. et al. ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in France: inventory assessed by a multicentric study. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 1, n.1., p.1–39, 2016.

ROCA, I. et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. **New Microbes and New Infections**, v. 6, n. 1, p. 22–29, 2015.

ROSE, W. E.; RYBAK, M. J. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. **Pharmacotherapy**, v. 26, n. 8, p. 1099–110, 2006.

ROSSI, F. et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 98–101, 2016a.

ROSSI, I. G. et al. Outbreaks of colistin-resistant and colistin-susceptible KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Brazilian intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v. 94, n. 4, p. 322-329, 2016b.

SADER, H. S. et al. Tigecycline antimicrobial activity tested against clinical bacteria from Latin American medical centres: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2011-2014). **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 48, n. 2, p. 144–150, 2016.

SAMPAIO, J. L. M. et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3566–3567, 2014.

SAMPAIO, L. J. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in *Enterobacteriaceae* in Brazil: focus on beta-lactams and polymyxins. **Brazilian Journal of Microbiol**, v. 47, n. 1, p. 31–37, 2016.

SCHAAR, V. et al. Group a *Streptococci* are protected from amoxicillin-mediated killing by vesicles containing β -lactamase derived from *Haemophilus influenzae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 1, p. 117–120, 2014.

SEIBERT, G. et al. Nosocomial infections by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing enterobacteria in a teaching hospital. **Einstein (Sao Paulo)**, v. 12, n. 3, p. 282–286, 2014.

SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: The predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 70, n. 2, p. 274–277, 2011.

SPELLBERG, B. et al. Trends in antimicrobial drug development: implications for the future. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 9, p. 1279–1286, 2004.

STOKES, H. W.; GILLINGS, M. R. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 35, n. 5, p. 790–819, 2011.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 27, n. 2, p. 116–129, 2009.

SUN, Y. et al. The emergence of clinical resistance to tigecycline. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 41, n. 2, p. 110–116, 2013.

SYKES, R. B. et al. Azthreonam (SQ 26,776), a synthetic monobactam specifically

active against aerobic gram-negative bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 21, n. 1, p. 85–92, 1982.

TAVARES, C. P. et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Enterobacteriaceae* (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 326–330, 2015.

TEILLANT, A. et al. Potential burden of antibiotic resistance on surgery and cancer chemotherapy antibiotic prophylaxis in the USA: A literature review and modelling study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 1429–1437, 2015.

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

TUMBARELLO, M. et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 55, n. 7, p. 943–950, 2012.

TUMBARELLO, M. et al. Infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: Differences in therapy and mortality in a multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 7, p. 2133–2143, 2015.

TZOUVELEKIS, L. S. et al. Treating infections caused by carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 20, n. 9, p. 862–872, 2014.

UDUMAN, S. A. et al. An outbreak of *Serratia marcescens* infection in a special-care baby unit of a community hospital in United Arab Emirates: The importance of the air conditioner duct as a nosocomial reservoir. **Journal of Hospital Infection**, v. 52, n. 3, p. 175–180, 2002.

VADING, M. et al. Comparison of disk diffusion, Etest and VITEK2 for detection of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* with the EUCAST and CLSI breakpoint systems. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 5, p. 668–674,

2011.

VAN DER BIJ, A. K.; PITOUT, J. D. D. The role of international travel in the worldwide spread of multiresistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 9, p. 2090–2100, 2012.

VAN DUIN, D. et al. Tigecycline therapy for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) bacteriuria leads to tigecycline resistance. v. 41, n. 3, p. 1120–1131, 2014.

VASOO, S.; BARRETO, J. N.; TOSH, P. K. Emerging Issues in gram-negative bacterial resistance: An update for the practicing clinician. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 90, n. 3, p. 395–403, 2015.

VERAS, D. L. et al. Prevalence of the blaSHV gene in *Klebsiella pneumoniae* Isolates obtained from hospital and community infections and from the microbiota of healthy individuals in Recife, Brazil. **Current Microbiology**, v. 62, n. 5, p. 1610–1616, 2011.

VETTER, L. et al. A hospital-wide outbreak of *Serratia marcescens*, and Ishikawa's "Fishbone" analysis to support outbreak control. **Quality management in health care**, v. 25, n. 1, p. 1–7, 2016.

VIMONT, S. et al. Comparison of PFGE and multilocus sequence typing for analysis of *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 1308–1310, 2008.

VOELZ, A. et al. Outbreaks of *Serratia marcescens* in neonatal and pediatric intensive care units: Clinical aspects, risk factors and management. **International Journal of Hygiene and Environmental Health**, v. 213, n. 2, p. 79–87, 2010.

WHO. Antimicrobial resistance. Bulletin of the World Health Organization, v. 61, n. 3, p. 383–94, 2014.

YANG, J. et al. A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese hospital: Dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 11, p. 9-15, 2013.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing-beta-lactamase, KPC-1 , from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2001.

YONG, D. et al. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5046–5054, 2009.

ZAGORIANOU, A. et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. **Eurosurveillance**, v. 17, n. 7, p. 1–7, 2012.