



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORES DE KPC-2 EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO
EPIDEMIOLÓGICO DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella
pneumoniae* PRODUTORES DE KPC-2 EM UM HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientadora: Profa. Dra. Mariangela Hungria.

Londrina
2012

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina.**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

V855c Vivan, Ana Carolina Polano.

Caracterização molecular e estudo epidemiológico de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-2 em um Hospital Universitário / Ana Carolina Polano Vivan. – Londrina, 2012.
74f. : il.

Orientador: Mariangela Hungria.

Coorientador: Eliana Carolina Vespero.

Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2012.
Inclui bibliografia.

1. Bactérias gram-negativas – Teses. 2. Antibióticos beta-lactâmicos – Teses. 3. Enzimas microbianas – Teses. 4. Drogas – Resistência em microorganismos – Teses. 5. Infecção hospitalar – Teses. I. Hungria, Mariangela. II. Vespero, Eliana Carolina. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. IV. Título.

CDU 579.841

ANA CAROLINA POLANO VIVAN

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE
ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE
KPC-2 EM UM HOSPITAL UNIVERSITÁRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dra. Mariangela Hungria
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
– EMBRAPA

Profa. Dra. Renata Katsuko Takayama
Kobayashi
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Profa. Dra. Márcia Regina Eches Perugini
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de março de 2012.

Dedico este trabalho
aos meus pais, Heliete e Marco, pelo
exemplo de vida e coragem,
e à minha avó querida, Dona Nilce, pela
ternura e amor incondicionais.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar força em toda a caminhada e mostrar que só nos entrega o peso que podemos carregar;

À Profa. Dra. Eliana Carolina Vespero, por tudo. Não tenho palavras pra descrever minha gratidão pelo empenho, dedicação, confiança, carinho, amizade e paciência. Obrigada por despertar meu amor pela Microbiologia, por estar sempre ao meu lado, nas vezes em que mais precisei, por me abrir tantas portas, por ser, além de excelente co-orientadora, uma grande amiga;

À Dra. Mariangela Hungria da Cunha, pela oportunidade e confiança, para que eu pudesse desenvolver esse trabalho. Sem seu apoio e orientação, nada disso teria sido possível;

À Dra. Sílvia Figueiredo Costa, por me abrir as portas de seu laboratório em São Paulo, onde fui muito bem recebida, para realizar os experimentos. Agradeço a atenção, a oportunidade e as sugestões, sempre muito pertinentes;

À Profa. Dra. Renata Kobayashi, por ser essa pessoa tão receptiva, por toda a ajuda e pela participação nas bancas de qualificação e defesa;

À Profa. Dra. Márcia Perugini, por todas as sugestões do trabalho, pelo apoio, disponibilidade, paciência e pela participação na banca de defesa;

Às demais docentes do Laboratório de Microbiologia do HU, Marsileni, Floristher, Aline e Regina, pelo apoio, incentivo e sugestões;

Aos funcionários do Laboratório de Microbiologia e da CCIH, pela paciência, companheirismo, ajuda e amizade, em especial à Gerusa, por ser essa pessoa maravilhosa e extremamente competente e dedicada, sem a qual esse trabalho não seria possível;

Às estagiárias e amigas Ana Cláudia, Ana Paula, Isadora, Angélica, Fernanda e Danielle, obrigada pela dedicação, esforço, capricho e companhia em tardes intermináveis de antibiograma e PCR. Desejo a todas muita sorte!

Ao pessoal do LIM-54, do IMT da USP, muito obrigada pela acolhida, ajuda e companhia nos 5 meses que passei aí. Em especial obrigada à Juliana e à Camila, por toda a paciência que tiveram ao ensinar as técnicas novas;

À Profa. Dra. Maria Cristina Tognim, da Universidade Estadual de Maringá, pela participação na banca de qualificação e sugestões para o trabalho;

À Pâmela, da Embrapa, pelo auxílio, participação na defesa do plano, e ao Renan, pela força com os dendrogramas e o Bionumerics;

Ao meu amigo Felipe, por ser tão prestativo e me quebrar muito galhos, muito obrigada!

À Sara, do laboratório da Profa. Renata, por me fazer acreditar que é possível fazer um gel de poliacrilamida! Adorei te conhecer, obrigada pela paciência e dedicação!

Às minhas queridíssimas amigas e companheiras na caminhada rumo ao título de Mestre, Nayara e Bárbara, obrigada pela companhia, apoio, risadas e amizade conquistados ao longo desses anos. Agradeço a Deus por ter colocado vocês em meu caminho!

Às amigas, companheiras de lar e irmãs por escolha, Fernanda e Bianca, pela paciência, incentivo e por confortarem meu coração todas as vezes que precisei;

A todos os meus amigos e amigas, de perto ou de longe, pela parceria, amizade e confiança em minha capacidade. Obrigada a todos os meus amigos por sempre me empurrarem pra frente, vocês são a família que escolhi;

A todos os meus familiares, minha avó maravilhosa, meus tios e tias, meus primos e primas. Amo vocês;

Aos meus pais, os maiores incentivadores desse trabalho. À minha mãe, a mulher de garra e sensibilidade, que acreditou em mim mais do que eu mesma, e que se enche de orgulho ao ver esse nosso sonho concretizado! Ao meu pai, o homem corajoso que me mostrou que pra realizar um sonho basta querê-lo, que me ensinou os princípios que me levaram a ser quem sou hoje. Agradeço a vocês, meus pais, por tudo o que fizeram e fazem por mim todos os dias de suas vidas. Eu amo vocês!

*“A percepção do desconhecido é a
mais fascinante das experiências.*

*O homem que não tem os olhos abertos
para o mistério, passará pela vida sem ver nada.”*

(Albert Einstein)

VIVAN, Ana Carolina Polano. **Caracterização molecular e estudo epidemiológico de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* produtores de KPC-2 em um Hospital Universitário**. 2012. 74 f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2012.

RESUMO

A ocorrência de enzimas que degradam os carbapenêmicos, como KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), em enterobactérias, tornou-se endêmica nos hospitais, sendo responsável pelo aumento do número de surtos em várias instituições de saúde no Brasil e vários países ao redor do mundo. *K. pneumoniae* é o patógeno mais comum que transporta genes *bla*_{KPC} e desempenha papel importante em infecções hospitalares causando, principalmente, pneumonia, sepse, infecção urinária e de feridas cirúrgicas. Este estudo foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina, com o objetivo de analisar 54 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de KPC oriundos de materiais de infecções de diferentes pacientes internados neste hospital, no período de julho de 2009 a julho de 2010. A caracterização de infecção foi feita pela CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar), com base nos critérios do CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*). Estas amostras apresentaram susceptibilidade reduzida a pelo menos um dos carbapenêmicos avaliados (imipenem, meropenem, ertapenem). As amostras foram identificadas através do sistema automatizado Microscan Walkaway (Siemens), e submetidas a testes de sensibilidade a antimicrobianos, através de disco difusão e/ou testes de diluição (Concentração Inibitória Mínima (CIM)), para os carbapenêmicos, além de polimixina B, colistina, gentamicina, tigeciclina e fosfomicina. Os resultados dos dois métodos foram avaliados, e a porcentagem de erro relativa aos testes foi calculada, reforçando que os métodos de diluição (CIM) devem ser considerados padrão ouro na determinação de sensibilidade. Resultados de CIM₅₀ e CIM₉₀ também foram obtidos. Os isolados foram submetidos ao teste de Hodge modificado e teste da adição de ácido borônico para confirmação da presença de carbapenemases, e, posteriormente, à PCR (reação em cadeia da polimerase), para pesquisa de genes *bla*_{KPC} e MBL (metalo-β-lactamases), sendo que o gene *bla*_{KPC} foi encontrado em todos os 54 isolados, mas nenhum gene MBL. O sequenciamento indicou que todas as cepas pertenciam ao subtipo KPC-2, e a análise de PFGE (eletroforese em gel de campo pulsado) mostrou distribuição policlonal entre os isolados desse hospital, com predominância de 3 clones. As informações que constavam dos prontuários médicos dos 54 pacientes foram analisadas e tabuladas para uma visão geral do quadro clínico destes.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. KPC. Resistência a carbapenêmicos. Carbapenemase.

VIVAN, Ana Carolina Polano. **Molecular characterization and epidemiologic study of clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* at a university hospital.** 2012. 74 f. Dissertation (Microbiology Master Degree) – Londrina State University, Londrina, 2012.

ABSTRACT

The occurrence of enzymes that degrade carbapenems, such as KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), in Enterobacteriaceae, has become endemic in hospitals and is responsible for the increased number of outbreaks in many health institutions in Brazil and several countries around the world. *K. pneumoniae* is the most common pathogen harbouring *bla*_{KPC} genes and plays an important role in causing nosocomial infections, mainly pneumonia, sepsis, urinary tract infection and surgical wounds infection. This study was conducted at the Laboratory of Microbiology, University Hospital of Londrina, and aimed to describe clinical and microbiological aspects of infections caused by KPC-producing *K. pneumoniae* in 54 clinical isolates from patients hospitalized at this hospital, from July 2009 to July 2010. The infection characterization was obtained by CCIH (Comissão de Controle de Infecção Hospitalar), according to CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) criteria. Samples were obtained from various clinical specimens, characterized as infection, with one sample per patient. They presented reduced susceptibility to at least one of the available carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem). The samples were identified by automated Microscan Walkaway (Siemens) system and tested for antimicrobial susceptibility by disk diffusion and/or dilutional tests (Minimal Inhibitory Concentration (MIC)) for carbapenems, polymyxin B, colistin, gentamicin, tigecycline and fosfomicin. The results of both methods were evaluated. The percentage of error was estimated, and reinforced that dilution methods (CIM) should be considered gold standard in determining sensitivity. Also, we obtained MIC₅₀ and MIC₉₀ results. The isolates were also tested by the modified Hodge test and boronic acid to confirm the presence of carbapenemases and were submitted to PCR (polymerase chain reaction), to search for *bla*_{KPC} and MBL (metallo- β -lactamases) genes, and *bla*_{KPC} gene was found in all 54 isolates, but not MBL. Sequencing indicated that all isolates belonged to subtype KPC-2, and PFGE analysis (pulsed field gel electrophoresis) showed polyclonal distribution among the isolates, with predominance of 3 main clones. The information in medical records of the 54 patients was analyzed and tabulated to obtain an overview of the clinical picture.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. KPC. Carbapenem resistance. Carbapenemase.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	Ā
2	OBJETIVOS	1F
2.1	OBJETIVOS GERAIS	1F
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	1F
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1G
3.1	AGENTE ETIOLÓGICO.....	1G
3.2	RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS.....	1I
3.2.1	Produção de β -lactamases	1Í
3.2.1.1	ESBL	FĪ
3.2.1.2	Amp C.....	FJ
3.2.2	Carbapenemases	2€
3.2.2.1	MBL	2F
3.2.2.2	OXA.....	2G
3.2.2.3	KPC	2H
3.2.3	Alteração das PBPs.....	2Í
3.2.4	Alteração dos Canais de Porina	2Ī
3.2.5	Sistema de Efluxo.....	2Ĵ
3.3	EPIDEMIOLOGIA DE KPC.....	2Ķ
3.4	TRATAMENTO DE KPC	3G
	REFERÊNCIAS	3I
	ARTIGO 1 – Molecular characterization and epidemiology of KPC-2 producing Klebsiella pneumoniae isolates at an University Hospital	4Ī
	ARTIGO 2 - Comparison of methods to evaluate susceptibility of KPC (Klebsiella pneumoniae carbapenemase)-producing K. pneumoniae isolates	ĪĴ
	CONCLUSÕES	7I

1 INTRODUÇÃO

A terapia antimicrobiana se desenvolveu ao longo dos últimos 60 anos como uma proposta prática e tem se tornado um dos avanços da medicina moderna. A redução de mortes prematuras devidas a infecções bacterianas é agora considerada uma certeza no mundo desenvolvido, mas está ameaçada pelo desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (HAWKEY, 2008). A resistência aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação da bactéria a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinados antibióticos, pode explicar a aquisição de genes por transferência de material genético através de conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando a modificações de genes existentes (SUNDSTROM, 1998; CARATOLLI, 2001). Vários mecanismos podem ser responsáveis por essa resistência, entre eles: alteração conformacional e bioquímica do sítio alvo do antimicrobiano; alteração da permeabilidade da parede celular da bactéria ao antimicrobiano; efluxo ativo; inativação enzimática do antimicrobiano (SANDERS; SANDERS, 1992; LIVERMORE, 1998). Resumidamente pode-se dizer que a resistência é favorecida pela pressão seletiva do uso inadequado de antimicrobianos, e ocorre pela disseminação clonal ou pela transferência horizontal de genes de resistência (WITTE, 2004).

A emergência e a disseminação de resistência entre as espécies da família *Enterobacteriaceae* trazem complicações para o tratamento de infecções hospitalares graves e podem contribuir para o aparecimento de espécies resistentes a todos os antimicrobianos atualmente disponíveis. *Klebsiella pneumoniae*, em particular, é um patógeno extremamente importante em infecções hospitalares, uma vez que pode apresentar resistência múltipla a antimicrobianos de diferentes classes (PATERSON, 2006).

Os carbapenêmicos atualmente representam as drogas de escolha para o tratamento de infecções graves por isolados multirresistentes, principalmente quando se trata de espécies de bactérias gram-negativas que produzem ESBL (β -lactamases de espectro ampliado) e/ou apresentam produção aumentada da β -lactamase Amp-C. Os carbapenêmicos mais comuns e utilizados na prática clínica são imipenem, meropenem e ertapenem. Entretanto, a resistência a essa classe de

antimicrobianos tem sido acentuadamente detectada, sendo principalmente associada à ação de enzimas do tipo carbapenemase (PEIRANO et al., 2009).

As carbapenemases são um grupo fenotípico de enzimas, uma mistura heterogênea de β -lactamases pertencentes à classe molecular A de Ambler (penicilinas), classe B (metaloenzimas) e classe D (oxacilinas). Essas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (BUSH; JACOBY, 2010). As três principais famílias de carbapenemases classe A incluem a SME (*Serratia marcescens enzyme*), IMI/NMC (imipenemase/non-metallo-carbapenemase-A) e a KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*) (QUEENAN; BUSH, 2007). Em *K. pneumoniae*, as enzimas KPC são as carbapenemases mais frequentes, sendo descritas até o presente 12 variantes (www.lahey.org).

As bactérias produtoras de KPC se tornaram endêmicas na cidade de Nova Iorque e em outros locais dos EUA, e também foram detectadas em vários outros países do mundo (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Resistência envolvendo carbapenemases, principalmente KPC, tem mostrado elevado potencial de transferência intra e interespecíes. Como esta enzima pode conferir resistência não apenas aos carbapenêmicos, mas a muitos beta-lactâmicos e a outras classes de antibióticos, as possibilidades de regimes terapêuticos eficazes são reduzidas consideravelmente, resultando em altas taxas de mortalidade (VILLEGAS et al., 2006).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterização molecular e epidemiológica dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC provenientes de materiais clínicos de pacientes internados no Hospital Universitário da Universidade Estadual de Londrina (HUUEL), no período de julho de 2009 a julho de 2010.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Avaliar os perfis de sensibilidade a antimicrobianos de 54 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de KPC;
- 2.2.2 Detectar a produção da enzima KPC por métodos fenotípicos e genotípicos;
- 2.2.3 Comparar os métodos utilizados para determinar a sensibilidade a antimicrobianos, e calcular seu erro relativo;
- 2.2.4 Caracterizar a enzima carbapenemase de tipo KPC encontrada, utilizando técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) e de sequenciamento;
- 2.2.5 Detectar a similaridade genética dos isolados de *K. pneumoniae* através da técnica de PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*);
- 2.2.6 Descrever as características clínicas de 54 pacientes, verificando as condições clínicas que podem aumentar os riscos para aquisição de infecção e/ou mortalidade por *K. pneumoniae* produtora de KPC.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 AGENTE ETIOLÓGICO

A família *Enterobacteriaceae*, uma das mais importantes famílias bacterianas, compreende a espécie amplamente conhecida *Escherichia coli* estirpe K12 e muitos patógenos humanos e de animais. Com relação ao homem, esses patógenos são importantes agentes de infecção hospitalar e, sem dúvida, constituem a principal causa de infecção intestinal. As enterobactérias são bacilos gram-negativos cujas células apresentam membrana citoplasmática, espaço periplásmico, peptidoglicano ou mureína e membrana externa (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

O gênero *Klebsiella* faz parte desta família e possui duas principais espécies, *K. oxytoca* e *K. pneumoniae*, esta última com três subespécies (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Tal nome foi dado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs. Inicialmente, as três subespécies de *K. pneumoniae* eram classificadas como três espécies distintas. Posteriormente, com a introdução de métodos de hibridização do ácido desoxirribonucléico (DNA), ficou demonstrado que essas espécies bacterianas possuíam sequências de DNA homólogas, permitindo agrupá-las em uma única espécie de *K. pneumoniae* e subclassificá-las em três subespécies: *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *K. pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis* (GRIMON; GRIMON, 2005). Outras espécies do gênero *Klebsiella*, tais como: *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. singaporensis* e *K. variicola* foram posteriormente descritas (MARTINEZ et al., 2004; ROSENBLUETH et al., 2004). Estas espécies possuem pouca importância clínica e são, geralmente, isoladas de amostras do meio ambiente, como: solo, água e vegetais (PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

A espécie mais isolada deste gênero é *K. pneumoniae*, de grande importância em microbiologia clínica. Pode ser encontrada nas fezes de indivíduos normais e, em menor frequência, na nasofaringe. É uma bactéria com relevância crescente nas infecções hospitalares e, na condição de patógeno oportunista, frequentemente causa infecções em pacientes imunocomprometidos. Está também presente em ambientes hospitalares como pisos, pias, desinfetantes e equipamentos inalatórios, em proporções que levam à colonização de pacientes, a qual é

proporcional ao tempo de hospitalização (HOBSON; BONTEN; JARVIS, 1996). Num estudo realizado por Kramer et al (2006), avaliou-se o tempo que um patógeno hospitalar persiste em superfícies inanimadas e verificaram que *Klebsiella* spp. foi capaz de sobreviver em ambiente hospitalar por mais de 30 meses. Cotton et al (2000) relataram um surto ocorrido em unidade neonatal por uma cepa de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, cujo vetor eram baratas. Os microrganismos da espécie *K. pneumoniae* são caracterizados como invasores, capacidade que lhes é conferida pela presença de cápsula, a qual é essencial para sua virulência e composta de uma camada espessa de polissacarídeo, responsável pelo aspecto brilhante e mucóide das colônias em ágar (BRISSE; JEANJEAN; GRIMONT, 2004). O polissacarídeo capsular confere resistência à fagocitose e impede a morte da bactéria pelo sistema complemento, através da inibição da ativação do componente C3b do mesmo (WILLIAMS; TOMAS, 1990).

A facilidade para colonizar mucosas privilegia *K. pneumoniae* como patógeno oportunista. Infecções por este agente comprometem, principalmente, o trato urinário e o trato respiratório, levando à bacteremia grave e à pneumonia aspirativa, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Entre a variedade de infecções extrapulmonares associadas a *K. pneumoniae*, a infecção urinária, tanto em crianças quanto em adultos, é a mais prevalente. *K. pneumoniae* também pode causar meningite, endocardite, infecções dos tecidos moles, feridas cutâneas e enterite. No ambiente hospitalar, as taxas de colonização por *K. pneumoniae* aumentam em razão direta ao tempo de internação do paciente. São relatados percentuais de isolamento deste microrganismo de até 77% nas fezes, 19% na orofaringe e 42% nas mãos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). No Brasil, as taxas de infecções causadas por este microorganismo são maiores do que as encontradas em diferentes partes do mundo. Em estudo realizado pelo programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) Brasil em 2003, *K. pneumoniae* foi o 3º bacilo gram negativo mais frequentemente isolado em hospitais brasileiros (16,9%). De acordo com estudos de Kiffer et al. (2005), *K. pneumoniae* foi responsável por 17,2% das infecções da corrente sanguínea relacionadas a catéter; 12% do trato respiratório; trato urinário, 18,6% e infecções de pele e tecidos moles, 11,5%.

Com a aquisição de mecanismos de resistência a novos antimicrobianos, este microrganismo tem alcançado notoriedade como patógeno

hospitalar responsável por diversos surtos, principalmente em unidades de alto risco, como de terapia intensiva e neonatal (BEN-HAMOUDA; FOULON; BEN-MAHREZ, 2004; BAGATTINI et al., 2006).

3.2 RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

O reconhecimento de que microrganismos são capazes de resistir a agentes físicos e químicos data do início da era antimicrobiana. Constatou-se, então, que isto podia ser uma característica natural das espécies bacterianas, ou ser adquirida por organismos individuais em uma população sensível. Esse fenômeno é visto de forma mais dramática no ambiente hospitalar, com o surgimento dos microrganismos multirresistentes, mas também tem sido notado em bactérias na comunidade, pela pressão seletiva determinada pelo uso clínico de antimicrobianos, tanto humano como veterinário, pelo seu uso comercial para engorda de animais e no seu uso industrial como conservantes de alimentos. Outras práticas incorretas têm contribuído para este explosivo aumento de resistência, tais como mistura de antibióticos com outras drogas, ausência de programas de controle de infecção em muitos hospitais, automedicação, uso de antibióticos sem esclarecimento do agente etiológico e seu perfil de sensibilidade, e ausência de regulamentação para ensaios clínicos com novas formulações (RIBEIRO FILHO, 2000).

O elevado índice de resistência bacteriana aos antimicrobianos é o melhor exemplo da rápida adaptação da bactéria a um novo ecossistema. A habilidade da bactéria em ampliar seu nicho ecológico, também na presença de determinados antibióticos, pode explicar a aquisição de genes por transferência de material genético através de conjugação, transformação e transdução e/ou pelo acúmulo de mutações pontuais, levando a modificações de genes existentes (SUNDSTROM, 1998; CARATOLLI, 2001).

Os problemas relacionados a bactérias patogênicas parecem ocorrer em ciclos: enquanto uma década pode enfrentar problemas com agentes gram-positivos, a próxima deve enfrentar novas ameaças de bactérias gram-negativas. Esta é a situação atual. Os microrganismos gram-negativos ambientais e entéricos (ex: *K. pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter*

baumannii, *E. coli*) atualmente ameaçam pacientes em hospitais e comunidades com multirresistência a drogas antimicrobianas (LEVY, 2005).

Esse assunto permanece uma preocupação de saúde pública crescente, com o temor de que, rapidamente, acabarão os antibióticos eficazes. Na realidade, esse panorama é mais heterogêneo, com uma melhora no que diz respeito a alguns patógenos, mas uma piora em relação a outros. No caso das enterobactérias, a disseminação de ESBL, AmpC e resistência a quinolonas está forçando o aumento da confiança nos antibióticos carbapenêmicos, acumulando, assim, resistência via disseminação de carbapenemases, entre outros mecanismos (LIVERMORE, 2009).

Entre os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos pode-se destacar: I) degradação do antibiótico por meio de enzimas hidrolisadoras da droga, como carbapenemases do tipo serina e metalo- β -lactamases; II) limitação do acesso intracelular da droga através de sua membrana externa, por meio da impermeabilidade ao antibiótico associada a uma produção de enzimas AmpC e/ou ESBL; III) proteção dos alvos da droga por meio de alterações nas proteínas ligadoras de penicilinas (PBP) (DAVIN-REGLI et al, 2008).

3.2.1 Produção de β -lactamases

No que diz respeito à resistência mediada por enzimas, as β -lactamases têm importância primordial. Estas são enzimas bacterianas que protegem os microrganismos contra a ação de antimicrobianos β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, clivando os β -lactâmicos, tornando-os drogas inertes. De acordo com a classificação de Ambler, baseada na identificação da sequência de aminoácidos, as β -lactamases podem ser divididas em quatro diferentes classes moleculares, A, B, C e D. As classes A, C e D usam resíduos de serina na atividade catalítica para a inativação das drogas, já a classe molecular B são metalo-enzimas, que requerem zinco como cofator para sua ação catalítica (RASMUSSEN; HOIBY, 2007). Em 2010, Bush e Jacoby atualizaram sua prévia classificação das β -lactamases, resultando na distribuição esquemática da tabela 1.

A β -lactamase TEM-1, a enzima mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas, foi detectada inicialmente em Atenas, em 1963. O termo TEM deriva de “Temoniera”, nome da paciente de cujo material clínico, uma hemocultura, foi isolada a primeira cepa de *E. coli* produtora desta enzima. TEM-2, a primeira derivada de TEM-1, apresenta um único aminoácido substituído na molécula da β -lactamase original (HERITAGE et al., 1999; BRADFORD, 2001).

Outra β -lactamase comumente encontrada em *K. pneumoniae* é a enzima SHV-1 Seu primeiro relato ocorreu em 1972 e foi assim denominada pela característica química de apresentar variações na ligação ao seu grupo sulfidril (MEDEIROS, 1995).

Tais β -lactamases, chamadas primordiais, têm a capacidade de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração.

Tabela 1 - Esquema de classificação para β -lactamases bacterianas, de acordo com as definições de Bush e Jacoby (2010)

Grupo Bush-Jacoby (2010)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe molecular (subclasse)	Substrato(s) distintivo(s)	Inibição por		Características definidoras	Enzimas representativas
				AC / TZB	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas em relação a benzilpenicilina; hidrolisa cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima e frequentemente outros oximino- β -lactâmicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina em relação a cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, cefalosporinas primordiais	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilina e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxone, cefepime, aztreonam)	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência ao ácido clavulânico,	TEM-30, SHV-10

						sublactam e tazobactam	
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplo espectro, monobactâmicos	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β -lactâmicos combinada à resistência ao ácido clavulânico, sublactam e tazobactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplo espectro	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplo espectro	Sim	Não	Hidrolisa cefalosporinas. Inibição por ácido clavulânico mas não por aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1) B(B3)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise de amplo espectro incluindo carbapenêmicos mas não monobactâmicos	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos	CphA, Sfh-1

3.2.1.1 ESBL

Em *Klebsiella* spp., as ESBL desempenham importante papel na resistência a antimicrobianos. ESBL são enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos β -lactâmicos, com exceção das cefamicinas (cefotetina e cefotetan)

e de carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). Têm como característica fenotípica importante o fato de permanecerem sensíveis à ação de inibidores de β -lactamases como sulbactam e ácido clavulânico, descritos na década de 70, e tazobactam, descrito na década de 80. Esses inibidores formam um complexo proteico com a β -lactamase, bloqueando, desta maneira, a atividade hidrolítica dessas enzimas (WILLIAMS, 1997). As espécies produtoras de ESBL podem sobreviver por longos períodos de tempo em hospitais, com frequência ocasionando surtos (THOMSON; PREVAN; SANDERS, 1996; BRADFORD, 2001).

O primeiro relato de ESBL data de 1983, a partir de três isolados de *K. pneumoniae* e um de *Serratia marcescens*, no oeste da Alemanha, que demonstraram resistência a cefotaxima e às demais novas cefalosporinas de terceira geração. Esta nova β -lactamase plasmidial chamada SHV-2, derivou de uma mutação de SHV-1 (KNOTHE, 1983). Após 15 anos da descoberta de SHV-2, esta enzima foi detectada em todos os continentes (PATERSON et al., 2003). ESBL do tipo SHV têm sido a causa de surtos, não só por *Enterobacteriaceae*, mas também por *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (POIREL et al., 2004; HUANG et al., 2004).

A primeira ESBL da família TEM descrita foi a TEM-3, relatada em 1987, sendo a primeira a manifestar o fenótipo ESBL. Desde então, foi observado aumento rápido no número e nas variantes de espectro ampliado do tipo TEM. A substituição de aminoácidos na enzima TEM ocorre em número limitado de posições. A combinação na mudança destes aminoácidos resulta em várias alterações sutis do fenótipo ESBL, como a capacidade de hidrolisar oximinocefalosporinas, tais como ceftazidima e cefotaxima (HERITAGE et al., 1999; BRADFORD, 2001; MACK; MACK, 2003). β -lactamases do tipo TEM são encontradas em todos os países, predominantemente na América do Norte (PATERSON; BONOMO, 2005).

Outro tipo de ESBL que tem sido amplamente distribuída no mundo, nos dias atuais, é a CTX-M. A primeira descrição da mesma se deu na Alemanha em 1989, por Bauernfeind et al. (1992), que relataram o isolamento de uma cepa de *E. coli* resistente a cefotaxima, cuja ESBL não era TEM nem SHV, sendo então designada CTX-M-1, devido à capacidade de hidrolisar cefotaxima. Concomitantemente, grande disseminação de cepas de *Salmonella* resistentes a cefotaxima foi relatada na América do Sul (BAUERNFEIND et al., 1992; POWER et

al., 1999). As enzimas CTX-M são subclassificadas em cinco grupos, de acordo com a similaridade nas sequências de aminoácidos em: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (JACOBY; BUSH, 2009). As enzimas CTX-M estão fortemente relacionadas com as β -lactamases de *Kluyvera* spp. e se originaram, provavelmente, da transferência horizontal de genes e subsequente mutação dessa enzima em diferentes espécies (BRADFORD et al., 1998; HUMENIUK et al., 2002). Estas enzimas estão envolvidas em surtos de ESBL em hospitais, disseminadas entre estados, países ou até mesmo entre os continentes. O aparecimento e a disseminação dessas enzimas são decorrentes da transmissão de cepas epidêmicas, ou ainda por meio de elementos móveis como sequências de inserção, transposons e integrons (COQUE et al., 2002; BONNET, 2004).

O fato de enterobactérias produtoras de ESBL serem prevalentes em infecções hospitalares é frequente. Porém, atualmente existem evidências de sua emergência e disseminação também na comunidade, sendo o trato urinário o sítio clínico mais comumente acometido por infecções por bactérias portadoras destes mecanismos de resistência (PATERSON, 2006). Atualmente, ESBL estão disseminadas entre todas as enterobactérias de importância clínica, sendo que há relatos da identificação de mais de 196 diferentes ESBL do tipo TEM, 143 SHV e 124 CTX-M (<http://www.lahey.org>).

3.2.1.2 Amp C

A expressão de β -lactamases de tipo AmpC também tem tido impacto clínico, uma vez que espécies intrinsecamente produtoras dessa enzima apresentam alta resistência para a maioria dos antibióticos β -lactâmicos, com exceção das cefalosporinas de quarta geração, como cefepime, e carbapenêmicos. Essas enzimas, porém, têm contribuído com a seleção de mutantes resistentes ao imipenem, os quais exibem fraca atividade hidrolítica combinada com uma deleção de porina do tipo OmpC ou OmpF, consideradas a principal via de ingresso deste antibiótico na célula bacteriana (THOMSON; SMITH-MOLAND, 2000, THOMSON; BONOMO, 2005; PAVEZ, 2009).

Estas enzimas podem ser produzidas por genes de localização cromossômica ou plasmidial (PÉREZ-PÉREZ; HANSON, 2002, NORDMANN; MAMMERI, 2007). Dentre as bactérias produtoras de AmpC cromossômica estão

Morganella morganii., *S. marcescens.*, *Providencia rettgeri*, *Citrobacter freundii*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *P. aeruginosa*, *Aeromonas hydrophyla*, *Hafnia alvei*. (ROSSI; ANDREAZZI, 2005.) Os genes AmpC plasmidiais (*pAmpC*) são derivados dos genes cromossômicos e estão normalmente localizados em integrons de classe I (TOLEMAN; BENNET; WALSH, 2006). Estes genes se disseminam facilmente através de transmissão horizontal (GAZOULI et al., 1998), e cepas produtoras de AmpC plasmidial são normalmente multirresistentes e encontram-se disseminadas não somente dentro do ambiente hospitalar, mas também na comunidade (GRAY et al., 2004; MIGLIAVACCA et al., 2007; HANSON et al., 2008).

3.2.2 Carbapenemases

Os carbapenêmicos atualmente representam as drogas de escolha para o tratamento de infecções graves por isolados multirresistentes, principalmente quando se trata de espécies de bactérias gram-negativas que produzem ESBL e/ou apresentam produção aumentada da β -lactamase Amp-C. Entretanto, a resistência aos carbapenêmicos tem sido acentuadamente detectada, sendo principalmente associada à ação de enzimas do tipo carbapenemase (PEIRANO et al., 2009).

As carbapenemases representam a família mais versátil de β -lactamases, com uma amplitude de espectro incomparável a outras enzimas que hidrolisam os β -lactâmicos (QUEENAN; BUSH, 2007). Estas enzimas conferem resistência à maioria dos agentes β -lactâmicos e são comumente codificadas por genes localizados em elementos genéticos móveis, como plasmídios, o que facilita a transferência de mecanismos de resistência de um isolado para outro. Por essa razão, isolados produtores de carbapenemases têm sido encontrados disseminados entre pacientes. Todos esses pontos relevantes fazem das enterobactérias produtoras de carbapenemases um importante problema no controle de infecções em instituições de cuidados de saúde (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009).

As carbapenemases são um grupo fenotípico de enzimas, uma mistura heterogênea de β -lactamases pertencentes às classes moleculares A de Ambler (penicilinases), B (metaloenzimas) e D (oxacilinases). Essas enzimas têm a propriedade comum de hidrolisar, ao menos parcialmente, imipenem ou meropenem, além de hidrolisar outras penicilinas e cefalosporinas (BUSH; JACOBY, 2010). A existência de enzimas capazes de inativar carbapenêmicos pode limitar as opções

de tratamento. Resistência a carbapenêmicos em enterobactérias tornou-se emergente nos últimos anos, sendo as β -lactamases da classe A as mais prevalentes entre as bactérias desta família (RASMUSSEN; HOIBY, 2007).

Essas β -lactamases têm sido detectadas mais freqüentemente em *K. pneumoniae*, *E. cloacae* e *S. marcescens*, em isolados individuais ou em surtos. As bactérias que expressam essas enzimas são caracterizadas pela redução da susceptibilidade ao imipenem, entretanto, a concentração inibitória mínima (CIM) para este antimicrobiano pode apresentar-se como levemente ou completamente aumentada. Essas β -lactamases, portanto, podem não ser reconhecidas imediatamente em testes de susceptibilidade de rotina (QUEENAN; BUSH, 2007).

3.2.2.1 MBL

Enzimas pertencentes à classe B de Ambler denominadas metalo- β -lactamases (MBL) foram descobertas há mais de 40 anos em uma amostra de *Bacillus cereus*. Possuem íons zinco no seu sítio ativo, e, conseqüentemente, sofrem inibição por quelantes iônicos, como o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), mas não são bloqueadas por inibidores de β -lactamases como clavulanato, sulbactam e tazobactam. Essas enzimas são as únicas da família das β -lactamases nas quais a atividade de carbapenemase é a regra, porém, curiosamente, não hidrolisam monobactâmicos, como o aztreonam (BUSH, 1998).

As MBLs mais frequentemente detectadas em bacilos gram-negativos são dos tipos IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), GIM (German Imipenemase), SPM (São Paulo metalo β -lactamase) e SIM (Seoul Imipenemase). Recentemente foi identificado um novo tipo de MBL, denominada NDM (New Delhi metalo β -lactamase) (KUMARASAMY et al., 2010). Essa nova MBL foi descrita com características semelhantes àquelas das enzimas IMP-1 e VIM-2. Esta enzima foi inicialmente identificada em cepas do norte europeu originadas de pacientes da Índia ou pacientes que viajaram à Índia para procedimentos médicos (BUSH, FISHER, 2011).

As enzimas VIM e IMP se encontram disseminadas geograficamente no mundo, principalmente entre as espécies de *P. aeruginosa* e membros da família *Enterobacteriaceae* (QUEENAN; BUSH, 2007). Na América do Sul, segundo estudos do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, os isolados envolvendo MBL têm

sido caracterizados pelo predomínio de VIM e SPM (JONES et al., 2005; SADER et al., 2005).

No Brasil, em abril de 2003 identificou-se a primeira metalo β -lactamase produzida por *K. pneumoniae*, sendo a primeira descrição de diversos isolados que apresentaram um padrão de resistência similar, mostrando, dessa forma, o surgimento de novos determinantes de resistência em hospitais brasileiros (LINCOPAN et al., 2005; LINCOPAN et al, 2006, PEIRANO et al, 2009; PAVEZ et al, 2009; ZAVASCKI et al, 2009).

MBL continuam a se disseminar pelo ambiente clínico, com surtos de patógenos produtores de VIM e IMP sendo reportados pela Europa e região Ásia-Pacífico. A MBL SPM-1, que anteriormente era restrita ao Brasil, agora chegou à Europa, quando um paciente da Suíça inicialmente tratado no Brasil foi identificado com um isolado de *P. aeruginosa* produtor de SPM-1 (BUSH, FISHER, 2011).

3.2.2.2 OXA

As oxacilinases são enzimas pertencentes à classe molecular D e estão inclusas no grupo 2d da classificação de Bush. Duzentas e trinta e duas oxacilinases foram descritas até o momento (<http://www.lahey.org>). Muitas delas são derivadas da OXA-2, OXA-3 e OXA-10 e são produzidas principalmente por *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. A árvore filogenética das β -lactamases tipo OXA apresenta pelo menos cinco grupos com base na sequência de aminoácidos (BOU; OLIVER; MARTINEZ-BELTRAN, 2000). As enzimas OXA têm mais de 50% de atividade hidrolítica contra cloxacilina ou oxacilina comparada àquela contra benzilpenicilina e variável perfil de inibição por inibidores de β -lactamase (RASMUSSEN; HOIBY, 2006). Em *K. pneumoniae*, encontrou-se a β -lactamase OXA-48, e surtos desta têm sido descritos na Turquia e Reino Unido. A descrição de isolados produzindo esta enzima tem ocorrido, também, no Líbano, Bélgica, Tunísia, Israel, Marrocos, Argentina e Índia (CUZON et al, 2011).

3.2.2.3 KPC

As mais frequentes carbapenemases da classe A em *K. pneumoniae* são as enzimas KPC, sendo que, até o momento, foram descritos 12 subtipos desta enzima. As KPC são enquadradas na classificação 2f de Bush, mesmo após a atualização funcional da mesma (BUSH, JACOBY, 2010). Os genes codificadores de KPC-1 e KPC-2 foram considerados iguais. Os perfis hidrolíticos de KPC-2 e KPC-3 são geralmente similares, tendo alta afinidade tanto por meropenem quanto por imipenem. A KPC-3, no entanto, manifesta um aumento na hidrólise de ceftazidima (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Nichos ambientais incomuns têm sido considerados fontes para as novas enzimas hidrolisadoras de β -lactâmicos. Pelo menos três isolados de *Pseudomonas fluorescens* produziram uma carbapenemase única da classe A/grupo 2f denominada BIC-1, uma enzima que apresenta 68% e 59% de identidade de aminoácidos com as serino-carbapenemases SFC-1 de *Serratia fonticola* e KPC-2, respectivamente (BUSH, FISHER, 2011).

Enzimas do tipo KPC são codificadas por plasmídeos, característica que as difere daquelas codificadas em cromossomos, como SME e NMC/IMI (KANTOPOULOU; PROTONOTARIOU; VASILAKOS, 2010).

O primeiro microrganismo produtor de KPC descrito foi um isolado de *K. pneumoniae* nos EUA (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Apesar do fato da sigla KPC se referir à espécie na qual a enzima KPC-1 foi originalmente identificada (*K. pneumoniae*), membros desse grupo de carbapenemases têm sido encontrados também em várias outras enterobactérias e bacilos gram-negativos não-fermentadores, como *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (RASMUSSEN; HOIBY, 2007; ROBLEDO et al, 2010; WOLTER et al, 2009).

O perfil de susceptibilidade de isolados produtores de KPC pode variar, mas estudos recentes têm mostrado que, quando a enzima codificada pelo gene *bla_{kpc}* é transferida a uma *E. coli* susceptível, a enzima pode conferir resistência a todos os agentes β -lactâmicos. Isso inclui penicilinas, como ampicilina e piperacilina; cefalosporinas, como cefalotina, cefotetan, ceftriaxona, ceftazidima e cefepime; e o monobactâmico aztreonam. A enzima KPC também pode conferir resistência a todos os carbapenêmicos: meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem (MUSHTAQ; GE; LIVERMORE, 2004). Inibidores de β -lactamases, especialmente ácido clavulânico, têm alguma atividade sobre KPC, mas essa

atividade é pouco eficiente em isolados produtores de KPC resistentes a todos os β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases, incluindo ampicilina-sulbactam, amoxicilina-ácido clavulânico e piperacilina-tazobactam (MIRIAGOU et al, 2003; VILLEGAS et al, 2006).

É possível listar fatores de risco associados à aquisição de KPC, como: hospitalização prolongada, internação em UTI, submissão a procedimentos invasivos, imunossupressão e uso de múltiplos agentes antimicrobianos antes de uma cultura que especifique o agente e seu perfil de susceptibilidade (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Um estudo realizado por Bratu et al (2005), mostrou que somente 12 de 58 pacientes com infecção por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos tiveram terapia prévia com estes antimicrobianos, enquanto que todos estes pacientes já haviam recebido um outro antibiótico β -lactâmico ou uma fluoroquinolona. Também, em estudo de 2009, Gasink et al. demonstraram que a severidade da doença, o uso prévio de fluoroquinolonas e de cefalosporinas de amplo espectro seriam fatores de risco para o isolamento de *K. pneumoniae* produtora de KPC. Patel et al (2011), reforçam que exposições constantes e cumulativas a antimicrobianos, com o tempo, podem vir a desequilibrar a microbiota natural do hospedeiro, e, dessa forma, expôr os pacientes a um maior risco de colonização por uma bactéria resistente. Já em estudo relacionado ao risco de mortalidade por KPC, observou-se que idade avançada e o *score* de APACHE II (*Acute Physiology and Chronic Health Disease Classification System II*) no momento de admissão e de determinação de infecção, associados à sepse severa ou choque séptico, seriam os melhores indicadores de taxa de mortalidade por infecção (ZARKOTOU et al., 2011).

Os genes *bla*_{KPC} têm sido identificados em muitos plasmídeos, de tamanho e estrutura diferentes. Esses plasmídios geralmente transportam também determinantes de resistência a aminoglicosídeos, e têm sido associados com genes de outras β -lactamases, como de ESBL (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). O gene em questão é identificado com frequência dentro de um transposon do tipo *Tn3* de 10Kb, o *Tn4401*. Este possui uma transposase (*tnpA*) e uma resolvase (*tnpR*) e duas sequências de inserção não relacionadas, ISKpn6 e ISKpn7. Este transposon pode ser a origem do gene de disseminação. Esta estrutura tem sido identificada em isolados de *K. pneumoniae* na França, de pacientes transferidos de hospitais da Grécia e EUA. Estruturas semelhantes, porém não idênticas ao *Tn4401* têm sido

também identificadas em isolados franceses de origem colombiana (NAAS et al., 2008).

3.2.3 Alteração das PBPs

As PBP (proteínas ligadoras de penicilina) são sítios-alvo para atividade dos antibióticos β -lactâmicos. Resistência aos carbapenêmicos, relacionada com a alteração de PBPs, tem sido escassamente relatada em enterobactérias, sendo descrita apenas em *Proteus mirabilis*, conferindo-lhe uma sensibilidade reduzida ao imipenem (NEUWIRTH et al., 1995).

3.2.4 Alteração dos Canais de Porinas

Embora incomum, *K. pneumoniae* sem atividade eficiente de carbapenemase pode ainda alcançar resistência a carbapenêmicos (LANDMAN; BRATU; QUALE, 2009). As proteínas de membrana externa (OMP) dos microrganismos gram-negativos, também chamadas de porinas, são capazes de formar canais constituídos de água no seu interior, que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (NIKAIDO, 1994). A perda ou a diminuição da expressão dos genes que codificam as OMP causa a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano, o que pode conferir resistência aos β -lactâmicos (QUINN et al., 1988).

Doumith et al (2009), em seu trabalho sobre o papel da expressão das porinas na resistência ao ertapenem em enterobactérias, descreveram que essa mudança no perfil de sensibilidade pode ocorrer devido à perda de porinas ou à diminuição da atividade das mesmas. Segundo estudo de Yigit et al. (2001), examinando canais de porina de uma cepa de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos, demonstrou-se que a cepa não apresentava níveis detectáveis de OmpK35 e OmpK37, apesar de apresentar OmpK36. Com isso, concluiu-se que esta alteração na expressão de porinas pode estar desempenhando um importante papel na resistência a carbapenêmicos.

3.2.5 Sistema de Efluxo

A hiperexpressão de sistemas de efluxo, que leva à redução da concentração de antimicrobiano no interior das células, é outro mecanismo de resistência aos β -lactâmicos (LIVERMORE, 2001). Os genes que codificam as bombas de efluxo são constituintes normais do genoma bacteriano e, portanto, fornecem para o microrganismo o potencial intrínseco de desenvolver um fenótipo de resistência aos β -lactâmicos sem a aquisição de novos genes (HASDEMIR et al., 2004). Diversos sistemas de bombas de efluxo têm sido descritos em bacilos gram-negativos, principalmente em *P. aeruginosa* (RODLOFF; GOLDSTEIN; TORRES, 2006). Porém, em enterobactérias, nenhum sistema de efluxo descrito parece contribuir para a resistência a β -lactâmicos (OGAWA et al., 2006).

3.3 EPIDEMIOLOGIA DE KPC

A primeira descrição de um isolado produtor de KPC foi a partir de uma cepa de *K. pneumoniae* na Carolina do Norte, EUA, identificado em 1996 e relatado em conjunto com os demais isolados subsequentes, em 2001, como publicação dos dados obtidos por meio do projeto ICARE (*Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*) (YIGIT et al., 2001). Este isolado se apresentou resistente a todos os β -lactâmicos, mas a CIM para carbapenêmicos foi significativamente diminuída após a adição de ácido clavulânico, um inibidor de β -lactamase (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Um estudo de prevalência no Brooklyn, Nova Iorque, foi realizado após o aparecimento de um isolado de *E. cloacae* produtor de KPC-3, entre amostras retrospectivas de *Enterobacter* spp. isoladas entre 2001 e 2003. Este foi o primeiro relato de uma carbapenemase em *E. aerogenes* e *E. cloacae*, transportando o gene *bla_{KPC3}* (BRATU et al., 2005).

Hoje, microrganismos produtores de KPC são regularmente isolados em muitas instituições de cuidado à saúde da cidade de Nova Iorque e em outros locais dos EUA, e vários outros países (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009).

O primeiro aparecimento de *K. pneumoniae* produtora de KPC (KPC-3) fora dos EUA foi em Israel. Esta cepa foi geneticamente relacionada às aquelas relatadas nos EUA, sugerindo transferência de cepas entre os pacientes de Israel e

EUA. Em Israel, *K. pneumoniae* estão sendo frequentemente identificadas e os relatos de *Enterobacter* spp. e *E. coli* produtores de KPC-2 estão aumentando (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

Na França, existem relatos de isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* produtores de KPC (DORTET et al., 2008; NAAS et al., 2005). Em 2011, Potron et al. descreveram a presença de *E. coli* produtora de KPC nesse país.

Wendt et al (2010) relataram o primeiro surto por *K. pneumoniae* produtora de KPC, na Alemanha. Na China, a enzima KPC tem sido amplamente identificada não só em *K. pneumoniae*, mas também em *C. freundii*, *E. coli* e *S. marcescens* (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Na cidade de Hangzhou foi relatado o aparecimento de *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, ambas produtoras de KPC-2, porém provenientes de hospitais diferentes (CAI et al., 2008). Cuzon et al. (2008) e Tsakris et al. (2008) descreveram que a Grécia pode ser outro país com epidemia de bactérias produtoras de KPC.

Woodford et al. (2008) caracterizaram o primeiro isolado de *K. pneumoniae* produzindo KPC no Reino Unido. O primeiro isolado foi em 2007, na admissão de um idoso em um hospital escocês, a partir de uma hemocultura. Ele não tinha história de viagem ao exterior nos últimos seis anos, mas anteriormente tinha sido hospitalizado em outros locais na Escócia. O segundo isolado foi em Londres, em 2008, a partir de uma amostra de urina de um paciente idoso, transplantado renal. Sua história inclui passagem por um hospital de Israel, um mês antes do isolamento de tal bactéria, para o tratamento de pielonefrite. Ambos os isolados de *K. pneumoniae* foram encaminhados para laboratório de referência para confirmação de resistência a carbapenêmicos. Após análise por reação em cadeia da polimerase (PCR) e eletroforese em gel em campo pulsado (PFGE), revelou-se que ambos os isolados representavam a mesma cepa, porém sem discernimento epidemiológico. E comparando com um banco de dados, percebeu-se grande parentesco (85% de similaridade de bandas) com um isolado recebido em 2007 de um surto no hospital Bnei Brak, em Israel. Isolados carreadores do gene *bla_{KPC}* também foram identificados na Noruega e Suécia (SAMUELSEN et al., 2009).

Um clone particular de KPC, denominado ST (*sequence type*) 258, está se disseminando rapidamente a nível internacional. Na Bélgica, Bogaerts et al (2009) descreveram os 3 primeiros casos de *K. pneumoniae* ST258 produtora de

KPC-2 detectados no país, após transferência de pacientes provenientes de hospitais da Grécia.

Na Espanha, Curiao et al (2010) descreveram os primeiros genes *bla*_{KPC-3} associados com clones multirresistentes endêmicos de *K. pneumoniae* no país. Recentemente foram detectados 3 isolados clínicos produtores de KPC de *Citrobacter freundii* no mesmo país, clonalmente relacionados (GÓMEZ-GIL, 2010).

O CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) criou um banco de dados de padrões de PFGE de *K. pneumoniae* produtora de KPC. Isolados com padrões similares têm sido identificados em muitos estados do nordeste dos EUA, mas também no Arizona e Novo México (KITCHEL et al., 2008). A similaridade desses isolados está em contraste com os padrões, tais como os da Virgínia, Missouri e Michigan central, os quais demonstram padrões de PFGE não-relacionados. Não está esclarecido se os isolados relacionados em diferentes localizações geográficas indicam transmissão de um isolado de *K. pneumoniae* produtora de KPC, ou se há uma cepa de *K. pneumoniae* que é mais susceptível a adquirir o mecanismo de resistência. Como mencionado anteriormente, também há evidência de isolados relacionados de *K. pneumoniae* produtora de KPC nos EUA e Israel (NAVON-VENEZIA et al., 2007). Tais achados destacam a necessidade de uma detecção laboratorial precisa e implementação de medidas apropriadas de controle de infecções (SIEGEL et al., 2007).

Um trabalho recente de Porto Rico realizado em vários hospitais mostra a disseminação da enzima KPC entre várias espécies: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* (ROBLEDO; AQUINO; VÁZQUEZ, 2011).

Na América do Sul, grande disseminação de KPC foi inicialmente relatada em *K. pneumoniae* em 2006, e subseqüentemente em várias outras espécies de enterobactérias de hospitais da Colômbia (VILLEGAS et al., 2006; KATTAN et al., 2007). A enzima KPC também tem sido identificada em *P. aeruginosa*, na Colômbia, mostrando o aparecimento desse determinante de resistência em espécies não-enterobactérias (VILLEGAS et al., 2007). Outros países da América do Sul (Brasil, Argentina) têm relatado identificação de bactérias produtoras de KPC (PEIRANO et al., 2009; PASTERAN et al., 2008).

No Brasil, ocorreram relatos concomitantes de isolamento de KPC-2, em diferentes estados, a partir de isolados clínicos de *K. pneumoniae*, realizados por

Peirano et al. (2009) e Monteiro et al. (2009). Os primeiros autores fazem parte do laboratório de Enterobactérias (LGB), do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, que recebem rotineiramente, isolados clínicos bacterianos de hospitais que pertencem à rede de vigilância de infecções nosocomiais por bactérias resistentes, a *Bacterial Nosocomial Infection Resistance Surveillance*. Isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram reduzida susceptibilidade ou resistência a carbapenêmicos, cefalosporinas de largo espectro e outros antimicrobianos são enviados para esse laboratório. Dois hospitais do Rio de Janeiro enviaram ao LGB amostras de bactérias para determinação de mecanismo de resistência subjacente. Neste estudo, foi descrita a detecção de KPC-2 em seis isolados clínicos de *K. pneumoniae*, também produtores de ESBL. Já Monteiro et al. (2009), identificaram KPC-2 a partir de quatro isolados distintos obtidos de pacientes internados na unidade de terapia intensiva em um hospital terciário em Recife, entre setembro e novembro de 2006.

Da mesma forma, Zavascki et al. (2009) descreveram a identificação de *E. cloacae* produtor de KPC, em dois pacientes em diferentes hospitais do Rio Grande do Sul. O primeiro isolado ocorreu em novembro de 2007, a partir de fragmento de tecido de pé amputado de uma paciente de 57 anos, diabética, internada na UTI. O segundo caso ocorreu em outubro de 2008, onde foi isolado *E. cloacae* da urina de uma paciente com câncer endometrial, após 3 dias de internação, que foi submetida a cirurgia e então evoluiu para choque abdominal e séptico.

Pavez et al. (2009) descreveram que, devido aos vários relatos concomitantes de isolados de *K. pneumoniae* e mais recentemente, *E. cloacae* produtores de KPC em várias cidades brasileiras, existem evidências de que esta enzima deve estar presente em hospitais brasileiros desde 2005.

Foi realizado por Carvalho-Assef et al (2010) o registro da primeira *E. coli* produtora de KPC-2 no Brasil, e o perfil de macrorestrição seguinte à eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) mostrou que os isolados eram geneticamente não-relacionados. Isso demonstra a capacidade de disseminação de tal mecanismo de resistência.

Relatos do SENTRY Antimicrobial Surveillance Program indicaram que *K. pneumoniae* foi a espécie mais isolada dentre os produtores de carbapenemase (51%) (CASTANHEIRA et al., 2007). Dados do programa MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) apontam que entre

isolados de *Klebsiella* spp, a resistência a carbapenêmicos foi raramente observada antes de 2003, mas após a emergência, as taxas de resistência rapidamente aumentaram para 8% em 2007 (RHOMBERG; JONES, 2009).

No HU-UDEL, a resistência aos carbapenêmicos apresentava índices de 1,17% e 2,6 % em 2007 e 2008, respectivamente, em *K. pneumoniae*. Porém, essa resistência ocorria somente a ertapenem, devido mecanismos não associados à produção de enzimas do tipo carbapenemase, como a hiperprodução da enzima AMP-C e produção de ESBL (CTX-M-2), já despertando a atenção e vigilância da equipe clínica e laboratorial. Em 2009, foi detectada a produção de carbapenemase entre os isolados clínicos de *K. pneumoniae*, sendo que 10,16% das cepas apresentavam resistência aos carbapenêmicos pela produção de carbapenemase, alcançando o índice de 55,6% em 2010, tornando-se uma preocupação constante no hospital, em virtude de sua ocorrência já ser considerada endêmica na instituição (Dados obtidos pelo sistema de exames do Hospital Universitário (LABHOS)).

No município de Londrina foi identificado o primeiro caso de *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC do Paraná, que ocorreu no mês de fevereiro de 2009. Ocorreu então, um surto na UTI de adultos do HU-UDEL, que durou até o início do mês de maio, culminando no fechamento desta unidade. Após as medidas de intervenção e controle de infecção serem adotadas, o surto parecia ter sido controlado. Porém, casos esporádicos continuaram a ser detectados após este período até que, em julho de 2010, outro surto pela enzima KPC, agora com envolvimento de diversas enterobactérias, como *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *S. marcescens* e *E.coli*, resultou no fechamento de diversas unidades do hospital (VESPERO et al., 2009). Também, em 2010, foi identificada a enzima KPC em dois isolados de *P. aeruginosa* (CARRARA-MARRONI et al., 2011).

Desta forma, o mecanismo de resistência envolvendo carbapenemasas, principalmente KPC, tem mostrado elevado potencial de transferência intra e interespecies, o que é preocupante, considerando o fato desta enzima conferir resistência não apenas ao carbapenêmicos, mas a muitos beta-lactâmicos e a outras classes de antimicrobianos, reduzindo consideravelmente as possibilidades de regimes terapêuticos eficazes, resultando em altas taxas de mortalidade (VILLEGAS et al., 2006).

A real prevalência dos isolados produtores de KPC, principalmente enterobactérias, é comprometida pela falha na detecção dos métodos de rotina nos

laboratórios de microbiologia, que focam seus resultados apenas nas características fenotípicas. Estas características podem induzir a produção de resultados falsos negativos, em razão de algumas cepas expressarem um grau muito baixo de resistência ou pela associação a outros mecanismos. Além disso, suas características fenotípicas podem confundi-las com cepas produtoras de ESBL. Testes automatizados podem exacerbar o erro, principalmente pela utilização de pequenas quantidades de inóculos (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A partir da constatação do aumento de casos nos hospitais de Londrina, o Comitê Municipal de Controle de Infecção em Serviços de Saúde da Londrina (CMCISSL) em conjunto com a CCIH do HU-UDEL, elaborou uma norma técnica para controle de microrganismos multirresistentes. Semelhantemente, ocorreu a detecção de KPC em outros hospitais de várias partes do Brasil durante o ano de 2010, o que acarretou grande preocupação das autoridades sanitárias, levando a ANVISA a publicar uma norma técnica (NT 1/2010) com o mesmo objetivo. Estas medidas aumentam os halos de sensibilidade e diminuem as CIM para os carbapenêmicos serem considerados sensíveis, no intuito de melhorar a identificação de enterobactérias resistentes a esta classe de antimicrobiano.

A utilização de técnicas moleculares permite uma caracterização específica da enzima KPC, como as técnicas de PCR e focalização isoelétrica, no entanto, não são utilizadas na rotina de laboratórios de microbiologia clínica (LABOMBARDI, 2007).

Uma variedade de medidas de controle incluindo precauções de contato, ênfase na limpeza do meio ambiente, uso criterioso de antimicrobianos têm sido propostas para minimizar o surgimento e a dispersão de cepas multirresistentes (RAMADHAN; HEGEDUS, 2005; SHADEL, et al., 2006; SIEGEL et al., 2007).

O Management Multidrug-Resistant Organisms in Healthcare Settings, publicado pelo CDC em 2007, é um documento que enfatiza a necessidade da compreensão de intervenções relativas a medidas de controle, além de envolvimento administrativo, com o objetivo de prevenir a emergência e transmissão de microrganismos multirresistentes (SIEGEL et al., 2007).

Entre estas intervenções pode-se destacar a educação da equipe médica e de outros profissionais da área da saúde, compreensão de métodos de vigilância para microrganismos resistentes, aplicação de precauções padrão no cuidado aos pacientes, medidas de cuidados como limpeza e desinfecção do

ambiente do paciente colonizado ou infectado, materiais não críticos de uso exclusivo, aparelhos individuais, entre outros sistemas de comunicação, um processo que assegure a adesão às recomendações do controle de infecção e o uso racional de antimicrobianos (SIEGEL et al., 2007).

3.4 TRATAMENTO DE KPC

As carbapenemases do tipo KPC são capazes de hidrolisar os carbapenêmicos (opção terapêutica para tratamento de ESBL) e conferem resistência a um amplo espectro de antibióticos. Dessa forma, o tratamento de infecções causadas por patógenos produtores dessa enzima é considerado um desafio considerável pelos médicos. O tratamento adequado para microrganismos produtores de KPC ainda deve ser determinado, e poucos dados clínicos estão disponíveis para a conduta de recomendações antimicrobianas (HIRSCH; TAM, 2010).

A utilização de uma combinação de antibióticos para atingir a eficácia pode ser necessária. As combinações de antimicrobianos são utilizadas algumas vezes para prevenir ou adiar a emergência de subpopulações do microrganismo em questão. Além disso, utilizando um agente adicional, pode ser possível a redução da dose de um antimicrobiano potencialmente tóxico. Por outro lado, administrar 2 antimicrobianos em alguns casos pode aumentar o risco de toxicidade e custo do tratamento (PANKEY; ASHCRAFT, 2011).

Alguns antimicrobianos ainda são eficazes contra algumas cepas produtoras de KPC. Porém, existem outros problemas envolvidos neste cenário. A colistina é amplamente utilizada, mas apresenta nefrotoxicidade e eficácia duvidosa em infecções pulmonares, embora pareça ser consistentemente efetiva em outros tipos de infecção. Tigeciclina é recomendada apenas em casos de infecções intra-abdominais e de pele e tecidos moles. Não é apropriada para infecções urinárias devido aos baixos níveis que atinge neste sítio (LIVERMORE et al, 2011).

A fosfomicina é um antimicrobiano “antigo” que inibe a primeira etapa da síntese de peptidoglicano e mostra potente ação bactericida contra muitos patógenos gram-negativos e gram-positivos. Esta droga apresenta baixa toxicidade, e atinge níveis muito elevados no soro e urina. A fosfomicina também penetra rapidamente em tecidos, uma propriedade altamente desejável no tratamento de

infecções graves. Infelizmente, a resistência se estabelece rapidamente quando a fosfomicina é usada como monoterapia (ENDIMIANI et al., 2010).

Enquanto a estratégia ao combate às β -lactamases ainda for ofensiva, o panorama de uma monoterapia efetiva com um β -lactâmico é de baixa probabilidade. A perspectiva para o futuro é de combinações de inibidores β -lactamases que permitirão estratégias de amplo espectro contra enzimas cada vez mais evoluídas (BUSH; FISHER, 2011).

REFERÊNCIAS

- BAGATTINI, M.; CRIVARO, V.; DI POPOPLO, A.; GENTILE, F.; SCARCELLA, A.; TRIASSI, M.; VILLARI, P.; ZARRILLI, R. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit. **J Antimicrob Chemother**, v.57, p. 979-982, 2006.
- BAUERNFEIND, A.; CASELLAS, J.M.; GOLDBERG, M.; HOLLEY, M.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; RÖHNISCH, T.; SCHWEIGHART, S.; WILHELM, R. A new plasmidic cefotaximase from patients infected with *Salmonella typhimurium*. **Infection**, v.20, p.158–163, 1992.
- BEN-HAMOUDA, T.; FOULON, T.; BEN-MAHREZ, K. Involvement of SHV-12 and SHV-2a encoding plasmids in outbreaks of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Microb Drug Resist**, v.10, p.132-138, 2004.
- BOGAERTS, P.; MONTESINOS, I.; RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; BLAIRON, L.; DEPLANO, A.; GLUPOZVNSKI, Y. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p.361-362, 2010.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.1-14, 2004.
- BOU, G.; OLIVER, A.; MARTINEZ-BELTRAN, J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 44, p. 1556-1561, 2000.
- BRADFORD, P. A.; YANG, Y.; SAHM, D.; GROPE, I.; GARDOVSKA, D.; STORCH, G. CTX-M-5, a novel cefotaxime-hydrolyzing β -lactamase from an outbreak of *Salmonella typhimurium* in Latvia. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, p.1980–1984, 1998.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamase in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, p. 933-951, 2001.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; ALAM, M.; QUALE, J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York city. **Arch Intern Med**, v. 165, p. 1430-1435, 2005.
- BRISSE, S.; JEANJEAN, S. I.; GRIMONT, P. A. D. Molecular serotyping of *Klebsiella* species isolates by restriction of the amplified capsular antigen gene cluster. **J Clin Microbiol**, v.42, p.3388-3398, 2004.
- BUSH K. Metallo-beta-lactamases: a class apart. **Clin Infect Dis**, v.27, p.48-53, 1998.

BUSH, K.; FISHER, J.F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **Annu Rev Microbiol**, v. 65, p. 455–78, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, p.969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, p.1211–1233, 1995.

CAI, J. C.; ZHOU, H.W.; ZHANG, R.; CHEN, G.X.. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -Lactamase KPC-2 in Intensive Care Units of a Chinese hospital. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 6, p. 2014-2018, 2008.

CARATOLLI, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. **Vet Res.**, v.32, p. 243-259, 2001.

CARRARA-MARRONI, et al. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **26 Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Foz do Iguaçu, v.4, abst 275-H, P 05/10, 2011.

CARVALHO-ASSEF, A.P.D.; LEÃO, R.S.; SILVA, R.V.; FERREIRA, A.G.; SEKI, L.M.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, p. 337–338, 2010.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H.S.; DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. 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. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 570-573, 2008.

COQUE, T. M.; OLIVER, A.; PÉREZ-DÍAZ, J.C.; BAQUERO, F.; CANTÓN, R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.500-510, 2002.

COTTON, M. F.; WASSERMAN, E.; PIEPER, C. H.; THERON, D. C.; VAN TUBBERGH, D.; CAMPBELL, G.; FANG, F. C.; BARNES, J. Invasive disease due to extended spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in neonatal unit: the possible role of cockroaches. **J Hosp Infect.**, v.44, p.13–17, 2000.

CURIAO, T.; MOROSINI, M.I.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; ROBUSTILLO, A.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M.; CANTÓN, R. Emergence of bla KPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.1608-1614, 2010.

CUZON, G.; NAAS, T.; DEMACHY, M.C.; NORDMANN, P. Plasmid-mediated-hydrolysing β -lactamase KPC in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, p. 796-797, 2008.

CUZON, G.; QUANICH, J.; GONDRET, R.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.2420-2423, 2011.

DAVIN-REGLI, A.; BOLLA, J.M.; JAMES, C.E.; LAVIGNE, J.P.; CHEVALIER, J.; GARNOTEL, E.; MOLITOR, A.; PAGÉS, J.M. Membrane permeability and regulation of drug influx and efflux in enterobacterial pathogens. **Curr Drug Targets**, v.9, p. 750-759, 2008.

DORTET, L.; RADU, I.; GAUTIER, V.; BLOT, F.; CHACHATY, E.; ARLET, G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 61, p. 455-457, 2008.

DOUMITH, M.; ELLINGTON, M.J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp clinical isolates from the UK. **J Antimicrob Chemoter**, v.63, p. 659-667, 2009.

ENDIMIANI, A.; PATEL, G.; HUJER, K.M.; SWAMINATHAN, M.; PEREZ, F.; RICE, L.B.; JACOBS, M.R.; BONOMO, R.A. In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p.526-529, 2010.

GASINK, L. B.; EDELSTEIN, P.H.; LAUTENBACH, E.; SYNNESTVEDT, M.; FISHMAN, N.O. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, p. 1180-1185, 2009.

GAZOULI, M.; TZOUVELEKIS, L. S.; VATOPOULOS, A. C.; TZELEPI, E. Transferable class C beta-lactamases in *Escherichia coli* strains isolated in Greek hospitals and characterization of two enzyme variants (LAT-3 and LAT-4) 71 closely related to *Citrobacter freundii* AmpC beta -lactamase. **J Antimicrob Chemother** . v. 42, n. 4, p. 419-425, 1998.

GÓMEZ-GIL, M.R.; PAÑO-PARDO, J.R.; ROMERO-GÓMEZ, M.P.; GASJOR, M.; LORENZO, M.; QUILES, I.; MINGORANCE, J. Detection of KPC-2-producing *Citrobacter freundii* isolates in Spain. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, p. 2695-2697, 2010.

GRAY, J. T.; HUNGERFORD, L. L.; FEDORKA-CRAY, P. J.; HEADRICK, M. L. Extended-spectrum cephalosporin resistance in *Salmonella enterica* isolates of animal origin. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 48, n. 8, p. 3179-3181, 2004.

GRIMONT, P.A.D.; GRIMONT, F. *Genus XVI. Klebsiella Trevisan 1885*. In: GARRITY, G.M. (ed.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology - The Proteobacteria Part B**. 2 ed, p. 685-693. Nova Iorque: Springer, 2005.

HANSON, N. D.; MOLAND, E. S.; HONG, S. G.; PROPST, K.; NOVAK, D. J.; CAVALIERI S, J. Surveillance of community-based reservoirs reveals the presence of CTX-M, imported AmpC, and OXA-30 beta-lactamases in urine isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in a U.S. community. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 52, n. 10, p. 3814-3816, 2008.

HASDEMIR, U.O.; CHEVALIER, J.; NORDMANN, P.; PAGÈS, J.M. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistance *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. **J Clin Microbiol**, v.42, p. 2701-2706, 2004.

HAWKEY, P.M. The growing burden of antimicrobial resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p.1-9, 2008.

HERITAGE, J.; M'ZALI, F.H.; GASCOYNE-BINZI, D.; HAWKEY, P.M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum beta-lactamases in Gram negative bacteria. **J Antimicrob Chemother**, v.44, p.309-318,1999.

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

HOBSON, K.; BONTEN, M. J. M.; JARVIS, W. R. Nosocomial pneumoniae in mechanically ventilated patients receiving anti-acid, ranitidine, or sucralfate as prophylaxis for stress ulcer: a randomized controlled trial. **Ann Intern Med**, v.120, p.653-662, 1996.

HUANG, Z. M.; MAO, P.H.; CHEN, Y.; WU, L.; WU, J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant *Acinetobacter baumannii*. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.2, p.5425-5427, 2004.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. Beta-lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrob Agents Chemother**, v.46, p.3045-3049, 2002.

JACOBY, G.; BUSH, K. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. **Lahey Clinic**. 2009.

JONES, L.A.; MELVER, C.J.; KIM, M.J.; RAWHINSON, W.D.; WHITE, P.A. The aadB gene cassette is associated with *bla*_{SHV} genes in *Klebsiella* species producing extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p.794-797, 2005.

KANTOPOULOU, K.; PROTONOTARIOU, E.; VASILAKOS, K.; KRITI, M.; KOTELI, A.; ANTONIADOU, E.; SOFIANO, D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 β -lactamase resistant to colistin. **J Hosp Infect**; v.76, p. 70-73, 2010.

KATTAN, J. N. et al. Widespread dissemination of KPC carbapenemases in multiple species from multiple cities within Colombia. **47th InterScience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Chicago, USA, 2007.

KIFFER, C.; HSIUNG, A.; OPLUSTIL, C.; SAMPAIO, J.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; MENDES, C. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative bacteria in Brazilian hospitals: the MYSTIC Program Brazil 2003. **Braz J Infect Dis**; v.9, p. 216-224, 2005.

KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States, abstr. C2-3730. *In* Abstr. **48th Ann. ICAAC/ IDSA 46th Ann. Meet. American Society for Microbiology**, Washington, DC, 2008.

KNOTHE, H. *In-vitro* activity of cefotaxima. **Wien Klin Wochenschr**, v.142, p.4-7, 1983.

KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMP, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infect Dis**, v.6, p.130, 2006.

LABOMBARDI, V. J. The emergence of the KPC carbapenemases : clinical and laboratory issues. **J Med Microbiol**, v. 18, p. 29-34, 2007.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; QUALE, J. Contribution of OmpK36 to carbapenem susceptibility in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **J Med Microbiol**, v. 58, p. 1303-1308, 2009.

LEVY, S.B. Antibiotic resistance – the problem intensifies. **Adv Drug Deliv Rev**, 57, p.1446– 1450, 2005.

LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V. C.; GALES, A. C.; MAMIZUKA, E. M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **J Clin Microbiol**, v.43, p.516-519, 2005.

LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M.A.; ELMOR DE ARAUJO, M.A.; RUIZ, A.S.; MAMIZUKA, E. Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J Med Microbiol**, v. 7, p. 1-3, 2006.

LIVERMORE, D. M. β -lactamase-mediated resistance and opportunities for its control. **J Antimicrob Rev**, v.8, p.557-584, 1998.

LIVERMORE, D.M. Of Pseudomonas, porins, pumps and carbapenems. **J Antimicrob Chemother**, v.47, p. 247-250, 2001.

LIVERMORE D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **J Antimicrob Chemother**, v. 64, p.29-36, 2009.

LIVERMORE, D. M.; WARNER, M.; MUSHTAQ, S.; DOUMITH, M.; ZHANG, J.; WOODFORD, N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, p. 415-419, 2011.

MACK, E.; MACK, D. Extended-spectrum-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **J Infect**, v.47, p. 273-295, 2003.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **Int Microbiol**, v.7, p.261-268, 2004.

MEDEIROS, A. A. Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. **Clin Infect Dis**, v. 24, p. 19-45, 1995.

MIGLIAVACCA, R.; NUCLEO, E.; D'ANDREA, M. M.; SPALLA, M.; GIANI, T.; PAGANI, L. Acquired AmpC type beta-lactamases: an emerging problem in Italian long-term care and rehabilitation facilities. **New Microbiol**. v. 30, p. 295-298, 2007.

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

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

MUSHTAQ, S.; GE, Y.; LIVERMORE, D. M. Comparative activities of doripenem versus isolates, mutants, and transconjugants of *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter* spp. with characterized β -lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, p. 1313-1319, 2004.

NAAS, T.; NORDMANN, P.; VEDEL, G.; POYART, C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, p. 4423-4424, 2005.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase bla_{KPC} gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 1257-1263, 2008.

NAVON-VENEZIA, S. et al. Emergence of an epidemic clone of KPC-3 producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (KPC Kpn) in Israel closely related to an epidemic clone in the United States. **Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 47, abstr. C2-1931, p. 141, 2007.

NEUWIRTH, C.; SIÉBOR, E.; DUEZ, J.M.; PÉCHINOT, A.; KAZMIERCZAK, A. Imipenem resistance in clinical isolates of *Proteus mirabilis* associated with alterations in penicillin-binding proteins. **J Antimicrob Chemother**, v. 36, p. 335-342, 1995.

NIKAIDO, H. Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. **J Biol Chem**, v.269, p. 3905-3908, 1994.

NORDMANN, P.; MAMMERI, H. Extended-spectrum cephalosporinases: structure, detection and epidemiology. **Future Microbiol**, v. 2, p. 297-307, 2007.

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

OGAWA, W.; KOTERASAWA, M.; KURODA, T.; TSUCHIYA, T. KmrA multidrug efflux pump from *Klebsiella pneumoniae*. **Biol Pharm Bull**, v. 29, p. 550-553, 2006.

PANKEY, G. A.; ASHCRAFT, D. S. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, p. 561-564, 2011.

PASTERAN, F. G.; OTAEGUI, L.; GUERRIERO, L.; RADICE, G.; MAGGIORA, R.; RAPOPORT, M.; FACCONI, D.; DI MARTINO, A.; GALAS, M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerg Infect Dis**, v. 14, p. 1178-1180, 2008.

PATEL, J. B.; RASHEED, J. K.; KITCHEL, B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: Activity, Epidemiology and Laboratory Detection. **Clin Microbiol Newsletter**, v. 31, p. 55-62, 2009.

PATEL, N.; HAMINGTON, S.; DIHMESS, A.; WOO, B.; MASOUD, R.; MARTIS, P.;

FIorenza, M.; GRAFFUNDER, E.; EVANS, A.; MCNUTT, L.; LODISE, T. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or -resistant

Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, p. 1600–1608, 2011.

PATERSON, D. L.; HUJER, K.M.; HUJER, A.M.; YEISER, B.; BONOMO, M.D.; RICE, L.B.; BONOMO, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47, p.3554–3560, 2003.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev** v. 18, p.657-686, 2005.

PATERSON, D.L. Resistance in Gram-negative Bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Am J Med**, v. 119, p. 20-28, 2006.

PAVEZ, M. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros. 125f. **Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2009.

PEIRANO, G.; SEKI L.M.; VAL PASSOS, V.L.; PINTO, M.C.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, p. 265-268, 2009.

PÉREZ-PÉREZ, F. J.; HANSON, N. D. Detection of Plasmid-Mediated AmpC beta lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. **J Clin Microbiol**. v. 40, p. 2153-62. 2002.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev**, v.11, p.589-603, 1998.

POIREL, L.; LEBESSI, E.; CASTRO, M.; FÈVRE, C.; FOUSTOUKOU, M.; NORDMANN, P. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, p.2277–2279, 2004.

POTRON, A.; POIREL, L.; VERDAVAINE, D.; NORDMANN, P. Importation of KPC-2-producing *Escherichia coli* from India. **J Antimicrob Chemother**, v.67, p.242-243, 2012.

POWER, P.; RADICE, M.; BARBERIS, C.; DE MIER, C.; MOLLERACH, M.; MALTAGLIATTI, M.; VAY, C.; FAMIGLIETTI, A.; GUTKIND, G. Cefotaxime-hydrolysing beta-lactamases in *Morganella morganii*. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v 18, p.743–747, 1999.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, p. 440-458, 2007.

QUINN, J.P.; STUDEMEISTER, A.E.; DIVICENZO, C.A.; LERNER, S.A. Resistance to imipenem in *Pseudomonas aeruginosa*: clinical experience and biochemical mechanisms. **Rev Infect Dis**, v.10, p.892-898, 1988.

RAMADHAN, A.A.; HEGEDUS, E. Survivability of vancomycin resistant enterococci and fitness cost of vancomycin resistance acquisition. **J Clin Pathol**, v. 58, p.744-746, 2005.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. OXA-type carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, p. 373-383, 2006.

RASMUSSEN, J. W.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, p. 470-482, 2007.

RHOMBERG, P.R.; JONES, R.N. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999-2008). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.65, p. 414-426, 2009.

RIBEIRO FILHO, N. Resistência Bacteriana aos Antibióticos. In: FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde**. Ed. Atheneu, São Paulo, 2000, cap. 85, p. 1550-1557.

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

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VÁZQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, p.2968-2970, 2011.

RODLOFF, A. C.; GOLDSTEIN, E. J. C.; TORRES, A. Two decades of imipenem therapy. **J Antimicrob Chemother**, v. 58, p. 916-929, 2006.

ROSENBLUETH, M.; MARTÍNEZ, L.; SILVA, J.; MARTÍNEZ-ROMERO, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. **Syst Appl Microbiol**, v. 27, p.27-35, 2004.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. **Resistência Bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2005.

SADER, H.S.; REIS, A.O.; SILBERT, S.; GALES, A.C. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo-beta-lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a Brazilian hospital. **Clin Microbiol Infect**, v. 11, p. 73-76, 2005.

SAMUELSEN, Ø; NASEER, U.; TOFTELAND, S.; SKUTLABERG, D.H.; ONKEN, A.; HJETLAND, R.; SUNDSFJORD, A.; GISKE, C.G. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **J Antimicrob Chemother**, v.63, p. 654-658, 2009.

SANDERS, C. C.; SANDERS, W.E. JR. β -lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clin Infect Dis**, v.15, p.824-839, 1992.

SHADEL, B.N.; PUZNIAK, L.A.; GILLESPIE, K.N.; LAWRENCE, S.J.; KOLLEF, M.; MUNDY, L.M. Surveillance for vancomycin-resistant enterococci: type, rates, costs, and implications. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v.27, p.1068-1075, 2006.

SIEGEL, J. D. et al. **2007 Guideline for Isolation Precautions: Preventing Transmission of Infectious Agents in Healthcare Settings**. 2007. Disponível em: <http://www.cdc.gov/ncidod/dhqp/gl_isolation.html>

SUNDSTROM, L. The potential of integrons and connected programmed rearrangements for mediating horizontal gene transfer. **APMIS**, v.84, p.37-42, 1998.

THOMSON, J.M.; BONOMO, R.A. The threat of antibiotic resistance in Gram-negative pathogenic bacteria: beta-lactams in peril. **Curr Opin Microbiol**, v.8, p. 518-524, 2005.

THOMSON, K. S.; PREVAN, A. M.; SANDERS, C. C. Novel plasmid-mediated β -lactamases in *Enterobacteriaceae*: emerging problems for new β -lactam antibiotics. **Curr Clin Top Infect Dis**, v.16, p.151-163, 1996.

THOMSON, K.S.; SMITH-MOLAND, E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram negative bacteria at the dawn of the new millennium. **Microbes Infect**, v.2, p. 1225-35, 2000.

TOLEMAN, M. A.; BENNETT, P. M.; WALSH, T. R. ISCR elements: novel gene-capturing systems of the 21st century? **Microbiol Mol Biol Ver**, v. 70, p. 296-316. 2006.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. Ed. Atheneu, São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte, 2008.

TSAKRIS, A.; KRISTO, I.; POULOU, A.; MARKOU, F.; IKONOMIDIS, A.; POURNARAS, S. First occurrence of KPC-2 possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc test. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 1257-1260, 2008.

VESPERO, E.C. **Tese de doutorado**: Caracterização e Epidemiologia Molecular de Cepas de *Klebsiella pneumoniae* Produtoras de ESBLs Isoladas de Pacientes do Hospital Universitário de Londrina, no período de 2000-2004. **Universidade Estadual de Londrina**, 2007.

VESPERO, E.C.; PELISSON, M.; ROCKSTROH, A. C.; PICÃO, R.; MAGALHÃES, G.L.G.; PERUGINI, M.R.E.; QUESADA, R.M.B.; GALES, A.C. Surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de KPC em um Hospital Universitário. **25° Congresso Brasileiro de Microbiologia**, Porto de Galinhas, 2009.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; SUAREZ, C.J.; LOPEZ, J.A.; VALLEJO, M.; QUINN, J.P. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, p. 2880-2882, 2006.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J.N.; LOPEZ, J.A.; QUINN, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, p. 1553-1555, 2007.

WENDT, C.; SCHUTT, S.; DALPKE, A.H.; KONRAD, M.; MIETH, M.; TRIERWEILLER-HAUKE, B.; WEIGAND, M.A.; ZIMMERMANN, S.; BIEHLER, K.; JONAS, D. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 29, p. 563-570, 2010.

WILLIAMS, P.; TOMAS, J. M. The pathogenicity of *Klebsiella pneumoniae*. **Rev. Med. Microbiol.** v.1, p.196-204, 1990.

WILLIAMS, J. D. β -lactamase inhibition and *in vitro* activity of sulbactam and sulbactam/cefoperazone. **Clin Infect Dis**, v. 24, p.494-497, 1997.

WITTE, W. International dissemination of antibiotic resistant strains of bacterial pathogens. **Infect Genet Evol**, v.4, p.187-191, 2004.

WOLTER, D.J.; KHALAF, N.; ROBLEDO, I.E.; VÁZQUEZ, G.J.; SANTÉ, M.I.; AQUINO, E.E.; GOERING, R.V.; HANSON, N.D. Surveillance of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Puerto Rican Medical Center Hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, p.1660-1664, 2009.

WOODFORD, N.; ZHANG, J.; WARNER, M.; KAUFMANN, M.E.; MATOS, J.; MACDONALD, A.; BRUDNEY, D.; SOMPOLINSKY, D.; NAVON-VENEZIA, S.; LIVERMORE, D.M. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **J Antimicrob Chemother**, v. 62, p. 1261–1264, 2008.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing b-Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

ZARKOTOU, O.; POURNARAS, S.; TSELIOTI, P; DRAGOUMANOS, V.; PITIRIGA, V.; RANELLOU, K.; PREKATES, A.; THEMELI-DIGALAKI, K.; TSAKRIS, A. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clin Microbiol Infect**, v.17, p.1798-1803, 2011.

ZAVASCKI, A.P.; MACHADO, A.B.; DE OLIVEIRA, K.R.; SUPERTI, S.V.; PILGER, D.A.; CANTARELLI, V.V.; PEREIRA, P.R.; LIEBERKMECHT, A.C.; BARTH, A.L. KPC-2 producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, p. 286-288, 2009.

ARTIGO 1 - MOLECULAR CHARACTERISATION AND EPIDEMIOLOGY OF KPC-2-PRODUCING *Klebsiella pneumoniae* ISOLATES FROM A UNIVERSITY HOSPITAL

Ana Carolina Polano Vivan¹, Juliana Ferraz Rosa², Marsileni Pelisson³, Silvia Figueiredo Costa², Mariangela Hungria¹, Eliana Carolina Vespero³

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kpn) presents an increasing global challenge in infection control and treatment. The aim of this study was to describe the clinical and microbiological aspects of KPC-Kpn infections from 54 patients hospitalised at the University Hospital of Londrina State University (HU-UEL) in Brazil. The strains were isolated from clinical specimens from July 2009 to July 2010, and only one sample per patient was included. These strains showed reduced susceptibility to at least one of the available carbapenems (imipenem, meropenem, ertapenem). All isolates were phenotypically positive for class A carbapenemase production, but negative for metallo- β -lactamase (MBL) activity. PCR analysis using specific primers for *bla*_{KPC} and Multiplex PCR for MBL genes demonstrated that all isolates carried the *bla*_{KPC} gene and that none of them produced MBL genes. The amplicons were sequenced, confirming that all strains belonged to the KPC-2 subtype. The isolates were tested for antimicrobial sensitivity, and all of them showed resistance to ertapenem, meropenem and imipenem. Susceptibility rates to other antimicrobials were as follows: 35.2% to gentamicin, 85.2% to polymyxin B, 87% to colistin and 98.1% to tigecycline and fosfomicin. PFGE (*Pulsed field gel electrophoresis*) analysis showed that three clones predominated among the isolates. The medical records of the 54 patients were analysed after the tests, and their lifestyle factors, hospital unit and underlying diseases were among the data included in this study. Our findings highlight the urgent need to develop strategies for infection control and prevention, including the possibility of limiting the use of certain antimicrobials.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*. Carbapenemase. KPC. Carbapenem resistance.

¹ Graduate Program in Microbiology - Centre for Biological Sciences - University of Londrina, Londrina, Brazil.

² Laboratory of Bacteriology (LIM-54), Hospital das Clínicas, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicological Center - Health Sciences - State University of Londrina, Londrina, Brazil.

1 INTRODUCTION

The emergence of KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase)-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kpn) isolates is attracting significant attention. In current surveys, it is the most common pathogen harbouring *bla*_{KPC} genes [1]. *K. pneumoniae* carbapenemase-1 (KPC-1) was first detected in a *K. pneumoniae* strain isolated in North Carolina in 2001. Since that time, several reports of KPC have appeared worldwide, including in South America [2]. In Brazil, KPC enzymes have been mainly described in *K. pneumoniae* [3,4], *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* [5,6].

KPC-associated infections are predominantly nosocomial and systemic infections, which affect patients with multiple risk factors. Therapeutic failures and adverse impacts on patient outcome, such as high mortality rates (ranging from 22% to 57%), have been reported [7]. Factors associated with a higher risk of KPC-producing bacterial infection include prolonged hospitalisation, an intensive care unit (ICU) stay, treatment with invasive devices, immunosuppression and exposure to multiple antibiotic agents before initial culture [8].

According to data from the University Hospital of Londrina State University (HU-UEL), *K. pneumoniae* showed carbapenem resistance levels of 1.2% and 2.6% in 2007 and 2008, respectively. Although this resistance was due to mechanisms that were not associated with carbapenemase production, it nevertheless elicited interest and vigilance from the clinical and laboratory teams. In February 2009, the first case of KPC-Kpn was detected at the institution, signalling the beginning of an outbreak characterised by this new resistance mechanism. In 2009, 10.2% of the tested *K. pneumoniae* isolates showed carbapenem resistance, and that figure climbed to 55.6% in 2010, mainly as result of dissemination of the *bla*_{KPC} genes. This resistant infection became a constant concern at the hospital, and it attracted our attention to the importance of this research. After the first outbreak, many cases of infection and colonisation by KPC enzymes occurred, culminating in a second outbreak in August of 2010. Within this context, our study aims to evaluate the clinical, microbiological and molecular aspects of KPC-Kpn strains isolated from hospitalised patients during the period between July 2009 and July 2010.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 *Bacterial strains*

Between July 2009 and July 2010, the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates detected in patients admitted to HU-UEL were screened for the presence of the KPC enzyme. The strains used in this study were isolated from clinical specimens, with one isolate per patient, resulting in 54 samples. Bacterial identification and the initial antibiotic susceptibility testing were performed using the Microscan Walkaway automated system (Siemens – Sacramento (CA) – USA). These isolates presented a MIC (minimal inhibitory concentration) ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ for carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem) and were subjected to further phenotypic tests.

2.2 *Phenotypic testing*

The isolates were screened for carbapenemase production by a modified Hodge test, according to Lee et al (2001), and a boronic acid test for the class A β -lactamase producing phenotype, according to Tsakris et al. (2010) [9, 10]. The phenotypic test to detect MBLs was performed with ethylenediamine tetra-acetic acid (EDTA) at 100 mM, according to Picão et al. (2008) [11].

2.3 *Antibiotic susceptibility testing*

The broth microdilution method was used to confirm antibiotic resistance. Cation-adjusted Mueller-Hinton broth was used, and the test was performed as described in the CLSI document M7-A8 [12]. The following antimicrobials were tested: imipenem (MSD), meropenem (ABL), ertapenem (MSD), tigecycline (Wyeth), colistin (USP), polymyxin B (Sigma) and gentamicin (Sigma). Each strain's susceptibility to fosfomicin (Sigma) was tested by the agar dilution method, according to CLSI 2011 guidelines [13]. For tigecycline and colistin, the breakpoints used were from the FDA (*US Food and Drug Administration*) and Eucast, respectively [14,15]. The ATCC strains used for test validation were as follows: *Escherichia coli* 25922, *Pseudomonas aeruginosa* 27853, *Staphylococcus aureus*

29213, *Enterococcus faecalis* 29212, *K. pneumoniae* 700603 and *K. pneumoniae* 13883.

2.4 *Molecular analysis*

Polymerase chain reaction (PCR) was used to search the strains for the *bla*_{KPC} gene, as described by Bradford et al. (2004) [16]. The presence or absence of the MBL genes was investigated by Multiplex PCR, as described by Ellington et al (2007) [17]. The amplicons were quantified by spectrophotometry, using a Nanodrop (Nanodrop® Technologies INC, Wilmington, DE, USA) and sequenced using ABI 3730 from Applied Biosystems.

2.5 *Macrorestriction analysis*

Pulse field gel electrophoresis (PFGE), as described by Chang and Chui (1998) [18], was utilised to perform an analysis of the chromosomal DNA. Chromosomal DNA was digested with *Xba*I (Invitrogen™), and the restricted DNA fragments were separated using the CHEF-DRIII system (Bio-Rad, Hemel Hempstead, UK), with pulses ranging from an initial 5 s pulse to a final pulse of 60 s, with a voltage of 6 V·cm⁻¹, at 14°C for 23 h. The λ ladder was used as a molecular marker in the gel (50-1,000 kb). The products were stained by ethidium bromide and observed under UV light. The sizes of the fragments were first normalised according to the molecular weight of the DNA markers, and then the fingerprints were analysed using BioNumerics software (Applied Mathematics, Kortrijk, Belgium, version 4.6), with a position tolerance of 3%. The samples were submitted to similarity analyses using the UPGMA algorithm (unweighted pair-group method, with arithmetic mean) with the Dice coefficient. DNA fragments greater than 12,000 bp or smaller than 200 bp were excluded from the analysis.

2.6 *Retrospective review of patients' data*

The medical records of 54 patients infected with KPC-Kpn were retrospectively reviewed. Follow-up was possible until the patients either died or were discharged from the hospital. The patients' age, gender, lifestyle factors, infection by

another pathogen, hospital unit, underlying diseases, antibiotic use, number of days at the hospital, prior surgery and prior hospitalisation were recorded for analysis. This study aimed to identify important patient conditions related to KPC-Kpn infection and/or mortality. The Acute Physiological and Chronic Health Evaluation II (APACHE-II) score was computed at the median date of hospitalisation.

3 RESULTS

The strains used in this study were isolated from clinical specimens, and only one isolate per patient was included, resulting in 54 samples from different patients, each of which caused infection according to CDC criteria [19]. The bacterial isolates were collected mainly from patients diagnosed with infections of the urinary tract (35.2%), lower respiratory tract (35.2%), bloodstream and central venous catheter (14.8%), skin and soft tissue (11.1%), or abdomen and peritoneum (3,7%).

The isolates were tested for antimicrobial sensitivity, and all of them showed resistance to ertapenem, meropenem and imipenem. However, 35,2% showed susceptibility to gentamicin, 85.2% to polymyxin B, 87% to colistin and 98.1% to tigecycline and fosfomycin. Fosfomycin and tigecycline were the most effective antimicrobial agents, according to MIC tests. Carbapenems had higher levels of resistance or non-susceptibility than gentamicin and other antimicrobial agents.

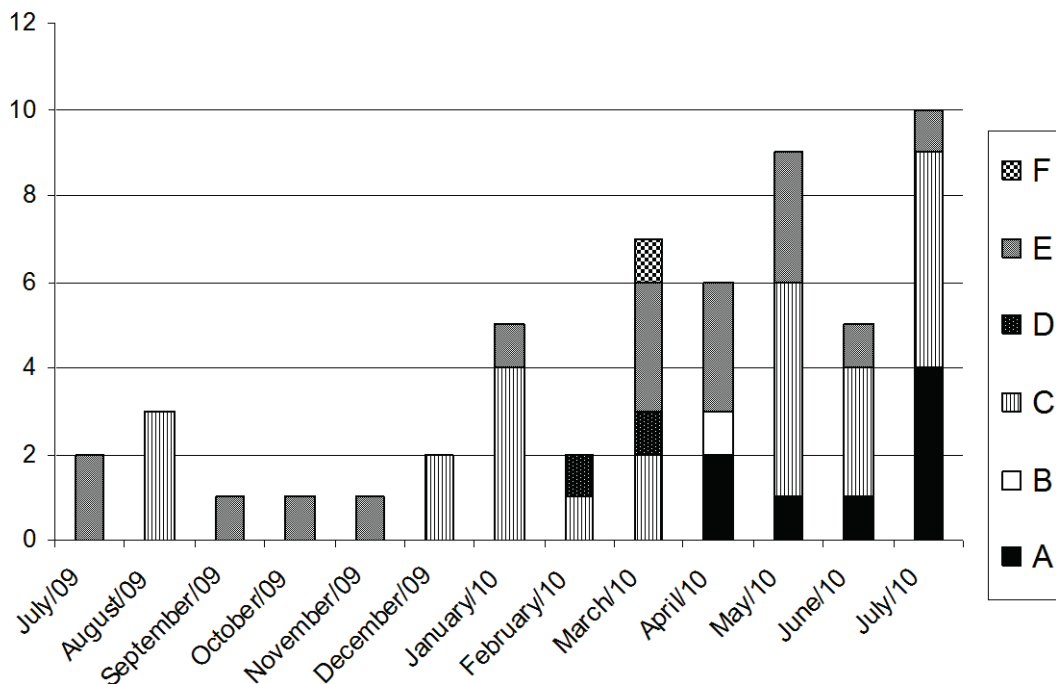
All isolates were phenotypically identified as potentially KPC-Kpn by a positive modified Hodge test, a negative EDTA test and a positive boronic acid disk test. The PCR results from all 54 isolates showed that they were *bla*_{KPC} carriers, and sequencing confirmed that all of them belonged to the *bla*_{KPC-2} subtype.

The different clonal types were designated A-F (data not shown). The PFGE analysis of the 54 KPC-Kpn isolates identified one major clone (B), which comprised 25 (46.3%) of the isolates and included subtypes B1 (n=10), B2 (n=1), B3 (n=2), B4 (n=4), B5 (n=6), and B6 (n=2). This clone appeared in August of 2009 and remained at a high frequency for most of the following months. A second prevalent clone (A), with 17 (31,5%) isolates, included subtypes A1 (n=6), A2 (n=4), A3 (n=1), A4 (n=3), A5 (n=2) and A6 (n=1). This was the first clone to appear after the outbreak and was detected almost every month until July of 2010. Clones A and B showed 75% genetic similarity between them. Eight isolates (15%) were clonal type F,

including subtypes F1 (n=3), F2 (n=1), F3 (n=2), and F4 (n=2), which are 70% genetically similar with clones A and B. Two clones with 1 (1,9%) isolate each were designated as clonal types E and D, and clone C comprised 2 isolates (3,8%). The temporal distribution of 54 KPC-Kpn isolates and their respective clonal type are shown in figure 1.

Figure 2 shows the distribution by hospital unit. The majority of KPC-Kpn cases were found in the intensive care unit (ICU), with 25 (46,3%) patients, followed by the emergency room (ER), with 12 (22,2%), the male ward (MW), with 9 (16,7%), and the female ward (FW), with 4 (7,4%). The male ward had more cases than the female ward. The other 4 units (contagious infection diseases (CID), neurology (NEUR), surgery (SURG) and pediatric ICU (P-ICU)) had one isolate each.

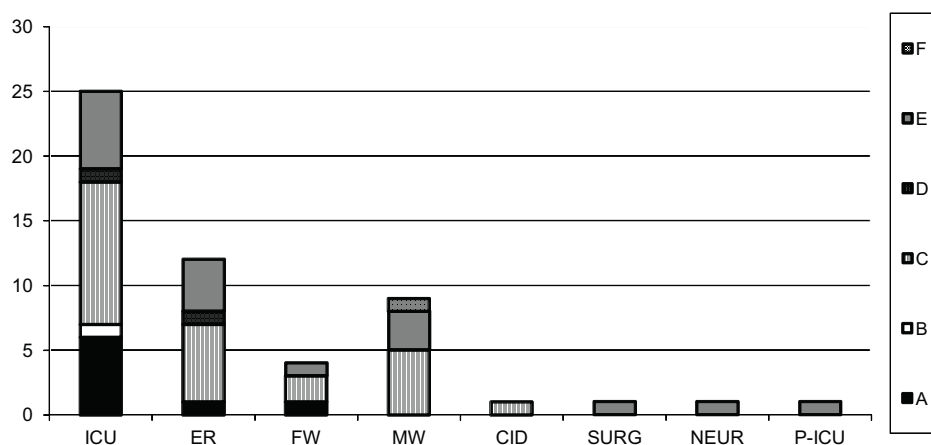
Figure 1 - Monthly prevalence of infection with KPC-2 producing *K. pneumoniae* during the study period. Clonal types (A-F) are shown.



The clinical characteristics and outcomes of 54 KPC-Kpn infection cases at this institution are shown in table 1. Most of the patients (51,85%) were over 60 years old, and 75,8% of them did not survive. Although 63% of the patients were male, the highest mortality rate occurred among women (66.6% female vs. 62.1% male). The risk factor associated with the highest percentage of deaths

was mechanical ventilation (90.3%). Heart and circulatory diseases affected 70.4% of the patients, and 63.4% of them died. Regarding antibiotic use, 84.6% of patients who were treated with colistin up to a month before the culture died, and the same was true of those treated with carbapenems (84%).

Figure 2 - Distribution of cases of 54 KPC-Kpn among hospital units during the study period.



Co-infection with *Acinetobacter baumannii* occurred in 63.6% of polymicrobial infections. Eighty percent of patients that were hospitalised for more than 21 days at the hospital died. The APACHE II score was calculated for only 33 of the 54 isolates; data were missing for the others. The patients with an APACHE II score > 30 presented a mortality rate of 100%.

Table 1 - Clinical Characteristics of 54 patients infected with KPC-Kpn between July 2009 and July 2010

CHARACTERISTICS	N (PATIENTS)	NON-SURVIVORS (MORTALITY)
Age		
<10	1 (1.85%)	---
10 – 40	9 (16.6%)	4 (36.3%)
41 – 60	16 (29.6%)	10 (58.8%)
>60	28 (51.85%)	22 (75.8%)

Gender

Male	34 (63%)	23 (62.1%)
Female	20 (37%)	14 (66.6%)

Risk factors

Mechanical ventilation	31 (57.4%)	28 (90.3%)
Diabetes Mellitus	16 (29.6%)	10 (58.8%)
Heart and circulatory disease	38 (70.4%)	26 (63.4%)
Etilism/Tabagism	15 (27.8%)	10 (66.6%)
Immunocompromised	8 (14.8%)	5 (62.5%)
Kidney or liver disease	11 (20.4%)	8 (72.7%)

**Antibiotic use one month before
KPC-2 *K. pneumoniae* isolation**

Colistin	13 (24%)	11 (84.6%)
Carbapenems	25 (46.3%)	21 (84%)
Third or Fourth-generation Cephalosporins	13 (24%)	12 (75%)
Piperacillin-tazobactam	15 (27.8%)	10 (66.6%)
Tigecycline	6 (11.1%)	4 (66.6%)
Fluoroquinolones	11 (20.4%)	9 (81.8%)

Polymicrobial infection

Association with <i>Acinetobacter baumanni</i>	11 (20.4%)	7 (63.6%)
Association with <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	7 (13%)	1 (14.3%)

**Number of days hospitalised before
infection**

≤ 3 days	5 (9.25%)	2 (40%)
4 to 10 days	11 (20.4%)	8 (72.7%)
11 to 20 days	23 (42.6%)	14 (60.9%)
≥ 21 days	15 (27.8%)	12 (80%)

Any hospitalisation in past year	13 (24%)	10 (76.9%)
Prior surgery within 30 days	12 (22.2%)	5 (41.6%)
Apache II score	33 (61.1%)	30 (90.9%)
≤ 20	11 (33.3%)	10 (90.9%)
21-30	11 (33.3%)	9 (81.8%)
>30	11 (33.3%)	11 (100%)

4 DISCUSSION

KPC-Kpn isolates have been associated with hospital outbreaks initially in the USA and subsequently in other geographical regions, including Brazil. This report describes the clinical, microbiological and molecular aspects of KPC-Kpn isolated between July 2009 and July 2010 from patients admitted to the HU-UEL.

Many authors [20, 21] have shown that the detection of KPC-Kpn may be difficult because some isolates have MICs for imipenem/meropenem within the susceptibility range and are therefore missed by automated susceptibility testing. In contrast, most KPC-positive strains are resistant to ertapenem. In this study, all isolates were resistant to carbapenems, showing a MIC₉₀ of 64 µg/mL for meropenem/imipenem and a MIC₉₀ >128 µg/mL for ertapenem. The strains showed high susceptibility to colistin, polymyxin, tigecycline and fosfomicin, making these therapeutic options for the treatment of KPC-Kpn infections. Given the limited number of remaining therapies, it is crucial to control the spread of this resistance mechanism.

To detect the presence of KPC, a phenotypic screening was performed, using the Hodge Test and the Boronic Acid Test. The first test is used to detect general carbapenemase activity, while the second has coverage for class A carbapenemases, the class to which KPC belongs. Both tests gave precise phenotypic results that guided us to the genotypic tests confirming the presence of the enzyme. The PCR for *bla*_{KPC} affirmed that KPC was present in the 54 studied strains. Ertapenem was a more sensitive indicator of KPC resistance than meropenem and imipenem, similar to results found by Anderson et al. (2007) [22].

Additionally, the negative results of phenotypic screening for MBLs were confirmed by Multiplex PCR, which also showed negative results.

Previous studies [20, 23, 24] have shown that an endemic strain containing the KPC enzyme suggests that spread occurs person-to-person as a result of a breakdown in infection control. The results of this molecular epidemiological study show the presence of three major clones, with clone B being the most prevalent. Many authors [25, 26] have described similar results, concluding that the dissemination of KPC enzymes requires transmissible plasmids. This concordance suggests that resistant isolates are being selected by antibiotic use. In this study, a larger proportion of deaths was not associated with any specific clone; however, clones A and B showed mortality rates of approximately 60%, and clone F showed a mortality rate of approximately 75%. All of the patients with infections caused by strains of clones C and E died. This study also contained 7 patients infected with strains resistant to colistin and polymyxin B, and all of these patients died. Four isolates from this cohort belonged to clone B, 2 belonged to clone A, and 1 belonged to clone F.

In comparison with the findings of other authors [24,27], our study found similar results when examining characteristics of age and sex. Studies from Israel, Greek, the USA and European countries [23, 24, 25, 26] have identified risk factors for nosocomial acquisition of KPC-Kpn. These risk factors include poor functional status, an ICU stay, transplantation, mechanical ventilation, a prolonged hospital stay and antimicrobial treatment. In our study, similar clinical characteristics were found. The patients with an APACHE II score >20 showed high mortality after infection caused by KPC-Kpn.

Previous antibiotic treatment and admission to an ICU were clinical characteristics found to increase the likelihood of infection by KPC-Kpn in this study. All patients were treated with multiple antimicrobial agents—often simultaneously (i.e., carbapenem, piperacillin-tazobactam, colistin, third or fourth-generation cephalosporins and/or fluorquinolones)—before the isolation of KPC-Kpn infections. The patients who had previously been treated with carbapenems and colistin had higher mortality. Prior cephalosporin use and prior carbapenem use have been associated with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in other studies [29, 30]. Co-infection with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* were found in this study, mainly in tracheal aspirates. Of the patients that had a KPC-Kpn infection

associated with *Acinetobacter baumannii*, 63.6% died. At our institution, *A. baumannii* is an important agent of nosocomial infections, and it results in high mortality rates.

The concentration of positive KPC-Kpn cases in the ICU and in the ER is likely due to the invasive procedures (such as mechanical ventilation) with which the patients of these units are treated. For this reason, some patients from other wards could have been contaminated with KPC when passing through one of these contaminated areas (ICU and ER), as most of the patients spent time in one or both of these wards at some point during their hospitalisation.

Due to their resistance to most available antimicrobial agents, invasive infections by these organisms have been associated with high rates of morbidity and mortality. Patients who are hospitalised for prolonged periods of time and those with severe underlying disease are at risk of acquiring these types of pathogens. This work concludes that this microorganism is an emerging pathogen and that it is associated with significant mortality. KPC-2-producing *K. pneumoniae* is becoming an endemic pathogen at the hospital. Our findings highlight the urgent need to develop strategies for prevention and infection control. Limiting the use of certain antimicrobials may be an effective strategy for curbing the spread of this pathogen.

REFERENCES

- [1] Endimiani A, Hujer AM, Perez F, Bethel CR, Hujer KM, Kroeger J et al. Characterization of blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates detected in different institutions in the Eastern USA. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 427–37.
- [2] Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008; 14: 1178-80.
- [3] Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 333-4.
- [4] Peirano G, Seki LM, Passos VLV, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63: 265–8.

- [5] Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents*, 2009; 34: 286-8.
- [6] Carvalho-Assef APD, Leão RS, Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68: 337–8.
- [7] Zarkotou O, Pournaras S, Tselioti P, Dragoumanos V, Pitiriga V, Ranellou K, et al. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 1798-803.
- [8] Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–36.
- [9] Lee K, Chong Y, Shin HB, Kim YA, Yong D, Yum JH. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. *Clin Microbiol Infect* 2001; 7: 88-91.
- [10] Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K, et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1664–71.
- [11] Picão RC, Andrade SS, Nicoletti AG, Campana EH, Moraes GC, Mendes RE, et al. Metallo- β -lactamase detection: Comparative evaluation of Double-Disk Synergy versus Combined Disk tests for IMP-, GIM-, SIM-, SPM-, or VIM producing isolates. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2028–37.
- [12] Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 8th ed. Document M7-A8. Wayne, PA: CLSI; 2009.
- [13] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement. Wayne, PA: CLSI; 2011.
- [14] United States Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER).
- [15] EUCAST - European Committee on Antibiotic Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, Taufkirchen, Germany, 2011.
- [16] Bradford PA, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York city. *Clin Infect Dis* 2004; 39:55–60.

- [17] Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 321-2.
- [18] Chang N, Chui L. A standardized protocol for the rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1998; 31:275-9.
- [19] Horan TC, Andrus M, Dudeck MA. CDC/NHSN surveillance definition of healthcare-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care setting. *Am J Infect Control* 2008; 36: 309-32.
- [20] Goossens H, Grabein B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended- spectrum beta-lactamase- and Amp C-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diag Microbiol Infect Dis* 2005; 53: 257-64.
- [21] Tenover FC, Kalsi RK, Williams PP. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis* 2006; 1: 1209-13.
- [22] Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, et al. Evaluation of Methods To Identify the *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 2723–5.
- [23] Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis* 2001; 32: 94-103.
- [24] Ikonomidis A, Tokatlidou D, Kristo I. Outbreaks in distinct regions due to a single *Klebsiella pneumoniae* clone carrying a *bla*_{VIM-1} metallo- β -lactamase gene. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 5344-7.
- [25] Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 US hospitals. *Antimicrob Agents Chemoter* 2002; 46: 3837-42.
- [26] Miriagou V, Tzouveleakis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemoter* 2003; 47: 1297-300.
- [27] Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 carbepenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol* 2008; 46: 2066-9.
- [28] Steinmann J, Kaase M, Gatermann S, Popp W, Steinmann E, Damman M, et al. Outbreak due to a *Klebsiella pneumoniae* strain harbouring KPC-2 and VIM-1 in a German university hospital, July 2010 to January 2011. *EEuro Surveill* 2011;16: 19944.

ARTIGO 2 - COMPARISON OF METHODS TO EVALUATE SUSCEPTIBILITY OF KPC (*KLEBSIELLA PNEUMONIAE* CARBAPENEMASE) producing *K. PNEUMONIAE* isolates

Ana Carolina Polano Vivan^{1*}, Marsileni Pelisson², Mariangela Hungria¹, Silvia Figueiredo Costa³, Eliana Carolina Vespero²

ABSTRACT

KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) production occurs mostly in *K. pneumoniae*, but it has also been reported in other *Enterobacteriaceae* species. This enzyme confers resistance to all β -lactam agents including penicillins, cephalosporins, monobactams, and carbapenems. Some isolates harbouring KPC genes demonstrate low-level carbapenem resistance, but when combined with other cellular changes, such as porin loss, the carbapenem MIC (Minimal Inhibitory Concentration) increases. In this study, the activity of gentamicin, tigecycline, polymyxin B, colistin, fosfomicin, ertapenem, meropenem and imipenem was evaluated against 54 KPC-producing *K. pneumoniae* strains, isolated from patients hospitalized at the University Hospital of Londrina, between July 2009 and July 2010. The tests (broth microdilution, agar dilution and disk diffusion) were performed according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines. By microdilution, following rates were found in this work: all isolates were resistant to ertapenem, meropenem and imipenem; 35,2% of isolates remain susceptible to gentamicin, 85,2% to polymyxin, 87% to colistin and 98,1% to tigecycline. Agar dilution was performed to determine sensibility to fosfomicin, and only one strain presented a resistance result. Gentamicin was the antibiotic with the highest number of discrepancies between the tests. Very major error, false-susceptible result by the disk diffusion test, was detected in four isolates (7,4%). Major error, false-resistant result produced by the disk diffusion test, in seven isolates (12,9%). Also, polymyxin B and colistin had very major error, six (11,1%) and two (3,7%) isolates, respectively. Major error was found in one isolate (1,85%) for tigecycline, and a minor error was observed with imipenem (1,85%). The disk diffusion method is one of the most frequently used techniques in microbiology laboratories. However, the high rates of errors with some antimicrobial agents of this study demonstrate that the disk diffusion method is not reliable compared to the broth microdilution method, considered as gold standard by CLSI.

Keywords: KPC. Susceptibility. Very major error. Major error. Minor error.

¹ Graduate Program in Microbiology - Centre for Biological Sciences - University of Londrina, Londrina, Brazil

² Department of Pathology, Clinical Analysis and Toxicological Center - Health Sciences - State University of Londrina, Londrina, Brazil.

³ Laboratory of Bacteriology (LIM-54), Hospital das Clínicas, Medical School of the University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

* Corresponding-author: carol_polano@hotmail.com

1 INTRODUCTION

Despite extensive progress in scientific knowledge and medical technology, infectious diseases remain as a leading cause of worldwide morbidity and mortality. Whether in the general healthy population, or in patients, immunocompromised and vulnerable to invasive opportunistic infections, the evolution of drug-resistant organisms has impaired the therapeutic efficacy of available anti-infective agents. It has, moreover, substantially added costs to the healthcare (MOELLERING et al., 2007).

Since the beginning of the last decade, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Enterobacteriaceae* have been increasingly detected in the USA (BRATU et al., 2005a; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009), but now it has an expanded geographic range, including Israel, China, Europe, Central and South America (MONTEIRO et al., 2009; YIGIT et al., 2001). KPC enzymes confer various levels of resistance to all β -lactams, including carbapenems (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Moreover, *bla*_{KPC} genes are easily transferable and are often linked with various non β -lactam resistance determinants, further compromising the therapeutic alternatives for clinically relevant infections (BRATU et al., 2005a; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; TSAKRIS et al., 2008). Clinical reports have already documented that hospital infections due to KPC-possessing *Enterobacteriaceae* are commonly associated with increasing therapeutic failure and mortality (BRATU et al., 2005a; HIRSCH; TAM, 2010; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). It has been recovered from hospitalized patients with prolonged hospital stays (usually in intensive care units), that received multiple antimicrobial drug courses and those mechanically ventilated (PEIRANO et al., 2009). Besides these observations, studies dealing with antimicrobial treatment of KPC infections and clinical outcomes are based on a limited number of case patients and therefore the optimum treatment has not been well established (HIRSCH; TAM, 2010).

Tigecycline, a glycylicycline antibiotic approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of complicated intra abdominal infections and skin and skin-structure infections in adults, has been found to be active against *Enterobacteriaceae* regardless of the presence of carbapenemases (CASTANHEIRA et al., 2008). Its action is mediated by the inhibition of bacterial protein synthesis and

is mainly bacteriostatic. The in vitro activity of tigecycline against KPC-producers has been only scarcely tested (BRATU et al., 2005b; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009), whilst antibiotic combinations including tigecycline have not been studied previously in these bacteria. Polymyxin B and E (colistin) are becoming increasingly important because of multidrug-resistant Gram-negative organisms - such as carbapenemase-producing *Klebsiella* - that are only susceptible to the polymyxins (CHEN; KAYE, 2009). Polymyxin B and E resistance in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* has been reported and varies from 8% to 89% (BRATU et al., 2005b, 2005c; CUZON et al., 2010; ELEMAM; RAHIMIAN; DOYMAZ, 2010; KANTOPOULOU et al., 2010; LEE et al., 2009). Susceptibility testing data suggest that treatment of infections caused by KPC-producers commonly requires the use of tigecycline or colistin as last-resort drugs; meropenem in many cases also retains phenotypic activity against KPC-producers and is considered as a possible alternative (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; POURNARAS et al., 2009; HIRSCH; TAM, 2010).

Using a combination of antibiotics to achieve efficacy may be necessary, once the clinical utility monotherapy is limited against isolates that produce KPC carbapenemases (LE et al., 2011). Antibiotic combinations are sometimes used to prevent or delay the in vivo emergence of drug-resistant subpopulations of the organism. In addition, by using an additional agent, it may be possible to reduce the dose of a potentially toxic antimicrobial (PILLAI; MOELLERING; ELIOPOULOS, 2005). On the other hand, administering two antimicrobials in some cases may increase the risk of toxicity and cost of treatment.

Given the lack of options for antibiotics that retain susceptibility against pathogens that produce KPC, selection of a dosing regimen that could potentially treat infections caused by these organisms depends on the ability to accurately determine the antibiotic MIC. With respect to KPC, the accurate determination of the antibiotics MIC may permit the application of pharmacodynamic principles to dosing regimen optimization by administering higher doses and using prolonged or continuous infusions, as has been accomplished against other resilient bacteria (BULIK et al., 2010; KUTI et al., 2004; NICASIO et al., 2010).

In automated systems, presence of a carbapenemase is suggested by elevated carbapenem MICs; however, failure in systems to detect KPC-producing isolates has been described. The aim of this study was to evaluate the efficacy of two

methods used for the detection of antimicrobial susceptibility, agar disk diffusion (DD) and MIC. The first one remains as the most commonly used in clinical microbiology laboratories, and broth microdilution method is considered the gold standard for detecting antimicrobial susceptibility, according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 BACTERIAL ISOLATES

Fifty-four samples of KPC-producing *K. pneumoniae* isolated from patients hospitalized in the University Hospital in Londrina, between July 2009 to July 2010, were evaluated. The susceptibility to antimicrobial agents: gentamicin (GEN), fosfomicin (FOS), tigecycline (TIG), polymyxin B (POL), colistin (COL), ertapenem (ERT), meropenem (MER) and imipenem (IMP) was tested. The samples were previously identified by the MicroScan Walkaway automated system (Siemens – Sacramento (CA), and those that were resistant to at least one of the available carbapenems (imipenem, meropenem and ertapenem) were submitted to confirmatory tests in order to detect carbapenemases.

2.2 CHARACTERIZATION OF KPC ISOLATES

The isolates that showed reduced susceptibility to at least one carbapenem were subjected to modified Hodge test (LEE et al., 2001), to phenotypically identify the presence of carbapenemases. Class A carbapenemase was confirmed by using of boronic acid, as described by Tsakris et al (2010). The PCR was performed with specific primers, as described by Bradford et al. (2004), in order to search for the presence of *bla*_{KPC} gene. The amplicons were sequenced in an ABI 3730 (Applied Biosystems).

2.3 ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING

2.3.1 Disk diffusion

Disk diffusion test was performed with Mueller-Hinton agar, and disks from Oxoid Ltd. (Basingstoke, UK), according to CLSI document M2-A10. The test disks were: gentamicin 10 µg, tigecycline 15 µg, imipenem 10 µg, meropenem 10 µg, ertapenem 10 µg, polymyxin B 300 U and colistin 10 µg.

2.3.2 Broth microdilution

Susceptibility to the following antibiotics was determined by broth microdilution method (BMD): ertapenem, imipenem, meropenem, gentamicin, polymyxin B, colistin and tigecycline. BMD with cation-adjusted Muller-Hinton broth was carried out in accordance with CLSI document M7-A8. Bacterial suspensions were adjusted according to CLSI recommendations and the final inoculum was verified for BMD susceptibility methods. MIC₅₀ and MIC₉₀ were calculated for all tested antibiotics.

As described in CLSI, for gentamicin, polymyxin B, colistin, meropenem and imipenem, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 25922 were used as quality control to the disk diffusion and broth microdilution tests. For tigecycline, the bacteria used were *E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC29213 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and for ertapenem *P. aeruginosa* ATCC 27853 and *E. faecalis* ATCC 29212.

There is no standardization, by CLSI, for colistin and polymyxin by disk diffusion test, only for broth microdilution. Therefore, standard breakpoints for *P. aeruginosa* were used.

2.3.3 AGAR DILUTION

The susceptibility to fosfomycin (Sigma) was tested by agar dilution method, according to CLSI 2011 guideline. The control strains used in this test were *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 13883.

2.3.4 AGREEMENT BETWEEN DISK DIFFUSION AND BROTH MICRODILUTION

Errors were ranked as follows: very major error, false-susceptible result by the disk diffusion test; major error, false-resistant result produced by the disk diffusion test; and minor error, intermediate result by disk diffusion method and a resistant or susceptible category for the reference method (microdilution test). Unacceptable levels are $\geq 1.5\%$ for very major errors, $\geq 3\%$ for major errors and 10% for minor errors as recommended in CLSI document M23-A2.

3 RESULTS

A total of 54 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates obtained from hospitalized patients were studied. The bacterial isolates were collected mainly from patients diagnosed with urinary infection tract (35,2%), lower respiratory tract (35,2%), bloodstream and catheter (14,8%), skin and soft tissue (11,1%), abdominal and peritoneal infections (3,7%). All samples were positive for the Hodge test and confirmed the presence of the enzyme KPC by PCR technique.

Antimicrobial activity of the tested agents and the susceptibility profile of KPC-producing *K. pneumoniae* are shown in Table 1. When the isolates were evaluated by microdilution, all were resistant to ertapenem, meropenem and imipenem. And 35,2% of isolates remained susceptible to gentamicin, 85,2% to polymyxin, 87% to colistin and 98,1% to tigecycline. Fosfomycin had only one resistant strain, by agar dilution, with 98,1% of susceptibility .

The MIC₅₀ and MIC₉₀ for eight antimicrobial agents studied are shown in Table 1. The isolates exhibited high MIC₉₀ to ertapenem (MIC₉₀ >128 µg/mL), meropenem and imipenem (MIC₉₀ 64 µg/mL), polymixyn B and colistin (MIC₉₀ 32µg/mL) and tigecycline (MIC₉₀ 2 µg/mL). The intermediate (MIC₉₀ 4 µg/mL) results for tigecycline were confirmed by Etest strips (Biomeri ux). Fosfomycin MIC₅₀ and MIC₉₀ were 4 µg/mL and 32 µg/mL, respectively.

Table 1 - Activity of seven antimicrobial agents against 54 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates obtained from patients hospitalized during the period of July 2009 to July 2010.

Agent	MIC ₅₀	MIC ₉₀	% Susceptibility	
			Disc diffusion	Minimal Inhibitory Concentration
Gentamicin	16	>64	35,2	35,2
Tigecycline	0,5	1	98,1	98,1
Imipenem	16	64	0	0
Meropenem	32	64	0	0
Ertapenem	32	>128	0	0
Polymyxin B	1	32	96,3	85,2
Colistin	0,5	32	90,7	87,0
Fosfomycin	4	32	----	98,1

The results obtained in agreement tests between disk diffusion and broth microdilution, are shown in Table 2. Gentamicin was the antibiotic with the highest number of discrepancies. Very major error, false-susceptible result by the disk diffusion test was detected in four (7,4%) isolates. Major error, false-resistant result produced by the disk diffusion test in seven (12,9%) isolates. Also, polymyxin B and colistin had very major error, six (11,1%) and two (3,7%) isolates, respectively. Major error was found with one isolate (1,85%) for tigecycline, and a minor error was observed with imipenem (1,85%).

Table 2 - Microdilution and disk diffusion discrepancy rates for seven antimicrobial agents studied in 54 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates obtained from patients hospitalized over a one-year period.

Antimicrobial agents	No. (%) of discrepancies		
	Very major error	Major error	Minor error
Gentamicin	4 (7,4%)	7 (12,9%)	-
Tigecycline	-	1 (1,85%)	-
Imipenem	-	-	1 (1,85%)
Meropenem	-	-	-
Ertapenem	-	-	-
Polymyxin B	6 (11,1%)	-	-
Colistin	2 (3,7%)	-	-
Fosfomycin	-	-	-

As seen in figure 1, seven samples had colistin MIC \geq 4 μ g/mL. Figure 2 shows breakpoints and zone diameter obtained for polymyxin and eight isolates were considered resistant using MIC \geq 4 μ g/mL. Figure 3 shows breakpoints and zone diameter obtained for tigecycline and only one isolate was considered resistant using MIC \geq 4 μ g/mL. The figure 4 shows the distribution of MIC and DD evaluated when the clinical isolates were tested for gentamicin.

Figure 1 - Comparative results between broth microdilution MICs and 10 µg disk zone diameters for colistin tested against 54 KPC producing *K. pneumoniae* isolates. The line represents the breakpoint value for colistin by microdilution method.

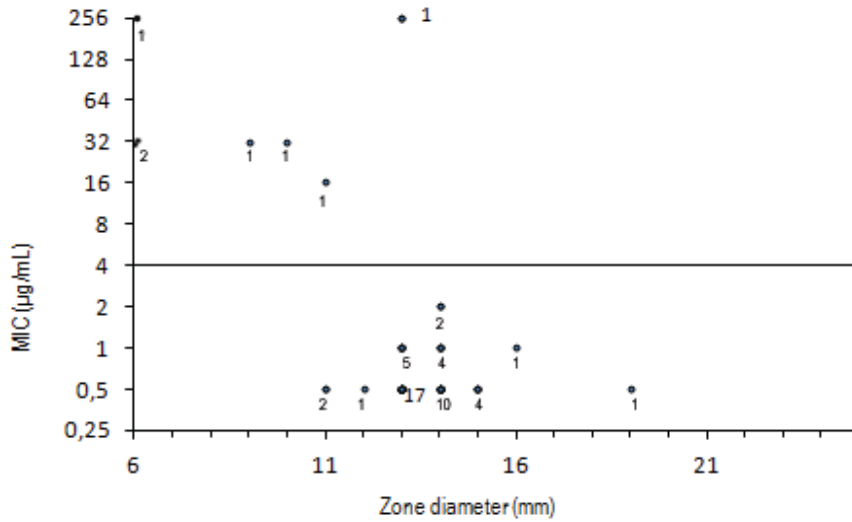


Figure 2 - Comparative results between broth microdilution MICs and 300U disk zone diameters for polymyxin B tested against 54 KPC producing *K. pneumoniae* isolates. The line represents the breakpoint value for polymyxin B by microdilution method.

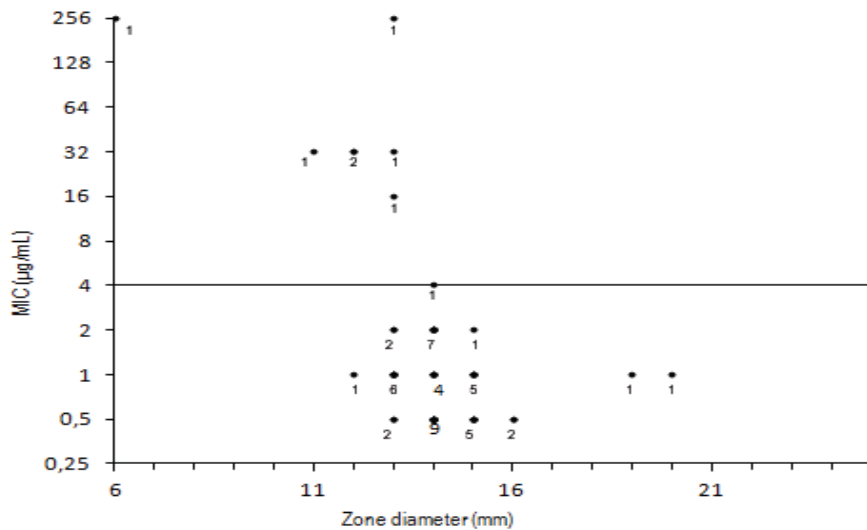


Figure 3 - Comparative results between broth microdilution MIC and 15 µg disk zone diameters for tigecycline tested against 54 KPC producing *K. pneumoniae* isolates. The horizontal line represents the breakpoint value for tigecycline by microdilution method and vertical zone diameter for disk diffusion.

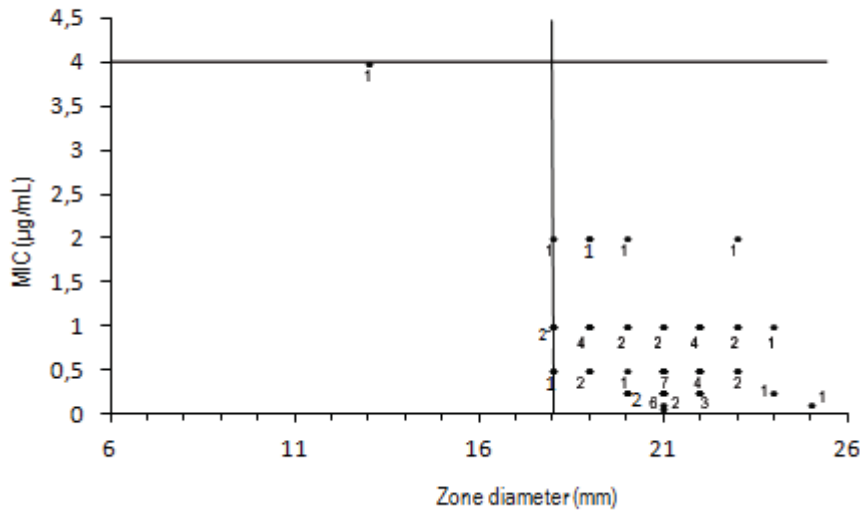
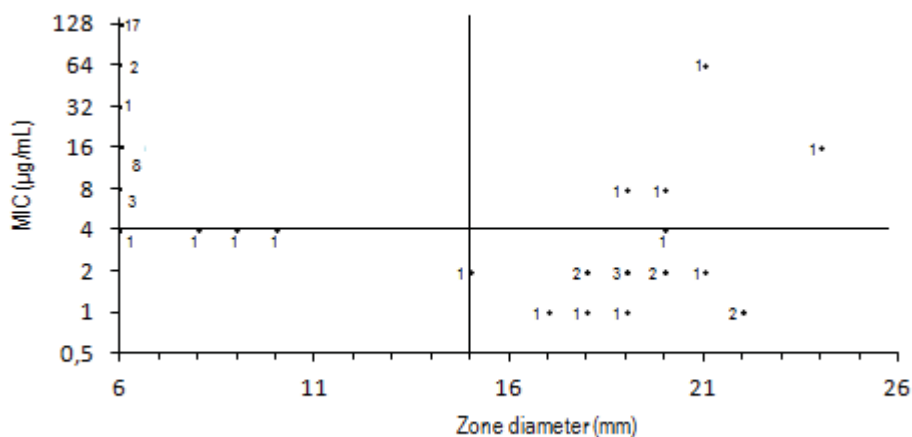


Figure 4 - Comparative results between broth microdilution MIC and 10 µg disk zone diameters for gentamicin tested against 54 KPC producing *K. pneumoniae* isolates. The horizontal line represents the breakpoint value for gentamicin by microdilution method and vertical zone diameter for disk diffusion.



4 DISCUSSION

The spread of carbapenem-resistant pathogens is of great concern, and controlling of the infections presents a serious clinical challenge in hospitals (CHEN et al., 2011). In a recent epidemiologic study (GASINK et al., 2009), infections due to KPC-producing *K. pneumoniae* were associated with significantly higher mortality than infections by carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* (32.1% versus 9.9%) (PANKEY; ASHCRAFT, 2011; PEREZ et al., 2010).

In vitro testing suggests that around 50% of KPC-producing *K. pneumoniae* isolates remain susceptible to aminoglycosides, 33% to 66% demonstrate susceptibility to doxycycline, and 90% are susceptible to polymyxins and colistin (polymyxin E) (MOELLERING et al., 2007). Susceptibility rates in this study (by microdilution) were as follows: 35.2% of isolates remained susceptible to gentamicin, 85.2% susceptible to polymyxin B and 87% to colistin. According to Vaara et al (2010), most of the research on acquired polymyxin resistance has been conducted using well-characterized mutants constructed in the laboratory. Colistin-resistant *K. pneumoniae* mutants have occasionally been encountered during therapy or during the course of a hospital outbreak, but the underlying molecular mechanisms have not been studied.

When testing the *Klebsiella spp.*, tigecycline (MIC₅₀, 0.25 µg/mL and MIC₉₀, 1 µg/mL) susceptibility rates varied from 99.4% in 2006 and 2007 to 97.0% in 2009 (SADER; FARRELL; JONES, 2011). Our results showed susceptibility of 98.1% to tigecycline, in isolates from 2010. The values of MIC₅₀ and MIC₉₀ were 0.5 µg/mL and 1 µg/mL, respectively. In the present study we found that tigecycline had good activity against *Klebsiella spp.* (MIC₉₀ ≤ 1 µg/ml). The determination of MIC is requisite to detect antibiotic-resistant strains. The dilution methods remain as the gold standard, but they are difficult to perform as routine tests in many clinical laboratories. In concordance with many authors and the Eucast group, we obtained good concordance between agar dilution and broth microdilution (BEHERA et al., 2010; LO-TEN-FOE et al., 2007; TAN; NG, 2006a, 2006b). Only one strain was not susceptible to fosfomicin, generating a high sensibility rate in this study for this drug. Michalopoulos et al (2011) examined the effectiveness and safety of fosfomicin in critically ill patients suffering from ICU-acquired infections due to carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. The authors concluded that fosfomicin may be considered

an alternative for the treatment of urinary infections tract due to carbapenem-resistant *K. pneumoniae* in adult patients, especially in combination with other antibiotics. As our study includes many urinary isolates, the use of fosfomycin could have obtained good results.

When commercial systems are used, the manufacturer's recommendations concerning storage, inoculation, incubation, and interpretations should be followed precisely. The error rate for these systems has to be determined by comparison with the reference CLSI broth dilution method using several single genus or species. The detection rate for very major errors (false susceptibility) should be less than 1.5% and major errors (false resistance) less than 3% (JOYCE; WOODS, 2004). Our studies showed 100% agreement between the DD and BMD to meropenem and ertapenem. However, very major error rates were found to gentamicin (7,4%), polymyxin B (11,1%) and colistin (3,7%). An unacceptably high rate of very major errors ranging from 5 to 11% has been reported in several studies (GALANI et al., 2008; LO-TEN-FOE et al., 2007; TAN; NG, 2006a, 2006b). Maalej et al. (2011) also found unacceptably high rates of very major errors (false-susceptible result by the disk diffusion test) with colistin. Leal Castro et al. (2010), evaluated *Enterobacteriaceae*, among them, *K. pneumoniae*, by the disk diffusion test with three different Mueller-Hinton agar brands, and the Vitek 2 automated system in comparison with the standard broth microdilution method. The authors concluded that Becton Dickinson agar had the lowest rate of minor (32.5%) and major errors (3.8%). No very major errors were found.

In order to identify this resistance mechanism, the laboratories should be prepared and aware of the methodology mistakes. The choice of methodology to be used in private laboratories is usually based on financial and labor resources and the volume of tests to be performed. Variables to be considered include relative ease of performance, cost of equipment and contract arrangements, cost of media and supplemental materials, flexibility in selection of drugs for testing, use of automated or semi automated devices to facilitate testing, and the perceived accuracy of the methodology (JOYCE; WOODS, 2004). Disk diffusion method is one of the most frequently used techniques in microbiology laboratories. However, the high rates of errors with some antimicrobial agents of this study demonstrate that the disk diffusion method isn't reliable compared to the broth microdilution method, once this last one is considered the gold standard by CLSI.

REFERENCES

- BEHERA, B.; MATHUR, P.; DAS, A.; KAPIL, A.; GUPTA, B.; BHOI, S.; FAROOQUE, K.; SHARMA, V.; MISRA, M.C. Evaluation of susceptibility testing methods for polymyxin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 596-601, 2010.
- BRADFORD, P.A. ; BRATU, S. ; URBAN, C. ; VISALLI, M. ; MARIANO, N. ; LANDMAN, D. ; RAHAL, J.J. ; BROOKS, S. ; CEBULAR, S. ; QUALE, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the Class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York city. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p.55–60, 2004.
- BRATU, S.; LANDMAN, D.; HAAG, R.; RECCO, R.; ERAMO, A.; ALAM, M.; QUALE, J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Archives of Internal Medicine**, v. 165, p. 1430-1435, 2005.
- BRATU, S.; TOLANEY, P.; KARUMUDI, U.; QUALE, J.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; LANDMAN, D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, p. 128-132, 2005a.
- BRATU, S.; MOOTY, M.; NICHANI, S.; LANDMAN, D.; GULLANS, C.; PETTINATO, B.; KARUMUDI, U.; TOLANEY, P.; QUALE, J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 3018-3020, 2005b.
- BULIK, C. C.; QUINTILIANI, R.; POPE, J.S.; KUTI, J.L.; NICOLAU, D.P. Pharmacodynamics and tolerability of high-dose, prolonged infusion carbapenems in adults with cystic fibrosis: a review of 3 cases. **Respiratory Medicine CME**, v. 3, p. 146-149, 2010.
- CASTANHEIRA, M.; SADER, H.S.; DESHPANDE, L.M.; FRITSCH, T.R.; JONES, R.N. 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, p. 570-573, 2008.
- CHEN, L. F.; KAYE, D. Current use for old antibacterial agents: polymyxins, rifamycins, and aminoglycosides. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 23, p. 1053-1075, 2009.
- CHEN, S.; HU, F.; LIU, Y.; ZHU, D.; WANG, H.; ZHANG, Y. Detection and spread of carbapenem-resistant *Citrobacter freundii* in a teaching hospital in China. **American Journal of Infection Control**, v. 39, p. 55-60, 2011.
- CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M.V.; WISELL, K.T.; CARMELI, Y.; GALES, A.C.; VENEZIA, S.N.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of

Klebsiella pneumoniae that produce beta-lactamase *bla*_{KPC-2} gene. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1349-1356, 2010.

ELEMAM, A.; RAHIMIAN, J.; DOYMAZ, M. In vitro evaluation of antibiotic synergy for polymyxin B-resistant carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, p. 3558-3562, 2010.

GALANI, I.; KONTOPIDOU, F.; SOULI, M.; REKATSINA, P.D.; KORATZANIS, E.; DELIOLANIS, J.; GIAMARELLOU, H. Colistin susceptibility testing by Etest and disk diffusion methods. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, p. 434–439, 2008.

GASINK, L. B.; EDELSTEIN, P.H.; LAUTENBACH, E.; SYNNESTVEDT, M.; FISHMAN, N.O. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 30, p. 1180-1185, 2009.

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, p. 1119-1125, 2010.

JOYCE, M.; WOODS, C. W. Antibacterial susceptibility testing in the clinical laboratory. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 18, p. 401–434, 2004.

KONTOPOULOU, K.; PROTONOTARIOU, E.; VASILAKOS, K.; KRITI, M.; KOTELI, A.; ANTONIADOU, E.; SOFIANOU, D. Hospital outbreak caused by *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-2 beta-lactamase resistant to colistin. **Journal of Hospital Infection**, v. 76, p. 70-73, 2010.

KUTI, J. L.; MOSS, K.M.; NICOLAU, D.P.; KNAUFT, R.F. Empiric treatment of multidrug-resistant *Burkholderia cepacia* lung exacerbation in a patient with cystic fibrosis: application of pharmacodynamic concepts to meropenem therapy. **Pharmacotherapy**, v. 24, p. 1641–1645, 2004.

LE, J.; MCKEE, B.; SRISUPHA-OLARN, W.; BURGESS, D.S. In vitro activity of carbapenems alone and in combination with amikacin against KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Medicine Research**, v. 3, p. 106-110, 2011.

LEAL CASTRO, A L.; BUITRAGO GUTIERREZ, G.; OVALLE, V.; CORTES, J. A.; ALVAREZ, C. A. Comparing in vitro activity of tigecycline by using the disk diffusion test, the manual microdilution method, and the VITEK 2 automated system. **Revista Argentina de microbiología**, v. 42, p. 208-211, 2010.

LEE, J.; PATEL, G.; HUPRIKAR, S.; CALFEE, D.P.; JENKINS, S.G. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, p. 1611-1612, 2009.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 7, p. 88-91, 2001.

LO-TEN-FOE, J. R.; DE SMET, A.M.; DIEDEREN, B.M.; KLUYTMANS, J.A.; VAN KEULEN, P.H. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, Etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, p. 3726–3730, 2007.

MAALEJ, S. M.; MEZIOU, M.R.; RHIMI, F.M.; HAMMAMI, A. Comparison of disc diffusion, Etest and agar dilution for susceptibility testing of colistin against *Enterobacteriaceae*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, p. 546-551, 2011.

MICHALOPOULOS, A.S., LIVADITIS, I.G., GOUGOUTAS, V. The revival of fosfomycin. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, p. 732–739, 2011.

MOELLERING, R. C.; GRAYBILL, J.R.; MCGOWAN, J.E.; COREY, L. Antimicrobial resistance prevention initiative - an update: proceedings of an expert panel on resistance. **The American Journal of Medicine**, v. 120, p. 4-25, 2007.

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

NICASIO, A. M.; EAGYE, K.J.; NICOLAU, D.P.; SHORE, E.; PALTER, M.; PEPE, J.; KUTI, J.L. Pharmacodynamic-based clinical pathway for empiric antibiotic choice in patients with ventilator-associated pneumonia. **Journal of Critical Care**, v. 25, p. 69–77, 2010.

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

PANKEY, G. A.; ASHCRAFT, D. S. Detection of synergy using the combination of polymyxin B with either meropenem or rifampin against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 70, p. 561-564, 2011.

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

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; RAY, A.J.; DECKER, B.K.; WALLACE, C.J.; HUJER, K.M.; ECKER, D.J.; ADAMS, M.D.; TOLTZIS, P.; DUL, M.J.; WINDAU, A.; BAJAKSOUZIAN, S.; JACOBS, M.R.; SALATA, R.A.; BONOMO, R.A. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p. 1807-1818, 2010.

PILLAI, S. K.; MOELLERING, R. C.; ELIOPOULOS, G. M. Antimicrobial combinations. In: WILLIAMS, L.; WILKINS. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. 5. ed. Philadelphia: Ed. Philadelphia, 2005. p. 365-440.

POURNARAS, S.; PROTONOTARIOU, E.; VOULGARI, E.; KRISTO, I.; DIMITROULIA, E.; VITTI, D.; TSALIDOU, M.; MANIATIS, A.N.; TSAKRIS, A.; SOFIANOU, D. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 348-352, 2009.

SADER, H. S.; FARRELL, D. J.; JONES, R. N. Tigecycline activity tested against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter spp.* isolated in US medical centers (2005–2009). **Diagnostic Microbiology & Infectious Disease**, v. 69, p. 223-227, 2011.

TAN, T. Y.; NG, L. S. Y. Comparison of three standardized disc susceptibility testing methods for colistin. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 58, n. 4, p. 864–867, out. 2006a.

TAN, T. Y.; NG, L. S. Y. The in-vitro activity of colistin in gram-negative bacteria. **Singapore Medical Journal**, v. 47, n. 7, p. 621–624, jul. 2006b.

TSAKRIS, A.; KRISTO, I.; POULOU, A.; MARKOU, F.; IKONOMIDIS, A.; Pournaras, S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p. 1257-1260, 2008.

TSAKRIS, A., POULOU, A.; Pournaras, S.; VOULGARI, E.; VRIONI, G.; THEMELI-DIGALAKI, K.; PETROPOULOU, D.; SOFIANOU, D. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, p. 1664–71, 2010.

VAARA, M. Polymyxins and their novel derivatives. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 5, p. 574-581, 2010.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, p. 1151-1161, 2001.

CONCLUSÕES

1. Embora todos os isolados clínicos estudados tenham apresentado resistência total aos carbapenêmicos, as altas taxas de sensibilidade obtidas para polimixina B, colistina, tigeciclina e fosfomicina sugerem que estes fármacos constituem opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por *K. pneumoniae* produtoras de KPC;
2. A alta taxa de erros maiores obtidos quando o teste de disco-difusão foi comparado com a técnica de microdiluição em caldo para avaliar a sensibilidade a gentamicina, polimixina B, colistina e tigeciclina, demonstra que o primeiro método deve ser utilizado com cautela nos laboratórios de microbiologia clínica;
3. A presença do gene *bla*_{KPC-2} em todos os isolados produtores de carbapenemases, enfatizam a importância deste mecanismo na manutenção da resistência aos carbapenêmicos entre os isolados de *K. pneumoniae* no HU-UJEL;
4. A obtenção de diferentes clones entre isolados produtores de KPC-2 recuperados de pacientes internados em diferentes unidades hospitalares demonstra a facilidade de disseminação deste mecanismo de resistência no hospital estudado, enfatizando a necessidade de reforço nas medidas de controle de infecção, principalmente na utilização racional dos carbapenêmicos nesta instituição;
5. A hospitalização prolongada, a idade acima de 60 anos, uso de ventilação mecânica, acometimento por doença cardíaca e/ou circulatória, terapia com colistina e/ou carbapenêmicos até um mês antes da cultura são fatores de risco para a aquisição e/ou óbito relacionados a infecções por *K. pneumoniae* produtora de KPC.