

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A
CARBAPENÊMICOS**

KESIA ESTHER DA SILVA

**DOURADOS MS
2014**

KESIA ESTHER DA SILVA

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ENTEROBACTERIAS RESISTENTES A
CARBAPENÊMICOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Dra. Simone Simionatto

Co-orientadora: Dra. Ana Cristina Gales

DOURADOS MS

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

S586e	Silva, Kesia Esther. Epidemiologia molecular de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos. / Kesia Esther da Silva. – Dourados, MS : UFGD, 2014. 105f. Orientador: Prof. Dr. Levi Marques Pereira. Dissertação (Pós-Graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados. 1. Tipagem Molecular. 2. Enterobactérias. 3. Carbapenemases. I. Título. CDD – 574.872
-------	---

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.

DEDICATORIA

Dedico este trabalho aos meus pais, **Sueli e Osiris**, por toda dedicação, apoio, incentivo e amor incondicional que me proporcionaram. Eles que serão para sempre presença constante em minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, por me permitir momentos tão especiais e me manter de pé frente a cada dificuldade me mostrando sempre o caminho certo a seguir.

Aos meus pais Sueli e Osiris que nunca mediram esforços para me dar a melhor criação que lhes era possível. Por me ensinarem a ser forte e por acreditarem sempre no meu potencial. A vocês serei eternamente grata e deverei todas as minhas vitórias.

Aos meus irmãos, Bruno e Helder pela amizade companheirismo e carinho. Obrigada por acreditarem sempre em mim, são as pessoas mais importantes no mundo pra mim. A minha tia Silvia e prima Karol por me mostrar novamente como é bom estar em família. Sinto-me muito feliz por ter vocês na minha vida.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Simone Simionatto, muito obrigada pela excelente orientação, pelos ensinamentos, paciência e amizade. Obrigada por entender minhas limitações e me incentivar a superá-las. Muito obrigada por ter sido sempre tão presente, por confiar em mim e por me proporcionar diversas oportunidades de crescimento profissional.

Aos professores Júlio Henrique Rosa Croda e Fabio Juliano Negrão pela ajuda e apoio em todos os momentos necessários. Obrigada por toda a atenção, por todos os ensinamentos e constantes conselhos científicos.

Ao Laboratório ALERTA, especialmente a Dr^a Ana Cristina Gales, ao Dr. Rodrigo Cayô e a Dra. Cecília Godoy Carvalhaes, que contribuíram imensamente no meu trabalho. Obrigada por me ensinarem tanto e por me possibilitarem conhecer e trabalhar com pessoas incríveis.

Aos meus grandes amigos e amigas, Malisa, Ana Paula, Edilaine, Suzana, David, Fernando e Luís Fernando que estão comigo desde a graduação. Muito obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e principalmente pela amizade e risadas nesses quase sete anos de convívio. Vocês foram essenciais nessa etapa da minha vida do começo ao fim. Podem ter certeza que eu amo mais que Bacon.

As minhas colegas e amigas de LPCS Lujan, Flora e Mari. Obrigada por toda ajuda, incentivo e sincera amizade. Por todos os momentos de alegria que compartilhamos nesses dois anos.

Aos amigos que fiz no mestrado Laís, Chaiane, Cibela, Regi, Thiago, Nani e Élen. Obrigada pelas conversas e risadas, vocês me proporcionaram muitos momentos alegres. Aos colegas da Armada SS vocês são com certeza o melhor grupo de pesquisa.

Aos amigos que fiz no Laboratório Alerta Fernanda, Will, Talita e Grazi. Muito obrigada por me receberem tão bem, por me ajudarem e me ensinarem o máximo que puderam. Obrigada pelos cafés da manhã e pela companhia nos domingos e feriados no laboratório.

Aos amigos que fiz em São Paulo Lorena, Mariana e Niltinho. Muito obrigada pelas aventuras na Paulicéia Desvairada. Vocês me deram muita força no tempo que estive aí. Pelas madrugadas, os brigadeiros, as coreografias do é o tchan e principalmente por toda fuleragem em Vila Madalena. Vocês foram meu suporte durante o tempo que fiquei aí.

A Universidade Federal da Grande Dourados e ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde.

À CAPES, pela bolsa de mestrado concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram para elaboração desse trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“A coisa mais indispensável a um homem é reconhecer o
uso que deve fazer do seu próprio conhecimento.”

(Platão)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Infecção Hospitalar	19
2.2 Enterobactérias.....	19
2.3 Resistência bacteriana em enterobactérias	21
2.4 Produção de β-lactamases.....	25
2.4.1 β-lactamases do tipo AmpC	29
2.4.2 β-lactamases de Espectro Limitado e Ampliado (ESBLs)	29
2.4.3 Carbapenemases de Classe A	31
2.4.4 Carbapenemases de classe B ou metalo-β-lactamases (MBLS).....	32
2.4.5 Carbapenemases de classe D ou oxacilinases	35
2.5 Contexto genético de aquisição e disseminação de genes de resistência.....	36
2.6 Epidemiologia Molecular	40
2.7 Conclusão	42
3. OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo Geral	43
3.2 Objetivos Específicos.....	43
4. ARTIGO 1.....	44
5. ARTIGO 2.....	71
6. CONCLUSÕES DO ESTUDO.....	92
7. ANEXOS	Erro! Indicador não definido.106

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AmpC – Cefalosporinase cromossomal

ATCC – *American Type Culture Collection*

attI – Sítio de recombinação específica

CDC – *Center for Diseases Control and Prevention*

CLSI – *Clinical Laboratory Standards Institute*

CTX-M - Cefotaximase

EDTA – Ácido Etileno-Diamino-Tetracético

ESBL – β -lactamase de espectro estendido

G - Guanina

GES - *Guiana extended spectrum*

GIM - *German imipenemase*

HU – Hospital Universitário

IMP – *Imipenemase*

IEF - Focalização Isoelétrica

IntI - Integrase

KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*

MALDI-TOF-MS - *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight*

MBL – Metallo- β -lactamase

MHT – Teste Modificado de Hodge

MIC – Concentração Inibitória Mínima

MLST – *Multi Locus Sequence Typing*

NDM - *New Delhi metallo- β -lactamase*

NMC - *Not metalloenzyme carbapenemase*

OMP – Proteínas de membrana externa
OXA - Oxacilinase
PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE – *Pulsed Field Gel Electrophoresis*
Phe - Fenilamina
PBP – Proteínas ligadoras de penicilina
SENTRY – *Antimicrobial Surveillance Program*
SIM - *Seul imipenemase*
SME – *Serratia marcescens* enzyme
SPM - *São Paulo metallo-β-lactamase*
ST – *Sequence Type*
T – Timina
UTI – Unidade de Terapia Intensiva
Val - Valina
VIM - *Verona imipenemase*
Zn⁺² – Zinco

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos principais grupos de antimicrobianos β -lactâmicos.....	18
Figura 2. Desenho esquemático dos principais mecanismos de resistência bacteriana.....	19
Figura 3. Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1 (Figura 3A), e como ocorre a aquisição de cassetes gênicos de resistência (Figura 3B). <i>Intl 1</i> : gene codificador da integrase; <i>attI</i> : sítio de recombinação específica; P_I : promotor responsável pela expressão da integrase; P_c : promotor responsável pela transcrição dos genes cassetes; <i>attC</i> : sítio de recombinação dos cassetes gênicos.....	34

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Porinas relacionadas com a resistência a antibióticos nas principais bactérias Gram-negativas.....	20
Tabela 2. Classificação funcional e molecular dos principais grupos de β -lactamases.....	23

RESUMO

Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases continuam a ser a principal causa de resistência a antibióticos β -lactâmicos e, potencialmente, um grave problema de saúde global. Este estudo foi realizado para avaliar a susceptibilidade antimicrobiana e a epidemiologia molecular de cepas de *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.* resistentes a carbapenêmicos isoladas de um hospital público de Dourados/MS. Durante Maio/2011 a Maio/2013, foram isoladas 30 cepas de *Serratia marcescens* e 68 cepas de *Klebsiella pneumoniae* com perfil de resistência ou intermediário às cefalosporinas de terceira geração. A identificação das espécies foi realizada com o sistema automatizado Vitek-2 e confirmado pelo sistema *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry* (MALDI-TOF MS). Todas as cepas apresentaram resistências à carbapenêmicos pela técnica de concentração inibitória mínima (CIM). A produção de carbapenemases pelo Teste Modificado de Hodge (MHT) foi detectada em 67 cepas de *K. pneumoniae* e 24 de *S. marcescens*. No entanto, a hidrólise de carbapenêmicos por MALDI-TOF MS foi detectada em 57 de *K. pneumoniae* e em 24 de *S. marcescens*. O gene *bla*_{KPC-2} foi identificado em 24 *S. marcescens* resistentes a carbapenêmicos e, entre elas o gene *bla*_{IMP-10} foi também observado em seis cepas. A presença dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foi evidenciada em seis cepas de *S. marcescens* negativas para o *bla*_{KPC-2}. Os experimentos de conjugação e hibridação mostraram que o gene *bla*_{KPC-2} estava inserido em plasmídeos conjugativos, enquanto o gene *bla*_{IMP-10} estava inserido em um integron de classe 1, com a presença de dois genes inseridos em cassetes, *aac(6')-IIc* e *aad1*. Todas as cepas de *S. marcescens* produtoras de KPC mostraram similaridade genética pelo PFGE. A amplificação por PCR e o sequenciamento mostrou que o gene *bla*_{KPC-2} estava presente em 57 *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos. O gene *bla*_{KPC-2} não foi encontrado em 11 cepas, porém foi observada a presença dos genes *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8 like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{SHV-like} e alteração das proteínas OmpK35 e OmpK36. As *K. pneumoniae* produtoras de KPC demonstraram alta similaridade genética na análise pelo PFGE. Para identificar os fatores de risco para *K. pneumoniae* produtora de KPC, foi realizado um estudo caso-controle com 94 patients (47 casos e 47 controles). Na análise multivariada, tempo de internação prolongado, cirurgia prévia, ventilação mecânica, cateter venoso central e cateter urinário, foram associados com *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Os resultados indicam a disseminação de Enterobactérias produtoras de beta-lactamases em um hospital público de Dourados/Mato

Grosso do Sul e a primeira descrição de cepas de *S. marcescens* co-produtoras de KPC-2 e IMP-10. Portanto, compreender a extensão do reservatório nas unidades de saúde pode ser importante para a intervenção direcionada e redução das infecções hospitalares.

ABSTRACT

Enterobacteriaceae producing β -lactamases extended spectrum (ESBL) and carbapenemases continue to be the leading cause of resistance to β -lactam antibiotics and, potentially a major global health problem. This study was carried out to assess antimicrobial susceptibilities and molecular epidemiology of β -lactamases-producing *Serratia sp.* and *Klebsiella sp.* strains isolated in a public hospital in Dourados/MS. During May/2011 to May/2013, 30 *Serratia marcescens* and 68 *Klebsiella pneumoniae* strains with resistance or intermediate profile to third-generation cephalosporins were recovered. Species identification was performed with Vitek-2 automatized system and confirmed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). All strains showed resistances to carbapenem by minimum inhibitory concentration (MIC). Carbapenemase production by Modified Hodge Test (MHT) was detected in 67 *K. pneumoniae* and 24 *S. marcescens* strains. However, carbapenem hydrolysis by MALDI-TOF MS was detected in 57 *K. pneumoniae* and 24 *S. marcescens*. The *bla*_{KPC-2} gene was present in 24 carbapenem-resistant *S. marcescens* and among them the *bla*_{IMP-10} gene was also observed in six strains. The presence of *bla*_{TEM-like} and *bla*_{SHV-like} genes was evidenced in six *S. marcescens* negative to *bla*_{KPC-2}. The conjugation experiments and hybridization showed that *bla*_{KPC-2} gene was inserted into conjugative plasmids while *bla*_{IMP-10} gene, was inserted into a class 1 integron with the presence of two inserted gene cassette, *aac(6')-IIc* and *aad1*. All KPC-producing *S. marcescens* strains showed the same PFGE patters. PCR amplification and sequencing showed that the *bla*_{KPC-2} gene was present in 57 carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. The *bla*_{KPC-2} gene was not found in 11 strains. However, the presence of *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8} like, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{SHV-like} genes and altered OmpK35 and OmpK36 proteins, were observed. The KPC-producing *K. pneumoniae* showed high genetic similarity in PFGE analysis. To identify risk factors for KPC-producing *K. pneumoniae*, a case-control study was conducted with 94 patients (47 cases and 47 controls). Longer hospitalizations, previous surgery, use of mechanical ventilation, central venous catheter and urinary catheter were associated with KPC-producing *K. pneumoniae* in the multivariable analysis. The results indicate the spread of β -lactamases-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Dourados Mato Grosso do Sul and the first report of KPC-2 and IMP-10 co-producing *S. marcescens* strains. Therefore, understanding the extent of the reservoir in healthcare facilities may be important for targeted intervention and reduction of hospital infections.

INTRODUÇÃO

Cerca de 720.000 pessoas contraem algum tipo de infecção em hospitais brasileiros por ano e 20% destas evoluem para o óbito. Essas infecções podem ser atribuídas principalmente às condições do ambiente hospitalar em que o paciente está exposto, as quais podem se manifestar durante a internação ou após a alta, acometendo mais de 15% dos pacientes que são internados (MARTINS et al., 2008; SOUZA et al., 2009; OLIVEIRA, et al., 2010).

O custo com internação de um paciente com infecção hospitalar pode chegar a ser três vezes maior do que de um paciente sem infecção (MOTA, et al., 2013). As taxas de infecção no Brasil permanecem elevadas e continuam crescendo, sendo que a maior incidência ocorre em hospitais de ensino, provavelmente devido à variedade de doenças que são tratadas nestes hospitais, à realização de procedimentos cirúrgicos e invasivos de alta complexidade, a longos períodos de internação e ao contato dos pacientes com diversos profissionais da saúde. As altas taxas de infecção nessas instituições se devem também ao fato que nesses hospitais há um número elevado de pessoas, incluindo internos e residentes em treinamento, exercendo diversas atividades e que muitas vezes não cumprem as medidas de higiene adequadamente. Esses hospitais recebem ainda financiamento do Sistema único de Saúde (SUS), o que dificulta o investimento em projetos que visam a elaboração de medidas de controle de infecção, conforme determinam os órgãos de vigilância em saúde (TENKE; KOVES; JOHANSEN, 2014). Neste contexto, torna-se pertinente a realização de estudos que determinem a prevalência das infecções em ambientes hospitalares, visando identificar fatores relacionados ao surgimento destas em pacientes em situação crítica (GOÇMEZ, et al., 2013; ONCUL, et al., 2013).

As enterobactérias são microrganismos que habitam a flora intestinal e estão entre os patógenos mais comuns em humanos causando vários tipos de infecções, e consequentemente responsáveis por um número significativo de mortes, principalmente por acometerem indivíduos em ambiente hospitalar, adquirindo assim a capacidade de se disseminar facilmente (NORDMAN; NAAS; POIREL, 2011). No Brasil, segundo dados da ANVISA (2014), as enterobactérias causam grande número de infecções de corrente sanguínea em UTIs, entre os patógenos *Klebsiella pneumoniae* (12,4%), *Escherichia coli* (5,9%), *Enterobacter spp.* (4,9%), *Serratia spp.* (2,9%) e outras enterobactérias (5,1%). O aumento da resistência antimicrobiana em bactérias responsáveis por infecções hospitalares é um grande

desafio à Saúde Pública e um problema de grandes proporções para o tratamento de pacientes imunodeprimidos ou em unidades de terapia intensiva (UTI) (POIREL, et al., 2007).

As betalactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas que conferem resistência a várias classes de antibióticos, dentre eles cefalosporinas e penicilinas. Por conta disso, os carbapenêmicos foram por muito tempo considerados medicamentos de escolha na terapia contra infecções causadas por microrganismos gram-negativos devido a sua estabilidade (QUEENAN; BUSH, 2007). Porém, o aumento significativo do uso terapêutico dos carbapenêmicos associado à exposição a outros medicamentos e a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar, resultou em um crescente número de enterobactérias resistentes a esses compostos (YIGIT et al., 2001).

Vários mecanismos podem contribuir para a resistência a essa classe de antibióticos, como a impermeabilidade da membrana externa, a hiper-expressão de bombas de efluxo, porém, a produção de carbapenemases é considerada o mecanismo de resistência mais importante. Os genes responsáveis pela produção das carbapenemases encontram-se inseridos em estruturas genéticas móveis como plasmídeos e transposons (LLEDO et al., 2009).

O primeiro relato de uma bactéria produtora de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases ocorreu nos Estados Unidos da América (EUA) em 2001, no estado da Carolina do Norte, onde uma cepa de *Klebsiella pneumoniae* manifestou resistência aos carbapenêmicos imipenem e meropenem, e a cefalosporinas de espectro estendido, penicilinas e alguns beta-lactâmicos. Foi concluído que o isolado apresentava a capacidade de produzir um novo tipo de enzima da classe das carbapenemases (YIGIT, et al., 2001). A partir daí a detecção de *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) começou a ocorrer em diversas partes do mundo, e durante uma década a sua presença deixou de ser restrita apenas a costa Leste dos Estados Unidos e passou a ser observada na Ásia, Europa e América do Sul (DIENSTMANN, et al., 2010).

No Brasil o primeiro relato de KPC ocorreu em 2009, em uma UTI de um hospital de Recife, onde cepas de *K. pneumoniae* apresentaram um padrão de resistência a carbapenêmicos e cefalosporinas de amplo espectro (MONTEIRO, et al., 2009). Com o surgimento de vários surtos de enterobactérias produtoras de KPC, esta passou a compor um importante mecanismo de resistência no contexto de infecção hospitalar mundial e a sua pesquisa um fator relevante a fim de restringir sua disseminação, contribuindo para reduzir os índices de morbidade e mortalidade. (DIENSTMANN, et al., 2010).

Com o aumento no número de casos de infecção hospitalar causada por enterobactérias, a triagem de cepas produtoras de carbapenemases envolvidas em casos clínicos tem grandes implicações no aperfeiçoamento de medidas de redução e contenção da disseminação desses microrganismos. O objetivo desse estudo foi avaliar a susceptibilidade antimicrobiana e a epidemiologia molecular de cepas de *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.* resistentes a carbapenêmicos, isoladas de pacientes internados um hospital público de Dourados/MS, visando identificar os fatores de riscos associados à aquisição de infecções causadas por estes microrganismos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecção Hospitalar

A infecção hospitalar é considerada um grave problema de saúde pública. Muitos hospitais possuem dificuldade na implementação de normas de biossegurança efetivas na contenção de microrganismos multiressistentes, o que contribui para a ocorrência de infecções hospitalares. A elaboração, aplicação e execução de ações que visem à contenção e prevenção de infecções nos hospitais, torna-se um desafio cada vez maior a ser enfrentado pelo poder público (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008).

A grande maioria das infecções hospitalares manifesta-se em pacientes em estado grave, normalmente usuários de imunossuppressores ou submetidos a procedimentos invasivos e a longos períodos de internação (PEREIRA et al., 2005; WAGENLERHNER et al., 2006; LIMA; ANDRADE; HAAS 2007). A incidência das infecções hospitalares varia de acordo com a unidade de tratamento, sendo que nas UTIs encontram-se os pacientes em estado mais grave e com defesa imunológica comprometida, condições clínicas predisponentes ao surgimento de infecção (PEREIRA, et al., 2000). Pacientes internados em UTIs, cujo risco de infecção é elevado, apresentaram risco médio de 5 a 10 vezes maior do que outros setores, atingindo cerca de 10 a 30% de pacientes internados, com taxa de mortalidade que varia de 10 a 80% (LIMA; ANDRADE; HASS, 2007; BARROS, et al., 2012).

Deve-se também considerar um fator determinante para o surgimento das infecções as características dos hospitais que apresentam uma grande rotatividade de seus leitos. A ocupação dos leitos imediatamente após serem vagos, favorece a limpeza e higienização inadequada, contribuindo para a proliferação de bactérias multirresistentes entre os pacientes (NETO, et al., 2010). As bactérias Gram-negativas são os patógenos com maior relevância clínica e epidemiológica nos ambientes hospitalares, dentre elas as pertencentes à família *Enterobacteriaceae* (SOUZA; OLIVEIRA, 2008).

2.2 Enterobactérias

As enterobactérias constituem uma família de bacilos Gram-negativos amplamente distribuídos na natureza, podendo ser encontradas no solo, água, no trato gastrointestinal de homens e animais, e algumas são exclusivamente agentes causadores de infecção (TRABULSI et al., 2002). Esses microrganismos possuem a capacidade de crescer rapidamente em condições aeróbicas e anaeróbicas, possuindo exigências nutricionais simples. Não formam esporos e do ponto de vista bioquímico, são catalase-positivo, oxidase

negativo, reduzem o nitrato e fermentam glicose (O'HARA, 2005). Embora apresente características em comum, a família *Enterobacteriaceae* é extremamente diversificada, abrangendo gêneros e espécies que se diferenciam pela capacidade de fermentação de uma série de outros carboidratos, pela produção de toxinas, ou por suas características antigênicas (ABBOTT et al., 2011).

Existem aproximadamente 28 gêneros e mais de 80 espécies de bactérias pertencentes a esta família, as quais podem ser diferenciadas bioquimicamente, o que contribui para a identificação de isolados clínicos (TRABULSI, et al., 2002). Várias espécies que compõem essa família são importantes patógenos causadores de infecções nosocomial, sendo que os membros desta família são responsáveis por grande parte das infecções hospitalares. Estudos epidemiológicos relatam que as principais espécies de importância clínica são *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., e *Serratia* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp, *Proteus* spp. e *Salmonella* spp (FEDLER et al., 2006; SOUZA; OLIVEIRA, 2008; ABBOTT, 2011). Nos EUA, nos anos de 2002 a 2004, as enterobactérias foram citadas como os principais microrganismos isolados de pacientes internados em UTI. Em 2008, o *Center for Diseases Control and Prevention* (CDC) divulgaram que espécies de *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp eram as mais comuns encontradas em infecções hospitalares (ABBOTT, et al., 2011). Um estudo multicêntrico realizado pelo *National Healthcare Safety Network* (2008) revelou que as espécies do gênero *Enterobacter* são responsáveis por cerca de 5% das bacteremias nosocomiais registradas e estão entre os dez patógenos com maior incidência em UTIs.

Resultados publicados pelo *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* revelam maior prevalência de infecções causadas por microrganismos gram-negativos na América Latina em comparação com EUA e Canadá. Divulgaram também que *E. coli* e o gênero *Klebsiella* são os principais agentes etiológicos de infecções da corrente circulatória, da pele e tecidos moles (GALES, et al., 2012). Algumas espécies de *S. marcescens*, *Proteus* spp., e *Morganella* spp., também foram relacionados a casos graves de infecção (WIECEK; MICHALSKA; GOSPODAREK, 2012; GARCIA, et al., 2011).

A grande maioria das infecções causadas por espécies de *Klebsiella* sp., estão associadas ao ambiente hospitalar. Atualmente estima-se que essas espécies sejam responsáveis por cerca de 8% de todas as infecções nosocomiais na Europa e nos EUA (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Segundo dados epidemiológicos as espécies desse gênero estão envolvidas em 7-14% dos casos de pneumonias nosocomiais, 6-17% de infecções do

trato urinário, 4-15% de sepses, 3-20% de infecções neonatais e 4-17% das infecções em UTIs (JANDA; ABBOUTT, 2006).

A emergência de enterobactérias multirresistentes constitui um dos principais desafios aos laboratórios clínicos e as equipes de saúde, com relatos no mundo todo. A presença de cepas produtoras de carbapenemases já foi descrita na maioria dos gêneros da família *Enterobacteriaceae* (ABBOUTT et al, 2011).

2.3 Resistência bacteriana em enterobactérias

A resistência bacteriana pode ocorrer pela presença de mecanismos intrínsecos, correspondendo a uma característica da espécie, ou adquiridos. A associação desses mecanismos leva a multirresistência, limitando de maneira drástica as opções terapêuticas para o tratamento das infecções causadas por patógenos multiresistentes (WILSON, 2013). A aquisição de resistência geralmente ocorre devido ao surgimento de algumas alterações genéticas que se expressam bioquimicamente. Diversos mecanismos podem estar envolvidos, porém a causa mais frequente é a aquisição de genes de resistência através de elementos genéticos móveis (MULVEY; SIMOR, 2009).

A resistência aos β -lactâmicos constitui um problema global e emergente, uma vez que se trata de uma categoria formada por várias classes de medicamentos bastante utilizados pela clínica médica. Os antibióticos β -lactâmicos tem em comum na base da sua estrutura molecular um anel β -lactâmico central, como os quatro membros da classe, representados na figura 1 (MURRAY et al., 2006). As cefalosporinas são um grupo de antibióticos β -lactâmicos mais utilizados para o tratamento de infecções hospitalares causadas por enterobactérias (BRADFORD, 2001). Entretanto, o aumento de cepas resistentes a estes compostos tem restringido o uso destes antibióticos pelos profissionais de saúde (DESHPANDE et al., 2010).

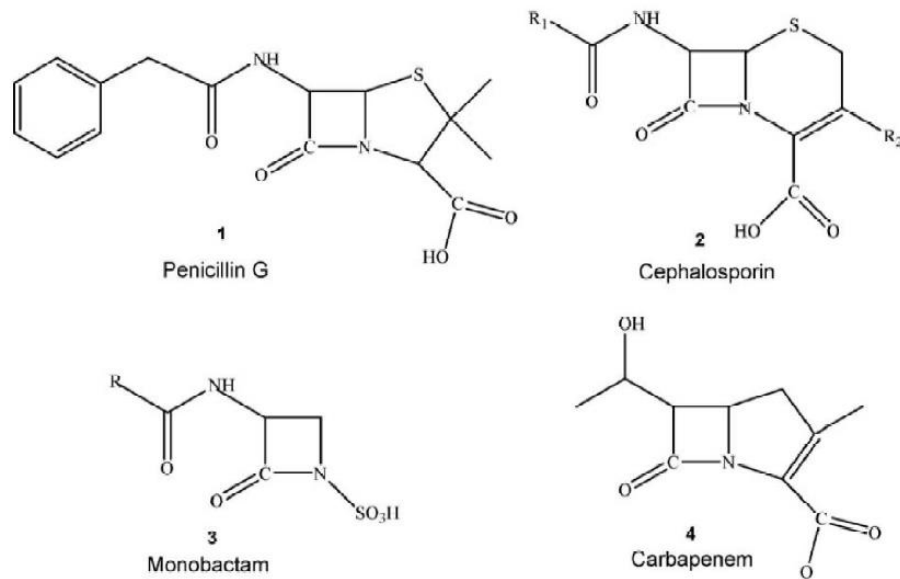


Figura 1. Estrutura química dos principais grupos de antimicrobianos β -lactâmicos. Adaptado de Babic et al., 2006.

A resistência bacteriana aos β -lactâmicos pode ser causada por quatro mecanismos: produção de β -lactamases, falta e/ou expressão reduzida das proteínas de membrana externa, hiperexpressão de bombas de efluxo e alteração do sítio alvo das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; SPELLBERG, et al., 2008). A figura 2 ilustra estes mecanismos de aquisição de resistência pelas bactérias.

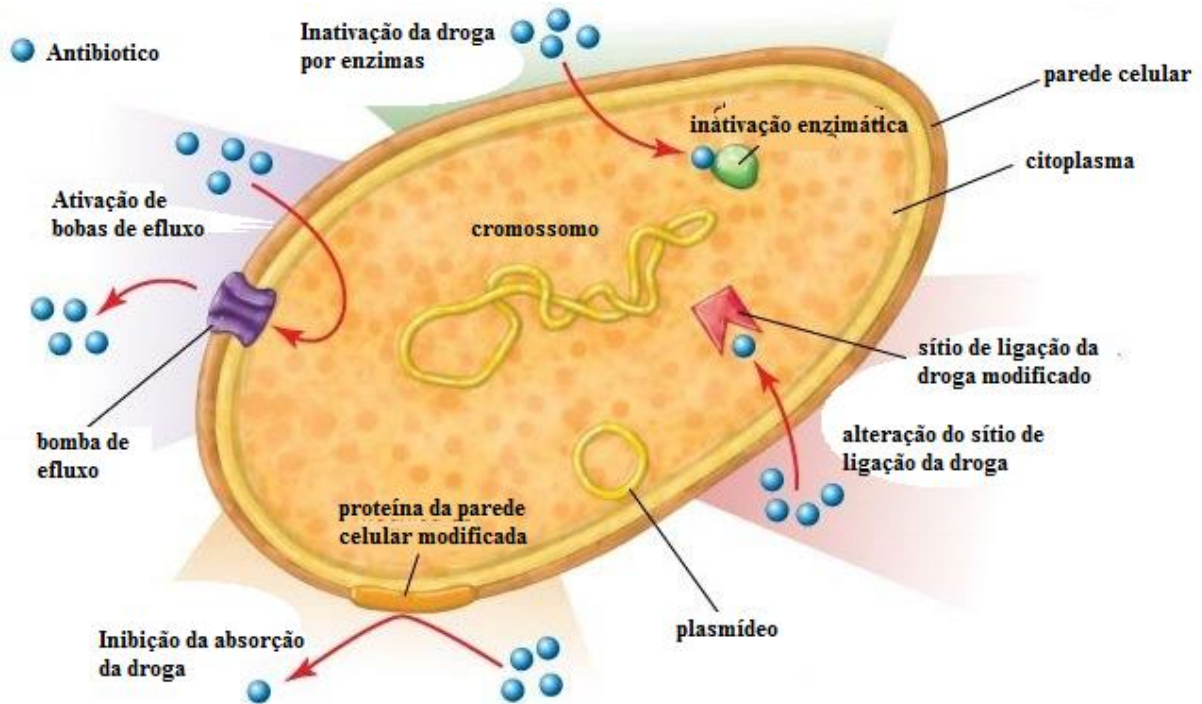


Figura 2. Desenho esquemático demonstrando os principais mecanismos de resistência bacteriana. Figura editada e obtida do site: (<http://www.britannica.com/EBchecked/media/129670/There-are-multiple-mechanisms-by-which-bacteria-can-develop-resistance>). Acessado em: 06 de janeiro de 2014.

A membrana externa das bactérias Gram-negativas constitui uma barreira de permeabilidade seletiva que efetivamente pode oferecer proteção contra vários compostos nocivos presentes no ambiente extracelular, selecionando os nutrientes necessários. Essa membrana é constituída de fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e por proteínas de membrana externa denominadas *Outer membrane proteins* (OMP), dentre as quais encontram-se as porinas. As porinas são proteínas capazes de formar canais constituídos de água no seu interior que permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a expulsão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). Quando ocorre a perda ou a diminuição da expressão dos genes responsáveis pela expressão das porinas, pode haver redução da entrada de antimicrobianos na célula, diminuindo a concentração interna desse agente, e, conseqüentemente, contribuindo para o mecanismo de resistência aos β -lactâmicos. Na maioria das vezes a perda e/ou a diminuição das porinas pode estar associada à produção de β -lactamases (NIKAIDO, 2003). A Tabela 1 demonstra alguns exemplos de porinas que foram relacionadas à resistência bacteriana.

Tabela 1. Porinas relacionadas com a resistência a antibióticos nas principais bactérias Gram-negativas.

Espécies	Porina	Antibiótico
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	OprD	Carbapenêmicos
<i>Escherichia coli</i>	OmpC	β -lactâmicos
	OmpF	β -lactâmicos
<i>Serratia marcescens</i>	OmpF	β -lactâmicos
	OmpC	β -lactâmicos
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	OmpK35	Cefalosporinas, carbapenêmicos e quinolonas
	OmpK36	Carbapenêmicos
<i>Enterobacter cloacae</i>	OmpF	Carbapenêmicos
<i>Enterobacter aerogenes</i>	OmpC	Carbapenêmicos
	OmpF	Carbapenêmicos
	Omp36	Imipenem, cefepime
<i>Klebsiella oxytoca</i>	OmpK36	Carbapenêmicos
<i>Acinetobacter baumannii</i>	CarO	Carbapenêmicos

Adaptado de Fernández e Hancock, 2012.

As mutações que afetam a expressão e/ou a função das porinas têm um impacto direto sobre a susceptibilidade aos agentes antimicrobianos. Estas mutações podem ter vários efeitos, como a diminuição ou perda total da função da porina, por meio da modificação do tamanho ou a condutância do canal de porina ou menor nível da expressão da mesma. As principais mutações responsáveis por esses efeitos são as que causam parada na tradução, exclusão ou elementos de inserção na sequência dos genes codificadores e mutações que afetam a regulação da expressão gênica. As mutações pontuais na região promotora podem causar redução da transcrição e conseqüentemente, perda de porinas, alguns estudos demonstram que alterações nas proteínas de membrana externa podem causar resistência aos antibióticos carbapenêmicos (HARDER, NIKAIDO; MATSUHASHI, 1981; HANCOCK, 1984; FERNANDEZ, HANCOCK, 2012; WOSNIAK, et al., 2012).

Doumith e colaboradores (2009) descreveram a resistência a ertapenem em isolados de *Enterobacter* spp. e *Klebsiella* spp. devido a deficiência da expressão de porinas associada a produção de β -lactamases. O estudo demonstrou ainda que o ertapenem é o antibiótico mais afetado por esse mecanismo comparado a outros carbapenêmicos. Wosniak e colaboradores

(2012) descreveram a presença de resistência a carbapenêmicos em isolados de enterobactérias devido a alteração de porinas. Todos os isolados do estudo apresentaram perda ou alteração na estrutura das porinas e a maioria apresentavam ao menos uma β -lactamase de espectro estendido (ESBL) ou AmpC. Zhang e colaboradores (2013) descreveram a contribuição da produção de β -lactamases e alteração das proteínas de membrana OmpK35 e OmpK36 na resistência a carbapenêmicos em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, todos os isolados apresentavam as enzimas KPC-2, TEM e CTX-M-14.

As alterações de permeabilidade da membrana associada à expressão aumentada de sistemas de efluxo torna-se um fator determinante na resistência bacteriana à antimicrobianos. A hiperexpressão do sistema de efluxo surgiu como um sistema evolutivo das bactérias para evitar que compostos tóxicos se acumulassem no interior das células. Este sistema tem função de bombear moléculas tóxicas do conteúdo intracelular, em um processo que não envolve a alteração ou degradação dos fármacos (LISTER; WOLRWE; HANSON, 2009; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). Geralmente mutações são responsáveis pelo aumento do nível de expressão da bomba de efluxo, resultando no aumento da resistência aos compostos. Em alguns casos, estas mutações causam alterações de apenas um aminoácido, que tornam mais eficiente o bombeamento dos antibióticos para fora da célula. A grande maioria das mutações responsáveis pelas alterações no transporte de antimicrobianos por sistemas de efluxo ocorrem nos genes que codificam proteínas com uma função reguladora (NILSEN, et al., 1996; VETTORETTI, et al., 2009; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). A presença desse mecanismo foi descrita inicialmente em 1978 e desde então, os sistemas de efluxo, sejam eles de codificação plasmidial ou cromossomal, vem sendo identificados com maior frequência (UGHACHUKWU, UNEKWE, 2012).

2.4 Produção de β -lactamases

O uso excessivo de penicilinas e cefalosporinas contribuiu para o surgimento de β -lactamases, uma família de enzimas bacterianas capazes de hidrolisar esses medicamentos, impulsionando o aumento na utilização de carbapenêmicos considerados antimicrobianos de última escolha. Porém, o uso indiscriminado dos carbapenêmicos, associado à exposição a outros medicamentos e a ausência de protocolos de controle e prevenção de infecção hospitalar permitiu a emergência de enterobactérias resistentes a este grupo de antibióticos (MUNOZ-PRICE; QUINN, 2009). A hidrólise de antimicrobianos pelas β -lactamases é o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas. Os genes que codificam essas enzimas sofrem mutações constantemente em resposta à pressão exercida

pelos antimicrobianos, contribuindo para o surgimento de novas classes de enzimas com espectro de atividade cada vez maior (NOYAL, et al., 2009).

Diversos tipos de β -lactamases já foram descritas e várias tentativas de classificação já foram propostas, sendo que as duas mais importantes são a de Ambler e a de Bush, Jacoby e Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH, et al., 1995), esta última revisada em 2010 (BUSH; JACOBY, 2010). A Tabela 1 demonstra de maneira simplificada a comparação entre elas. A classificação proposta por Ambler esta relacionada com a estrutura molecular das enzimas e a sequência de aminoácidos codificados. Nessa classificação quatro classes moleculares foram descritas: I, β -lactamases de espectro estendido (ESBLs) e limitado; II, pencilinasas; III, metalo- β -lactamases (MBLs) e IV, oxacilinasas (AMBLER, 1980). A classificação proposta por Bush relacionou propriedades inibitórias e os substratos preferenciais de cada enzima. No entanto, ao longo dos anos essa classificação passou por atualizações, sendo que características estruturais e funcionais das β -lactamases foram levadas em consideração.

Tabela 1. Classificação funcional e molecular dos principais grupos de β -lactamases.

Classificação de BUSH-JACOBY, 2010		Classificação de AMBLER, 1980	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais conferem resistência a todos os β -lactâmicos, exceto aos carbapenêmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
	1e	C	Hidrólise aumentada à ceftazidima e não inibidas pelo ácido clavulânico.
2	2 ^a	A, D	Grande maioria das enzimas é inibida pelo ácido clavulânico.
	2 ^a	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem alto grau de resistência às penicilinas.
	2b	A	β -lactamases de espectro limitado de bactérias Gram-negativas. Inclui TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
	2be	A	β -lactamases de espectro ampliado, conferindo resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
	2br	A	β -lactamases derivadas de TEM resistentes aos inibidores de β -lactamases (IRT).
	2ber	A	Enzimas não inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina com maior eficiência.
	2ce	A	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepima e cefpiroma.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina); fracamente inibidas pelo ácido clavulânico.
	2de	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina) e oxinimo- β -lactâmicos.
	2df	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina) e carbapenens.
	2e	A	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenens com sítio ativo serina, inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os outros β -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
4		ND	Enzimas não são classificadas nos outros grupos.

ND, classe excluída da classificação atual (Adaptado de Bush & Jacoby, 2010).

A resistência bacteriana mediada pelas β -lactamases ocorre pela capacidade das mesmas em quebrar a ligação amida no anel β -lactâmico presente na estrutura do antibiótico (LIVERMORE, 1995). Alguns fatores podem interferir na capacidade das β -lactamases em conferir resistência, dentre esses fatores destacam-se: a quantidade de enzima produzida, a habilidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o β -lactâmico penetra na membrana celular externa. A síntese das β -lactamases pode ocorrer de diferentes formas, podendo ser cromossômica ou mediada por plasmídeos e transposons. Além disso, pode ser induzida tanto pela presença de β -lactâmicos através da pressão seletiva, ou por meio de precursores da parede celular (LIVERMORE, 1995).

Os carbapenêmicos são uma classe de antibióticos β -lactâmicos que tem como mecanismo de ação a inibição da síntese de parede celular, causando o rompimento da célula devido à pressão osmótica. Possuem o mais amplo espectro de atividade contra bactérias Gram-negativas, quando comparado a outros β -lactâmicos (COLE, et al., 2009). Os principais antibióticos que compõe essa classe são: imipenem, meropenem, doripenem e ertapenem, sendo que o último é menos eficaz, pois apresenta espectro mais limitado frente a *P. aeruginosa*. O imipenem é mais ativo, porém o doripenem apresenta concentração inibitória mínima (MIC) mais baixa quando testado frente à maioria das bactérias não fermentadoras (GALAL, et al., 2010; OZCENGIZ; DEMAİN, 2013).

Os carbapenêmicos também podem ser utilizados através de terapia combinada com outros agentes antimicrobianos no tratamento de infecções graves e ou provocadas por microrganismos multi-droga resistente, geralmente para o tratamento empírico de infecções hospitalares de origem não identificada. São combinados com um antibiótico ativo principalmente contra bactérias Gram-positivas. Porém, a combinação de carbapenêmicos com outros agentes apresenta algumas desvantagens, como efeitos adversos e principalmente o aumento da resistência a uma das drogas utilizadas na combinação (THALAN; JENSEN, 2013).

Os carbapenêmicos são estáveis à maioria das β -lactamases, como as de espectro estendido, cefalosporinases e oxacilinases. No entanto, o número de isolados Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos vem aumentando (NORDMAN et al., 2011). As carbapenemases formam o grupo mais importante de β -lactamases, que possuem habilidade variada de hidrolisar os carbapenêmicos e outros tipos de beta-lactâmicos. A detecção de microrganismos produtores de carbapenemases torna-se uma tarefa difícil e

um grande problema no controle de infecção, uma vez que frequentemente estão envolvidos com uma ampla e muitas vezes total resistência bacteriana (SHWABER et al., 2008; THOMSON, 2010).

2.4.1 β -lactamases do tipo AmpC

As β -lactamases do tipo AmpC, ou cefalosporinases cromossomais, são enzimas que tem a capacidade de hidrolisar penicilinas e cefamicinas com grande eficácia, enquanto o aztreonam e as cefalosporinas de terceira geração são hidrolisadas com menor eficácia. Geralmente, as cefalosporinas de quarta geração e os carbapenêmicos são fracamente hidrolisados pelas enzimas AmpC (JACOBY, 2009). Quando os antibióticos β -lactâmicos não estão presentes, a β -lactamase AmpC é produzida em níveis baixos, mas na presença de β -lactâmicos indutores, como a cefoxitina e, especialmente, o imipenem, essas enzimas passam a ser produzidas em grande quantidade. O mecanismo de indução de AmpC é controlado pela atividade de três proteínas a AmpG, AmpD e AmpR (JACOBY, 2009). As cefalosporinases cromossomais constituem um grupo de enzimas com características particulares como resistência aos inibidores de beta-lactamases, como o ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam (THONSON, 2010).

Essas enzimas já foram descritas em diversos microrganismos, principalmente naqueles pertencentes ao grupo CESP, sendo eles: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Providencia stuartii*, *P. aeruginosa* e *Morganella morganii*, nos quais essas AmpC são induzíveis, enquanto que nas espécies bacterianas *E. coli* e *A. baumannii*, não apresenta indução da enzima AmpC (HANSON; SANDERS, 1999; JACOBY, 2009; STRATEVA; YORDANOV, 2009)

A detecção fenotípica de cefalosporinas é realizada pela metodologia de aproximação de disco. Para isso, utiliza-se um disco de cefoxitina, próximo a um disco de Aztreonam ou outro beta-lactâmico. Após incubação observa-se uma zona de entroncamento entre os dois discos, o que indica a presença de β -lactamases do tipo AmpC (DALMARCO; BLATT; CÓRDOVA, 2006).

2.4.2 β -lactamases de Espectro Limitado e Ampliado (ESBLs)

As enzimas ESBLs apresentam atividade hidrolítica contra as penicilinas, cefalosporinas de largo espectro e o aztreonam. A maioria dessas enzimas é sensível à ação dos inibidores de serino- β -lactamase (PATERSON; BONOMO, 2005). Foram

descritas inicialmente em membros da família *Enterobacteriaceae*, sendo observados mais comumente em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*. A prevalência de microrganismos com estas enzimas é crescente, com descrição de focos de infecções graves em todos os continentes (RUPP; FEY, 2003). As enzimas classificadas nesse grupo incluem também as β -lactamases de espectro limitado, as quais são em sua maioria inibidas pelos inibidores de serino- β -lactamases. Essas enzimas apresentam potente atividade contra as penicilinas e as cefalosporinas de primeira e segunda geração. Essas β -lactamases, hidrolisam carbenicilina com a mesma eficiência que hidrolisam a benzilpenicilina (ZAVASCKI et al., 2010).

As enzimas do tipo TEM, originalmente encontradas em um isolado de *E. coli* a partir de cultura de sangue de um paciente chamado Temoniera na Grécia, por isso a denominação, conferem resistência a ampicilina, penicilina e cefasloporinas de primeira geração como a cefalotina. Variantes da primeira TEM apresentam resistência à inibição por ácido clavulânico. Esta enzima é responsável por aproximadamente 90 % da resistência à ampicilina em isolados de *E. coli* (MEDEIROS, 1984). As enzimas do tipo SHV, são encontradas principalmente em isolados de *K. pneumoniae*, cujos genes podem estar inseridos em plasmídios ou no cromossomo, e capazes de conferir resistência a penicilinas e cefalosporinas de primeira geração (JACOBY; SUTTON, 1991; PATERSON; BONOMO, 2005).

As ESBL do tipo cefotaximase (CTX-M) apresentam apenas 40% de similaridade com as β -lactamases TEM e SHV. As CTX-M são codificadas por genes localizados em plasmídios, os quais normalmente abrigam outros genes que conferem resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim e à tetraciclina. Acredita-se que a β -lactamase tipo CTX-M foi originada a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de similaridade (BRAFOR, 2001; BONNET, 2004).

As β -lactamases do tipo *Guiana extended spectrum* (GES), foram inicialmente classificadas como ESBL por possuírem amplo espectro de ação, contra penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, e por não apresentarem quase nenhuma atividade contra antibióticos carbapenêmicos (POIREL, et al., 2000). Entretanto, em 2001 uma variante de GES-1 foi identificada em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada na África do Sul. Essa variante GES-2 apresentava uma única alteração de aminoácido quando comparada à GES-1, um resíduo de asparagina, ao invés de glicina e seu espectro de ação passou a incluir também os carbapenêmicos (POIREL, et al., 2001).

2.4.3 Carbapenemases de Classe A

As carbapenemases da classe A, ou serino-carbapenemases, pertencem a classe molecular A de Ambler e hidrolisam uma ampla variedade de β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, aztreonam, carbapenêmicos, e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN; BUSH, 2007). As maiores famílias de carbapenemases da classe A incluem as enzimas NMC-A, IMI, SME e KPC. Os genes que codificam as enzimas SME, IMI e NMC estão localizados no cromossomo bacteriano, o que contribui para sua distribuição restrita a determinados microrganismos em regiões geográficas específicas (NORDMAN; POIREL, 2002). A primeira descrição de uma enzima desse grupo foi à *Serratia marcescens* enzyme (SME-1), identificada em 1982 em um isolado clínico de *S. marcescens*, em Londres (BUSH, et al., 1995; POIREL, et al., 2007; QUEENAN; BUSH, 2007). A enzima *Not metalloenzyme carbapenemase* (NMC-A) foi isolada em 1990 de uma cepa de *E. cloacae* a partir de um paciente internado em um hospital francês (NORDMAN; POIREL, 2002). Em 1991 a enzima Imipenemase (IMI) foi descrita partir de duas amostras de *E. cloacae* isoladas no sul da Califórnia (RASMUSSEN; HOIBY, 2007). Essas enzimas foram descritas apenas em isolados de *Enterobacter spp* em vários países como: França, Estados Unidos, Argentina e China, porém ainda não existem relatos de bactérias produtoras destas enzimas no Brasil. Isolados produtores de SME, IMI ou NMC apresentam sensibilidade diminuída ou resistência às penicilinas, às cefalosporinas de primeira e segunda geração, ao aztreonam e ao imipenem, mantendo a sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro. Além disso, essas enzimas são inibidas pelos inibidores de serino- β -lactamases, como o ácido clavulânico e o tazobactam (QUEENAN; BUSH, 2007).

A *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) é a carbapenemase mais comum isolada de enterobactérias e confere resistência aos antibióticos de amplo espectro, como os carbapenêmicos, penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos. É habitualmente mais frequente em *K. pneumoniae* (ANDERSON et al., 2007), porém vem sendo relatada em diversas outras espécies de interesse clínico, como a *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp* e *S. marcescens* (MIRIAGOU et al., 2003; PETRELLA et al., 2008). Essa enzima foi descoberta em 1996 e descrita pela primeira vez em 2001 em um isolado de *K. pneumoniae* (YIGIT et al., 2001). Desde a sua identificação a mesma se difundiu em vários países (KITCHEL et al., 2009). Normalmente a KPC é codificada por genes localizados em plasmídeos e hidrolisam

todos os agentes β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (QUEENAN, BUSH, 2007).

Atualmente já foram descritas doze variantes da enzima KPC, sendo sequencialmente classificadas como KPC-2 a KPC-13. A enzima KPC-2 foi identificada em 2003 em Baltimore em um isolado clínico de *K. pneumoniae*. Posteriormente estudos demonstraram que a sequência dos genes bla_{KPC-1} e bla_{KPC-2} eram idênticas. A mutação no gene responsável pela produção dessa enzima é caracterizada pela substituição de um único nucleotídeo (DAIKOS, et al., 2012). As variantes KPC-2 e KPC-3 são responsáveis pela maioria dos surtos endêmicos. As principais espécies envolvidas na disseminação dessas enzimas são as enterobactérias (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Os genes bla_{KPC} descritos foram identificados inseridos em plasmídeos e frequentemente estão relacionados com o Transposon Tn4410 com diferentes isoformas identificadas. Estas estruturas associadas a esses genes de resistência indicam a presença de um mecanismo de transposição replicativa, que permite a propagação de sequências de codificação da KPC entre diferentes unidades genéticas (CUZON, et al., 2010).

Na América do Sul a primeira detecção de KPC-2 ocorreu em 2006 por Villegas e colaboradores na Colômbia, em isolados de *K. pneumoniae*. Essas cepas apresentavam resistência a carbapenêmicos e foram isoladas de pacientes de dois hospitais diferentes, os quais haviam sido admitidos para o tratamento de pneumonia bacteriana. No Brasil, a enzima KPC-2 foi identificada em cepas de *K. pneumoniae* em um hospital de Recife em 2006 (MONTEIRO, et al., 2009). Desde então, isolados de *K. pneumoniae* e *E. cloacae* produtores de KPC-2 também foram descritas no Rio de Janeiro, São Paulo e Rio Grande do Sul, mostrando que a emergência deste mecanismo de resistência em hospitais brasileiros vem crescendo desde 2005 (PAVEZ, et al, 2009; PEIRANO, et al, 2009; ZAVASCKI, et al., 2009). Em 2010 após vários casos de surtos de KPC no país, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) restringiu a venda de antibióticos sem prescrição médica, a fim de controlar o uso inadequado desses medicamentos.

2.4.4 Carbapenemases de classe B ou metalo- β -lactamases (MBLS)

As metalo- β -lactamases (MBL) ou carbapenemases da classe B são enzimas que apresentam potente atividade contra carbapenêmicos, mas diferem de outras carbapenemases em três aspectos: requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes

como cofator no sítio ativo; são resistentes à ação dos inibidores das serino- β -lactamases, embora sofram inibição por agentes quelantes como o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), derivados de tiol e do ácido dipicolínico; não hidrolisam monobactams como o aztreonam (WALSH, et al., 2005). Normalmente os genes que codificam MBLs estão inseridos em estruturas genéticas móveis, e as enzimas codificadas por estes genes conhecidas como MBLs móveis ou adquiridas. Atualmente, já foram descritas 10 sub-classes de MBLs adquiridas, porém as mais conhecidas são: *imipenemase* (IMP), *Verona imipenemase* (VIM), *São Paulo metallo- β -lactamase* (SPM), *German imipenemase* (GIM), *Seul imipenemase* (SIM) e *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM) (PALZKILL, 2013).

A primeira carbapenemase da classe B a ser descrita foi a IMP-1, caracterizada em um isolado de *S. marcescens* no Japão (OSANO, et al., 1994). A partir de então, a produção de enzimas do tipo IMP foi observada em *Klebsiella spp*, *Pseudomonas spp*, *Acinetobacter spp* e em diversas espécies de enterobactérias (GALES, et al., 2003; CASTANHEIRA, et al., 2004). No Brasil o primeiro relato de IMP-1 ocorreu em 2003 por Gales e colaboradores, onde a enzima foi descrita em um isolado de *A. baumannii* que apresentava resistência a carbapenêmicos. Em 2004 uma nova variante de IMP foi isolada no Brasil em uma cepa de *P. aeruginosa* que apresentava resistência a todos os antibióticos beta-lactâmicos testados. Essa variante foi denominada IMP-16 (MENDES, et al., 2004). A variante IMP-10 foi descrita no Japão em 2002 em amostras de *P. aeruginosa* e *Alcaligenes xylosoxidans*. Este estudo demonstrou que essa variante era derivada da IMP-1 e surgiu devido a uma mutação pontual com a substituição de uma única base de G para T, levando a alteração do aminoácido Val⁴⁹ para Phe. Através de parâmetros cinéticos foi identificado que a IMP-10 em comparação com a IMP-1 apresenta menor atividade hidrolítica contra penicilinas, porém apresentava maior atividade de hidrólise contra imipenem e meropenem. Um estudo realizado em 2009 por Hu e Zhao comparou o fenótipo de resistência das duas variantes em isolados clínicos de *S. marcescens*. Os resultados demonstraram que cepas com IMP-10 apresentavam valores de MICs para carbapenêmicos maiores do que cepas produtoras de IMP-1, o mesmo ocorria com os seus transconjugantes, indicando que cepas com IMP-10 apresentavam maior nível de resistência (IYOUBE, et al., 2002). No Brasil ainda não há relatos de IMP-10.

A primeira enzima da família VIM, foi descrita em 1999, em uma amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, na Itália em 1997. Desde então, foram descritas 39

variantes desta enzima. Embora a maior parte destas descrições tenha ocorrido a partir de isolados recuperados na Europa, algumas variantes foram também identificadas nos continentes americano e asiático (QUEENAN; BUSH, 2007; WALSH, 2008).

Em 2002, uma nova MβL foi descrita no Brasil, nomeada de SPM-1. Essa enzima foi caracterizada a partir de uma cepa de *P. aeruginosa* recuperada do trato urinário de uma paciente hospitalizada no complexo Hospital São Paulo (TOLEMAN, et al., 2002). Alguns estudos identificaram a produção de SPM-1 em *P. aeruginosa* em diferentes regiões brasileiras, sendo que a produção desta enzima parece ocorrer de forma endêmica, relacionada inicialmente à sua disseminação clonal em vários surtos (CARVALHO et al., 2006; PELLEGRINO, et al., 2006; CIPRIANO, et al., 2007. A única descrição da produção de SPM-1 fora do Brasil ocorreu em 2010, na Suécia (GALES, et al., 2003).

Em 2002, na Alemanha, foi descrita a MβL da família GIM-1 isolada de uma cepa de *P. aeruginosa* de pacientes hospitalizados em Dusseldorf (CASTANHEIRA, et al., 2004). Em 2005, outra MβL foi descrita em isolados clínicos de *A. baumannii* na Coreia, denominada SIM-1 (LEE, et al., 2005). Em 2009 uma nova sub-classe de MBL, a enzima *New Delhi metallo-beta-lactamase* (NDM-1) foi caracterizada em uma *K. pneumoniae* proveniente da urina de um paciente internado em Nova Delhi, mas que tinha morado por muitos anos na Suécia, com internação prévia em hospital indiano (YONG, et al., 2009). Uma das primeiras descrições de NDM-1 na América do Sul foi em 2012 no Uruguai, logo depois foi relatada a presença da enzima em um surto de *K. pneumoniae* na Colômbia e em uma cepa de *A. baumannii* no Paraguai (PERÉZ et al., 2013). No Brasil a NDM-1 foi descrita pela primeira vez em 2013 em Porto Alegre. A enzima foi identificada em um isolado clínico de *Providencia rettgeri* que apresentava resistência a carbapenêmicos (CARVALHO-ASSEF, et al., 2013).

O teste de aproximação de disco com EDTA é utilizado para detecção inicial de metalo-β-lactamases e considerado com sensibilidade alta. Neste teste, a zona de inibição em torno do disco de β-lactâmico é alterada pela ação do inibidor da metalo-β-lactamase no microrganismo testado. (QUEENAN; BUSH, 2007; OVERTUF, 2010). Nas últimas décadas a rápida detecção de carbapenemases da classe A e B de Ambler vem sendo realizada com sucesso por técnicas de espectrometria de massa, onde as moléculas são ionizadas, aceleradas por um campo elétrico e separadas de acordo com a razão entre sua massa e sua carga elétrica. A mais utilizada atualmente trata-se da

Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight (MALDI-TOF MS) (CARVALHAES, et al., 2013; WANG, et al., 2013).

2.4.5 Carbapenemases de classe D ou oxacilinases

As oxacilinases (OXA) foram nomeadas assim por apresentarem uma atividade hidrolítica potente contra as penicilinas resistentes às penicilinas, dentre elas: a oxacilina, a cloxacilina e a meticilina. Uma característica marcante desse grupo de enzimas é o fato de serem fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, mas fortemente inibidas pelo cloreto de sódio (POIREL, et al., 2010; NORDMAN; NAAS, POIREL, 2011).

Essas enzimas podem ser classificadas em diferentes subgrupos: oxacilinases de espectro liminado, oxacilinases do tipo ESBLs, oxacilinases do tipo carbapenemases (BUSH; JACOBY, 2010). Embora, a maioria dos genes que codificam enzimas do tipo OXA seja localizada em plasmídeos, alguns podem estar no genoma. As enzimas do tipo ESBL possuem espectro mais limitado e se assemelha à evolução observada pelas enzimas do tipo TEM e SHV. A ESBL do tipo OXA foi originalmente descoberta em isolados de *P. aeruginosa* na Turquia (QUEENAN; BUSH, 2007; POIREL, et al., 2010). Atualmente mais de 250 tipos de oxacilinases já foram descritas, sendo que uma minoria demonstrou baixos níveis de atividade hidrolítica contra antibióticos carbapenêmicos (PATEL; BONOMO, 2013).

A primeira β -lactamase do tipo OXA com atividade contra carbapenêmicos foi descrita por Paton e colaboradores (1993), em um isolado de *A. baumannii*, estudos bioquímicos revelaram que se tratava de uma β -lactamase que era fracamente inibida por EDTA e ácido clavulânico. Esta enzima foi detectada como ARI-1, (*Acinetobacter* resistente a imipenem), porém estudos posteriores revelaram que a enzima tratava-se de uma OXA que pertencia a classe D das β -lactamases e mais tarde foi renomeada como OXA-23 (QUEENAN; BUSH, 2007). Existem nove grupos de OXA carbapenemases baseado na sequência de aminoácidos. Os subgrupos 1, 2 e 3 são baseados na sequência das enzimas OXA-23, OXA-24 e OXA-51 respectivamente. Os subgrupos 4, 5 e 6 são representados pelas enzimas OXA-58, OXA-55 e OXA-48, que em contraste com outras enzimas foi descrito primeiramente em um isolado clínico de *K. pneumoniae*. As enzimas OXA-50, OXA-60 e OXA-62 são representantes dos subgrupos 7, 8 e 9 (QUEENAN; BUSH, 2007; RASMUSSEN; HOIBY, 2007).

As carbapenemases do tipo OXA podem ocorrer naturalmente em alguns organismos Gram negativos, assim como podem ser adquiridas. Essas enzimas apresentam capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, mas não apresentam atividade sobre aztreonam e cefalosporinas de terceira e quarta geração. As carbapenemases do tipo OXA foram descritas principalmente em isolados de *A. baumannii*, com exceção da enzima OXA-48, que foi descrita apenas em enterobactérias até o momento (PATEL; BONOMO, 2013). A enzima OXA-48 foi identificada em *K. pneumoniae*, na Turquia e foi a primeira oxacilinase a apresentar resistência a carbapenêmicos. Essa enzima tem sido exclusivamente isolada em enterobactérias, possui grande similaridade com as outras carbapenemases do tipo OXA, porém, possui maior atividade hidrolítica contra o imipenem quando comparada com as outras (QUEENAN; BUSH, 2007; NORDMAN; NAAS, POIREL, 2011).

A detecção de oxacilinas é uma das principais preocupações para controlar a disseminação das carbapenemases da classe D, isso ocorre pela ausência de testes fenotípicos que possam contribuir para a detecção rápida e fácil, principalmente quando se trata das propriedades enzimáticas das OXA do tipo carbapenemase. Além disso, a fraca inibição pelo ácido clavulânico e o tazobactam podem classificá-las erroneamente como pertencentes a classe A (MIRIAGOU, et al., 2010).

2.5 Contexto genético de aquisição e disseminação de genes de resistência

A habilidade das bactérias de mobilizar genes de resistência é considerada o principal fator na evolução das espécies, conferindo vantagens para as células como degradação de diferentes substratos. A transferência de genes pode ocorrer de uma célula para outra através de unidades genéticas móveis (BOERLIN; REID-SMITH, 2008), como plasmídios conjugativos, elementos de transferência horizontal que se movem de uma bactéria a outra, ou cassetes de genes que se mobilizam no genoma através da recombinação por meio de transposons e/ou integrons (BENNET, 2008).

Os plasmídeos são moléculas de DNA extracomossomais, que possuem um papel importante na transferência horizontal da informação genética entre bactérias da mesma, ou de espécies diferentes, por meio da conjugação bacteriana (SORENSEN et al., 2005). Já os integrons são elementos genéticos que possuem a característica de excisar, inserir e rearranjar cassetes gênicos, através de um sistema de recombinação sítio específico. A ampla distribuição de plasmídios e integrons nos cromossomos bacterianos indica que os mesmos desempenham importante papel na disseminação e

acumulação de genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos entre bactérias de um mesmo ambiente (HALL, 2012).

Os genes codificadores das enzimas KPC geralmente estão inseridos em plasmídeos conjugativos, que podem apresentar diferentes tamanhos e agrupados a diversos grupos de incompatibilidade. *K. pneumoniae* produtoras de KPC estão frequentemente relacionadas a surtos em diversos países, sendo que os plasmídeos mais encontrados pertencem ao grupo de incompatibilidade IncN (CARATOLLI, 2009). Apesar disso vários estudos já identificaram a presença do gene *bla*_{KPC} em plasmídeos pertencentes a outros grupos de incompatibilidade. Jiang e colaboradores (2010) detectaram cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos que carregavam plasmídeos do grupo IncF. Calisto e colaboradores (2011), realizaram um estudo sobre a caracterização genética dos elementos envolvidos na mobilização do gene *bla*_{KPC} em enterobactérias e os plasmídeos do grupo IncF foram os mais envolvidos. No Brasil a presença do gene *bla*_{KPC} tem sido relacionada a mais de um tipo de plasmídeo, sendo o grupo IncN o mais prevalente (ANDRADE et al., 2011).

Através da análise do contexto genético do gene *bla*_{KPC} foi determinado que o gene é inserido em um transposon de aproximadamente 10 KB denominado Tn4401. A estrutura desse elemento genético compreende a presença de um gene de transposase, um gene de resolvase e duas sequências de inserção, que podem estar relacionadas com a alteração da expressão dos genes e o nível de resistência das cepas aos carbapenêmicos. Essa estrutura conta ainda com uma região não conservada responsável pela origem de diferentes isoformas que se diferenciam pela deleção de alguns pares de base (CHEN et al., 2012). Um estudo realizado por Andrade e colaboradores (2011) sobre a disseminação do gene *bla*_{KPC-2} em espécies de enterobactérias de diferentes regiões brasileiras demonstrou que principalmente as isoformas "a" e "b" do transposon Tn4410 estão envolvidas nos surtos hospitalares.

Os integrons são elementos genéticos que possuem a característica de excisar, inserir e rearranjar cassetes gênicos, através de um sistema de recombinação sítio específico. A ampla distribuição dessas estruturas nos cromossomos bacterianos indica que os mesmos desempenham importante papel na disseminação e acumulação de genes que conferem resistência a diferentes classes de antimicrobianos entre bactérias de um mesmo ambiente (HALL, 2012). Embora não possuam autonomia de movimentação, estão frequentemente associados a outros elementos genéticos que por sua vez apresentam mobilidade, como plasmídeos e transposons. Podem ser divididos em

integrons de classe 1, classe 2, classe 3 e classe 4, sendo que todos possuem a mesma integrase, porém com diferentes cassetes gênicos (STALDER, et al, 2012). A estrutura básica desses elementos é formada por uma região conservada denominada 5'CS, seguida por uma região variável que contém os cassetes gênicos que variam de tamanho e sequência. A região conservada é formada por um gene codificador de uma recombinase sítio-específica, denominada *IntI*, e por um sítio de recombinação denominado *attI*, localizado a frente do gene da integrase. A integrase reconhece o sítio de recombinação e insere os cassetes gênicos nessa região (DOMINGUES; SILVA; NIELSEN, 2012). A figura 3, demonstra a forma esquemática de organização de um integron classe 1.

A expressão dos cassetes inseridos no integron de classe 1 é controlada por um promotor conhecido como P_c , e outro denominado P_{ant} , que se encontra localizado antes do sítio de recombinação, responsável pela expressão do gene da integrase. Além desses promotores, alguns integrons possuem um segundo promotor, conhecido como P_2 , entretanto na maioria dos integrons identificados este promotor parece inativo (HALL; COLLINS, 1998).

Os integrons de classe 1 são formados por duas regiões conservadas. Além da região conservada 5'CS, eles possuem adicionalmente uma outra região conservada, localizada adjacente aos cassetes gênicos inseridos. Essa região é denominada 3'CS geralmente formada pela região *qacΔI*, a qual confere resistência a compostos quaternários de amônia, e a região *sulI*, responsável pela resistência a sulfonamidas (HALL; COLLINS, 1998).

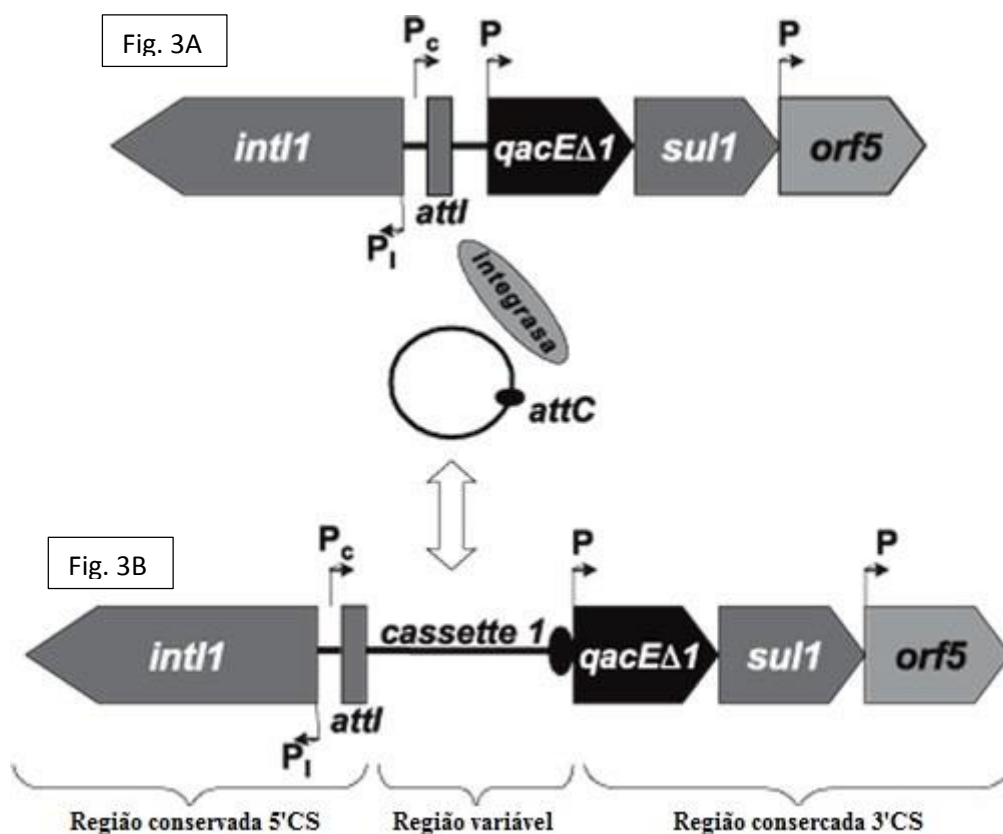


Figura 3. Representação esquemática da estrutura de um integron de classe 1 (Figura 3A). Aquisição de cassetes gênicos de resistência (Figura 3B). *Int1 I*: gene codificador da integrase; *attI*: sítio de recombinação específica; P_I : promotor responsável pela expressão da integrase; P_c : promotor responsável pela transcrição dos genes cassetes; *attC*: sítio de recombinação dos cassetes gênicos. Adaptado de González, et al, 2004.

Espécies de esterobactérias produtoras de MBLs apresentam seus genes frequentemente inseridos em integrons de classe 1, facilitando a rápida disseminação desses genes. Hu e Zhao (2009) identificaram integrons carreadores de *bla*_{IMP-1} e *bla*_{IMP-10} em cepas de *S. marcescens*. Os integrons identificados nesse estudo foram caracterizados como de classe 1, e além de conter as região conservadas apresentavam em sua região variável dois genes cassetes *bla*_{IMP} and *aac(69)-IIc*. Ode e colaboradores (2009) identificaram cepas de *K. oxytoca* produtora de IMP-1 cujo integron apresentava os genes cassetes *aac(6)-IIc - aadA2*, que promovem resistência a quinolonas e aminoglicosídeos. Em 2012 foi isolada a primeira cepa de *K. pneumoniae* produtora de IMP-4 e a análise do contexto genético demonstrou que o gene estava inserido em um

integron de classe 1, seguido de duas sequências de leitura aberta (ORFs) diferentes (LI et al., 2012).

2.6 Epidemiologia Molecular

A detecção laboratorial de bactérias produtoras de β -lactamases contribui para a escolha de terapia antimicrobiana apropriada e, principalmente, para a implementação de medidas de controle de infecção hospitalar (DOYLE et al., 2012). A genotipagem de cepas bacterianas envolvidas em surtos de infecção hospitalar dão subsídios para acompanhar a evolução dos mecanismos de multiressistência, servindo de base para traçar medidas de contenção, além de auxiliar na escolha por terapias mais adequadas no controle das infecções hospitalares. Associado a detecção molecular, estudos epidemiológicos tornaram-se cada vez mais importantes a fim de identificar possíveis surtos de bactérias envolvidas em infecções nosocomiais intra e inter-hospitalar (WANG et al., 2007; BARANIAK et al., 2009; KITCHEL et al., 2009; PEREZ et al., 2013).

A disseminação de enterobactérias produtoras de enzimas codificadas por genes de resistência tornou-se um grande desafio para a Saúde Pública e vários estudos relatam a rápida disseminação mundial de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 (MATHERS, et al., 2011). Um estudo realizado por Gómez e colaboradores (2011) realizou a análise do perfil clonal de cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenêmicos de um hospital de Nova Jersey e os resultados demonstraram que os isolados clínicos apresentavam clones com 100% de similariedade com isolados identificados em outros estados.

Woodford e colaboradores (2004) realizaram um estudo utilizando a técnica de eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE) para avaliar um surto causado por *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos produtoras de KPC-3 envolvendo 24 pacientes em Nova York, sendo identificado um clone predominante em 19 pacientes. Em 2010 foi descrito um surto de *K. pneumoniae* ocorrido em um hospital da Grécia, onde 50 isolados foram identificados com 4 diferentes estirpes clonais, sendo que um único clone representava 41 isolados (82%) (SOULI et al., 2012). No Brasil o primeiro estudo com *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos utilizando a técnica de PFGE, revelou que as cepas eram geneticamente relacionadas, evidenciando a presença de um único perfil clonal (MOTTEIRO et al., 2009). Peirano e colaboradores (2009) avaliaram por PFGE cepas de *K. pneumoniae* recuperadas de dois hospitais do Rio de Janeiro. Os

resultados demonstraram dois perfis clonais, sendo que dois isolados recuperados de hospitais diferentes mostraram similariedade de 96 a 100%. A semelhança entre os dois grupos clonais identificados foi de 67,03%. Embora esse estudo tenha sido realizado com um número relativamente reduzido de isolados as análises de PFGE demonstraram a disseminação clonal de amostras produtoras de carbapenemases de diferentes centros médicos.

Beirão e colaboradores (2011) realizaram um estudo para caracterizar clínica e microbiologicamente surtos causados por *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases. Das seis amostras isoladas, três apresentaram perfis clonais distintos. Quatro destes isolados foram considerados indistinguíveis, enquanto dois não demonstraram similariedade genética com um dos isolados recuperado de um paciente internado em uma instituição de saúde diferente. No Brasil um estudo de epidemiologia molecular com 133 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 isoladas de todas as regiões brasileiras: região sul (Santa Catarina), região sudeste (Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais), região norte (Amazonas), região nordeste (Pernambuco, Alagoas, Ceará e Piauí) e região centro-oeste (Goiás e Distrito Federal), identificou com o PFGE 22 perfis clonais. O mesmo estudo utilizando o *Multilocus sequence typing* (MLST), identificou 22 tipos de sequências (ST) diferentes (PEREIRA et al., 2013). Vários estudos relatam que as cepas isoladas em hospitais brasileiros pertencem a um complexo clonal onde, o clone endêmico ST258 disseminado mundialmente está incluído (ANDRADE et al., 2011).

Estudos utilizando o MLST identificaram cepas de *K. pneumoniae* com predominância de clones do tipo ST258, sendo encontradas inicialmente nos Estados Unidos da América (EUA) e dez estados do país. Essas estirpes já foram descritas em outros países da América do Norte, Europa e Ásia. Vingicar e colaboradores (2001), demonstraram que cepas de *K. pneumoniae* isoladas em um hospital de Londres apresentavam 65% de similariedade à cepas referidas pelo *Health Protection Agency's Centre for Infections*. O estudo ainda identificou que os clones não pertenciam ao tipo ST258 e sim a um variante denominado ST11. A ST11 foi identificada pela primeira vez em *K. pneumoniae* na França, porém esta estirpe atualmente é predominante na China, Coréia do Sul e Hungria, mas já foram registrados relatos desse clone na Holanda, Noruega, Polônia, Portugal e Espanha. No Brasil foram identificados casos esporádicos da ST11 causando surtos, porém sua identificação ocorreu em diferentes cidades do país (BARANIACK, et al., 2009; BOGAERTS, et al., 2010).

2.7 Conclusão

Nos últimos anos a crescente resistência antimicrobiana em enterobactérias responsáveis por infecções hospitalares tornou-se um grande desafio à Saúde Pública. Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases representam um dos mais importantes problemas de resistência bacteriana de cepas de interesse clínico, pois conferem resistência à maioria dos beta-lactâmicos, diminuindo as opções terapêuticas. Pelo fato dos genes que codificam essas enzimas estarem inseridos em elementos genéticos móveis e serem facilmente transferidos, os relatos da ocorrência de surtos tornaram-se cada vez mais comuns no ambiente hospitalar, tornando a sua pesquisa um fator relevante a fim de restringir a sua disseminação. Diante disso estudos de mecanismos de resistência a β -lactâmicos, são importantes na busca do controle de infecções hospitalares causadas por microrganismos multirresistentes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Caracterizar fenotipicamente e genotipicamente cepas de enterobactérias resistentes a carbapenêmicos isoladas de pacientes atendidos em um hospital público de Dourados/MS e identificar os fatores de riscos associados à aquisição de infecções causadas por estas bactérias

3.2 Objetivos Específicos

- Identificar fenotipicamente cepas de *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.* resistentes a carbapenêmicos e avaliar a suscetibilidade antimicrobiana.
- Identificar os genes produtores de β -lactamases em *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.* através das técnicas de PCR e sequenciamento.
- Avaliar as características genéticas envolvidas na resistência a carbapenêmicos de cepas de *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.*
- Avaliar o perfil clonal das cepas de *Klebsiella sp.* e *Serratia sp.* produtoras de KPC por eletroforese em gel de campo pulsado (PFGE).
- Identificar os fatores de risco associados à infecção por *Klebsiella sp.* produtora de KPC em pacientes internados em um hospital público de Dourados.

1 **4. ARTIGO 1**

2

3 **Co-Production of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia***
4 ***marcescens* (Sme) isolated from an Outbreak in a Brazilian hospital.**

5

6 ¹Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grasso do Sul,
7 Brazil

8 ²Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, Brazil

9 ³Hospital Universitário de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil

10

11 *Corresponding author:

12 Simone Simionatto (S. Simionatto)

13 Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande
14 Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Cidade Universitária S/N, Caixa Postal
15 533, CEP 79.804-970, Dourados, MS, Brazil.

16 E-mail: simonesimionatto@ufgd.edu.br

17

18 **Short running title: Co-Production of KPC-2 and IMP-10 in *Serratia marcescens***

19

20

21

22

23 **ABSTRACT**

24 **Objective:** Describe herein the microbiological characterization of what was, to our
25 knowledge, the first KPC-2 and IMP-10-producing *Serratia marcescens* clone causing
26 an outbreak in a Brazilian hospital.

27 **Methods:** An outbreak caused by carbapenem-resistant *S. marcescens* isolates occurred
28 in a Brazilian teaching hospital between September/2011 and February/2013. Bacterial
29 identification and antimicrobial susceptibility profile were performed by MALDI-TOF
30 MS and broth microdilution, respectively. Screening for carbapenemase production was
31 accessed by Modified Hodge Test and MALDI-TOF MS ertapenem assay. The presence
32 of β -lactamase encoding genes was evaluated by PCR and DNA sequencing. Genetic
33 relatedness was performed by PFGE. The entire class 1 integron harboring the *bla*_{IMP-10}
34 was molecularly characterized and conjugation assay was performed using the
35 *Escherichia coli* J53 as the recipient strain.

36 **Results:** A total of 30 carbapenem-resistant *S. marcescens* isolates were studied.
37 Twenty-four of 30 isolates carried the *bla*_{KPC-2} and among them *bla*_{IMP-10} was also
38 detected in six isolates. All *S. marcescens* isolates were clonally related. High resistance
39 rates to β -lactams, aminoglycosides and polymyxin B were observed among the KPC-2
40 and IMP-10-producing *S. marcescens* isolates. Tigecycline was the only antimicrobial
41 that remained active against these strains. Although *bla*_{IMP-10} was located as a gene
42 cassette of a new integron (In990), it could not be successfully transferred by
43 conjugation as *bla*_{KPC-2} did.

44 **Conclusion:** We report the acquisition of *bla*_{IMP-10} by an epidemic strain of KPC-2-
45 producing *S. marcescens*. The spread of carbapenemase encoding genes among
46 pathogens intrinsically resistant to polymyxins is a cause of great concern, since
47 drastically reduces the therapeutic options available for treatment of such infections.

48 INTRODUCTION

49 *Serratia marcescens* is a common pathogen involved in serious nosocomial
50 infections affecting several body sites, such as meningis, blood and lungs, with a
51 significant impact on morbidity and mortality rates.^{1,2} In general, carbapenems are the
52 main therapeutic options to treat these infections,³ since *S. marcescens* isolates
53 frequently exhibit resistance to broad-spectrum cephalosporins due to overproduction of
54 chromosomally encoded AmpC enzyme and/or acquisition of plasmid-borne extended-
55 spectrum β -lactamases (ES β LS).⁴⁻⁶ However, the emergence of carbapenem-resistant *S.*
56 *marcescens* strains in many countries has jeopardized the clinical use of carbapenems.⁷⁻⁹

57 The mechanisms of carbapenem resistance in *S. marcescens* are related to loss of
58 porins coupled with AmpC overexpression,^{10,11} or mainly by the production of Ambler
59 class A (KPC and SME types) or class B metallo- β -lactamases (M β LS; IMP and VIM)
60 carbapenemases.^{7,8,12,13} In addition, although the production NDM-1 or OXA-48 has
61 been described in *S. marcescens* clinical isolates,^{14,15} carbapenem resistance rates are
62 still low in this pathogen, when compared to other Enterobacteriaceae species.¹⁶
63 However, the spread of carbapenem-resistant *S. marcescens* isolates in the nosocomial
64 environment is worrying since this pathogen is intrinsically resistant to polymyxins,
65 drugs of last resort for treatment of infections caused by multi-drug resistant Gram-
66 negative bacilli.¹⁷

67 So far, a few Brazilian studies reported the production of KPC-2 in carbapenem-
68 resistant *S. marcescens* isolates in hospitals located in the South and Northeast
69 Brazilian geographic regions.^{18,19} We describe herein the microbiological
70 characterization of what was, to our knowledge, the first KPC-2 and IMP-10-producing
71 *S. marcescens* clone that caused an outbreak in a teaching hospital located in the
72 Middle-West Brazilian region.

73 MATERIALS AND METHODS

74 **Bacterial strains.** A total of 30 carbapenem-resistant *S. marcescens* isolates were
75 isolated from patients hospitalized at intensive care units (ICUs) of a tertiary teaching
76 hospital located in the city of Dourados, Mato Grosso do Sul, a Middle-West Brazilian
77 state, between September/2011 and February/2013. Strains isolated from the same
78 patients, on different days of isolation or body site of infections, were included in this
79 study. Identification and patients' demographic characteristics were recorded. Species
80 identification was performed by Vitek[®] 2 automated system (bioMérieux, Hazelwood,
81 MO), according to the manufacturer's recommendations, and confirmed by matrix-
82 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF
83 MS), using the Microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA), as
84 previously published.²⁰

85

86 **Antimicrobial susceptibility testing.** The minimal inhibitory concentrations (MICs)
87 were determined by broth microdilution according with the Clinical and Laboratory
88 Standards Institute (CLSI) guidelines,²¹ except for tigecycline that was determined by
89 Etest strips (bioMérieux, Marcy l'Étoile, France), according to the manufacturer's
90 recommendations. The following antimicrobials were tested: cefotaxime, ceftazidime,
91 ceftriaxone, cefepime, aztreonam, ertapenem, imipenem, meropenem, amikacin,
92 gentamicin, ciprofloxacin, levofloxacin and polymyxin B. The powders of antimicrobial
93 agents were purchased from Sigma-Aldrich (Sigma, Steinheim, Germany). *Escherichia*
94 *coli* ATCC 25922 and *P. aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains.
95 The susceptibility results were interpreted according with the CLSI breakpoints.²²

96

97 **Molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).** Among the KPC-2-
98 producing *S. marcescens* strains, genetic similarity using the restriction enzyme SpeI
99 (New England BioLabs, Ipswich, MA, USA) was carried out by PFGE. The restriction
100 fragments were separated on a 1% (w/v) agarose gels in 0.5% TBE buffer in a CHEF-
101 DR II Mapper electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) for
102 19 h at 14°C using a *pulse ramping* rate changing from 5 to 60 s at 6 V/cm, as described
103 elsewhere.²³ The restriction patterns were evaluated and interpreted using BioNumerics
104 software (version 3.0; Applied Maths, Ghent, Belgium). Dendrogram and cluster
105 analysis were performed using algorithms available within the BioNumerics software
106 package v.6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Percent similarity
107 between different chromosomal fingerprints was scored by the Dice coefficient.²⁴ The
108 unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA) was used to obtain the
109 dendrogram accepting a 1.00% tolerance limit.

110

111 **Phenotypic assays for carbapenemase production.** Preliminary screening for the
112 presence of carbapenemases was performed by the Modified Hodge Test (MHT)
113 according to CLSI guidelines.²² The positive results obtained by the MHT were
114 confirmed by ertapenem hydrolysis by MALDI-TOF - MS, as previously published.²⁵

115

116 **PCR amplification for detection of β -lactamase encoding genes, analysis of the**
117 **genetic environment and sequencing.** The presence of β -lactamase encoding genes
118 (*bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-}
119 *like*, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{VIM-like}, *bla*_{SIM-like}, *bla*_{GIM-}
120 *like*, *bla*_{NDM-like} and *bla*_{OXA-48-like}) was evaluated by PCR using specific primers, as
121 described previously.²⁶⁻³⁰ The integrons carrying the *bla*_{IMP-10} gene were amplified by

122 PCR and sequenced using the previously published specific primers targeting the 5'
123 conserved sequences (CS) and 3' CS.^{31,32} PCR products were purified using the
124 QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to manufacturer
125 instructions. Quantification of genomic DNA was determined by optical density in a
126 digital NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Canada). After the
127 measurement, approximately 70 ng of DNA was subjected to preparatory sequencing
128 reaction using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems,
129 Foster City, USA). Bidirectional DNA sequencing was performed using an ABI 3500
130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Perkin Elmer, USA). The DNA sequences
131 obtained and the derived protein sequences were analyzed using the Laser gene
132 Software Package (DNASTAR, Madison, USA) and then compared with the sequences
133 deposited in the GenBank.

134

135 **Plasmid analysis, hybridization and conjugation experiments.** Plasmid extraction
136 was performed by the Kieser protocol.³³ *E. coli* NCTC50192 and NCTC50958 strains
137 were used as plasmid molecular weight. DNA-DNA hybridization of plasmid DNA was
138 performed with a Southern blot using a Hybond™-N⁺ nylon transfer membrane (GE
139 Healthcare, Little Chalfont, UK). Labeling of the *bla*_{KPC-2} and *bla*_{IMP-10} specific probes
140 and signal detection were carried out using the DIG DNA Labeling and Detection Kit
141 (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) according to the manufacturer's
142 instructions. Conjugation assays using the azide-resistant recipient *E. coli* J53 strain
143 were performed to determine the transfer of *bla*_{KPC-2}- and *bla*_{IMP-10}-carrying plasmids as
144 previously published. Transconjugant clones were screened on MacConkey agar plates
145 supplemented with azide (100 mg/L) and ampicillin (100 mg/L). β-lactamase encoding
146 genes were detected by PCR amplification, as described above.

147 **Statistical analysis.** All clinical data were entered into the electronic data base Redcap
148 (Research Electronic Data Capture) and analyzed using SAS version 9.1 (SAS Institute,
149 Cary, NC, USA). Univariate logistic regressions were conducted to identify the factors
150 associated with the co-production of KPC-2 and IMP-10 in *S. marcescens* isolates.
151 Variables were included in the model if they achieved a significant level of $P < 0.20$ in
152 the univariate analysis.

153 **RESULTS**

154 **Outbreak description.** The university hospital of Dourados provides 177 triple-
155 patient rooms for standard care units and 45 beds of intensive care units. Since
156 May/2011, the hospital have been experienced a dissemination of KPC-2-producing
157 isolates, mainly, *K. pneumoniae*, and eventually *Enterobacter* spp. As part of the control
158 measures, surveillance cultures are obtained weekly from patients hospitalized at the
159 ICUs. A carbapenem-resistant *S. marcescens*, the index strain, was isolated from the
160 tracheal aspirate of an ICU patient, on September 25th, 2011. Other 29 carbapenem-
161 resistant *S. marcescens* were subsequently recovered from 23 patients hospitalized at
162 different ICUs, including pediatric and neonatal ICUs, during the study period. Among
163 them, 60.9% (n=14) were from male patients. The patients' age ranged from 1 to 85
164 years, and the medium length of hospital stay was 66 days (15-180 days). Prior to the
165 isolation of carbapenem-resistant *S. marcescens*, all patients had received antimicrobial
166 therapy, which included penicillins, broad-spectrum cephalosporins, carbapenems,
167 fluoroquinolones and/or aminoglycosides. All patients were previously receiving at
168 least one β -lactam, especially cephalosporins and/or carbapenens (n=21/91.3%), except
169 for a single patient who had received monotherapy with fluoroquinolone. Among the 30
170 *S. marcescens* isolates studied, 20 were identified as a true pathogens, while the
171 remaining 10 isolates were identified as colonizers, respectively (Table 1). The majority
172 of isolates were recovered from tracheal secretion (40%), followed by urine (20%),
173 blood (10%), intravenous catheter (10%), rectal swabs (7%), nasal swabs (7%), and
174 surgical wounds (6%). According with the univariate analysis, the infections caused by
175 KPC-2 and IMP-10 co-producing *S. marcescens* isolates were associated with diabetes,
176 alcoholism, substance abuse, hypertension, previous hospital admission and earlier use
177 of antibiotics (Table 2). The analysis of patient's outcomes revealed that KPC-2 and

178 IMP-10 co-producing *S. marcescens* infected patients had a higher mortality rates
179 compared to those with KPC-2-producing *S. marcescens* isolates, 100% and 22.2% ($P =$
180 <0.01), respectively.

181

182 **Microbiological features.** A total of 30 *S. marcescens* isolates were resistant to
183 ertapenem (MIC_{50} , >16 mg/L), imipenem (MIC_{50} , >8 mg/L) and meropenem (MIC_{50} ,
184 >8 mg/L), according to susceptibility test by broth microdilution. All 24 carbapenem-
185 resistant *S. marcescens* isolates were classified as carbapenemase producers by the
186 MHT and MALDI-TOF MS and showed to codify bla_{KPC-2} . bla_{IMP-10} was also detected
187 in six of these 24 isolates (Table 3). All 24 KPC-2-producing *S. marcescens* strains
188 exhibited a similarity superior to 94.1%, including those that co-produced IMP-10, as
189 showed on the dendrogram analysis (Figure 1). The susceptibility testing results by
190 broth microdilution for the six *S. marcescens* isolates co-producing KPC-2 and IMP-10
191 were as following as: cefotaxime (MIC_{50} , >256 mg/L), ceftriaxone (MIC_{50} , >256 mg/L),
192 ceftazidime (MIC_{50} , >256 mg/L), cefepime (MIC_{50} , >256 mg/L); aztreonam (MIC_{50} ,
193 >32 mg/L), ertapenem (MIC_{50} , >32 mg/L), imipenem (MIC_{50} , >16 mg/L), meropenem
194 (MIC_{50} , >8 mg/L), amikacin (MIC_{50} ; >64 mg/L) and gentamicin (MIC_{50} , >64 mg/L).
195 Decreased susceptibility was observed for the fluoroquinolones, such as, ciprofloxacin
196 (MIC_{50} , 4 mg/L) and levofloxacin (MIC_{50} , 4 mg/L). As expected, high MICs to
197 polymyxin B (MIC_{50} , > 64 mg/L) were observed for all *S. marcescens* isolates tested.
198 Tigecycline (MIC_{50} , 0.5 mg/L) was the only antimicrobial agent tested with activity
199 against the carbapenem-resistant *S. marcescens* isolates.

200 The sequencing analysis of genetic context demonstrated that the M β L encoding
201 bla_{IMP-10} gene was inserted into a new class 1 integron, named In990, which contained
202 5'-CS *intI1* and 3'-CS *qacE1/sul1* genes (GenBank under accession number X). bla_{IMP-}

203 $_{10}$ was harbored as the first gene cassette of *In990*, immediately downstream of the 5'
204 CS, followed by two aminoglycoside-modifying enzymes (AMEs) encoding genes
205 *aac(6')-31* and *aadA1*. The *bla*_{IMP-10} gene was preceded by a weak P1 promoter
206 (TGGACA(N)₁₇TAAGCT) and an inactive P2 promoter (TTGTTA(N)₁₄TACAGT).
207 According to the southern blot and hybridization assays the *bla*_{KPC-2} gene was inserted
208 into a conjugative 101.9-kb plasmid in all 24 carbapenem-resistant *S. marcescens*
209 isolates and was successfully transferred to *E. coli* J53 strain by conjugation, while the
210 *bla*_{IMP-10} gene was located into a different plasmid size of 150.7-kb in the six *S.*
211 *marcescens* strains. However, this plasmid was not successfully transferred by
212 conjugation despite many attempts.

213 **DISCUSSION**

214 *S. marcescens* is intrinsically resistant to many antimicrobial agents,³⁴ including
215 polymyxins,¹⁷ and is capable of acquiring multiple mechanisms of drug resistance
216 during antimicrobial therapy.^{1,2} In Brazil, resistance to carbapenems is rarely reported in
217 *S. marcescens*, and exclusively associated with KPC-2 production.^{18,19,37} The first
218 Brazilian report of KPC-2-producing *S. marcescens* occurred in Rio de Janeiro in
219 2011,³⁵ two years after the first report of KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolate in our
220 country.³⁶ In 2013, Ribeiro and colleagues reported that only 14 of 345 (4%)
221 Enterobacteriaceae clinical isolates with reduced susceptibility to carbapenems collected
222 from 11 hospitals of the southern region of Brazil possessed *bla*_{KPC-2}. Among them,
223 three KPC-2-producing *S. marcescens* isolates were found.¹⁸ In opposite, at the same
224 year, a study conducted by da Costa Guimarães and colleagues reported a small
225 outbreak caused by KPC-2-producing *S. marcescens* isolates in a private hospital of the
226 Northeast region of the country.¹⁹ In the present study, we describe an outbreak caused
227 by KPC-2-producing *S. marcescens* clonally related involving different ICUs of a
228 tertiary teaching hospital located in the Middle-west region of Brazil. Outbreaks of *S.*
229 *marcescens* in ICUs are frequently associated with a significant mortality rates, ranging
230 from 14-60%,^{37,38} which are in accordance with our findings, since the all mortality rate
231 was 39%.

232 Interestingly, six KPC-2-producing *S. marcescens* isolates described in the
233 present study also produced the MβL IMP-10. This enzyme is a variant of IMP-1, since
234 *bla*_{IMP-10} exhibits a single base replacement of G→T at nucleotide 145, which led to an
235 amino acid substitution Val49Phe. In 2002, Iyobe and colleagues described this MβL for
236 the first time in *P. aeruginosa* and *Alcaligenes xylosoxidans* strains isolated from Japan
237 in 1997 and 2000, respectively.³⁹ The authors showed that the single point mutation

238 observed in IMP-10 caused a decrease in its penicillin-hydrolyzing ability compared to
239 IMP-1. In the study of Zhao and colleagues, similar results were found showing that
240 IMP-10 lost its ability to hydrolyze extended-spectrum penicillins, the fourth-generation
241 cephalosporin cefpirome and monobactams, but kept its activity against the third-
242 generation cephalosporins, cefepime and carbapenems.⁴⁰ One year later, the same
243 authors describe the presence of *bla*_{IMP-1} and *bla*_{IMP-10} among *S. marcescens* isolates
244 recovered from a Japanese teaching hospital, in 2000.⁴¹ Both genes were present at the
245 first position of a class 1 integrons (In-*s1* and In-*s2*), followed by the AME encoding
246 gene *aac(69)-IIc*.⁴¹ Similarly, the new In990 differed from the In86, an integron that
247 usually harbors *bla*_{IMP-1},³² only by a single point mutation at the *bla*_{IMP-10} gene. The In86
248 has been described in carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*
249 and *K. pneumoniae* strains that caused distinct outbreaks in many hospitals of the São
250 Paulo state.⁴²⁻⁴⁴ Recently, Chouchani and colleagues found a high diversity of β -
251 lactamase encoding genes among polluted river bacterial isolates in Tunisia, specially
252 *bla*_{IMP-8}, *bla*_{IMP-10} and *bla*_{IMP-13} in *K. pneumoniae* isolates. These findings demonstrated
253 the potential of dissemination and maintenance of these resistant determinants in the
254 environment.⁴⁵

255 Previous studies have been described the co-production of KPC-2 with different
256 variants of IMP, like IMP-4, IMP-8 and IMP-18 in *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* and *P.*
257 *aeruginosa* clinical isolates, respectively,⁴⁶⁻⁴⁸ especially in China. However, to our
258 knowledge, this is the first report of co-production of KPC-2 and IMP-10. The six *S.*
259 *marcescens* isolates co-harboring KPC-2 and IMP-10 were recovered from five patients
260 during six months. These patients were ≥ 50 years old and presented history of previous
261 hospitalization in the ICU for 30 to 90 days, and possessed comorbidities such as
262 diabetes, heart failure, decubitus ulcers, chronic obstructive pulmonary disease,

263 systemic hypertension and cancer. During their hospitalization, they were submitted to
264 central venous catheters, mechanical ventilation or surgical procedures, and received
265 more than five different antibiotics prior to the isolation of *S. marcescens* strains.
266 Therefore, the high mortality rate (100%) verified among this group of patients cannot
267 be attributed only to the presence of KPC-2 and IMP-10-co-producing *S. marcescens*
268 isolates, but also with the unfavorable clinical conditions. Risk factors associated with
269 KPC-2 and IMP-10 co-producing *S. marcescens* infection are similar to those described
270 in association with *S. marcescens* infection.⁷⁻⁴⁹

271 All patients infected by a IMP-10- and KPC-2-producing *S. marcescens* strain
272 was previously hospitalized in a another hospital. The first patient was admitted to our
273 hospital and stay colonized by this strain for six months, which demonstrates the
274 persistence ability of IMP-10 and KPC-2 producing *S. marcescens*. The introduction of
275 this clonal strain in our hospital has been probably attributed to colonization from prior
276 hospitalizations. This observation, which is highly indicative of the possible pre-
277 existing dissemination of such strains in Brazil and their ineffective detection and
278 isolation, is further strengthened by the retrieval of IMP-10 bearing *S. marcescens*
279 strains from patients in our study. Following the initial detection and characterization
280 of this clone, infection control measures were reinforced, rectal surveillance swabs were
281 performed in all patients in the wards and ICUs and no new KPC-2 and/or IMP-10 co-
282 producing strains have been found to date.

283 Although both carbapenemases encoding genes were located in two different
284 plasmids, the *bla*_{IMP-10} gene was not transferred to the recipient *E. coli* J53 strain by
285 conjugation assay, indicating that probably it was not located in a conjugative plasmid,
286 different from what was observed by Hu and Zhao.⁴¹ This finding may be justified in

287 part why the *bla*_{IMP-10} gene has been identified only in six of 24 KPC-2-producing *S.*
288 *marcescens* isolates.

289 In conclusion, to our knowledge, we report for the first time the production of
290 IMP-10 in Brazil, as well as, the co-production of KPC-2 and IMP-10 in *S. marcescens*
291 isolates causing an outbreak in ICUs associated with significant mortality at a teaching
292 Brazilian hospital. The production of both carbapenemases at the same *S. marcescens*
293 strain is very worrisome, since this pathogen is intrinsically resistant to polymyxins.
294 Thus, our findings highlight the urgent need for development of efficacious strategies
295 for prevention and control to counterattack the emergence of multi-drug Gram-negative
296 bacilli.

297 **FUNDING**

298 This work was partially supported by the Brazilian National Research Council (CNPq
299 grants 480949/2013-1) and the Support Foundation for the Development of Education,
300 Science and Technology in the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT grants 05/2011
301 and 04/2012). We are grateful to the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São
302 Paulo (FAPESP) for providing a Post-doctoral grant to R.C. (protocol 2012/15459-6).

303

304 **TRANSPARENCY DECLARATIONS**

305 A.C.G. has recently received research funding and/or consultation fees from
306 AstraZeneca and Merck Sharp & Dhome. Other authors have nothing to declare. This
307 study was presented in part at the 24th European Congress of Clinical Microbiology and
308 Infectious Diseases (ECCMID), in Barcelona, Spain, 10-13 May 2014.

309

310 **ETHICAL APPROVAL**

311 This study was conducted with the approval of the research ethics committee from the
312 Universidade Federal da Grande Dourados (no.039439/2012).

313 **REFERENCES**

- 314 1. Iosifidis E, Farmaki E, Nedelkopoulou N, Tsivitanidou M, Kaperoni M,
315 Pentsoglou V, Pournaras S, Athanasiou-Metaxa M, Roilides E. Outbreak of
316 bloodstream infections because of *Serratia marcescens* in a pediatric
317 department. *Am J Infect Control* 2012; **11**: 11-5.
- 318 2. de Vries JJ, Baas WH, van der Ploeg K, Heesink A, Degener JE, Arends JP.
319 Outbreak of *Serratia marcescens* colonization and infection traced to a
320 healthcare worker with long-term carriage on the hands. *Infect Control Hosp*
321 *Epidemiol* 2006; **27**: 1153-8.
- 322 3. Baughman RP. The use of carbapenems in the treatment of serious infections. *J*
323 *Intensive Care Med* 2009; **24**: 230-41.
- 324 4. Ivanova D, Markovska R, Hadjieva N *et al.* Extended-spectrum β -lactamase-
325 producing **Serratia marcescens** outbreak in a Bulgarian hospital. *J Hosp Infect*
326 2008; **70**: 60-65.
- 327 5. Markovska RD, Stoeva TJ, Bojkova KD *et al.* Epidemiology and molecular
328 characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter*
329 spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* isolates from a Bulgarian
330 hospital. *Microb Drug Resist* 2014; **20**: 131-7.
- 331 6. Jacoby GA. AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; **22**: 161-82.
- 332 7. Zhang R, Zhou HW, Cai JC *et al.* Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing β -
333 lactamase KPC-2 in carbapenem-resistant **Serratia marcescens** isolates from
334 Hangzhou, China. *J Antimicrob Chemother* 2007; **59**: 574-6.
- 335 8. Nastro M, Monge R, Zintgraff J *et al.* First nosocomial outbreak of VIM-16-
336 producing *Serratia marcescens* in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2013. **19**:
337 617-9.

- 338 **9.** Mataseje LF, Boyd DA, Delpont J *et al.* *Serratia marcescens* harbouring SME-
339 type class A carbapenemases in Canada and the presence of *bla*_{SME} on a novel
340 genomic island, SmarGI1-1. *J Antimicrob Chemother* 2014; **69**: 1825-9.
- 341 **10.** Suh B, Bae IK, Kim J *et al.* Outbreak of meropenem-resistant *Serratia*
342 *marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction
343 and outer membrane protein loss. *Antimicrob. Agents Chemother* 2010; **54**:
344 5057-61.
- 345 **11.** Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A *et al.* Porin alterations present in non-
346 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels
347 of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol* 2012; **61**: 1270-9.
- 348 **12.** Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS *et al.* SME-type carbapenem-
349 hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse ***Serratia***
350 ***marcescens*** strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; **44**: 3035-9.
- 351 **13.** Osano E, Arakawa Y, Wacharotayankun R *et al.* Molecular characterization of
352 an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of ***Serratia***
353 ***marcescens*** that shows imipenem resistance. *Antimicrob Agents Chemother*
354 1994. **38**: 71-8.
- 355 **14.** Potron A, Poirel L, Bussy F *et al.* Occurrence of the carbapenem-hydrolyzing
356 beta-lactamase gene *bla*_{OXA-48} in the environment in Morocco. *Antimicrob*
357 *Agents Chemother* 2011; **55**: 5413-4.
- 358 **15.** Rubin JE, Peirano G, Peer AK *et al.* NDM-1-producing Enterobacteriaceae from
359 South Africa: moving towards endemicity? *Diagn Microbiol Infect Dis* 2014;
360 **79**: 378-80.
- 361 **16.** Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK *et al.* Antimicrobial susceptibility of Gram-
362 negative organisms isolated from patients hospitalized in intensive care units in

- 363 United States and European hospitals (2009-2011). *Diagn Microbiol Infect Dis*
364 2014; **78**: 443-8.
- 365 **17.** Samonis G, Korbila IP, Maraki S *et al.* Trends of isolation of intrinsically
366 resistant to colistin Enterobacteriaceae and association with colistin use in a
367 tertiary hospital. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014; **33**: 1505-10.
- 368 **18.** Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR *et al.* Molecular characterization of
369 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J*
370 *Med Microbiol* 2013; **62**: 1721-7.
- 371 **19.** da Costa Guimarães AC, Almeida AC, Nicoletti AG, Vilela MA, Gales AC, de
372 Morais MM. Clonal spread of carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates
373 sharing an IncK plasmid containing *bla*_{KPC-2}. *Int J Antimicrob Agents* 2013; **42**:
374 369-70.
- 375 **20.** Fehlberg LC, Andrade LH, Assis DM *et al.* Performance of MALDI-ToF MS
376 for species identification of *Burkholderia cepacia* complex clinical isolates.
377 *Diagn Microbiol Infect Dis* 2013. **77**: 126-8.
- 378 **21.** Clinical Laboratory Standard Institute. *Methods for dilution antimicrobial*
379 *susceptibility test for bacteria that grow aerobically - Ninth edition: Approved*
380 *Standard M7-A9*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012.
- 381 **22.** Clinical Laboratory Standard Institute. *Performance Standards for antimicrobial*
382 *susceptibility testing - Twenty-Four edition. Informational Supplement M100-*
383 *S24*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2014.
- 384 **23.** Silva FM, Carmo MS, Silbert S *et al.* SPM-1-producing *Pseudomonas*
385 *aeruginosa*: analysis of the ancestor relationship using multilocus sequence
386 typing, pulsed-field gel electrophoresis, and automated ribotyping. *Microb Drug*
387 *Resist* 2011; **17**: 215-20.

- 388 **24.** Dice LR. Measures of the amount of ecological association between species.
389 *Ecology* 1945; **26**: 297-302.
- 390 **25.** Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM *et al.* Detection of SPM-1-producing
391 *Pseudomonas aeruginosa* and class D β -lactamase-producing *Acinetobacter*
392 *baumannii* isolates by use of liquid chromatography-mass spectrometry and
393 matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J*
394 *Clin Microbiol* 2013; **51**: 287-90.
- 395 **26.** Poirel L, Héritier C, Tolün V *et al.* Emergence of oxacillinase-mediated
396 resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*
397 2004; **48**: 15-22.
- 398 **27.** Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J *et al.* Rapid detection and identification of
399 metallo-beta-lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and
400 melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 544-7.
- 401 **28.** Picão RC, Poirel L, Gales AC *et al.* Diversity of beta-lactamases produced by
402 ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream
403 infections in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 3908-13.
- 404 **29.** Yong D, Toleman MA, Giske CG *et al.* Characterization of a new metallo-beta-
405 lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on
406 a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from
407 India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 5046-54.
- 408 **30.** Fehlberg LC, da Silva Nogueira K, Cayô da Silva R, Nicoletti AG, Palmeiro JK,
409 Gales AC, Dalla-Costa LM. Detection of PER-2-producing *Enterobacter*
410 *cloacae* in a Brazilian liver transplantation unit. *Antimicrob Agents Chemother*
411 2014; **58**: 1831-2.

- 412 **31.** Mendes RE, Toleman MA, Ribeiro J *et al.* Integron carrying a novel metallo-
413 beta-lactamase gene, *bla*_{IMP-16}, and a fused form of aminoglycoside-resistant
414 gene *aac(6')-30/aac(6')-Ib'*: report from the SENTRY Antimicrobial
415 Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; **48**: 4693-702.
- 416 **32.** Mendes RE, Castanheira M, Toleman MA *et al.* Characterization of an integron
417 carrying *bla*_{IMP-1} and a new aminoglycoside resistance gene, *aac(6')-31*, and its
418 dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian
419 hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; **51**: 2611-4.
- 420 **33.** Kieser T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from *Streptomyces*
421 *lividans* and *Escherichia coli*. *Plasmid* 1984; **12**: 19-36.
- 422 **34.** Mahlen SD. *Serratia* infections: from military experiments to current practice.
423 *Clin Microbiol Rev* 2011; **24**: 755-91.
- 424 **35.** Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC *et al.* Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread
425 of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and
426 plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil.
427 *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 3579-83.
- 428 **36.** Monteiro J, Santos AF, Asensi MD *et al.* First report of KPC-2-producing
429 *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009;
430 **53**: 333-4.
- 431 **37.** Milisavljevic V, Wu F, Larson E *et al.* Molecular epidemiology of *Serratia*
432 *marcescens* outbreaks in two neonatal intensive care units. *Infect Control Hosp*
433 *Epidemiol* 2004; **25**: 719-21.
- 434 **38.** Arslan U, Erayman I, Kirdar S *et al.* *Serratia marcescens* sepsis outbreak in a
435 neonatal intensive care unit. *Pediatr Int* 2010; **52**: 208-12.

- 436 **39.** Iyobe S, Kusadokoro H, Takahashi A *et al.* Detection of a variant metallo-beta-
437 lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and
438 an *alcaligenes xylosoxidans* strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; **46**:
439 2014-6.
- 440 **40.** Zhao WH, Hu ZQ, Shimamura T. Potency of IMP-10 metallo-beta-lactamase in
441 hydrolysing various antipseudomonal beta-lactams. *J Med Microbiol* 2008; **57**:
442 974-9.
- 443 **41.** Hu Z, Zhao WH. Identification of plasmid- and integron-borne *bla*_{IMP-1} and
444 *bla*_{IMP-10} in clinical isolates of *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol* 2009; **58**:
445 217-21.
- 446 **42.** Gales AC, Tognim MC, Reis AO *et al.* Emergence of an IMP-like metallo-
447 enzyme in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain from a Brazilian teaching
448 hospital. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2003; **45**: 77-9.
- 449 **43.** Penteadó AP, Castanheira M, Pignatari AC *et al.* Dissemination of bla(IMP-1)-
450 carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new
451 trimethoprim resistance gene *dfr23*. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2009; **63**: 87-91.
- 452 **44.** Polotto M, Casella T, de Lucca Oliveira MG *et al.* Detection of *P. aeruginosa*
453 harboring *bla*_{CTX-M-2}, *bla*_{GES-1} and *bla*_{GES-5}, *bla*_{IMP-1} and *bla*_{SPM-1} causing
454 infections in Brazilian tertiary-care hospital. *BMC Infect Dis* 2012; **12**:176.
- 455 **45.** Chouchani C, Marrakchi R, Henriques I *et al.* Occurrence of IMP-8, IMP-10,
456 and IMP-13 metallo-β-lactamases located on class 1 integrons and other
457 extended-spectrum β-lactamases in bacterial isolates from Tunisian rivers. *Scand*
458 *J Infect Dis* 2013; **45**: 95-103.

- 459 **46.** Martínez T, Vázquez GJ, Aquino EE *et al.* First report of a *Pseudomonas*
460 *aeruginosa* clinical isolate co-harboring KPC-2 and IMP-18 carbapenemases.
461 *Int J Antimicrob Agents* 2012; **39**: 542-3.
- 462 **47.** Wei Z, Yu T, Qi Y *et al.* Coexistence of plasmid-mediated KPC-2 and IMP-4
463 carbapenemases in isolates of *Klebsiella pneumoniae* from China. *J Antimicrob*
464 *Chemother* 2011; **66**: 2670-1.
- 465 **48.** Li B, Sun JY, Liu QZ *et al.* First report of *Klebsiella oxytoca* strain coproducing
466 KPC-2 and IMP-8 carbapenemases. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**:
467 2937-41.
- 468 **49.** Adamson V, Mitt P, Pisarev H *et al.* Prolonged outbreak of *Serratia marcescens*
469 in Tartu University Hospital: a case–control study. *BMC. Infectious Diseases*
470 2012; **12**: 1-6.

471 **Table 1.** Clinical characteristics of the 23 patients involved in the ICUs outbreak caused by a epidemic KPC-2 producing *S. marcescens* strain.

Patient	Age/Sex	Clinical isolates	Date of admission	Date of isolation	Hospital unit	Length of stay (days)	Place prior to admission/Duration	Outcome	Exposure to antibiotics	Carbapenemase genes
1	60/F	Tracheal aspirates	09/26/2011	10/03/2011	ICU	65	Another hospital	Death	Carbapenems	<i>bla_{KPC-2}</i>
2	63/F	Tracheal aspirates	09/25/2011	10/12/2011	ICU	15	Home	Recovery	Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
3	82/M	Urine culture	10/24/2011	10/28/2011	ICU	180	Another hospital	NA	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}/bla_{IMP-10}</i>
4	1/M	Rectal swab	11/20/2011	11/25/2011	ICUneo	29	Home	Recovery	Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
5	75/F	Scar	09/26/2011	11/29/2011	ICU	24	Another hospital	NA	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
6	76/F	Tracheal aspirates	12/06/2011	12/21/2011	ICU	28	Home	NA	Aminoglycosides/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
7	2/M	Catheter	12/10/2011	12/26/2011	ICUped	90	Home	Recovery	Penicillins	ND
5	75/F	Nasal swab	09/26/2011	12/27/2011	ICU	24	Another hospital	NA	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
5	75/F	Tracheal aspirates	09/26/2011	12/28/2011	ICU	24	Another hospital	Death	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}/bla_{IMP-10}</i>
6	76/F	Blood culture	12/06/2011	01/05/2012	ICU	28	Home	Death	Aminoglycosides/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
8	25/M	Scar	01/02/2012	01/07/2012	ICU	30	Another hospital	Recovery	Fluoroquinolones	<i>bla_{KPC-2}</i>
9	1/M	Urine culture	01/10/2012	01/14/2012	ICUneo	15	Home	Recovery	Cephalosporins	ND
10	62/M	Tracheal aspirates	01/05/2012	01/16/2012	ICU	80	Home	Recovery	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
11	1/F	Blood culture	12/29/2011	02/09/2012	ICUped	90	Home	Death	Cephalosporins	<i>bla_{KPC-2}</i>
12	52/M	Urine culture	01/31/2012	02/13/2012	ICU	90	Another hospital	Death	Aminoglycosides/ Carbapenems	<i>bla_{KPC-2}/bla_{IMP-10}</i>

13	62/M	Urine culture	02/06/2012	02/16/2012	ICU	23	Another hospital	NA	Aminoglycosides/ Carbapenems	ND
14	56/M	Tracheal aspirates	02/08/2012	02/16/2012	ICU	31	Home	NA	Aminoglycosides/ Carbapenems/ Fluoroquinolones	<i>bla</i> _{KPC-2}
15	82/M	Nasal swab	02/08/2012	02/17/2012	ICU	33	Another hospital	Recovery	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla</i> _{KPC-2}
16	62/M	Tracheal aspirates	02/06/2012	02/27/2012	ICU	47	Another hospital	Recovery	Aminoglycosides/ Carbapenems	<i>bla</i> _{KPC-2}
13	62/M	Tracheal aspirates	02/06/2012	03/18/2012	ICU	23	Another hospital	Recovery	Aminoglycosides/ Carbapenems	<i>bla</i> _{KPC-2}
14	56/M	Urine culture	02/08/2012	03/19/2012	ICU	31	Home	Recovery	Aminoglycosides/ Carbapenems/ Fluoroquinolones	<i>bla</i> _{KPC-2}
3	82/M	Urine culture	10/24/2011	04/03/2012	ICU	180	Another hospital	Death	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla</i> _{KPC-2} / <i>bla</i> _{IMP-10}
17	67/M	Tracheal aspirates	03/31/2012	04/16/2012	ICU	90	Another hospital	Death	Aminoglycosides/ Carbapenems	<i>bla</i> _{KPC-2} / <i>bla</i> _{IMP-10}
18	45/M	Rectal swab	03/15/2012	04/20/2012	ICU	28	Another hospital	Death	Carbapenems/ Cephalosporins	<i>bla</i> _{KPC-2}
19	85/F	Tracheal aspirates	04/17/2012	04/23/2012	ICU	43	Another hospital	Death	Aminoglycosides/ Carbapenems	<i>bla</i> _{KPC-2} / <i>bla</i> _{IMP-10}
20	75/F	Blood culture	06/08/2012	06/13/2012	ICU	30	Home	Recovery	Penicillins/ Carbapenems	ND
21	83/F	Tracheal aspirates	06/30/2012	07/04/2012	ICU	27	Home	Recovery	Cephalosporins	<i>bla</i> _{KPC-2}
22	2/F	Catheter	10/09/2012	11/04/2012	ICU	90	Home	Recovery	Cephalosporins	ND
23	1/M	Catheter	01/29/2013	02/09/2013	ICUneo	30	Home	Recovery	Cephalosporins	ND

472 **Abbreviations:** F - Female; M - Male; ICU - General Intensive Care Unit; **ICUped** - Pediatric Intensive Care Unit; **ICUneo** - Neonatal

473 Intensive Care Unit; **NA** - not available; **ND** - not detected.

474 **Table 2.** Risk factors associated with co-production of KPC-2 and IMP-10 in *S.*
 475 *marcescens*.

Risk factors	KPC-2-producing isolates (n=18)/ n° of isolates (%)	KPC-2+IMP-10- producing isolates (n=6)/ n° of isolates (%)	Univariable analysis (<i>p</i>)
Comorbidities			
Diabetes mellitus	3(16.3)	4 (66.6)	0.01
Chronic heart failure	4 (22.2)	1 (16.6)	0.77
Chronic renal failure	1 (1.7)	5 (8.6)	0.55
Alcoholism	1 (5.56)	3 (50.0)	0.01
Substance abuse	3 (15.6)	3 (50.0)	0.01
Pulmonary disease	7 (38.8)	3 (50.0)	0.63
HIV infection	2 (11.1)	1 (16.6)	0.72
Ulcers	1 (5.5)	1 (16.6)	0.39
Cancer	1 (5.5)	1 (16.6)	0.39
Hypertension	8 (44.4)	5 (83.3)	0.09
Hospitalization			
Length of hospital stay	11 (61.1)	4 (66.6)	0.80
Previous hospital admission	6 (33.3)	5 (83.3)	0.01
Previous surgery	6 (33.3)	3 (50.0)	0.46
Previous use of antibiotics	14 (77.7)	6 (100.0)	0.20
Presence of device			
Urinary catheter	3 (16.6)	1 (16.6)	1.00
Mechanical ventilation	9 (50.0)	3 (50.0)	1.00
Central venous catheter	9 (50.0)	2 (33.3)	0.47

477 **Table 3.** Antimicrobial susceptibility patterns, genetic similarity and carbapenemase content of the six KPC-2- and IMP- 10-producing *S.*
 478 *marcescens* isolates.

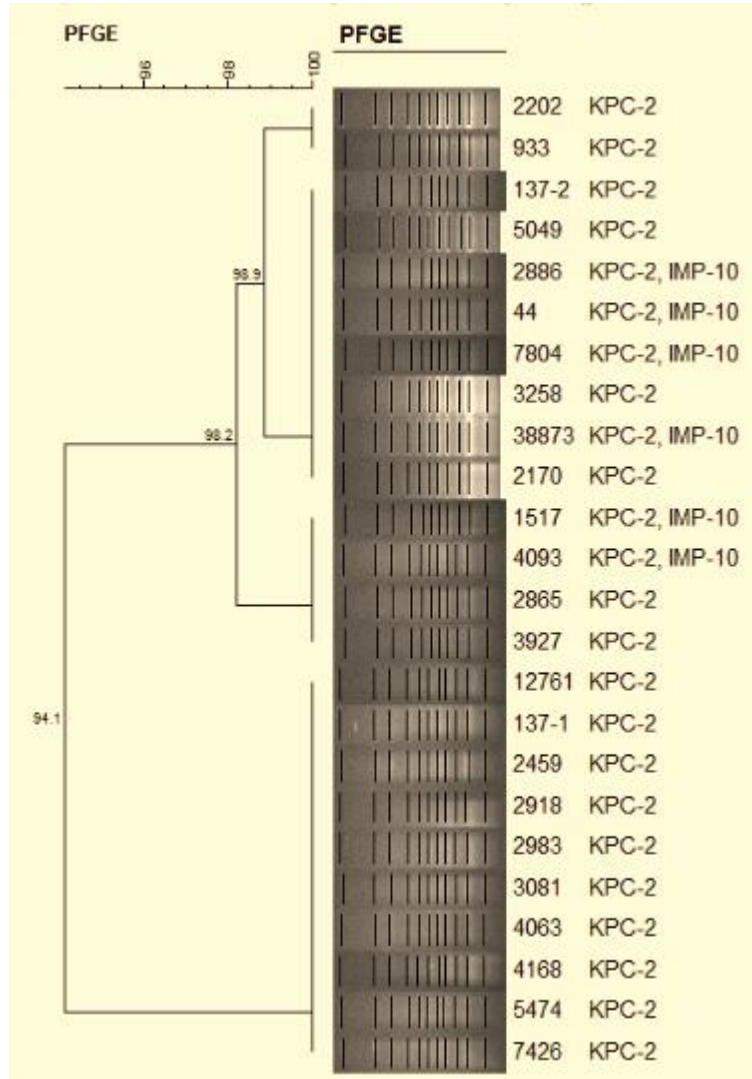
Strain	PFGE	MICs (mg/L)													Genetic location (kb)		
		CAZ	CTX	CRO	FEP	ATM	IPM	MEM	ETP	AMK	GEN	CIP	LEV	TGC	PMB	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{IMP-10}
44	A	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	≥8	≥16	≥32	64	≥64	16	8	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)
1517	A	≥256	≥256	≥256	128	≥32	≥8	≥16	≥32	64	32	4	8	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)
2886	A	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	≥8	≥16	≥32	64	≥64	4	4	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)
4093	A	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	≥8	≥16	≥32	64	≥64	4	4	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)
7804	A	16	64	128	32	≥32	≥8	≥16	≥32	32	2	2	4	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)
37510	A	≥256	≥256	≥256	≥256	≥32	≥8	≥16	≥32	64	2	4	4	0.5	≥64	P ⁺ (101.9)	P ⁻ (150.7)

479 **Abbreviations:** P⁺, conjugative plasmid; P⁻, non-conjugative plasmid; MIC, minimal inhibitory concentration; CEF, cephalothin; CAZ,
 480 ceftazidime; CTX, cefotaxime; CRO, ceftriaxone; FEP, cefepime; ATM, aztreonam; IMP, imipenem; MEM, meropenem; ETP, ertapenem;
 481 AMK, amikacin; GEN, gentamicin; CIP, ciprofloxacin; TGC, tigecycline; PMB, polymyxin B. Kb, kilobase.

482 **FIGURE LEGENDS**

483 **Figure 1.** Dendrogram displaying the genetic relatedness by PFGE and carbapenemase
484 content of 24 carbapenem-resistant *S. marcescens* strains recovered from ICUs.

485



486

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

5. ARTIGO 2.

Molecular Epidemiology study identifies surgery as risk factor associated with KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*

Short running title: Molecular Epidemiology of *Klebsiella pneumoniae*

¹Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

²Universidade Federal de São Paulo - UNIFESP, São Paulo, Brazil.

³Hospital Universitário de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.

*Corresponding author:

Simone Simionatto

Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Rodovia Dourados, Itahum Km 12, Cidade Universitária S/N, Caixa Postal 533, CEP 79.804-970, Dourados, MS, Brazil.

Tel.: +55 67 3410 2225; Fax: +55 67 3410 2225

E-mail address: simonesimionatto@ufgd.edu.br

ABSTRACT

27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

The aim of this study was to describe the molecular characteristics and risk factors associated with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. From May/2011 to May/2013, 68 *K. pneumoniae* strains with resistance or intermediate profile to third-generation cephalosporins were recovered. Species identification was performed with Vitek-2 automatized system and confirmed by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). All strains showed resistances to carbapenem by minimum inhibitory concentration (MIC). Carbapenemase production by Modified Hodge Test (MHT) was detected in 67 *K. pneumoniae* strains and carbapenem hydrolysis by MALDI-TOF MS was detected in 57. PCR amplification and sequencing showed that the *bla*_{KPC-2} gene was present in 57 carbapenem-resistant strains. The *bla*_{KPC-2} gene was not found in 11 carbapenem-resistant *K. pneumoniae*. However, the presence of *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8 like}, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{SHV-like} genes and altered OmpK35 and OmpK36 proteins, were observed. The KPC-producing *K. pneumoniae* showed high genetic similarity in PFGE analysis. To identify risk factors, a case-control study was conducted with 94 patients (47 cases and 47 controls). Longer hospitalizations, use of mechanical ventilation, central venous catheter, urinary catheter and previous surgery were associated with KPC-producing *K. pneumoniae* in the multivariable analysis. Our results show that KPC-producing *K. pneumoniae* is associated with several healthcare-related risk factors and is the first study to demonstrate an association between surgical procedures and KPC. Thus, it is warranted that surveillance of epidemiology of those resistant isolates should be a cause for concern and more intensive efforts to control nosocomial spread of KPC-producing strains are required.

51 INTRODUCTION

52 The emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* has been reported in
53 many countries and has become a matter of great concern (Kaczmarek et al., 2006;
54 Vatopoulos, 2008). They cause numerous diseases, are hard to treat and have the potential to
55 spread within healthcare facilities. Infections with these organisms are associated with high
56 rates of morbidity and mortality (Falagas et al., 2006; Souli et al., 2012). Bacterial resistance
57 to carbapenems may be attributed to three known mechanisms: (i) production of extended-
58 spectrum beta-lactamases combined with decreased outer membrane permeability due to loss
59 or alteration of porins (Jacoby, 2009); (ii) production of a β -lactamase that is capable of
60 hydrolyzing carbapenems; (iii) changes in the affinity of the target enzymes and the penicillin
61 binding proteins (Yigit et al., 2001).

62 However, resistance to carbapenems occurs mainly due to the action of carbapenemase
63 type enzymes. The emergence and dissemination of *K. pneumoniae* harboring carbapenemase
64 type enzymes in various geographic regions pose a significant threat to the control and
65 treatment management of nosocomial infections and have been associated with hospital
66 outbreaks (Gupta et al., 2011; Mathers et al., 2011; Won et al., 2011; Hoenigl et al., 2012).
67 Carbapenemases, including enzymes of Ambler classes A (KPC, GES, and SME types), B
68 (metallo- β -lactamases) (IMP, VIM, and NDM types) and D (OXA-23, OXA-24, OXA-40,
69 OXA-48, and OXA-58) can hydrolyze almost all β -lactams. In addition, the rates of
70 carbapenems resistance among *K. pneumoniae* have dramatically increased (Queenan &
71 Bush, 2007). The most frequently encountered carbapenemase is *Klebsiella pneumoniae*
72 carbapenemase (KPC) (Mathers et al., 2011). The KPC occurs most commonly in *K.*
73 *pneumoniae*, but it has also been reported in other species of *Enterobacteriaceae* (Morris et
74 al., 2011; Leung et al., 2012). Several outbreaks of KPC-producing bacteria have occurred,
75 this can be explained by the fact that the gene encoding the KPC enzyme is normally

76 associated with transposons and often identified in conjugative plasmids, increasing its
77 potential to spread (Gupta et al., 2011) and making this enzyme an international clinical and
78 public health concern (Mathers et al 2011).

79 Although many studies have reported the drug resistance of *K. pneumoniae* worldwide
80 (Kaczmarek et al., 2006; Vatopoulos, 2008; Mathers et al 2011), there is paucity scientific
81 information available on the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains in Mid-Eastern
82 Brazil. To better understand the antimicrobial resistance mechanisms and the risk factors
83 associated with carbapenem-resistant *K. pneumoniae*, a case-control study was performed
84 with 94 patients admitted in a public hospital in Brazil from May/2011 to May/2013 and
85 molecular characteristics of 57 strains were assessed. To comprehend the extent of the
86 reservoir in healthcare facilities may be important for targeted intervention and is of utmost
87 importance to reduce hospital infection.

88 **METHODS**

89 **Bacterial strains.**

90 Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolates were obtained from patients
91 hospitalised at intensive care units (ICUs) of a tertiary teaching hospital located in the city of
92 Dourados in Mato Grosso do Sul, a Central-Western Brazilian state, between May 2011 and
93 May 2013. Strains isolated from 47 patients, collected on different days from different
94 infected anatomic sites, were included in this study. Patients' identification and demographic
95 data were recorded. This study was conducted with the approval of the research ethics
96 committee from the Universidade Federal da Grande Dourados (no.039439/2012).

97

98 **Bacterial identification, susceptibility testing and phenotypic assays**

99 Bacterial species were identified using the VITEK[®] 2 automated system (bioMérieux,
100 Hazelwood, MO), according to the manufacturer's recommendations, and confirmed by
101 matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF
102 MS) using the Microflex LT spectrometer (Bruker Daltonics, Massachusetts, USA), as
103 previously described (Carvalhaes et al., 2013). The minimal inhibitory concentrations (MICs)
104 of antimicrobials were determined by broth microdilution according to the Clinical and
105 Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (CLSI, 2012). The following antimicrobials
106 were tested: ertapenem, imipenem and meropenem. The antimicrobial agents (powder) were
107 purchased from Sigma-Aldrich (Sigma, Steinheim, Germany). *Escherichia coli* ATCC 25922
108 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 were used as quality control strains. The
109 susceptibility results were interpreted according to the CLSI breakpoints (CLSI, 2014).
110 Preliminary screening for the presence of carbapenemases was performed by the modified
111 Hodge test (MHT), according to CLSI guidelines (CLSI, 2012). Positive results obtained with

112 the MHT were confirmed by ertapenem hydrolysis using MALDI-TOF MS, as previously
113 described (Carvalhaes et al., 2013).

114

115 **PCR amplification for detection of β -lactamase encoding genes and sequencing.** The
116 presence of β -lactamase genes (*bla*_{TEM-like}, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like}, *bla*_{CTX-M-8-}
117 *like*, *bla*_{CTX-M-14-like}, *bla*_{GES-like}, *bla*_{KPC-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{IMP-like}, *bla*_{SPM-like}, *bla*_{VIM-like},
118 *bla*_{SIM-like}, *bla*_{GIM-like}, *bla*_{NDM-like} and *bla*_{OXA-48-like}) was evaluated by PCR using specific
119 primers, as previously described (Poirel et al., 2004; Fehlbeg et al., 2014) . The PCR products
120 were purified using the QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France),
121 according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA was quantified by measuring the
122 optical density with a digital NanoVue™ Plus Spectrophotometer (GE Healthcare, Canada).
123 Approximately 70 ng of DNA was used for preliminary sequencing using the BigDye
124 Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, USA). Bidirectional
125 DNA sequencing was performed using an ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems,
126 Perkin Elmer, USA). The DNA sequences and their derived protein sequences were analysed
127 using the Lasergene Software Package (DNASTAR, Madison, USA) and compared to the
128 sequences deposited in GenBank.

129

130 **Molecular typing by pulsed field gel electrophoresis (PFGE).** The genetic relationships
131 among the KPC-2 producing *K. pneumoniae* strains were determined by pulsed-field gel
132 electrophoresis (PFGE), using the restriction enzyme *SpeI* (New England BioLabs, Ipswich,
133 MA, USA). The restriction fragments were separated on a 1% (w/v) agarose gel in 0.5% tris-
134 borate-EDTA buffer in a CHEF-DR II electrophoresis system (Bio-Rad Laboratories,
135 Richmond, CA, USA) for 19 h at 14°C, using a *pulse ramp* rate changing from 5 s to 60 s, at
136 6 V/cm (Silva et al., 2011). The restriction patterns were analysed using the BioNumerics

137 software v.3.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). Percent similarity between
138 fingerprints was scored by the Dice coefficient (Dice, 1945). The unweighted pair group
139 method with arithmetic mean, with a 1.00% tolerance limit, was used to construct a
140 dendrogram. Dendrogram and cluster analysis were performed using the algorithms available
141 within the BioNumerics software package v.6.0 (Applied Maths, Sint-Martens-Latem,
142 Belgium).

143

144 **Outer membrane protein analysis.**

145 The outer membrane proteins (OMPs) of *K. pneumoniae* strains were analyzed by
146 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), using membrane
147 extracts from bacteria grown overnight in nutrient broth and gels were stained with
148 Coomassie blue (Carvalhaes et al., 2010). Altered OmpK35 and OmpK36 encoding genes
149 were investigated by PCR (Correa et al., 2013).

150

151 **Case-control study**

152 To identify risk factors, a case-control study was conducted. A case was defined as a
153 patient having a positive PCR for KPC-producing *K. pneumoniae* during the outbreak period.
154 Controls were patients without positive PCR for *K. pneumoniae*. All medical, nursing, and
155 microbiological records of patients hospitalized during the study period were reviewed.
156 Clinical records from inpatients were reviewed and the following data were recorded:
157 demographics (age, sex); medical history and co-morbid conditions; residence in a healthcare
158 institution prior to hospital admission; location prior to admission; ward of admission;
159 hospital course (duration and ward location); invasive procedures (insertion of central venous
160 catheter, insertion of urinary catheter and surgery) receiving of mechanical ventilation;
161 treatment with immunosuppressors; antibiotic exposure history; source of infection (blood,

162 urinary tract, tissue/wound/graft, abdominal source, respiratory or other) and outcome
163 (recovery/death).

164 Recorded co-morbidities included diabetes mellitus, cardiovascular disease, renal
165 failure, chronic obstructive pulmonary disease, alcoholism, substance abuse, HIV infection,
166 presence of decubitus ulcers, active cancer and hypertension. Both the individual and
167 cumulative numbers of co-morbid conditions were tabulated. All antibiotics administered for
168 ≥ 24 h during the current hospitalization were recorded. The information collected included
169 the drug name, start date, dose, route of administration, dosing frequency and total duration of
170 use. Both individual and cumulative antibiotic exposures were tabulated.

171

172 **Statistical analysis**

173 All clinical data were entered into a Research Electronic Data Capture (Redcap)
174 database, and analysed using SAS v.9.1 (SAS Institute, Cary, NC, USA). Chi-Square was
175 used to identify the factors associated with KPC-producing *K. pneumoniae*.

176 RESULTS

177 Patients of the study and outbreak description

178 The patients were hospitalized in different hospital wards, their ages ranged from 02 to
179 80 years. All patients prior to the isolation of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* had
180 received antimicrobial regimens, which included penicillins, third or fourth generation
181 cephalosporins, quinolones, aminoglycosides, carbapenems and polymyxins. A total of 68
182 carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains were recovered from 47 patients, 2–40 days
183 following admission and 36 of them had a history of previous hospitalization in our facilities
184 or in other hospitals. The remaining patients had no history of previous hospitalization and
185 were admitted to the ICU directly from the emergency room. The 44 strains were isolated
186 from the ICU and 24 of different hospital wards. Among them, 35 (51 %) were obtained from
187 urine culture, 13 (19 %) from swabs, 10 (15 %) from tracheal aspirates, 6 (9 %) from blood
188 culture and 4 (6 %) from surgical wound.

189 There were no significant differences ($P > 0.05$) among cases and controls, with
190 regard to baseline demographic. KPC-producing *K. pneumoniae* infection was associated with
191 long hospitalizations, previous surgery, use of mechanical ventilation, central venous catheter
192 and urinary catheter, by multivariable analysis (Table 1). The analysis of data on outcomes of
193 patients revealed that KPC-producing *K. pneumoniae* patients had a higher mortality
194 compared with patients infected with carbapenem-susceptible *K. pneumoniae* (47.2 % and
195 19.3 %; $P = 0.01$), respectively.

196

197 Susceptibility testing

198 Carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains showed resistance to the antibiotics
199 tested by broth microdilution, as follows: meropenem (MIC₅₀, >8 mg/L), imipenem (MIC₅₀,
200 >16 mg/L) and ertapenem (MIC₅₀, >32 mg/L. Carbapenemase production by MHT was

201 detected in 67 *K. pneumoniae* strains. However, carbapenem hydrolysis by MALDI-TOF MS
202 was detected in 57.

203

204 **Molecular testing and PFGE**

205 PCR amplification and sequencing showed that *bla*_{KPC-2} gene was present in 57
206 carbapenem-resistant strains. The *bla*_{KPC-2} gene was not found in 11 strains. However, the
207 presence of *bla*_{CTX-M-1-like}, *bla*_{CTX-M-2-like} was observed in 10, *bla*_{CTX-M-8 like} in 2, *bla*_{CTX-M-14-like}
208 in 6, and *bla*_{SHV-like} in 6 strains. Eight *bla*_{CTX-M-2} positive strains also carried *bla*_{CTX-M-8 like},
209 *bla*_{CTX-M-14-like} and *bla*_{SHV-like} genes. The presence of *bla*_{GES-like}, *bla*_{SME-like}, *bla*_{NDM-like}, *bla*_{VIM-}
210 *like*, *bla*_{SIM-1}, *bla*_{GIM-1} and *bla*_{OXA-48-like} genes could not be evidenced.

211 Carbapenem hydrolysis and genes encoding carbapenemases were not detected in 11
212 *K. pneumoniae* strains. However, *bla*_{CTX} and *bla*_{SHV} genes were identified and alteration in the
213 OmpK35 and OmpK36 proteins, were investigated. According to the SDS-PAGE results, 11
214 *K. pneumoniae* strains presented two bands, probably corresponding to OmpA and either
215 OmpK35 or OmpK36, suggesting that they have lost porins. PCR analysis of OMP-encoding
216 genes showed altered amplicons of at least one OMP-encoding gene, including a lack of
217 amplification (10 isolates) or enhanced amplicon size (1 isolates). The PCR amplification of
218 the *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV}, *ompk35* and *ompk36* genes are shown in Table 2.

219 PFGE analysis of the 47 KPC-producing *K. pneumoniae* strains identified 33 (70.21
220 %) with the same clonal type, containing greater than 88.80 % similarity. In addition, 72.72 %
221 of these strains were obtained from urine cultures, 82.35 % were isolated from ICU patients.
222 Analysis of data revealed that patients infected with this predominant clonal type had a higher
223 mortality (78.78 %; $P = < 0.01$) compared with other clonal types (Figure 1). Ten KPC-
224 producing *K. pneumoniae* strains isolated from the same patients, on different days and sites
225 of infection, were not included in PFGE analysis.

226 **DISCUSSION**

227 Due to the wide use of antibiotics, carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains are
228 increasing. Global emergence and spread of carbapenemase genes among *K. pneumoniae*
229 strains pose severe challenges to public health (Falagas et al., 2007; Queenan & Bush, 2007;
230 Monteiro et al., 2009). In this study, we investigated the molecular epidemiology, clinical
231 outcomes associated with KPC-producing *K. pneumoniae* and the risk factors associated.
232 During the 24 month study period, 47 patients were diagnosed with healthcare-associated
233 infections caused by carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains in our hospital. The
234 proportion of the KPC positive cases in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains was very
235 high (83.82 %). Furthermore, the multidrug resistance caused by KPC was associated with
236 higher morbidity and mortality rates. Thus, it is warranted that surveillance of epidemiology
237 of those resistant isolates should be a concern.

238 In our study, most KPC-2 positive strains (57 %) were isolated from patients
239 hospitalized in ICU and were receiving aggressive medical interventions with several
240 comorbidities and had been exposed to broad-spectrum antibiotics. These results are in
241 agreement with research that showed prior antimicrobial exposure in hospitalized patients,
242 especially severely ill patients, is the main force driving the spread of carbapenem-resistant
243 organisms (Hernandez-Alles et al., 1999; Falagas et al., 2007; Patel et al., 2008; Hoenigl et
244 al., 2012). Assessment of the factors that predict carbapenem resistance by multivariable
245 analysis demonstrated that longer hospitalizations, use of mechanical ventilation, central
246 venous catheter, urinary catheter and previous surgery, were associated with KPC-producing
247 *K. pneumoniae* infection. These risk factors likely represent severe underlying illness and
248 susceptibility to infection, leading to increased risk of infection with multidrug-resistant
249 organisms. Similar risk factors for KPC have been described. Prior studies demonstrated
250 associations between KPC-producing *K. pneumoniae* infection and length of stay, use of

251 central venous catheter, stay in an ICU, and exposure to specific broad-spectrum
252 antimicrobial agents, such as carbapenems, cephalosporins, fluoroquinolones and penicillins
253 (Maltezou et al., 2009; Tuon et al., 2012; Tumbarello et al., 2014). To the best of our
254 knowledge, this study is the first to show an association between surgical procedures and
255 KPC-producing *K. pneumoniae*. This population of patients with surgery frequently had
256 prolonged hospitalization, which could have increased the risk of infection by KPC. Thus,
257 these results suggest that infection control measures should be reinforced in our hospital to
258 control the spread of KPC enzymes and reduce mortality rates.

259 To analyze the mechanisms of antimicrobial resistance, the phenotypic and molecular
260 analyses from carbapenem-resistant *K. pneumoniae* were performed. *In vitro* antimicrobial
261 resistance to carbapenems was observed in all *K. pneumoniae*. The occurrence of false
262 detection of carbapenemase production by MHT was found in eleven strains. According to
263 Wang and colleagues (2011), the false positive results observed in MHT probably occurred
264 due to low-level hydrolysis of ertapenem by ESBLs, particularly those of the CTX-M type.
265 Although carbapenemase encoding genes were not identified in eleven *K. pneumoniae* strains,
266 *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} genes were detected. The SDS-PAGE results in conjunction with the
267 PCR analysis showed that *ompK35* and *ompK36* were modified in the form of mutations or
268 insertion sequences in all ESBL strains. Therefore, these porin alterations might induce
269 impermeability of outer membrane and may contribute to carbapenem susceptibility decrease
270 in those strains. Increased levels of resistance to carbapenems were very likely caused by
271 decreased expression of outer membrane porins and/or increased efflux as described
272 elsewhere by Correa et al (2013). Our results are in agreement with those found by
273 Carvalhaes and colleagues (2010), which reported carbapenem resistance due to ESBLs
274 production coupled with porins loss.

275 To explore the genetic relationship of KPC-producing *K. pneumoniae* the PFGE
276 results were evaluated. The analysis of 47 KPC-producing *K. pneumoniae* strains identified a
277 predominant clonal type (cluster A), which comprised of 33 strains (74.46 %). A molecular
278 epidemiology study confirmed that outbreak of KPC-producing *K. pneumoniae* was associated
279 to ICU patients (93 %), urine infections (72.72 %) and a high mortality rate (78.78 %).
280 Outbreaks of KPC-producing *K. pneumoniae* isolated from ICU patients have been described
281 (Souli et al, 2010; Tofteland et al, 2010; Yang et al., 2013) with mortality rates range of 52.80
282 % to 66.70 % (Zarcothou et al., 2011; Quereshi et al., 2013). However, our results showed a
283 high mortality rate (78.78 %) associated with the KPC outbreak. Thus, our institution needs to
284 implement an extensive infection control program to contain the dissemination of this virulent
285 pathogen and reduce mortality rates.

286 Our findings showed that KPC-producing *K. pneumoniae* strains were associated with
287 several healthcare-related risk factors and this is the first study to demonstrate an association
288 between surgical procedures and KPC. The early and accurate detection in conjunction with
289 effective infection control measures are of utmost importance for controlling the spread of
290 carbapenemase-producing organisms. Therefore, more intensive efforts for its control in our
291 hospital are required.

292 **ACKNOWLEDGMENTS**

293 This work was partially supported by the Brazilian National Research Council
294 (CNPq grants 480949/2013-1) and the Support Foundation for the Development of
295 Education, Science and Technology in the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT
296 grants 05/2011 and 04/2012).

297

298 **FUNDING**

299 This work was partially supported by the National Council for Science and
300 Technological Development (CNPq grants 480949/2013-1) and the Support Foundation
301 for the Development of Education, Science and Technology in the State of Mato Grosso
302 do Sul (FUNDECT grants 05/2011 and 04/2012). We are grateful to the Fundação de
303 Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) for providing a Post-doctoral
304 grant to R.C. (protocol 2012/15459-6). A. C. G. is a researcher from the CNPq, Ministry
305 of Science and Technology, Brazil (Process number: 307816/2009-5).

306

307 **ETHICAL APPROVAL**

308 This study was conducted with the approval of the research ethics committee
309 from the Universidade Federal da Grande Dourados (no.039439/2012). Dourados
310 (no.039439/2012).

311 **REFERENCES**

312

313 **Carvalhaes, C., G., Cayô, R., Assis, D., M., Martins, E., R., Juliano, R., Juliano, M., A. &**
314 **Gales, A., C. (2013).** Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D
315 β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-
316 Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass
317 Spectrometry. *J. Clin. Microbiol* **51**, 287-290.

318 **Carvalhaes, C., G., Picão, R., C., Nicoletti, A., G., Xavier, D., E. & Gales, A., C. (2010).**
319 Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemases production in *Klebsiella*
320 *pneumoniae*: be aware of false positive results. *J Antimicrob Chemother* **65**, 249–251.

321 **CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third**
322 **Informational Supplement.** CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: Clinical and
323 Laboratory Standards Institute 2013.

324 **Correa, L., Martino, M., D., V., Siqueira, I., Pasternak, J., Gales, A., C., Silva, C.,**
325 **V., Camargo, T., Z., Scherer, P., F. & Marra, A., R. (2013).** A hospital-based matched
326 case–control study to identify clinical outcome and risk factors associated with carbapenem-
327 resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *BMC Infectious Diseases* 13:80.

328 **Falagas, M., E., Rafailidis, P., I., Kofteridis, D., Vartzili, S., Chelvatoglou, F.,**
329 **C., Papaioannou, V., Maraki, S., Samonis G. & Michalopoulos, A. (2007).** Risk factors of
330 carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. *J*
331 *Antimicrob Chemother* **60**, 1124 – 1130.

332 **Gupta, N., Limbago, B., M., Patel, J., B. & Kallen, A. (2011).** Carbapenem-Resistant
333 *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 60-67.

334 **Hernaández-Alle´s, S., Alberti´, S., Alvarez, D., Doménech-Sánchez, A., Martínez-**
335 **Martínez, L., Gil, J., Tomás, J., M. & Benedí, V., J. (1999).** Porin expression in clinical
336 isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145**, 673–679.

337 **Hoenigl, M., Valentin, T., Zarfel, G., Wuerstl, B., Leitner, E., Salzer, H., J., Posch,**
338 **J., Krause, R. & Grisold, A., J. (2012).** Nosocomial Outbreak of *Klebsiella pneumoniae*
339 Carbapenemase-Producing *Klebsiella oxytoca* in Austria. *Antimicrob. Agents Chemoter* **56**,
340 2158-2161.

341 **Jacoby, G., A. (2009).** AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* **22**, 161-82.

342 **Kaczmarek, F. M., Dib-Hajj, F., Shang, W. & Gootz, T. D. (2006).** High level carbapenem
343 resistance in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate is due to the combination of *bla*_{ACT-1} β -
344 lactamase production, porin OmpK35/36 insertional inactivation, and down-regulation of the
345 phosphate transport porin *phoE*. *Antimicrob. Agents Chemother* **50**, 3396–3406.

346 **Leung, V., Loo, V., G., Frenette, C., Domingo, M., C., Bourgault, A., M., Mulvey, M., R.**
347 **& Robson, H., G. (2012).** First Canadian outbreak of enterobacteriaceae-expressing
348 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 3. *Can J Infect dis Med Microbiol* **23**, 117-120.

349 **Mathers, A., J., Cox, H., L., Kitchel, B., Bonatti, H., Brassinga, A., K., Carroll,**
350 **J., Scheld, W., M., Hazen, K., C. & Sifri, C., D. (2011).** Molecular Dissection of an
351 Outbreak of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Reveals Intergenous KPC
352 Carbapenemase Transmission through a Promiscuous Plasmid. *MBio* **2**, 1-7.

353 **Monteiro, J., Santos, A., F., Asensi, M., D., Peirano, G. & Gales, A., C. (2009).** First
354 Report of KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. *Antimicrob. Agents*
355 *Chemoter* **53**, 333-334.

356 **Morris, D., Boyle, F., Ludden, C., Condon, I., Hale, J., O'Connell, N., Power, L., Boo,**
357 **T., W., Dhanji H, Lavallee, C. & other authors. (2011).** Production of KPC-2

358 carbapenemase by an *Escherichia coli* clinical isolate belonging to the international ST131
359 clone. *Antimicrob Agents Chemother* **55**, 4935–6.

360 **Papadimitriou-Olivgeris, M., Marangos, M. & Fligou, F. (2012).** Risk factors for KPC-
361 producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. *J Antimicrob*
362 *Chemother* **67**, 2976–2981.

363 **Patel, G., Huprikar, S., Factor, S., H., Jenkins, S., G. & Calfee, D., P. (2008).** Outcomes
364 of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and
365 adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* **29**, 1099–1106.

366 **Queenan, A., M. & Bush, K. (2007).** Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. *Clin.*
367 *Microbiol. Rev* **20**, 440-458.

368 **Souli, M., Galani, I., Antoniadou, A. Papadomichelakis, E., Poulakou, G., Panagea, T.,**
369 **Vourli, S., Zerva, L., Armaganidis, A. & Kanellakopoulou, K. (2012).** An outbreak of
370 infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumonia carbapenemase 2*-producing *K.*
371 *pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and
372 outcomes. *Clin Infect Dis* **50**, 364 – 373.

373 **Tofteland, S., Nasser, U., Lislevand, J. H., Sundsfjord, A. & Samuelsen O. (2013).** A
374 Long-Term Low-Frequency Hospital Outbreak of KPC-Producing *Klebsiella*
375 *pneumoniae* Involving Intergenous Plasmid Diffusion and a Persisting Environmental
376 Reservoir. *Plos one* **8**, 1-8.

377 **Tumbarello, M., Treccarichi, E. M., Tumietto, F., Del Bono, V., Rosa, F. G., Basetti, M.,**
378 **Losito, A. R., Tedeschi, S., Saffiotti, C. & Corsione, S. (2014).** Predictive Models for
379 Identification of Hospitalized Patients Harboring KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*.
380 *Antimicrob. Agents Chemother* **58**, 3514-3520.

381 **Vatopoulos A. (2008).** High rates of metallo-beta-lactamase producing *Klebsiella*
382 *pneumoniae* in Greece—a review of the current evidence. *Euro Surveillance* **13**, 1-6.

383 **Wang, P., Hu, F. & Xiong, Z. (2011).** Susceptibility of Extended-Spectrum-β-Lactamase-
384 Producing *Enterobacteriaceae* According to the New CLSI Breakpoints. *J Clinical*
385 *Microbiology* **49**, 3127–3131

386 **Won, S., Y., Munoz-Price, S., Lolans, K., Hota, B., Weinstein, R., A. & Hayden, M., K.**
387 **(2011).** Emergence and Rapid Regional Spread of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-
388 Producing *Enterobacteriaceae*. *Clin. Infect. Dis.* **53**, 532-540.

389 **Yang, J., Ye, L., Guo, L., Zhao, Q., Chen, R. Luo, Y., Chen, Y., Tian, S., Zhao, J., Shen,**
390 **D. & Han, L.** A nosocomial outbreak of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a
391 Chinese hospital: dissemination of ST11 and emergence of ST37, ST392 and ST395. *Clinical*
392 *Microbiology and Infection.* **19**, 509-515.

393 **Yigit, H., Queenan, A., M., Anderson, G., J., Domenech-Sanchez, A., Biddle, J.,**
394 **W., Steward, C., D., Alberti, S., Bush, K. & Tenover, F., C. (2001).** Novel Carbapenem-
395 Hydrolyzing b-lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella*
396 *pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemoter* **45**, 1151-1161.

397

398

399

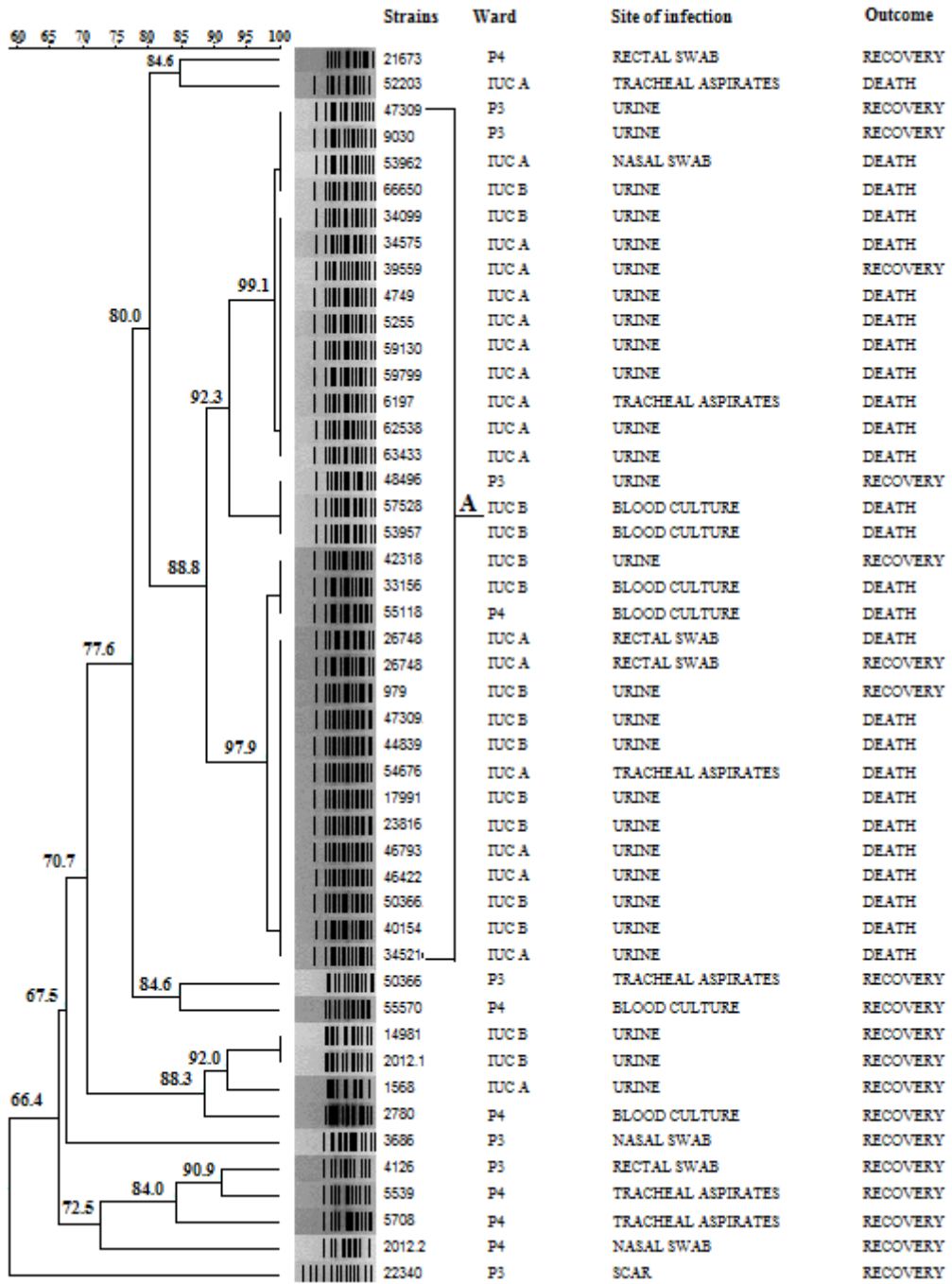
400

401

402

403 Table 1. Summary of risk factors associated with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* infection.

Risk factor	Case patients (n=47)	Controls patients (n=47)	Univariable analysis		Multivariable analysis	
			OR (95% CI)	P	OR (95% CI)	p
Mean Age (years)	60.8	43.6				
Comorbidities						
Diabetes mellitus	10 (21.2)	1 (12.7)	0.54 (0.17-1.63)	0.27		
Chronic heart failure	9 (19.1)	7 (14.8)	0.73 (0.25-2.18)	0.58		
Chronic renal failure	1 (2.3)	4 (8.5)	4.27 (0.45-39.81)	0.16		
Alcoholism	7 (14.8)	2 (4.2)	0.25 (0.04-1.29)	0.07		
Substance abuse	5 (10.6)	3 (6.3)	0.57 (0.12-2.54)	0.45		
Pulmonary disease	24 (51.0)	3 (6.3)	0.06 (0.01-0.24)	<0.01		
HIV infection	1 (2.1)	2 (4.2)	2.04 (0.17-23.34)	0.55		
Ulcers	3 (6.3)	2 (4.2)	0.65 (0.10-4.09)	0.64		
Cancer	7 (14.8)	0 (0.0)	0.85 (0.75-0.95)	<0.01		
Hypertension	10 (21.2)	12 (25.5)	1.26 (0.48-3.30)	0.62		
Hospitalization						
Intensive care unit stay	38 (80.8)	23 (48.9)	0.22 (0.09-0.57)	<0.01		
Length of hospital stay	30 (63.7)	7 (14.8)		<0.01		
Previous hospital admission	32 (68.0)	18 (38.3)	0.29 (0.12-0.68)	<0.01		
Previous surgery	15 (31.9)	2 (4.2)	0.09 (0.02-0.44)	<0.01	35.98 (9.42-137.48)	<0.01
Use of immunosuppressive	0 (0.0)	1 (2.1)	1.02 (0.97-1.06)	0.31		
Previous use of antibiotics	42 (89.3)	18 (38.3)	13.53 (4.51-40.57)	<0.01	13.53 (4.51-40.57)	
Presence of device						
Urinary catheter	15 (31.9)	3 (6.3)	0.14 (0.03-0.54)	<0.01	37.55 (9.61-146.69)	<0.01
Mechanical ventilation	28 (59.5)	3 (6.3)	0.04 (0.01-0.17)	<0.01	17.80 (5.64-56.13)	<0.01
Central venous catheter	17 (36.1)	0 (0.0)	0.63 (0.51-0.79)	<0.01	15.48 (3.83-62.56)	<0.01



404

405 Figure 1. Dendrogram illustrating the clonal relatedness of KPC-producing *K. pneumoniae*
 406 strains. The 33 strains with the same clonal type, containing 88.80% similarity, are grouped
 407 above (cluster A).

408

377 Table 2. Phenotypic screening and resistant mechanisms detected in *K. pneumoniae* strains.

Strains	MHT	MALDI TOF	<i>bla</i> _{CTX-M-1}	<i>bla</i> _{CTX-M-8}	<i>bla</i> _{CTX-M-14}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>ompk35</i>	<i>ompk36</i>
1	-	-	+	-	+	-	+	+(IS)
2	+	-	-	+	+	-	+	-
3	+	-	+	-	-	+	-	+
4	+	-	+	+	-	-	+	-
5	+	-	+	-	+	-	+	-
6	+	-	+	-	+	+	+	-
7	+	-	+	-	-	-	-	+
8	+	-	+	-	+	-	+	-
9	+	-	+	-	+	-	+	-
10	+	-	+	-	-	-	-	+
11	+	-	+	-	-	-	-	+

378

379 IS = Insertion Sequence, + = positive, - = negative.

6. CONCLUSÕES DO ESTUDO

Os resultados obtidos neste estudo indicam a disseminação de enterobactérias produtoras de β -lactamases em um hospital público de Dourados/MS, com identificação de um surto de *S. marcescens* e outro de *K. pneumoniae* produtoras de KPC. Este é o primeiro estudo que demonstra a presença de IMP-10 no Brasil, bem como a co-produção de KPC-2 e IMP-10 em *S. marcescens*. As cepas que abrigavam *bla*_{KPC-2} mais *bla*_{IMP-10} foram associadas a 100 % de mortalidade. O estudo de caso-controle demonstrou que a KPC esteve associada a vários fatores de risco, sendo que este é o primeiro estudo a relatar a associação de KPC com cirurgias. Desta forma, estes resultados ressaltam a necessidade de desenvolver estratégias de prevenção e controle de infecção hospitalar nesta instituição de saúde.

REFERÊNCIAS

- ABBOTT, S. L., et al. **Manual of Clinical Microbiology**. 10th edition, ASM Press, 2011.
- AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philos. Trans. R. Soc. Lond.** 1980; 289:321–331.
- ANDERSON, K. F. et al., Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol.** 2007; 45, 2723–2725.
- ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2011; 55(7): 3579-3583.
- BABIC, M; HUJER, A. M; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat** 2006; 9(3):142-156.
- BARANIAK, A. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2009; 53:4565–4567.
- BARROS, L. M. et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, 2012;33(3):429-435.
- BEIRÃO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases.** 2011; 15(1): 69-73.
- BENNET, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal of Pharmacology.** 2008; 153(1):347-357.
- BOERLIN, P; SMITH, R. J. R. Antimicrobial resistance: its emergence and transmission. **Anim. Health. Res. Rev.** 2008;9:115-26.
- BOGAERTS, P. et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2010 65:361–362.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother.** 2004; 48(1): 1-14.

BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clinical Microbiology Reviews**. 2001;14(4):933-951.

BUSH, K. et al. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother**.1995; 39:1211–1233.

BUSH, K; JACOBY, G. A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2010; 50(3):969-976.

CALISTO, F. et al. INCF plasmids responsible by dissemination of *bla*_{KPC} gene among Enterobacteriaceae. **BMC Proceedings**. 2011, 5(6):132

CARVALHAES, C. G. et al. Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D β -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. 2013; 51(1):287-290.

CARVALHO, A. P. Characterization of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo-beta-lactamase in a hospital located in Rio de Janeiro, Brazil. **Microb Drug Resist**. 2006; 12(2):103-8.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**. 2013;68(12):2956-7.

CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother** 2004; 48(12): 4654-4661.

CHEN, L. et al. Partial Excision of *bla*_{KPC} from Tn4410 in Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. 2012 56(3): 1635-1638.

CIPRIANO, R. et al. Coexistence of epidemic colistin-only-sensitive clones of *Pseudomonas aeruginosa*, including the *bla*_{SPM} clone, spread in hospitals in a Brazilian Amazon City. **Microb Drug Resist**. 13(2):142-6.

COLE, J. M. et al. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. **Journal of Clinical Microbiology**. 2009;47(2):322-326.

CUZON, G. et al. Functional Characterization of Tn4401, a Tn3-Based Transposon Involved in *bla*KPC Gene Mobilization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2010; 55(11):5370-5373.

DAIKOS, G. L. et al. Bloodstream Infections Caused by Carbapenemase-producing *Klebsiella Pneumoniae*. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2012;10(12):1393-1404.

DALMARCO, E. M; BLATT, S. L; CÓRDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. **RBAC.** 2006; 38(3): 171-177.

DESHPANDE, P. et al. New Delhi Metallo-beta lactamase (NDM-1) in Enterobacteriaceae: treatment options with carbapenems compromised. **J Assoc Physicians India.** 2010; 58:147-9.

DIENSTIMANN, R. et al. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, 2010, 46: 23-27.

DOMINGUES, S; SILVA, G. J; NIELSEN, K. M. Vehicles and pathways for horizontal dissemination in bactéria. **Mobile Genetic Elements.** 2012;2(5):211–223.

DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter spp.* clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** 2009; 63: 659-667.

DOYLE, D. et al. Laboratory Detection of *Enterobacteriaceae* That Produce Carbapenemases. *Journal of Clinical Microbiology.* 2012; 50(12): 3877-3880.

FEDLER, K. A. et al. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Programo n 3 continents. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(4):427-436.

FERNANDEZ, L; HANCOCK, L. E. W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** 2012; 25(4):661–681.

GALAL, A. M. et al. An Update on the Synthesis and Antibacterial Effects of Carbapenems. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery.** 2010; 5(1): 23-43.

- GALES, A. C. et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. **J Antimicrob Chemother.** 2003; 52(4):699-702.
- GALES, A. C. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis.** 73(4):354-60, 2012.
- GARCIA, C. P. et al., Clinical and molecular characterization of ESBL-producing enterobacteria isolated from bacteremia in a university hospital. **Rev Chilena Infectol.** 28(6):563-71, 2011.
- GOÇMEZ, C. et al. Evaluation of risk factors affecting hospital-acquired infections in the neurosurgery intensive care unit. **Int J Neurosci.** 2013.
- GOMEZ, S. A. et al. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. **Clin Microbiol Infect** 2011; 17: 1520–1524.
- GONZÁLEZ, G. R. et al. Integrons and resistance gene cassettes: structure and role against antimicrobials. **Rev Méd Chile.** 2004; 132: 619-626.
- HALL, M. Integrons and gene cassettes: hotspots of diversity in bacterial genomes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 2012; 71–78.
- HALL, R. M.; COLLINS, C. M. Antibiotic resistance in gram-negative bacteria: the role of gene cassettes and integrons. **Drug Resist. Updates.** 1998; 1:109–119.
- HANCOCK, R. E. W. Alterations in outer membrane permeability. **Annu. Rev. Microbiol.** 1984;38:237–264.
- HANSON, N. D; SANDERS, C. C. Regulation of inducible AmpC beta-lactamase expression among *Enterobacteriaceae*. **Curr Pharm Des.** 1999;5(11):881-94.
- HARDER, K. J; NIKAIDO, H; MATSUHASHI, M. Mutants of *Escherichia coli* that are resistant to certain beta-lactam compounds lack the *ompF* porin. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1981; 20:549 –552.
- HU, Z; ZAHO, W. H. Identification of plasmid- and integron-borne blaIMP-1 and blaIMP-10 in clinical isolates of *Serratia marcescens*. **J Med Microbiol.** 2009 ;58(2):217-21.

- IYOUBE, S. et al. Detection of a Variant Metallo-Lactamase, IMP-10, from Two Unrelated Strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* Strain. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002; 46(6): 2014-2016.
- JANDA, J. M; ABBOUTT, S. L. The Genera *Klebsiella* and *Raoultella*. **The Enterobacteria**. Washington, USA: ASM Press. 2nd ed.,115-129, 2006.
- JACOBY, G. A; SUTTON, L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1991; 35:164–169.
- JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.** 2009 ;22(1):161-82.
- JIANG, X. Paradoxical effect of *Klebsiella pneumoniae* OmpK36 porin deficiency. **Pathology**. 2009; 41:388–392.
- KENNETH, S; THONSON. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **Journal of Clinical Microbiology**. 2010; 48(4): 1019-1025.
- KITCHEL, B, et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: clonal expansion of MLST sequence type 258. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2009; 53:3365–3370.
- LEE, K. et al. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. 2003; 41(10): 4623-4629.
- LEE, K. et al. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob Agents Chemother.** 2005; 49(11):4485-91.
- LIMA M. E; ANDRADE D; HAAS, V. J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de Unidade de Terapia Intensiva. **Rev Bras Ter Intensiva.** 2007;19(3):342-7
- LISTER, P. D; WOLTER, D. J; HANSON, N. D. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. **Clin Microbiol Rev.** 2009; 22(4): 582-610.
- LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev.** 1995; 8(4): 557-584.

- LLEDO, W. et al. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. **MMWR Morb Mortal Wkly Rep.** 2009;58(10):256-260.
- MARTINS, M. A, et al. Vigilância pós-alta das infecções de sítio cirúrgico em crianças e adolescentes em um hospital universitário de Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. **Cad Saúde Pública.** 2008;24(5):1033-41.
- MATHERS, A. J. et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. **MBio.** 2011; 2(6): 1-7.
- MATTHEW, M. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of β -lactamases. **J. Gen. Microbiol.** 1975; 88:169–178.
- MEDEIROS, A. A. β -Lactamases. **Br. Med. Bull.**1984; 40:18–27.
- MENDES, R. E. et al. Integron Carrying a Novel Metallo- β -Lactamase Gene, *bla*_{IMP-16}, and a Fused Form of Aminoglycoside-Resistant Gene *aac(6₋)-30/aac(6₋)-Ib₋*:Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2004; 48(12): 4693-4702.
- MIRIAGOU, V. et al. Imipenem resistance in *Salmonella* strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrob Agents Chemother.** 2003; 47, 1297–1300.
- MIRIAGOU, V. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance. **Clin Microbiol Infect** 2010; 16: 112-122.
- MONTEIRO, J. et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** 2009;53(1):333-334.
- MOTA, E. C. et al. Epidemiological profile of hospital infections by multidrug-resistant bacteria in a hospital of northern Minas Gerais (Brazil). **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.** 2013;3(2):45-49.
- MULVEY, M. R; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? **CMAJ.** 2009;180(4):408-15.
- MUNOZ-PRICE, L. S; QUINN, J. P. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases: a tale of strains, plasmids and transposons. **Clinical Infectious Diseases.** 2009;49(11):1739-1741.

- MURRAY, P. R. et al., **Microbiologia Médica**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006.
- National Healthcare Safety Network Team and Participating National Healthcare Safety Network Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006–2007. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**2008;29(11),996–1011.
- NETO, G. T. C. *et al.* Detecção de Enterobactérias em superfícies de uma unidade mista de saúde no município de São Luís, Maranhão, Brasil. **Revista de Investigação Biomédica do Uniceuma**. 2010;1(2):77-84.
- NIKAIDO, H. Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 2003; 67(4): 593-656.
- NILSEN, I. W. et al. Isolation of *cmr*, a novel *Escherichia coli* chloramphenicol resistance gene encoding a putative efflux pump. **J. Bacteriol.** 1996; 178:3188 –3193.
- NORMAN, P; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clin Microbiol Infect.** 2002; 8(6):321-31.
- NORDMAN, P; NAAS, T; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**. 2011;17(10):1791-1798.
- NOYAL, M. J. C. et al. Simple screening tests for detection of carbapenemases in clinical isolates of nonfermentative Gram-negative bacteria. **Indian J Med Res.** 2009; 129: 707-712.
- O'HARA, L. M. Manual and automated instrumentation for identification of *Enterobacteriaceae* and other aerobic gram negative bacilli. **Clinical Microbiology Reviews**. 2005; 18: 147-162.
- ODE, T. et al. Analysis of plasmid-mediated multidrug resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca* isolates from clinical specimens in Japan. 2009; 34(4): 347-350.
- OLIVEIRA, R; MARUYAMA, S. A. T. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Rev. Eletr. Enf.** 2008;10(3):775-83.
- OLIVEIRA, A. C, et al. Nosocomial Infection in an Intensive Care Unit in a Brazilian University Hospital. **Rev Latino-Am. Enfermagem**. 2010;18(2):233-9.
- ONCUL, O. et al. Nosocomial infection characteristics in a burn intensive care unit: Analysis of an eleven-year active surveillance. **Burns**. 2013(13)00362-8.

- OSANO, E. et al. Molecular characterization of an enterobacterial metallo β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.** 1994 38:71–78.
- OVERTUF, G. D. Carbapenemases A Brief Review for Pediatric Infectious Disease Specialists. **The Pediatric Infectious Disease Journal.** 2010;29(1): 68-70.
- OZCENGIZ, G; DEMAIN, A. L. Recent advances in the biosynthesis of penicillins, cephalosporins and clavams and its regulation. **Biotechnol Adv.** 2013;31(2):287-311.
- PALZKILL, T. Metallo- β -lactamase structure and function. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 2013; 1277 91–104.
- PATEL, G; BONOMO, R. A. “Stormy waters ahead”: global emergence of carbapenemases. **Front. Microbiol.** 2013; 4(48): 1-17.
- PATERSON; D. L; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev.** 2005;18(4):657-86.
- PATON, R. et al. ARI-1: beta-lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. **Int J Antimicrob Agents.** 1993; 2:81–88.
- PAVEZ, M. et al. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother** 2009; 53(6): 2702.
- PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother.** 2009; 63(2):265-268.
- PELLEGRINO, F. L. et al. *bla*_{GES} carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Braz J Infect Dis.** 2006; 10(4):251-3.
- PEREIRA, M. S. et al., Controle de Infecção Hospitalar em Unidade de terapia Intensiva: desafios e perspectivas. **Revista Eletrônica de Enfermagem.** 2000;2(1).
- PEREIRA, et. al. A infecção hospitalar e suas implicações para cuidar da Enfermagem. **Texto e contexto de Enfermagem.** 2005;14(2) 256.
- PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST 11, ST 437 and ST 340). **Journal Antimicrobial Chemotherapy.** 2013; 68: 312-316.
- PEREZ, J. A. E. et al. Outbreak of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal unit in Colombia. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** 2013; 57(4); 1957-60.

- PETRELLA, S., et al. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2008; 52:3725–3736.
- PODSCHUN, R; ULLMANN, U. *Klebsiella spp.* as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev.** 1998;11(4):589-603.
- POIREL, L. et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2000; 44(3):622-32.
- POIREL, L, et al. GES- 2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001; 45(9): 2598-2603.
- POIREL, L. et al. Expanded-spectrum beta-lactamase and plasmid-mediated quinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases.** 2007;13(5):803-5.
- POIREL, L. et al. SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate from Switzerland. **Antimicrob Agents Chemother.** 2007; 51(6):2282-3.
- POIREL, L. Emergence of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2010; 54:3072.
- QUEENAN, A. M; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev.** 2007;20(3):440-58
- RASMUSSEN, J. W; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother.** 2007; 60(3): 470-482.
- RUPP, M. E; FEY, P. D. Extended Spectrum β -Lactamase (ESBL)-Producing *Enterobacteriaceae* Considerations for Diagnosis, Prevention and Drug Treatment. **Drugs** 2003; 63 (4): 353-365.
- SCHWABER, M. J. et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2008; 52:1028–1033.
- SORENSEN, S. J. et al. Studying plasmid horizontal transfer in situ: a critical review. **Nature Reviewa Microbiology.** 2005; 3(1): 700-710.

- SOULI, J. D. et al. A brief review of other notable electrophoretic methods. **Methods Mol Biol.** 2012;869:445-50.
- SOUZA C. M, et al. Responsabilidade civil dos profissionais de enfermagem nos procedimentos invasivos. **Rev Bras Enferm.** 2009;62(5):717-22.
- SOUZA, A. S; OLIVEIRA, Laboratory Identification of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs) of human clinical samples origin hospital. **RBAC**,2010;42(4): 303-306.
- SPELLBERG, B, et al. The epidemic of antibiotic-resistant infections: a call to action for the medical community from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis** 2008;46:155-64.
- STALDER, T. et al. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. **Frontiers in Microbiology.** 2012; 3(1): 1-14.
- STRATREVA, T. et al. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. **J Med Microbiol.** 2009; 58(9): 1133-1148.
- TENKE, P; KOVES, B; JOHANSEN, T. E. An update on prevention and treatment of catheter-associated urinary tract infections. **Curr Opin Infect Dis.** 2014;27(1):102-7.
- THALAN, K; JENSEN, S. E. Origins of the β -lactam rings in natural products. **J Antibiot (Tokyo).** 2013;66(7):401-10.
- THONSON, K. S; MOLAND, E. Version 2000: the new beta-lactamases of Gram-negative bacteria at the dawn of the new millennium. **Microbes Infect.** 2000;2(10):1225-35.
- THONSON, K. S. Extended-Spectrum- β -Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **Journal of Clinical Microbiology.** 2010;48(4):1019-1025.
- TOLEMAN, et al. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J Antimicrob Chemother.** 2002; 50(5):673-9.
- TORTORA, G. J; FUNKE, B. R; CASE, C. L. Microbiologia. 8^a ed. Rio de Janeiro: Artmed, 2005.
- TRABULSI, L. R. **Bactérias de interesse médico in: Microbiologia.** 8^a ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 2002.
- UGHACHUKWU, P. O; UNEKWE P. C. Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. **Ann. Med. Health. Sci. Res.** 2012;2(1):191-198.

- VETTORETTI, L, et al. Efflux unbalance in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from cystic fibrosis patients. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2009 :1987–1997.
- VIGINCAR, N. et al. *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in a district general hospital in the UK. **Journal of Hospital Infection** 2011; 78: 293-296.
- VILLEGAS, M. V. et al. First detection of metallo- β -lactamase VIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from Colombia. **Antimicrob. Agents Chemother.** 2006; 50:226–229.
- WAGENLEHNER, E. et al. Incidence of nosocomial urinary tract infections on a surgical intensive care unit implications for management. **Int J Antimicrob Agents.** 2006;28(1):86-90.
- WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clin Microbiol Rev.** 2005; 18(2):306-25.
- WALSH, T. R. Clinically significant carbapenemases: an update. **Curr. Opin. Infect. Dis.** 2008; 21:367-371.
- WANG, H. et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter spp.* from Chinese hospitals. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** 2007;51(11):4022-8.
- WANG, L. et al. MALDI-TOF MS applied to indirect carbapenemases detection: a validated procedure to clearly distinguish between carbapenemase-positive and carbapenemase-negative bacterial strains. **Anal Bioanal Chem.** 2013;405(15):5259-66.
- WIECEK, Z. P; MICHALSKA, A; GOSPODAREK, E. Morganella sp. rods--characteristics, infections, mechanisms of resistance to antibiotics. **Postepy Hig Med Dosw (Online).** 23;66:242-51, 2012.
- WILSON, D. N. Ribosome-targeting antibiotics and mechanisms of bacterial. **Nat Rev Microbiol.** 2013;12(1):35-48.
- WOSNIAK, A. et al. Porin alterations present in non carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. **Journal of Medical Microbiology.** 2012; 61:1270–1279.
- WOODFORD, N. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents Chemotherapy.** 2004; 48(12):4793-9.

YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2001;45(4):1151-61.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother.** 2009; 53(12):5046-54.

ZAVASCKI, A. P. e al., KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents.** 2009; 34(3): 286-288.

ZAVASCKI, A. P. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. **Expert Rev Anti Infect Ther.** 2010; 8(1):71-93.

ZHANG, Y. et al. Contribution of β -lactamases and the porin proteins OmpK35 and OmpK36 to 2 carbapenem resistance in clinical isolates of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2014; 58(2): 1214-1217.

7. ANEXOS