

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA ASSOCIADOS EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS
CARBAPENÊMICOS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Tanise Vendruscolo Dalmolin

**Santa Maria, RS, Brasil
2015**

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA ASSOCIADOS EM ISOLADOS
CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS
CARBAPENÊMICOS**

por

Tanise Vendruscolo Dalmolin

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos

COORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Priscila de Arruda Trindade

Santa Maria, RS, Brasil

2015

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA
ASSOCIADOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*
RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS**

elaborada por
Tanise Vendruscolo Dalmolin

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA

Marli Matiko Anraku de Campos, Dr^a. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Priscila de Arruda Trindade, Dr^a. (UFSM)
(Coorientadora)

Letícia Matter, Dr^a. (UFSM)

Erico Loreto da Silva, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

Dedico este trabalho:

*À minha família, amigos, colegas e a todos aqueles
que estiveram ao meu lado, apoiando-me e
incentivando-me durante esta caminhada.*

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar e me dar força interior nos momentos difíceis, por mostrar os caminhos nas horas incertas e por ter me iluminado durante esta trajetória.

Aos meus pais, Zuldinei e Tania, e meu irmão Lucas que sempre foram meus maiores incentivadores, que sempre me apoiaram incondicionalmente em todas as decisões da minha vida e que seguramente são os que mais compartilham das minhas alegrias e conquistas.

A minha madrinha Lizete, que sempre realizou seu papel de dinda da melhor forma possível, tornando-se minha segunda mãe e com certeza umas das pessoas que mais me incentivou e me apoiou nessa etapa.

A minha orientadora, Prof. Dr^a. Marli Matiko Anraku de Campos, por acreditar na minha capacidade e por ter aberto as portas da pesquisa na minha formação. Sou eternamente grata pelos seus ensinamentos, tanto pessoais com profissionais, pela orientação, palavras de incentivo, pela paciência e dedicação nesses quase 7 anos de convívio.

A minha coorientadora, Prof. Dr^a. Priscila de Arruda Trindade pela orientação, pelos ensinamentos, pela confiança, pelas oportunidades que me proporcionou e principalmente pela amizade.

A Prof. Dra. Ana C. Gales e todos os integrantes do Laboratório LEMC-ALERTA UNIFESP que me proporcionaram uma experiência indescritível para minha formação.

A Carolina Ramos, que apesar do pouco tempo de convívio demonstrou ser uma pessoa que ama o que faz, sempre com muita paciência e dedicação.

Aos meus amigos de longa data, Naiara, Mariele e Andrio, que sempre estiveram ao meu lado quando eu mais precisei, sempre me apoiando, ouvindo meus desabafos e sempre querendo o meu melhor.

Aos integrantes do Labmyco pela amizade durante esses quase 7 anos, pelos ensinamentos, e por terem contribuído de alguma forma na formação da pessoa que sou hoje.

A minha IC, Bianca, que além de ser uma das pessoas mais responsáveis e éticas que conheço é uma excelente amiga, prima e parceira. Meus eternos agradecimentos pela ajuda prestada nesse trabalho e pela amizade extra laboratorial.

A Eloisa que chegou ao laboratório na parte mais crítica do meu trabalho e que sempre esteve a disposição não importando nem a hora nem o dia. Obrigada pela ajuda.

A Yasmin, pela ajuda prestada e pela amizade.

A Luisa que, também, além de uma colega de mestrado tornou-se uma grande amiga que levarei para sempre comigo. Sempre prestativa, esclarecendo minhas dúvidas moleculares e alegrando o meu dia.

A Jaci, que foi um grande presente que a UFSM me deu. Mesmo não estando mais no laboratório na reta final do meu trabalho, sempre esteve ao meu lado quando eu mais precisava.

As minhas colegas de faculdade (Vanessa, Sabrina, Marluce, Tuany e Laís) que sempre estiveram do meu lado, não apenas no mestrado, mas desde a faculdade.

Aos “Dignos” (Luisa, Bianca e Vini) que com certeza me ajudaram ouvindo meus desabaços e dando-me conselhos. São pessoas que quero manter contato para o resto da minha vida.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria (LAC-HUSM), por cederem as amostras clínicas e dividirem os seus conhecimentos com nosso laboratório.

À Universidade Federal de Santa Maria, pela oportunidade de estudos.

A CAPES pela bolsa de estudos e pelos recursos financeiros concedidos.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho, e não estão nominalmente citados.

Muito obrigada a todos!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

AVALIAÇÃO DE MÚLTIPLOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA ASSOCIADOS EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTE AOS CARBAPENÊMICOS

AUTORA: TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN
ORIENTADOR: PROF^a. DR^a. MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
COORIENTADORA: PROF^a. DR^a. PRISCILA DE ARRUDA TRINDADE

Local e Data da Defesa: Santa Maria, 21 de agosto de 2015.

A resistência aos antimicrobianos é considerada um grave problema de saúde pública em âmbito mundial e dificulta o tratamento de infecções causadas por microrganismos resistentes. Os carbapenêmicos são os antibacterianos considerados último recurso para o tratamento de infecções graves causadas por *Klebsiella pneumoniae* e a resistência a esse grupo de β -lactâmicos pode resultar da acumulação de diferentes mecanismos de resistência (carbapenemases, bomba de efluxo e perdas de porinas). Este trabalho teve como objetivo avaliar os múltiplos mecanismos de resistência de 27 isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria-RS no período de julho de 2013 a agosto de 2014. Foram avaliados os perfis de suscetibilidade desses isolados através de microdiluição em caldo frente aos antimicrobianos ciprofloxacino, imipenem, ertapenem, meropenem, cefepima, ceftazidima e ceftaxetina. A detecção de carbapenemases foi realizada através de testes fenotípicos com a utilização do disco de antimicrobiano associado com os inibidores ácido fenilborônico (AFB) e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e através do teste Blue-Carba. Também foram realizados testes genotípicos para detectar os genes que codificam as carbapenemases. Bombas de efluxo foram avaliadas através de microdiluição em caldo juntamente com inibidor de bomba de efluxo e a perda de porinas foi avaliada pela eletroforese em gel de sulfato de dodecilo de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE). Altos níveis de resistência foram verificados nesses isolados pela concentração inibitória mínima (CIM) 50 e 90 para ciprofloxacino (64 e 128 μ g/mL), imipenem (32 e >128 μ g/mL), ertapenem (>128 e >128 μ g/mL), meropenem (128 e >128 μ g/mL), cefepima (>128 e >128 μ g/mL), ceftazidima (64 e 128 μ g/mL) e ceftaxetina (128 e >128 μ g/mL), respectivamente. Na resistência através da produção de carbapenemases, 89% dos isolados apresentaram o gene *bla*_{KPC} e nenhum isolado apresentou genes que codificam as metalo- β -lactamases. Foi observado que os testes Blue-Carba e disco combinado com AFB apresentaram 100% de concordância, enquanto o teste de disco combinado com EDTA apresentou elevado número de falso-positivos (48%) quando comparados com o teste genotípico. Quatro isolados apresentaram perfil fenotípico compatível com a presença de bomba de efluxo e todos os isolados apresentaram perda de uma ou ambas porinas, sendo que em três isolados, esse foi o único mecanismo de resistência encontrado. Em 14% dos isolados pode-se observar concomitantemente a presença dos três mecanismos de resistência. Devido ao exposto, é de fundamental interesse científico que estudos sejam realizados para investigar e compreender os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos, a fim auxiliar em estratégias de prevenção e controle de infecção.

Palavras-chave: Carbapenêmicos. Mecanismos de resistência. *Klebsiella pneumoniae*. Perda de porinas. Bomba de efluxo. Carbapenemases.

ABSTRACT

Master's Degree Dissertation
Postgraduate Program in Pharmaceutical Sciences
Federal University of Santa Maria

EVALUATION OF MULTIPLES ASSOCIATED RESISTANCE MECHANISMS IN CLINICAL ISOLATES OF *K. pneumoniae* RESISTANT TO CARBAPENEMS

AUTHOR: TANISE VENDRUSCOLO DALMOLIN
ADVISOR: PROF^a. DR^a. MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS
CO-ADVISOR: PROF^a. DR^a. PRISCILA DE ARRUDA TRINDADE

Place and Date: Santa Maria, August 21st 2015

Antimicrobial resistance is considered a serious public health problem worldwide and complicates the treatment of infections caused by resistant microorganisms. The carbapenems are antimicrobial agents considered the last resource for treatment of severe infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and the resistance to β -lactams can result in the accumulation of different resistance mechanisms (carbapenemases, efflux pump and loss of porins). This study aimed to evaluate multiple resistance mechanisms in 27 clinical isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems coming from the University Hospital of Santa Maria-RS from July 2013 to August 2014. These isolates were evaluated the susceptibility profiles through broth microdilution against ciprofloxacin, imipenem, ertapenem, meropenem, cefepime, ceftazidime and ceftoxitin. Carbapenemase detection was performed through phenotypic tests with combined disc test with phenylboronic acid (AFB) and ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) and Blue-Carba test. In addition, genotypic tests to detect genes encoding carbapenemase were performed. Efflux pump was evaluated by broth microdilution together with efflux pump inhibitor and loss of porins were evaluated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). High levels of resistance verified by the minimum inhibitory concentration (MIC) 50 and 90 for ciprofloxacin (64 and 128 μ g/mL), imipenem (32 to >128 μ g/mL), ertapenem (>128 and >128 μ g/mL), meropenem (128 and >128 μ g/mL), cefepime (>128 and >128 μ g/mL), ceftazidime (64 and 128 μ g/mL) and ceftoxitin (128 and >128 μ g/mL), respectively. In the resistance through carbapenemases production, 89% of the clinical isolates showed *bla*_{KPC} gene and no clinical isolated showed genes encoding the metallo- β -lactamases. It was observed that the Blue-Carba test and combined disc test with AFB showed 100% concordance, while the combined disc test with EDTA showed high number of false positive (48%) when compared with genotypic test. Four isolates showed phenotypic profile consistent with the presence of efflux pump and all clinical isolates had lost one or both porins, being that in three isolated, this was the only resistance mechanism found. In 14% of the isolates can observe simultaneously observe the presence of three resistance mechanisms. Consequently, it is of fundamental scientific interest that studies are conducted in order to investigate and understand the mechanisms involved in resistance to carbapenems in order to assist strategies of prevention and infection control.

Keywords: Carbapenems. Resistance mechanism. *Klebsiella pneumoniae*. Loss of porins. Efflux pump. Carbapenemases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Representação dos resultados do teste CarbaNP.....	23
Figura 2. Representação dos resultados do teste Blue-Carba	25

LISTA DE TABELAS
ARTIGO CIENTÍFICO

Table 1. Minimum inhibitory concentration (MIC) 50 and 90 for antimicrobials tested against 27 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*43

Table 2. Relationship of different resistance mechanisms in 27 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AFB	Ácido fenilborônico
CCCP	Cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona
CRE	Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos
CSE	Enterobactérias sensíveis aos carbapenêmicos
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ESBL	β -lactamase de espectro estendido
GES	<i>Guiana-extended spectrum</i>
GIM	Germany imipenemase
IBE	Inibidores de bomba de efluxo
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MBL	Metallo β -lactamase
MFS	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
MHA	Mueller- Hinton Agar
NDM	New Delhi imipenemase
OMP	Proteína de membrana externa
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PCR	Reação em cadeia da polimerase
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
SDS- PAGE	Eletroforese em gel de sulfato de dodecilo de sódio-poliacrilamida
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
SPM	São Paulo imipenemase
VIM	Verona imipenemase

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (UFSM).....	50
--	-----------

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A – Quadro de resultados fenotípicos e genotípicos.....	54
Apêndice B – Teste de Blue-Carba.....	56
Apêndice C – Testes de disco combinado.....	57
Apêndice D – Fotos dos géis de eletroforese em agarose e SDS-PAGE.....	59

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO	15
INTRODUÇÃO	16
1 Resistência aos antimicrobianos.....	16
2 Enzimas Carbapenemases.....	18
2.1 Detecção de Carbapenemases.....	20
3 Protéínas de membrana externa - porinas.....	26
4 Bomba de efluxo.....	28
OBJETIVOS	32
1 Objetivo Geral	32
2 Objetivos Específicos.....	32
ARTIGO CIENTÍFICO	33
CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS	45
ANEXOS	51
Anexo A – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa - UFSM	51
APÊNDICES	54
Apêndice A – Quadro de resultados fenotípicos e genotípicos	55
Apêndice B – Teste de Blue-Carba	55
Apêndice C – Testes de disco combinado	57
Apêndice D – Fotos dos géis de eletroforese em agarose e SDS-PAGE	59

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação será apresentada sob a forma de artigo científico. As seções materiais e métodos, resultados e discussão encontram-se no próprio artigo e representam a íntegra deste estudo. O item conclusões, encontrado no final desta, apresenta interpretações e comentários gerais sobre o artigo científico contido neste trabalho. As referências mencionam somente às citações que aparecem no item introdução, uma vez que as referências utilizadas para a elaboração do artigo estão mencionadas no mesmo.

INTRODUÇÃO

1 Resistência aos antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é considerada um grave problema de saúde pública em âmbito mundial, ameaçando conquistas da medicina moderna. O desenvolvimento da resistência bacteriana é um processo evolutivo normal, porém, é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antibacterianos. Até 1970, novos medicamentos antibacterianos foram desenvolvidos contra os patógenos mais comuns, os quais eram suscetíveis, sendo a descoberta da última classe de antibacterianos em meados dos anos 80. Infelizmente o surgimento de antimicrobianos estagnou e os novos candidatos têm limitada atividade contra agentes patogênicos resistentes. Portanto, a preservação da eficácia dos medicamentos existentes torna-se essencial a fim de reduzir a evolução e propagação da resistência enquanto não surgem novas classes de antibacterianos. Reforçar estratégias tradicionais de controle de infecção, por exemplo, a higiene das mãos e precauções de contato para pacientes colonizados por patógenos multirresistentes, bem como a gestão de antimicrobianos se fazem necessárias (LOOKE et al., 2013; WHO 2014).

Pacientes infectados com bactérias resistentes geralmente apresentam maior risco de agravamento clínico e morte, em comparação com pacientes infectados com bactérias sem o padrão de resistência. O impacto do aumento da resistência tem sido visto em todos os grupos etários, tornando o tratamento difícil e com altos custos para a sociedade, tanto em termos humanos como econômicos, resultando em doenças mais prolongadas e aumento da mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que o custo anual com resistência antimicrobiana para o sistema de saúde dos EUA seja de 21 a 34 milhões de dólares, visto que são necessários maiores cuidados de saúde (LOOKE et al., 2013; WHO 2014).

Membros da família *Enterobacteriaceae* estão entre os principais patógenos causadores de doenças em seres humanos. Esses microrganismos podem habitar a microbiota intestinal e são fontes de infecções comunitárias e hospitalares, disseminando-se facilmente entre os seres humanos através das mãos, alimentos e água contaminada. Outro aspecto preocupante é a aquisição de material genético que pode ocorrer por transmissão horizontal de plasmídeos e transposons (NORDMANN et al., 2011).

Klebsiella pneumoniae é uma bactéria Gram-negativa, oportunista e causa comum de infecções nosocomiais, frequentemente colonizadora do intestino, da pele humana e do trato respiratório, capaz de persistir em superfícies ambientais. Infecções causadas por essa bactéria ocorrem principalmente no trato urinário, trato respiratório e corrente sanguínea, variando desde infecções urinárias leves à bacteremia e pneumonia grave com uma elevada taxa de morbi-mortalidade. Acometem indivíduos mais vulneráveis como bebês prematuros, pessoas com deficiências imunológicas, diabéticos, distúrbios do uso de álcool e pacientes sob cuidados médicos avançados (DU et al., 2014; GARCIA-SUREDA et al., 2011; WHO 2014).

Antibacterianos β -lactâmicos atuam inibindo a síntese do peptidoglicano da parede celular e são compostos por quatro subclasses: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos. Cefalosporinas de terceira e quarta geração são os antimicrobianos mais comumente utilizados para tratamento de infecções graves causadas por *K. pneumoniae*, visto que a mesma carrega um gene de resistência (β -lactamase localizado cromossomicamente) que naturalmente torna ineficaz as penicilinas com espectro estendido, tais como ampicilina e amoxicilina. No entanto, o aumento da resistência devido à produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e β -lactamase do tipo AmpC têm dificultado o uso de cefalosporinas, visto que estirpes produtoras de ESBL são resistentes a essa subclasse (LUPO et al., 2013; TSAI et al., 2011; WHO 2014).

Os carbapenêmicos são antibacterianos considerados último recurso para o tratamento de infecções graves, sendo utilizados quando as cefalosporinas já não são confiáveis devido à alta proporção de resistência mediada por ESBL e AmpC. O aumento da resistência a essa subclasse de β -lactâmicos deixa o sistema de saúde com opções terapêuticas ainda mais restritas (HAIDER et al., 2014; NORDMANN et al., 2012c). Isolados resistentes aos carbapenêmicos frequentemente apresentam sensibilidade apenas às polimixinas (colistina e polimixina B), tigeciclina e, algumas vezes, à fosfomicina. Essas drogas são utilizadas em associação para prevenção da emergência de resistência às polimixinas (CURRIE et al., 2012).

Um estudo de vigilância realizado pela OMS relatou que a resistência às cefalosporinas de terceira geração foi encontrada em 87 (45%) Estados-membros, e a resistência a carbapenêmicos em 71 (37%). A maioria dos países que forneceram dados faz parte da Região das Américas e da Região Européia, revelando grandes lacunas de conhecimento em muitas partes do mundo. A partir dessa análise, concluiu-se que mais de 30% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração. Uma taxa alarmante de resistência aos carbapenêmicos – superior a 50% - foi relatada em

isolados de *K. pneumoniae*. Dados brasileiros foram analisados a partir de 132 publicações entre os anos de 2004 e 2009, onde os isolados eram oriundos de sangue e 55,6% eram resistentes a cefalosporinas de terceira geração (WHO 2014).

Resultados sugerem que o número de mortes atribuíveis à resistência aos carbapenêmicos é consideravelmente alto entre as pessoas com infecções causadas por enterobactérias. Em uma meta-análise realizada por Falagas e colaboradores (2014) concluiu-se que a taxa de mortes por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (CRE) variou de 26% a 44% em sete estudos, e, que o número de mortes é duas vezes maior entre pacientes com CRE que em pacientes com enterobactérias sensíveis aos carbapenêmicos (CSE).

A resistência aos carbapenêmicos pode resultar da acumulação de diferentes mecanismos de resistência como: (i) a inativação enzimática do antimicrobiano por enzimas cromossomais ou plasmidiais que hidrolisam o anel β -lactâmico; (ii) baixa permeabilidade da membrana externa através da produção de porinas modificadas ou perda de expressão; e (iii) efluxo de antimicrobiano para o exterior da bactéria, através da produção de bomba de efluxo (GARCIA-SUREDA et al., 2011; LUPO et al., 2013; TSAI et al., 2011).

2 Enzimas Carbapenemases

A propagação de bactérias produtoras de carbapenemases é uma questão clínica relevante, visto que confere resistência à maioria dos antimicrobianos β -lactâmicos, tornando-se uma fonte de falhas terapêuticas e causadora de mortes, tanto em infecções hospitalares como em infecções adquiridas na comunidade. Potenciais produtores de carbapenemases são rastreados utilizando os testes de suscetibilidade usando os valores de ponto de corte estabelecidos por protocolos de comitês internacionais de padronização. No entanto, muitas carbapenemases não conferem níveis de resistência *in vitro* detectável aos carbapenêmicos (NORDMANN et al., 2012c).

A classificação das β -lactamases é baseada em características funcionais das enzimas e a sua estrutura primária. A classificação através da sequência de proteínas é a mais simples e fácil, agrupando essas enzimas em quatro classes moleculares: A, B, C e D. As classes A, C e D são formadas por enzimas que hidrolisam os seus substratos por formação de uma enzima

acil através de um sítio ativo de serina. A classe B são as metaloenzimas que utilizam pelo menos um sítio ativo do íon zinco para facilitar a hidrólise (BUSH; JACOB, 2010).

A classificação de acordo com o ponto de vista funcional relaciona a estrutura das carbapenemases e o espectro de antimicrobianos hidrolisados bem como a ação dos inibidores de β -lactamases. Essa classificação é mais subjetiva, porém facilita a correlação das propriedades de uma enzima específica com o perfil de resistência do isolado clínico. Foi proposta inicialmente por Bush, em 1989, e expandida em 1995. Novos subgrupos foram adicionados por Bush em 2010. Essa classificação agrupa as enzimas conforme a classe de β -lactâmicos que hidrolisam e capacidade de inativação dos inibidores de β -lactamase (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam) (BUSH; JACOB, 2010).

A classificação ideal resultaria em um esquema onde ocorresse o alinhamento da estrutura e função. Porém muitas β -lactamases tem sido descritas apenas com base na sequência proteica e pouca descrição funcional. Por isso, atualmente um conjunto de critérios tem sido proposto para a uma nova descrição de β -lactamase, incluindo tanto informações estruturais como funcionais (BUSH; JACOB, 2010).

As enzimas da classe A de Ambler (Grupo 2f de Bush) são muito eficientes na hidrólise de benzilpenicilina e ampicilina, e conseqüentemente, elas foram caracterizadas inicialmente como penicilinasas. As enzimas mais comuns desse grupo são *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC) e *Guiana-extended spectrum* (GES), as quais são codificadas por plasmídeos. A família GES é composta por nove membros diferentes, dos quais apenas quatro (1, 2, 4 e 5) mostram atividade enzimática mensurável contra carbapenêmicos. No entanto, a atividade da carbapenemase GES-1 é tão baixa que parece razoável considerar a enzima como uma ESBL em vez de carbapenemase. O primeiro isolado produtor de KPC (KPC-2 em *K. pneumoniae*) foi identificado em 1996, no leste dos Estados Unidos. Isolados produtores de KPC têm sido relatados principalmente a partir de infecções nosocomiais causadas por *K. pneumoniae* e em menor grau a partir de *Escherichia coli* (NORDMANN et al., 2011; WALTHER-RASMUSSEN et al., 2007; THOMSON et al., 2010).

Enzimas da classe B de Ambler (grupo 3 de Bush) incluem as metalo- β -lactamases (MBL) que tipicamente hidrolisam de forma eficiente os carbapenêmicos, mas não monobactâmicos (aztreonam). Resistem aos inibidores de β -lactamase disponíveis, porém são inibidas por agentes quelantes tais como ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). As principais enzimas são Verona imipenemase (VIM), imipenemase (IMP) e New Delhi imipenemase (NDM). Isolados produtores de NDM ocorrem em várias espécies, disseminando-se pelo ambiente, fato profundamente desconcertante para a saúde pública em

nível mundial. As MBLs do tipo *German* imipenemase (GIM) e São Paulo imipenemase (SPM) apresentam menor impacto global (LUPO et al., 2013; NORDMANN et al., 2011; THOMSON et al., 2010).

A classe D de Ambler inclui as oxacilinases (OXA), principalmente identificadas em *K. pneumoniae* e *E. coli*. Isolados portadores de OXA que também são produtores de ESBL e/ou possuem defeitos na permeabilidade da membrana apresentam níveis de resistência aos carbapenêmicos mais elevado. A prevalência real dessa classe de enzimas pode ser subestimada, devido a grande dificuldade na sua identificação *in vitro*. A taxa de mortalidade atribuída a infecções com produtores de OXA-48 produtores é desconhecida (NORDMANN et al., 2011).

2.1 Detecção de carbapenemases

2.1.1 Meios de cultura

A detecção de microrganismos produtores de carbapenemases em um laboratório de microbiologia clínica é de suma importância para a escolha dos esquemas terapêuticos apropriados e para a implementação de medidas de controle de infecção. Diversos meios de cultura são utilizados para triagem de mecanismos de resistência, porém essas abordagens não irão identificar o tipo de carbapenemase, apenas sua presença (NORDMANN et al., 2012b; MIRIAGOU et al., 2010).

Para triagem de carbapenemases é utilizado o meio de cultura CHROMagar™ KPC, contendo um carbapenêmico. É um meio útil para enterobactérias produtoras de KPC e VIM, oriunda das fezes, porém não diferencia os tipos de carbapenemases. Como desvantagem, esse meio apenas detecta enzimas em cepas com alta resistência aos carbapenêmicos (NORDMANN et al., 2012b ; PANAGEA et al., 2010).

O meio de cultura Supercarba, em processo de patente, contém uma molécula de carbapenêmico em meio de ágar Drigalski, sulfato de zinco para melhorar a expressão de MBL e cloxacilina. Detecta todos os tipos de carbapenemases, incluindo produtores de OXA-48 (NORDMANN et al., 2012b).

2.1.2 Testes de disco combinado com inibidores

A triagem inicial para a detecção de carbapenemases é baseada nos teste de suscetibilidade, que pode ser realizada por disco difusão ou de maneira automatizada. Dentre os carbapenêmicos, o ertapenem tem sido recomendado como o melhor agente, visto que isolados geralmente são resistentes ao ertapenem, porém podem permanecer suscetíveis a outros carbapenêmicos. Uma série de testes não moleculares tem sido utilizados para a detecção de atividade das carbapenemases e são recomendados para fins epidemiológicos e de controle de infecção (NORDMANN et al., 2011; NORDMANN et al., 2012a; THOMSON et al., 2010).

Testes empregando inibidores têm sido desenvolvidos para a detecção específica de produtores de MBL. Essas enzimas são dependentes do íon zinco, agentes quelantes, tais como EDTA, são utilizados para inibir sua hidrólise. Os inibidores de MBL podem agir de forma inespecífica e afetam outras estruturas e processos (MIRIAGOU et al., 2010).

Ensaio fenotípicos específicos para a identificação de produtores de KPC baseiam-se no efeito inibidor do ácido fenilborônico (AFB). Este teste apresenta elevada sensibilidade e falso-positivos podem ser gerados para microrganismos com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos devido ao alto nível de expressão de AmpC e alteração de porinas (MIRIAGOU et al., 2010; NORDMANN et al., 2011).

A concentração de AFB utilizada no disco (400µg) não interfere no crescimento das bactérias, visto que sua concentração inibitória mínima (CIM) é $\geq 2500\mu\text{g/mL}$. A sensibilidade e a especificidade de AFB com discos de imipinem e meropenem são de 100%. Já com discos de ertapenem a especificidade é de 95,3%, visto que a presença de AmpC podem resultar em falso-positivos. Considera-se resultado positivo quando há um aumento de $\geq 5\text{mm}$ do halo de inibição do disco combinado com AFB em relação ao disco com apenas o antimicrobiano (THOMSON et al., 2010; TSAKRIS et al., 2009).

A cloxacilina é utilizada para impedir o crescimento de isolados que apresentam elevado nível de expressão de cefalosporinase (β -lactamase do tipo AmpC). O teste de disco combinado com cloxacilina, juntamente com o resultado do AFB, é adequado para avaliar a presença de AmpC (NORDMANN et al., 2012a).

Estes métodos requerem o isolamento da bactéria a partir da cultura da amostra clínica seguido por pelo menos um período de tempo adicional de 24 horas para realização da técnica baseada no inibidor (DORTET et al., 2014a). A detecção através da utilização de inibidores requer tempo e treinamento. Além disso, não há inibidores conhecidos para OXA-48 (NORDMANN et al., 2012c).

2.1.3 CarbaNP e Blue-Carba

As limitações dos testes com inibidores acima descritos impulsionaram o desenvolvimento de novos testes para detecção da hidrólise do anel β -lactâmico de um carbapenêmico como por exemplo o CarbaNP e o Blue-Carba.

O teste CarbaNP utiliza solução de vermelho de fenol, sulfato de zinco e imipenem mono-hidratado como substrato. A bactéria a ser testada é recuperada a partir da placa de antibiograma ou de meio de isolamento anterior ao teste de sensibilidade e ressuspensa em tampão Tris-HCl, incubada à temperatura ambiente durante 30 minutos. Após centrifugação, certa quantidade do sobrenadante é adicionado à solução de imipenem mono-hidratado, vermelho de fenol e sulfato de zinco e incubadas a 37°C por 2 horas (NORDMANN et al., 2012c).

A produção de carbapenemases é detectada pela alteração da cor vermelha para laranja ou amarelo, enquanto a não produção de carbapenemases permanecerá vermelha conforme Figura 1. *P. aeruginosa* produtora de VIM leva entre 30 minutos a duas horas, OXA-48 em *K. pneumoniae* em torno de 1 hora e KPC de *K. pneumoniae* em torno de 30 minutos para positivarem o teste. Em comparação ao método molecular esse teste apresentou 100% de sensibilidade e especificidade, sendo possível a sua rápida e fácil implantação (NORDMANN et al., 2012c; VASOO et al., 2013).

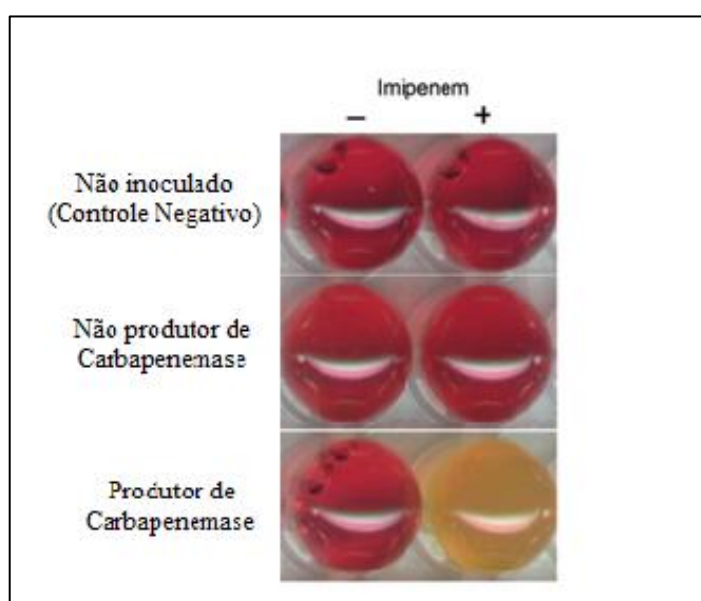


Figura 1. Representação dos resultados do teste CarbaNP (Fonte: NORDMANN et al., 2012c).

O teste CarbaNP diminui a carga de trabalho e simplifica o manejo clínico dos potenciais isolados produtores de carbapenemase, podendo diminuir em pelo menos 24 horas essa detecção. Para o tratamento correto, uma identificação rápida de produtores de carbapenemases se faz necessária, independentemente do seu tipo. O teste CarbaNP seria uma estratégia como teste de triagem para a detecção primária da produção de carbapenemase, seguido por uma caracterização molecular específica dos genes (DORTET et al., 2014a; NORDMANN et al., 2012c).

Um estudo realizado por Dortet e colaboradores (2014a) mostrou que o teste CarbaNP apresenta 100% de sensibilidade e especificidade, com 100% de valor preditivo positivo e negativo, sendo seu custo menor que 1 dólar por cepa testada. Visto que testes moleculares só detectam genes já conhecidos, o teste de CarbaNP positivo seguido de resultados moleculares negativos podem corresponder a uma nova carbapenemase (DORTET et al., 2014a).

Segundo Tijet e colaboradores (2013), no teste de CarbaNP ocorreram resultados falso-negativos em produtores de GES-5 em *P. aeruginosa* (5 de 5) e em isolados produtores de OXA-48 (31 de 39), reduzindo, assim, a sensibilidade e o valor preditivo negativo do teste para 72,5% e 69,2%, respectivamente. Esses resultados foram associados com cepas que apresentam colônias mucoides ou atividade de carbapenemase fraca ou de baixa expressão. Quando ocorreu uma modificação na técnica usando maior concentração de células, 15 isolados produtores de OXA-48, inicialmente falso-negativos, foram classificados como positivos, aumentando a sensibilidade e valor preditivo negativo do teste para 80% e 77,3%, respectivamente. Este estudo constatou que o teste Carba NP não é confiável para a identificação precisa de produtores de OXA-48 (TIJED et al., 2013).

Em contraponto, Dortet (2014b) enfatiza que deve-se ter extremo cuidado com as condições de crescimento das estirpes e que a origem (fabricante) das placas de agar Mueller-Hinton (MHA) é crucial para se obter um meio que permite um elevado nível de expressão MBL. Neste estudo os melhores resultados foram obtidos com placas de MHA da marca Becton Dickinson®, a qual provavelmente contém a concentração ótima de zinco para a expressão de MBL. Em 2012, o teste CarbaNP foi usado em 1485 isolados de CRE enviadas para um Centro Nacional de Referência na França para a triagem de potenciais carbapenemases, sendo que o teste detectou todos os produtores de carbapenemases independentemente do tipo e do seu fenótipo mucoide, incluindo os produtores de OXA-48 comparando com os resultados de PCR (DORTET et al., 2014b).

O princípio do método do Blue-Carba é semelhante ao teste CarbaNP, o qual é capaz de detectar estirpes produtoras de carbapenemases diretamente de culturas bacterianas. É um método rápido, simples, confiável, com custo significativamente reduzido por reação e dispensa a fase de extração com tampão apropriado como no teste de CarbaNP. A hidrólise do anel β -lactâmico é determinada a partir acidificação do extrato bacteriano na presença do indicador de pH azul de bromotimol, cuja faixa ótima de pH (6,0-7,6) é ideal para a maioria das β -lactamases. A solução teste contém azul de bromotimol, sulfato de zinco e imipenem como substrato. A solução de controle negativo não contém imipenem, a fim de controlar a influência de componentes e produtos bacterianos no pH da solução (PIRES et al., 2013).

A partir de MHA a bactéria é diretamente suspensa em ambas as soluções teste e controle negativo, incubadas durante 2 h, com leitura inicial de 15 minutos. É considerado positivo quando a solução teste e a solução controle negativo apresentarem as seguintes colorações, respectivamente : (i) amarelo e azul, (ii) amarelo e verde, ou (iii) verde e azul. Não produtores de carbapenemases permanecerão azul ou verde em ambas as soluções, conforme Figura 2. O teste apresenta 100% de sensibilidade e especificidade (PIRES et al., 2013).

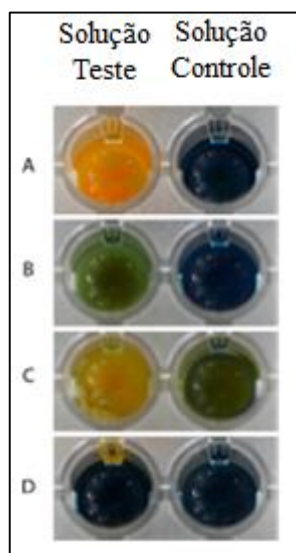


Figura 2. Representação dos resultados do Teste Blue-Carba. A, B e C são produtores de carbapenemases e D é não produtor de carbapenemase. (Fonte: PIRES et al., 2013).

2.1.4 Métodos moleculares e outros testes

A agilidade na detecção dos mecanismos de resistência se faz necessária, visto que facilita o atendimento ao paciente com orientação a terapêutica antimicrobiana, gestão de antimicrobianos e controle de infecção. Métodos moleculares são considerados padrão ouro para a identificação de genes de carbapenemases, apresentando alta sensibilidade e tempo de resposta rápido. Além disso, eles proporcionam recursos para investigações epidemiológicas (LEE et al.; 2014; MILILLO et al., 2013).

O padrão de referência para identificação e diferenciação de carbapenemases é a PCR que fornece resultados dentro de 4-6 horas, com excelente sensibilidade e especificidade. Essa metodologia pode ser seguida por sequenciamento se necessária a identificação precisa da carbapenemase. As principais desvantagens da PCR são o seu custo, a exigência de pessoal treinado e a ausência de detecção de qualquer gene novo de carbapenemase (NORDMANN et al., 2011; NORDMANN et al., 2012a).

A PCR simples permite a identificação de um único gene e exige a concepção específica de iniciadores para o alvo pretendido. É utilizada em estudos de diagnóstico e de epidemiologia para a detecção de genes de resistência. Permite a detecção e não a caracterização, a qual deve ser feita através da técnica de sequenciamento (LUPO et al., 2013).

A PCR multiplex baseia-se no mesmo princípio da PCR simples, porém usa vários conjuntos de iniciadores que permitem a amplificação de alvos diferentes na mesma reação. Para a realização dessa técnica é necessária a utilização de iniciadores altamente específicos para os objetivos pretendidos, não auto reação e ciclos idênticos para os mesmos, além de diferentes tamanhos que permitam a diferenciação dos *amplicons*. Assim como na PCR simples o uso de controles positivos é indispensável, especialmente quando os produtos de amplificação são visualizados em gel de agarose (LUPO et al., 2013).

Tanto a PCR simples como a PCR multiplex requerem elevado número de cópias do alvo a ser amplificado para que o produto de amplificação seja detectável. Ao contrário do que ocorre quando a PCR é realizada a partir de colônias bacterianas, quando a mesma é realizada a partir de amostras clínicas pode apresentar sensibilidade diminuída, visto que esse tipo de material pode abrigar inibidores, como a hemoglobina e heparina no sangue, uratos na urina e polissacarídeos nas fezes (LUPO et al., 2013).

A presença de carbapenemases também pode ser detectada através da espectrofotometria de massa (MALDI-TOF - *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) com análise dos picos de degradação do carbapenêmico. Em estudo realizado por Knox (2014), este método identificou corretamente todos os isolados clínicos produtores de OXA-48. Como desvantagens dessa técnica citam-se o tempo necessário de incubação do microrganismo (aproximadamente 4 horas), o processamento das placas e dificuldade na interpretação dos resultados (KNOX et al., 2014; NORDMANN et al., 2012a). Outra técnica para detecção de carbapenemases é o ensaio espectrométrico, onde a hidrólise de imipenem por uma bactéria é avaliada após 18 horas de cultura em caldo. Ambas as técnicas apresentam a desvantagem de não discriminar os diferentes tipos de carbapenemases (NORDMANN et al., 2012a).

3 Proteínas de Membrana Externa - Porinas

O envelope celular das bactérias Gram-negativas consiste em três camadas principais: membrana externa, parede celular de peptidoglicano e membrana interna ou citoplasmática. A membrana externa forma uma barreira hidrofóbica que protege a célula contra agentes externos, tais como metais pesados e detergentes. Esta membrana contém proteínas específicas, chamadas porinas, que formam canais e permitem a passagem seletiva de nutrientes essenciais e outros compostos, inclusive antimicrobianos, para seus sítios ativos periplasmáticos. As porinas também servem como receptores para bacteriófagos e bacteriocinas e, em conjunto com peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS), possuem um papel estrutural significativo em manter a integridade das células (HONG et al., 2013; TSAI et al., 2011).

Além da produção de carbapenemases, a perda de porinas desempenha um papel importante na resistência aos carbapenêmicos. Alterações no número ou na atividade dessas porinas bacterianas pode ter efeito sobre a resistência a essa classe de antimicrobianos (CAI et al., 2012).

K. pneumoniae contém duas porinas principais, OmpK35 e OmpK36, que correspondem a OmpF e OmpC, respectivamente, em *Escherichia coli*. A porina OmpK37 normalmente não está expressa ou é expressa em níveis muito baixos *in vitro*, não sendo detectável. A ausência ou expressão reduzida de OmpK35 e OmpK36, normalmente

resultante de mutações no interior das regiões promotoras ou sequências de codificação, pode contribuir para a resistência aos carbapenêmicos. Clinicamente, a maioria das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL expressam apenas OmpK36, enquanto que as não produtoras de ESBL apresentam tanto OmpK35 e OmpK36. Portanto, OmpK36 pode desempenhar um papel importante na resistência ou susceptibilidade reduzida a carbapenêmicos em *K. pneumoniae* produtoras de ESBL ou AmpC (HONG et al., 2013; TSAI et al., 2011; WANG et al., 2009; WASSEF et al., 2015).

Além das porinas supracitadas, *K. pneumoniae* pode expressar outras, como PhoE e LamB, que podem ser cruciais na ausência de OmpK 36/35. PhoE e LamB, respectivamente, representam alternativas que poderiam compensar a deficiência das porinas OmpK36/35. Outra porina encontrada nesse microrganismo é a OmpK26, que possui função compensatória à perda de OmpK36. No entanto, as diferenças estruturais fazem com que ocorra uma menor penetração dos carbapenêmicos causando uma susceptibilidade reduzida (GARCIA-SUREDA et al., 2011).

Um estudo realizado por Tsai e colaboradores (2011) mostrou que uma cepa mutante com deleção da porina OmpK36 apresentou aumentos na CIM de cefazolina, cefalotina e cefoxitina, partindo de um fenótipo intermediário para resistente. A deleção de ambas as porinas OmpK35/36 tornaram as cepas altamente resistentes a estas cefalosporinas, e houve um aumento de 8 e 16 vezes nos valores de CIM de meropenem e cefepima, respectivamente. (TSAI et al., 2011). Em outro estudo, também pode-se analisar que a perda de OmpK35 ou OmpK36 em *K. pneumoniae* acarreta a susceptibilidade reduzida à cefoxitina e cefotaxima (CIM de 2-4µg/mL), mas mantém a sensibilidade aos carbapenêmicos (CIM de 0,06-0,125µg/mL). No entanto, a perda de ambas as porinas pode resultar em susceptibilidade reduzida à imipenem e meropenem (CIM de 0,25-2µg/mL). Apenas a expressão de OmpK35 não foi suficiente para recuperar resistência ao ertapenem ou reverter a susceptibilidade reduzida a imipenem e meropenem, evidenciando que OmpK36 é mais importante que a OmpK35 no que diz respeito a resistência aos carbapenêmicos (WANG et al., 2009).

A eletrofore em gel de sulfato de dodecilo de sódio-poliacrilamida (SDS-PAGE) é o método mais comum de análise de porinas, porém requer tempo e é trabalhoso. A osmolaridade do meio de cultura afeta a expressão de porinas, por isso pequenas variações do sistema SDS-PAGE e tampão, podem resultar em grandes mudanças no perfil eletroforético das porinas (CAI et al., 2012; HERNANDEZ-ALLES et al., 1999). Espectrometria de massa (MALDI-TOF) também tem sido utilizada para detecção de porinas. Quando comparada a SDS-PAGE apresenta as seguintes vantagens: facilidade de execução da técnica e diminuição

do tempo decorrido até obtenção dos resultados. Por outro lado, há um número reduzido de estudos, sendo necessários mais experimentos com maior número de dados e amostras clínicas para o estabelecimento dessa técnica (CAI et al., 2012).

4 Bomba de efluxo

As bombas de efluxo são compostas por proteínas que estão localizadas e encaixadas na membrana externa bacteriana e fazem o reconhecimento de agentes nocivos que tenham penetrado na parede celular, expelindo os mesmos antes de eles atingirem seu alvo. A sua ação depende de gasto energético, visto que o transporte ocorre contra o gradiente de concentração (KVIST et al., 2008; RAJENDRAN et al., 2010).

A presença de bomba de efluxo representa um mecanismo de autodefesa dos microrganismos, a qual apresenta algumas funções fisiológicas, tais como secreção de toxinas, resíduos celulares e manutenção da homeostase celular; bem como agem na expulsão de substâncias nocivas como os antimicrobianos. A hiperexpressão de bomba de efluxo é preocupante, uma vez que resulta em concentrações subletais de antimicrobianos no interior das células bacterianas predispondo o desenvolvimento de resistência e dificultando a terapia clínica (HANDZLIK et al., 2013; MOURATO, 2012; OGAWA et al., 2012).

No final da década de 1980 foram descobertos os primeiros sistemas de efluxo em procariotos. O primeiro relato de bomba de efluxo foi descrito em *E. coli*, caracterizado pela resistência a tetraciclina. Esta resistência é transferível entre as linhagens e codificada em plasmídeos ou transposons. Após essa descoberta outros sistemas de efluxo foram identificados em bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e em micobactérias (CANAL, 2010; STAVRI et al., 2007).

As bombas de efluxo microbianas têm sido classificadas em dois grupos principais baseados na homologia da sequência de aminoácidos, na estrutura secundária e de acordo com recursos energéticos utilizados. O primeiro grupo, chamado transportador primário ou *ATP Binding Cassette* (ABC), oferece resistência específica a apenas um fármaco. Transportadores ABC estão envolvidos no efluxo de toxinas, metabólitos e fármacos e apresentam dois locais de ligação, um para o agente que é transportado (substrato) e outro para a ligação de ATP, que é hidrolisado promovendo liberação de energia e acarretando em uma mudança

conformacional, com consequente expulsão do agente nocivo. Nessa família inclui-se o transportador LmrCD de *Lactobacillus lactis*, AbcA de *Staphylococcus aureus* e MacAB-tolC de *E.coli* (AMARAL; MOLNA, 2012; CANAL, 2010; GRANATO, 2011; MARQUEZ, 2005).

O segundo grupo é nomeado transportador secundário, o qual utiliza gradiente de prótons ou sódio como fonte de energia. As famílias que utilizam força motriz de prótons adquirem-na do resultado do metabolismo celular, o qual produz prótons que não são utilizados para acoplar com o oxigênio molecular, sendo exportados para a superfície da célula. Este grupo se subdivide em quatro famílias: superfamília dos facilitadores majoritários - *Major Facilitator Superfamily* (MFS), família de pequena resistência a múltiplos fármacos - *Small Multidrug Resistance* (SMR), família de extrusão de compostos tóxicos e múltiplos fármacos - *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) e família de divisão celular, nodulação e resistência - *Resistance Nodulation Division* (RND) (AMARAL; MOLNA, 2012; CANAL, 2010; MARQUEZ, 2005; NEVES et al., 2011).

As proteínas da família MFS transportam açúcares, metabólitos intermediários e fármacos, e como exemplos de bactérias que apresentam esse tipo de bomba são *S. aureus* (NorB), *Bacillus subtilis* (LmrB) e *E. coli* (EmrAB-TolC/EmrKY-TolC). As proteínas de membrana da família SMR estão envolvidas no efluxo de fármacos catiônicos lipofílicos em bactérias. *Serratia marcescens* (SsmE) e *S. aureus* (SepA) são exemplos de bactérias que apresentam este tipo de bomba. Proteínas da família MATE apresentam topologia similar da membrana de MFS e transportam detergentes e fármacos. Como exemplo desta família temos a bomba de efluxo MepA presente em *S. aureus* e HmrM presente em *Haemophilus influenza* (MARQUEZ, 2005).

A família RND está envolvida no transporte de moléculas lipofílicas e anfifílicas ou cátions divalentes tóxicos, sendo também responsável pela tolerância aos solventes. Esta bomba de efluxo é dividida em três partes (transportador localizado na membrana citoplasmática, um canal de membrana externa e uma proteína da membrana periplásmica interligando os outros dois componentes), sendo cada uma essencial para o efluxo do fármaco e a ausência de uma delas pode comprometer todo o funcionamento. Este tipo de bomba pode estar presente em *Pseudomonas aeruginosa* (MexEF-OprN e MexAB-OprM), *E. coli* (AcrAB-TolC) e *K. pneumoniae* (AcrAB) (LOMOVSKAYA; BOSTIAN 2006; MARQUEZ, 2005).

Tem sido sugerido que a bomba de efluxo AcrAB possa estar envolvida na resistência às quinolonas em *K. pneumoniae* e também foi previamente relatado que a suscetibilidade

reduzida frente à ertapenem e meropenem pode ser devida a expressão desta bomba de efluxo. Sugere-se também que essa bomba de efluxo possa ser regulada pelo ativador de transcrição RamA, conhecido por seu papel na promoção da resistência aos antimicrobianos. Anteriormente relatou-se que a hiperexpressão de RamA está relacionada com uma elevada expressão da bomba de efluxo AcrAB em *K. pneumoniae* e a inativação do gene *ramA* diminui a expressão desta bomba (FINDLAY et al., 2012; KALLMANN et al., 2008; OGAWA et al., 2005; RUZIN et al., 2005).

Inibidores de bomba de efluxo (IBE) são substâncias que modulam ou mesmo reverterem a resistência bacteriana a certos antimicrobianos. A inibição da bomba de efluxo é importante para aumentar a concentração intracelular do fármaco, restabelecer a atividade do mesmo contra cepas resistentes e minimizar ainda mais o desenvolvimento de novas cepas resistentes. Com a inibição da bomba de efluxo a CIM pode sofrer diminuição significativa, podendo reverter a resistência adquirida e prevenir o surgimento de mutantes altamente resistentes (AMARAL; MOLNA, 2012; ASKOURA et al., 2011; GROBLACHER et al., 2012; STAVRI et al., 2007).

Existem vários compostos relatados na literatura como IBE, entre eles estão a planta alcalóide reserpina, as fenotiazinas (tioridazina e clorpromazina - agentes neurolépticos e antieméticos), antagonistas dos receptores de dopamina e inibidores de calmodulina que atuam através da ruptura energética da membrana, cianeto de carbonila 3-clorofenil-hidrazona (CCCP - *carbonyl cyanide 3-chlorophenyl-hydrazone*), flavonóide biochanina A e verapamil, que é antagonista de canais de cálcio (MOURATO, 2012; ROY et al., 2012).

O CCCP é um ionóforo que dissipa o gradiente de prótons e assim desacopla o transporte de elétrons a partir de síntese de ATP. Portanto, a força próton-motriz é cancelada e moléculas de ATP não são mais sintetizadas. A respiração celular continua e pode até ser estimulada. As concentrações utilizadas de CCCP para o bloqueio da bomba de efluxo em cada bactéria são variáveis (GHOUL et al., 1989).

Vários métodos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de evidenciar a presença da bomba de efluxo em microrganismos multirresistentes. Alguns desses métodos consistem na utilização de substratos sinalizados com compostos fluorescentes (por exemplo: brometo de etídeo), radiomarcadores ou marcados com metais pesados. A atividade também pode ser avaliada pela determinação da CIM para diferentes substratos, na presença e ausência de compostos descritos como IBE. Outra metodologia confiável e sensível é a PCR em tempo real, sendo possível a análise quantitativa da expressão dos genes a partir da obtenção do

RNA mensageiro e posterior produção de DNA complementar (MOURATO, 2012; NEVES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2008).

Frente ao exposto, é de fundamental interesse científico que estudos sejam realizados a fim de investigar e compreender os mecanismos envolvidos na resistência a carbapenêmicos. Através desses novos conhecimentos será possível estabelecer estratégias de prevenção e controle de infecção capazes de conter a disseminação de microrganismos resistentes, contribuindo assim para a excelência dos serviços na instituição.

OBJETIVOS

1 Objetivo Geral

Avaliar os múltiplos mecanismos de resistência de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenêmicos oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria-RS.

2 Objetivos Específicos

- 2.1 Avaliar perfil de suscetibilidade dos isolados frente aos antimicrobianos;
- 2.2 Detectar os genes que codificam as carbapenemases;
- 2.3 Comparar os métodos fenotípicos e genotípicos para detecção das carbapenemases;
- 2.4 Detectar fenotipicamente a presença de bombas de efluxo nestes isolados;
- 2.5 Detectar perda de porinas;
- 2.6 Relacionar os diferentes mecanismos de resistência.

ARTIGO CIENTÍFICO

As seções “Métodos”, “Resultados” e “Discussão” estão apresentadas no próprio artigo científico, o qual foi submetido para publicação no periódico *Microbes and Infection*.

Detection and analysis of different interactions of resistance mechanisms to carbapenems in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

Authors: Tanise Vendruscolo Dalmolin^{a*}, Bianca Vendruscolo Bianchini^a, Ana Carolina Ramos^b, Eloísa Salette Dalla Nora^a, Yasmin Nessim Samara^a, Luisa Pacheco^a, Ana Cristina Gales^b, Priscila de Arruda Trindade^a, Marli Matiko Anraku de Campos^a

^a Laboratório de Micobacteriologia. Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

^b Laboratório ALERTA. Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

ABSTRACT

Carbapenems are considered last-line agents for the treatment of serious infections caused by *Klebsiella pneumoniae* and this microorganism may exhibit resistance to β -lactamics group due to different mechanisms of resistance (carbapenemases, efflux pump and loss of porins). Evaluate multiple resistance mechanisms tests were conducted for 27 isolates of *K. pneumoniae* resistant to carbapenems coming from the University Hospital of Santa Maria-RS from July 2013 to August 2014. Antimicrobial susceptibility, carbapenemases detection (combined disc test with phenylboronic acid and ethylenediamine tetraacetic acid, Blue-Carba test and genes detection), presence of efflux pump by broth microdilution method combined with efflux pump inhibitor and loss of porin by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) were studied. High levels of resistance were verified by the

concentration inhibitory minimum (MIC) 50 e 90 for antimicrobials tested. *bla*_{KPC} gene was presented in 89% of clinical isolated and Blue-Carba tests and combined disc test with AFB showed 100% concordance, while the combined disc test with EDTA showed high number of false-positive (48%) compared with genotypic test. Four isolates showed phenotypic profile consistent with the presence of efflux pump and all clinical isolates had lost one or both porins. The investigate and understand the mechanisms involved in resistance to carbapenems is fundamental scientific interest to assist strategies of infection control and prevention as well as epidemiological surveillance.

Keywords: *K. pneumoniae*; resistance mechanism; carbapenemases; porins; efflux pump.

1. INTRODUCTION

Cephalosporins are antibiotics commonly indicated to treat severe infections caused by *Klebsiella pneumoniae*. However, the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) and AmpC β -lactamase has increased the development of resistance against cephalosporins. The cephalosporins resistance is emerging the use of carbapenems, which results of great concern due to the emergence of resistance to those antibiotics [1].

The carbapenem resistance can be associated to the production of carbapenemases that confer resistance to most β -lactams antibiotics, which can result in a therapeutic failure [2]. Besides the carbapenemases production, the loss of porins (OmpK35 and OmpK36) may play an important role in the development of resistance to carbapenems in *K. pneumoniae* [3]. The overexpression of AcrAB efflux pump has also been proposed as responsible for the reduced susceptibility to ertapenem and meropenem antibiotics [4].

The objective of this study was to compare phenotypic with genotypic tests in carbapenemases detection and to evaluate the contribution of different resistance mechanisms of *K. pneumoniae* against carbapenems.

2. METHODS

2.1 Bacterial Strains

Twenty-seven nonduplicated *K. pneumoniae* clinical isolates resistant to carbapenems collected from July 2013 to August 2014 at the University's Hospital (Santa Maria, Brazil) were included in this study. Species identification was performed with the Vitek® 2 automated identification system (Biomérieux, France) and confirmed with MALDI-TOF MS in Microflex LT apparatus (Bruker Daltonics, Germany) with score value between 2,0 and 2,299 [5].

2.2 Susceptibility testing

The antimicrobials used for susceptibility test were ciprofloxacin (Sigma), imipenem, meropenem (Meronem®), ertapenem (Invanz®), cefepime (Cefepen®), ceftazidime (Cetaz®) and ceftoxitin. The tests were performed by broth microdilution [6]. The strains *Escherichia coli* ATCC 25922 was used as quality control.

2.3 Carbapenemases

The detection of genes *bla*_{KPC} [7], *bla*_{OXA-48} [8] and *bla*_{NDM} [9] was performed by multiplex PCR technique, as well for detection of genes *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM} e *bla*_{GIM} [10]. The detection of gene *bla*_{GES} was carried out with simplex PCR [11]. The strains used as positive control were provided by Dra. Anna Sara Levin (LIM54/FMUSP).

2.4 Disc diffusion assay using phenyl boronic acid, EDTA and cloxacillin

For phenotypic detection of KPC enzyme was used the disk diffusion assay using phenyl boronic acid (AFB)(Sigma) [12] and for metallo β -lactamase (MBLs) enzyme was used the chelating ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA)[13]. For quality control were used strains of KPC2- production *K. pneumoniae*, IMP1- production *K. pneumoniae* and *E. coli* ATCC 25922.

2.5 Blue-Carba test

Blue-Carba test consists on the detection of hydrolysis of the carbapenem β -lactam ring in a bacterial extract through the acidification of bromothymol blue indicator. Carbapenemase activity in clinical isolates was revealed as recommended by Pires et al 2013 [14]. Strains containing the genes *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP} and *bla*_{OXA-48} were used as positive control and *E. coli* ATCC 25922 were used as negative control.

2.5 Efflux Pump

The technique was performed by broth microdilution using antimicrobial alone and antimicrobials associated with the efflux pump inhibitor carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)(Sigma) [15].

2.6 OMP analysis

Outer membrane protein (OMP) profiles were analyzed by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) [16]. OmpK35 of *K. pneumoniae*, OmpK36 of *K. pneumoniae* and OmpK35 and OmpK36 of *K. pneumoniae* were used as control strains belonging Alerta Laboratory (UNIFESP).

RESULTS AND DISCUSSION

High levels antimicrobial resistance were observed through the concentration that inhibits 50% (MIC_{50}) and 90% (MIC_{90}) of bacterial isolates and they are shown in Tables 1. Phenotypic tests for carbapenemases detection were compared with the presence and absence of the genes of the carbapenemases detect by PCR and they are shown in Table 2 together with the results about the presence and absence of the pump efflux and loss the porin.

A common mechanism of carbapenems resistance is the class-A, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC). The KPC enzyme confers resistance to all β -lactams agents including penicillins, cephalosporins, monobactams and carbapenems [17]. Most of the isolates had bla_{KPC} gene (89%), which may have been the mechanism responsible for this resistance carbapenems and in association with loss of porins increasing the degree of resistance.

Methods for phenotypic identification of carbapenemases are based on the use of specific inhibitors. The phenotypic test to detect KPC enzyme with AFB demonstrated 100% agreement with the Blue-Carba test and the gold standard, PCR. Studies have shown that the sensitivity of the disc diffusion assay using AFB is 100%, in agreement with this study [13, 18].

In the present study no MBLs were detected by PCR, however the MBLs phenotypic detection test using EDTA presented many false positives (48%) when compared with PCR technique, which have also been reported in the literature [14, 19, 20, 21]. These results can be explained based on the effect on the membrane permeability which can increase the susceptibility to many antimicrobial agents, including imipenem and meropenem [20, 21]. It can also be associated with a low production β -lactamase or even with some unknown enzyme production [22].

Blue-Carba test is a rapid, simple and reliable, with significantly reduced cost for each reaction and presents 100% specificity and sensitivity [14]. In our study this test detected all KPC enzymes (100% sensitivity) and all clinical isolates that showed no carbapenemases were negative in the Blue-Carba test (100% specificity). A previous study has shown that all clinical isolates that had A and B class of carbapenemases were positive in Blue-Carba test, but only 9/14 of *Enterobacteriaceae* producing OXA-48 were positive, with 97% sensitivity and 100% specificity [23].

In our collection, the absence of one or both porins (OmpK35 and OmpK36) was found in all the isolates. Due to the limitation of the SDS-PAGE technique and the very close molecular weights to the studied porins, we were not able to distinguish which of porins was absent.

The loss of the major porins OmpK35/36 is often present in *K. pneumoniae* clinical isolates resistant to carbapenems, demonstrating an increase of MICs to cephalosporins and carbapenems. The loss of only the OmpK35 porin did not influence significantly the resistance to carbapenems [24, 25]. The loss of OmpK35/36 conferred 31-, 8- and 4-fold increases in the MIC of ertapenem, meropenem and doripenem, respectively, and led to ertapenem resistance [1]. This suggests that when a clinical isolated from our study lost a porin or another, possibly is the OmpK36. However, more molecular methods should be performed. Clinical isolates tested against cephalosporins, carbapenems and ciprofloxacin showed resistance profile and the highest MIC values (>128 µg/ml) were associated with the loss of both porins.

The loss of OmpK36 porin also results in a moderate increase in resistance to fluoroquinolones in strains with active efflux [26]. The efflux pump was present in four isolates and the literature is controversial regarding their participation in the resistance to carbapenems. In our study this mechanism has always been associated with other mechanisms

that already proven their participation in the resistance to carbapenems, so further studies should be performed to evaluate the overexpression and characterization of efflux pump.

The relationship of different resistance mechanisms to carbapenems were present in clinical isolates, demonstrate the often the cause of resistance can not be only a single mechanism, but the union of many. Our results show that 14% of clinical isolates exhibit different resistance mechanisms accumulated (carbapenemases, drug efflux and loss of porin) and all isolates the predominant profile of mechanism resistance was the presence of *bla*_{KPC} and loss of porins. The detection of these mechanisms becomes extremely important for the implementation of infection control and prevention measures, as well as epidemiological surveillance.

4. References

1. Tsai YK, Liou CH, Fung CP, Lin JC, Siu LK. Single or in combination antimicrobial resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae* contribute to varied susceptibility to different carbapenems. PlosOne 2013; 8: e79640.
2. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenem- producing *Enterobacteriaceae*. Emerg Infect Dis 2012, 18: 1503-7.
3. Cai JC, Hu YY, Zhang R, Chen GX. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. J Clin Microbiol 2012, 50:2179–82.
4. Flinday J, Amouda A, Dancer SJ, Amyes SGB. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. Clin Microbiol Infect 2012, 18: 140-6.

5. Panda A, Kurapati S, Samantaray JC, Srinivasan A, Khalil S. MALDI-TOF mass spectrometry proteomic based identification of clinical bacterial isolates. *Indian J Med Res* 2014, 140: 770-7.
6. Clinical and laboratory standards institute (CLSI). Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - tenth edition. M07-A10. Wayne, PA: CLSI; 2015.
7. Lomaestro BM, Tobim EH, Shang W, Gootz T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase – producing *K. pneumoniae* to upstate New York. *Clin Infect Dis* 2006, 43:26-8.
8. Poirel L, Walsh TR, Cuvillier V, Nordmann P. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011, 70:119-23.
9. Nordmann P, Poirel L, Carrer A, Toleman MA, Walsh TR. How to detect NDM-1 producers. *J Clin Microbiol* 2011, 49: 718–21.
10. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, Castanheira M, Andrade SS, Gales AC et al. Rapid detection and identification of metallo- β -Lactamase-encoding genes by multiplex real-time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol* 2007, 45: 544-7.
11. Kim SY, Park YJ, Yu JK, Kim HS, Park YS, Yoon JB et al. Prevalence and mechanisms of decreased susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2007, 57:85–91.
12. National Health Surveillance Agency (ANVISA). Technical note on 01/2013. Measures to prevent and control infections by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. 2013.
13. Tsakris A, Poulou A, Pournaras S, Voulgari E, Vrioni G, Themeli-Digalaki K et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo- β -lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. *J Antimicrob Chemother* 2010, 65: 1664-71.

14. Pires J, Novais A, Peixe L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. *J Clin Microbiol* 2013, 51: 4281–83.
15. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, Galazzo J, Fronko R, Lee M, Blais J et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 2001, 45:105-16.
16. Hernández-Allés S, Albertí S, Álvarez D, Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Gil J et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999, 145: 673-9.
17. Shanmugan P, Meenakshisundaram J, Jayaraman P. *bla*_{KPC} gene detection in clinical isolates of carbapenem resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary care hospital. *J Clin Diagn Res* 2013, 7: 2736-8.
18. Song W, Hong SG, Yong D, Jeong SH, Kim HS, Kim H et al. Combined use of the modified hodge test and carbapenemase inhibition test for detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and metallo- β -Lactamase-producing *Pseudomonas spp.* *Ann Lab Med* 2015, 35: 212-219.
19. Franklin C, Liolios L, Peleg AY. Phenotypic detection of carbapenem-susceptible metallo- β -lactamase-producing Gram-negative bacilli in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* 2006, 44: 3139–44.
20. Chu YW, Cheung TKM, Ngan JYW, Kam KM. EDTA susceptibility leading to false detection of metallo- β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* by Etest and an imipenem–EDTA disk method. *Int J Antimicrob Agents* 2005, 26: 338–41.

21. Franco MRG, Caiaffa-Filho HH, Burattini MN, Rossi F. Metallo-beta lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university Hospital. Clin 2010, 65:825-9.
22. Khosravi Y, Loke MF, Chua EG, Tay ST, Vadivelu J. Phenotypic detection of metallo- β -lactamase in imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. Sci World J, 2012, 2012:654939
23. Pasteran F, Veliz O, Ceriana P, Lucero C, Rapoport M, Albornoz E et al. Evaluation of the Blue-Carba test for rapid detection of carbapenemases in Gram negative bacilli. J Clin Microbiol 2015, 53: 1996-8.
24. García-Sureda L, Doménech-Sánchez A, Barbier M, Juan C, Gascó J, Albertí S. OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2014, 55: 4742–7.
25. Shi W, Li K, Ji Y, Jiang Q, Wang Y, Shi M et al. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin OmpK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. Braz J Microbiol 2013, 44: 435-42.
26. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, Conejo MC, Pascual A, Tomás JM et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. Antimicrob Agents Chemother 2003, 47: 3332–5.

TABLES

Table 1- Minimum inhibitory concentration (MIC) 50 and 90 for antimicrobials tested against 27 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

	MIC ₅₀ (µg/mL)*	MIC ₉₀ (µg/mL)**
Ciprofloxacin	64	128
Imipenem	32	>128
Ertapenem	>128	>128
Meropenem	128	>128
Cefepime	>128	>128
Ceftazidime	64	128
Cefoxitin	128	>128

*MIC₅₀: Concentration that inhibits 50% of bacterial isolates.

**MIC₉₀: Concentration that inhibits 90% of bacterial isolates.

Table 2- Relationship of different resistance mechanisms in 27 clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*

			Negative <i>bla</i> _{KPC}		Positive <i>bla</i> _{KPC}		Total	
			Negative MBL, <i>bla</i> _{GES} and <i>bla</i> _{OXA-48} *		Negative MBL, <i>bla</i> _{GES} and <i>bla</i> _{OXA-48} *			
			Loss OmpK35 and OmpK36	Loss OmpK35 or OmpK36	Loss OmpK35 and OmpK36	Loss OmpK35 or OmpK36		
			Negative pump efflux	Negative pump efflux	Negative pump efflux	Positive pump efflux		
Negative AFB**	Negative EDTA	Negative Blue-Carba	1	2			3	
	Negative EDTA	Positive Blue-Carba			6	1	3	11
Positive AFB**	Positive EDTA	Positive Blue-Carba			9	1	2	13
Total			1	2	15	2	5	27

* MBL: metalloβ-lactamase (*bla*_{NDM}, *bla*_{SPM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM-1} and *bla*_{SIM-1});

**AFB: phenyl boronic acid

CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Altos níveis de resistência aos antimicrobianos foram observados através da CIM₅₀ e CIM₉₀ para ciprofloxacino (64 e 128 µg/mL), imipenem (32 e >128 µg/mL), ertapenem (>128 e >128 µg/mL), meropenem (128 e >128 µg/mL), cefepima (>128 e >128 µg/mL), ceftazidima (64 e 128 µg/mL) e cefoxitina (128 e >128 µg/mL), respectivamente.
- O gene *bla*_{KPC} esteve presente em 89% dos isolados e nenhum isolado apresentou genes que codificam as MBLs.
- Os testes Blue-Carba e disco combinado com AFB apresentaram 100% de concordância em relação a detecção de carbapenemases por PCR, enquanto o teste de disco combinado com EDTA apresentou elevado número (48%) de falso-positivos quando comparados aos resultados da PCR.
- Apenas quatro isolados apresentaram perfil fenotípico compatível com a presença de bomba de efluxo. No entanto, são necessários testes moleculares adicionais para avaliação da hiperexpressão e caracterização da bomba de efluxo.
- Todos os isolados apresentaram perda de uma ou ambas porinas, sendo que em três isolados esse foi o único mecanismo de resistência encontrado. Tais dados reforçam a importância desse mecanismo nas amostras estudadas. Porém, existe a necessidade de realização de testes moleculares para melhor compreensão qual porina está em falta, bem como analisar alterações.
- A inter-relação de vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos se fez presente nos isolados clínicos, demonstrando que muitas vezes a causa da resistência pode não ser de apenas um único mecanismo e sim a união de diversos. Em 14% dos isolados pode-se observar concomitantemente os três mecanismos de resistência estudados.

REFERÊNCIAS

AMARAL, L.; MOLNA, J. Inhibitors of efflux pumps of Gram-negative bacteria inhibit quorum sensing. **Open Journal of Pharmacology**. v. 2, n. 2, 2012.

ASKOURA, M. et al. Efflux pump inhibitors (EPIs) as new antimicrobial agents against *Pseudomonas aeruginosa*. **Libyan Journal Medical**. v. 6, p. 5870, 2011.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 3, p. 969–976. 2010.

CAI, J. C. et al. Detection of OmpK36 porin loss in *Klebsiella* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 50, n. 6, p. 2179–2182. 2012.

CANAL, L. **Caracterização de resistência a antimicrobianos e diversidade genética em *Escherichia coli* isoladas de amostra de água da Lagoa dos Patos, RS**. 2010. 98f. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

CURRIE, B. The emergence of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Infectious Disease**. Special Edition. p. 9-12. 2012.

DORTET, L. et al. Strategy for a rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 4, p. 2441–2445. 2014.a

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Further proofs of concept for the Carba NP test. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 2, p. 1269. 2014. b

DU, J. et al. Phenotypic and molecular characterization of multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated from a University Teaching Hospital, China. **PlosOne**. v. 9, n. 4, p. e95181. 2014.

WHO. Antimicrobial Resistance. Global report on surveillance. Geneva, World Health Organization, 2014.

FALAGAS, M. E. et al. Deaths attributable to carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. **Emerging Infectious Diseases**. v. 20, n. 7, p. 1170-1175. 2014.

FLINDAY, J. et al. Rapid acquisition of decreased carbapenem susceptibility in a strain of *Klebsiella pneumoniae* arising during meropenem therapy. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, p. 140–146, 2012.

GARCÍA-SUREDA, L. et al. OmpK26, a novel porin associated with carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 10, p. 4742–4747. 2014.

GHOUL, M. et al. Effect of carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone on *Escherichia coli* halotolerance. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 55, n. 4, p. 1040-1043, 1989.

GRANATO, P. C. **Aspectos sobre resistência bacteriana a tetraciclina (revisão de literatura)**. 2011. 52 f. Monografia (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

GROBLACHER, B.; KUNERT, O.; BUCAR, F. B. Compounds of *Alpinia katsumadai* as potential efflux inhibitors in *Mycobacterium smegmatis*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 20, p. 2701–2706, 2012.

HAIDER, M. et al. Necessity of detection of extended spectrum β -lactamase, AmpC and metallo- β -lactamases in Gram-negative bacteria isolated from clinical specimens. **Muller Journal of Medical Science and Research**. v. 5, n. 1, p. 23 – 28. 2014.

HANDZLIK, J.; MATYS, A.; KONONOWICZ, K. K. Recent advances in multi-drug resistance (MDR) efflux pump inhibitors of Gram-positive bacteria *S. aureus*. **Antibiotics**. v. 2, p. 28-45, 2013.

HERNANDÉZ-ALLÉS, S. et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. **Microbiology**. n. 145, p. 673-679. 1999.

HONG, J. H. et al. Characterization of porin expression in *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* identifies isolates most susceptible to the combination of colistin and carbapenems. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 5, p. 2147–2153. 2013.

KALMANN, O. et al. Cefuroxime non-susceptibility in multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* overexpressing ramA and acrA and expressing ompK35 at reduced levels. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, p. 986–990. 2008.

KNOX, J. et al. Phenotypic detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry and the Carba NP test. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 11, p. 4075–4077. 2014.

KVIST, M.; HANCOCK, V.; KLEMM, P. Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm Formation. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 74, n. 23, p. 7376–7382, 2008.

LEE, L. Y.; KORMAN, T. M.; GRAHAM, M. Rapid Time to results and high sensitivity of the CarbaNP Test on early cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 52, n. 11, p. 4023–4026. 2014.

LOMVSKAYA, O.; BOSTIAN, K. A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic - A vision for applied use. **Biochemical pharmacology**. v. 71, p. 910–918, 2006.

LOOKE, D. F. M. et al. Gram-negative resistance: can we combat the coming of a new “Red Plague”? **The Medical Journal of Australia**. v. 198, n. 5, p. 243–244. 2013.

LUPO, A. et al. Non-phenotypic tests to detect and characterize antibiotic resistance mechanisms in *Enterobacteriaceae*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 77, p 179–194. 2013.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**. v. 87, p. 1137–1147, 2005.

MILILLO, M. et al. Rapid and simultaneous detection of *bla*KPC and *bla*NDM by use of multiplex Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 4, p. 1247–1249. 2013.

MIRIAGOU, V. et al. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 2, p. 112–122. 2010.

MOURATO, C. A. **A contribuição das bombas de efluxo QacA e Smr para a multirresistência em *Staphylococcus aureus***. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em

Microbiologia Médica) – Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2012.

NEVES, P. R. et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente: um problema endêmico no Brasil. **Jornal Brasileiro Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n. 4; p. 409-420, 2011.

NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, n. 5, p. 432- 438. 2012.a

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* using a novel screening medium. **Journal Clinical Microbiology**. v. 50, n. 8, p. 2761–2766. 2012.b

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**. v. 17, n. 10, p. 1791-1798. 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. ; DORTET, L. Rapid detection of carbapenem- producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infection Diseases**. v.18, n.9, p. 1503-1507. 2012.c

OGAWA, W. et al. Functional study of the novel multidrug efflux pump KexD from *Klebsiella pneumoniae*. **Gene**. v. 498, p.177–182, 2012.

OGAWA, W. et al. Multidrug resistance in *Klebsiella pneumoniae* MGH78578 and cloning of genes responsible for the resistance. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 28, n. 8, p. 1505-1508, 2005.

PANAGEA, T. et al. Evaluation of CHROMagar™ KPC for the detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in rectal surveillance cultures. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 37, n. 2, p. 124-128. 2010.

PIRES, J.; NOVAIS, A.; PEIXE, L. Blue-Carba, an easy biochemical test for detection of diverse carbapenemase producers directly from bacterial cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 12, p. 4281–4283. 2013.

RAJENDRAN, R. et al. Efflux pumps may play a role in tigecycline resistance in *Burkholderia* species. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v.36, p. 151–154, 2010.

RODRIGUES, L. et al. Thioridazine and chlorpromazine inhibition of ethidium bromide efflux in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium smegmatis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, p. 1076–1082, 2008.

ROY, S. K. et al. Phenylpropanoids of *Alpinia galanga* as efflux pump inhibitors in *Mycobacterium smegmatis* mc² 155. **Fitoterapia**. v. 83, p. 1248–1255, 2012

RUZIN et al. Influence of transcriptional activator RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB and tigecycline susceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 3, p. 1017–1022, 2005.

STAVRI, M.; PIDDOCK, L. J. V.; GIBBONS, S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, p. 1247–1260, 2007.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p. 470–482. 2007.

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

TIJET, N. et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n. 9, p. 4578–4580. 2013.

TSAI, Y. et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 4, p. 1485–1493. 2011.

TSAKRIS, A. et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 2, p. 362–367. 2009.

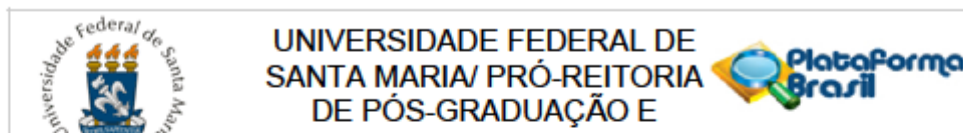
VASOO, S. et al. Comparison of a novel, rapid chromogenic biochemical assay, the Carba NP test, with the modified Hodge test for detection of carbapenemase-producing Gram-negative bacilli. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 51, n. 9, p. 3097–3101. 2013.

WANG, X. D. et al. Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated β -lactamase production and OmpK36 porin deficiency. **Journal of Medical Microbiology**. v. 58, p. 1196–1202. 2009.

WASSEF, M. et al. The role of OmpK35, OmpK36 porins, and production of β -lactamases on imipenem susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates, Cairo, Egypt. **Microbial Drug Resistance**. v. XX, n. XX, p. XX. 2015.

ANEXOS

Anexo A. Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP-UFSM).



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: MARLI MATIKO ANRAKU DE CAMPOS

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 27094514.7.0000.5346

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 570.476

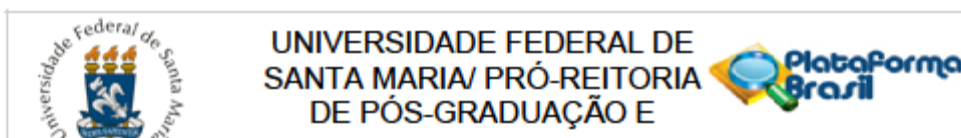
Data da Relatoria: 26/03/2014

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um projeto de mestrado, que descreve a emergência de resistência bacteriana aos carbapenêmicos. As enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos têm sido notáveis devido a capacidade de causar surtos e pelo aumento de sua prevalência. As carbapenemases mais frequentemente encontradas são as KPC, em sua maioria codificadas por plasmídios em cepas de *K. pneumoniae*. No Brasil, existem diversos relatos de casos e surtos envolvendo cepas produtoras de KPC, predominantemente em isolados de *K. pneumoniae*. No período de junho a dezembro de 2013, foram identificados 34 casos de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), sendo 58% destes causados por *Klebsiella pneumoniae*. Portanto, *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos representa hoje um problema importante na instituição.

MÉTODO: O presente projeto, propõe-se a realização de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos por microdiluição em caldo e caracterização molecular de aproximadamente 200 isolados clínicos de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Estas amostras serão selecionadas durante 12 meses consecutivos, sendo estudados todos os isolados bacterianos de enterobactérias resistentes ao ertapenem, com teste de Hodge modificado (HTM) positivo ou inconclusivo, provenientes de qualquer sítio de infecção. Inicialmente, as cepas isoladas serão identificadas pelo sistema Vitek2 e submetidas ao HTM e

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 91.059-900
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 570.476

teste de sensibilidade por E-test para confirmação da resistência, como rotina, no setor de microbiologia do laboratório de análises clínicas do HUSM. Os isolados serão submetidos ao teste de sensibilidade aos antimicrobianos pela técnica de microdiluição em caldo, conforme descrito pelo Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Serão testados os seguintes antimicrobianos: imipenem/cilastatina sódica, meropenem, ertapenem, sulfato de polimixina B e tigeciclina. Todos isolados clínicos identificados fenotipicamente como resistentes a imipenem, meropenem e ertapenem, serão confirmados por PCR quanto à presença de genes que codificam enzimas com capacidade de hidrólise de carbapenêmicos, a saber: KPC, GES, IMP, VIM, GIM-1, SIM-1 e SPM. Para investigar a presença destes genes será realizada PCR com iniciadores específicos para cada gene. A análise dos dados será realizada através da colocação dos resultados em um banco de dados, que será gerado utilizando-se o programa Bionumerics (AppliedMaths, Bélgica). Esse programa possui diversos módulos que permitem analisar os resultados de sensibilidade a antimicrobianos, caracterização e tipagem molecular.

Objetivo da Pesquisa:

GENERAL: Caracterizar molecularmente isolados clínicos da família das Enterobacteriaceae resistente a carbapenêmicos no Hospital Universitário de Santa Maria.

ESPECÍFICOS:

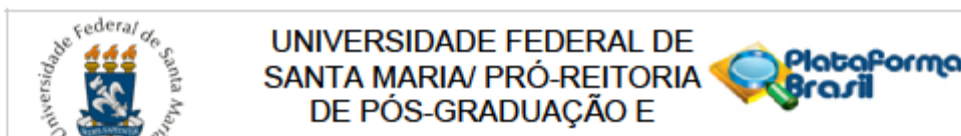
- 1- Por meio da detecção de genes que codificam carbapenemases, determinar se o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos é por produção de enzimas que degradam essas drogas;
- 2- Identificar diferentes tipos de carbapenemases através de técnicas moleculares;
- 3- Avaliar perfil de sensibilidade a antimicrobianos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RISCOS: a pesquisa não trará risco de ordem física ou psicológica aos pacientes que apresentarem infecção pelos isolados clínicos estudados, pois os testes in vitro serão realizados com material já coletado e processado, não havendo intervenção dos pesquisadores na coleta e diagnóstico do paciente, não sendo estes envolvidos diretamente na pesquisa.

BENEFÍCIOS: Não haverá benefícios diretos ao paciente. Apenas benefícios indiretos, com maior conhecimento do tema estudado.

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 91.059-900
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 570.476

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta Termo de confidencialidade, folha de rosto, autorização institucional, registro no GAP devidamente redigidos e assinados.

Recomendações:

.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências assinaladas anteriormente foram atendidas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 26 de Março de 2014

Assinador por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
 (Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
 Bairro: Camobi CEP: 91.059-900
 UF: RS Município: SANTA MARIA
 Telefone: (55)3220-9362 E-mail: cep.ufsm@gmail.com

APÊNDICES

Apêndice A – Quadro de resultados fenotípicos e genotípicos

Isolados Clínicos	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{OXA-48}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{SPM}	<i>bla</i> _{SIM}	<i>bla</i> _{VIM}	<i>bla</i> _{IMP}	<i>bla</i> _{GIM}	Bomba de efluxo	Blue-Carba	EDTA	AFB	Porinas OmpK35/36	55
19	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	Perda de uma ou outra	
23	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	Perda de uma ou outra	
25	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Perda de ambas	
30	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de uma ou outra	
37	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	POS	Perda de ambas	
39	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de uma ou outra	
40	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de uma ou outra	
48	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
49	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
51	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
53	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de uma ou outra	
54	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de uma ou outra	
56	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
60	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
67	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
73	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
75	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
76	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Perda de uma ou outra	
78	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
82	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	Perda de uma ou outra	
86	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
87	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
89	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	POS	Perda de ambas	
91	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
93	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	
95	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	POS	Perda de ambas	

Quadro 1- Resultados fenotípicos e genotípicos obtidos para os 27 isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Hospital Universitário de Santa Maria de julho de 2013 a agosto de 2014).

Apêndice B - Teste de Blue-Carba

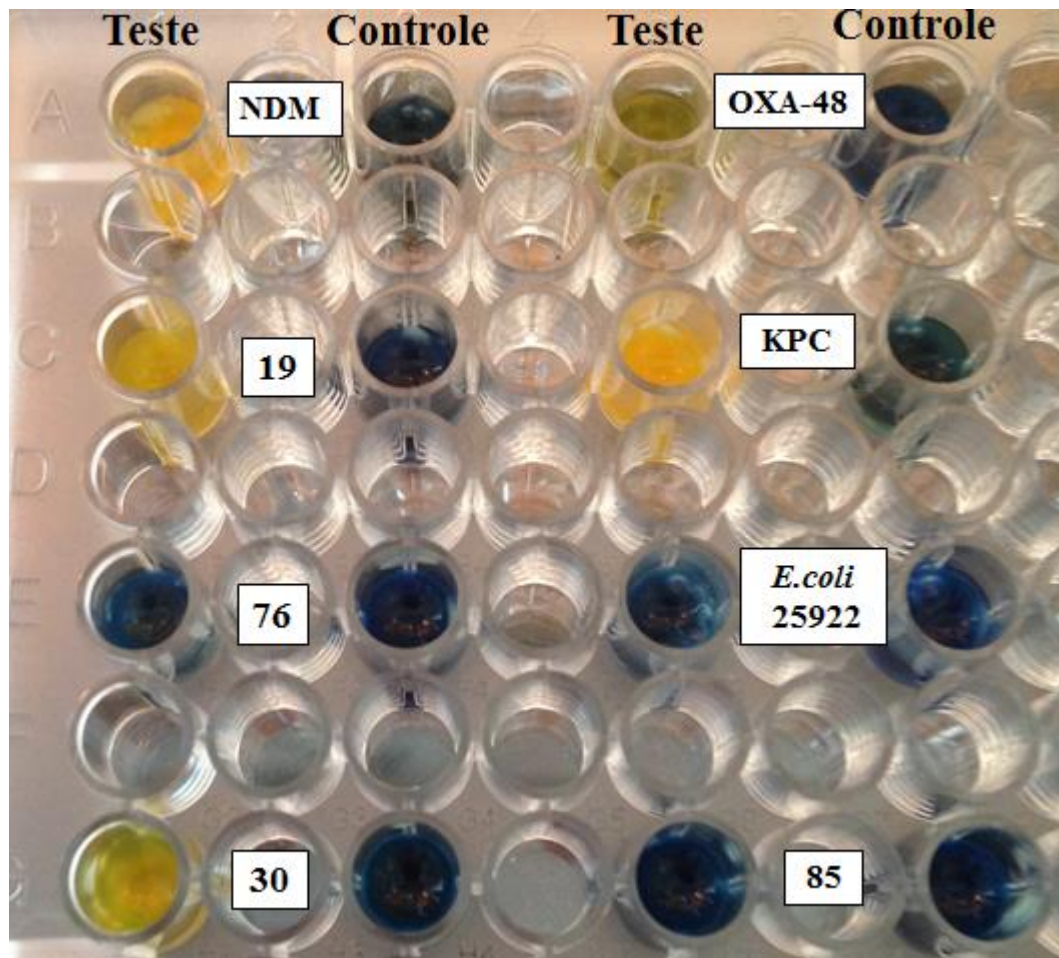


Figura 3. Resultado do Teste de Blue-Carba para os isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Hospital Universitário de Santa Maria de julho de 2013 a agosto de 2014). Controle negativo: *E. coli* ATCC 25922; controles positivos: KPC, NDM e OXA-48; isolados clínicos: 19, 76, 30 e 85.

Apêndice C – Testes de disco combinado

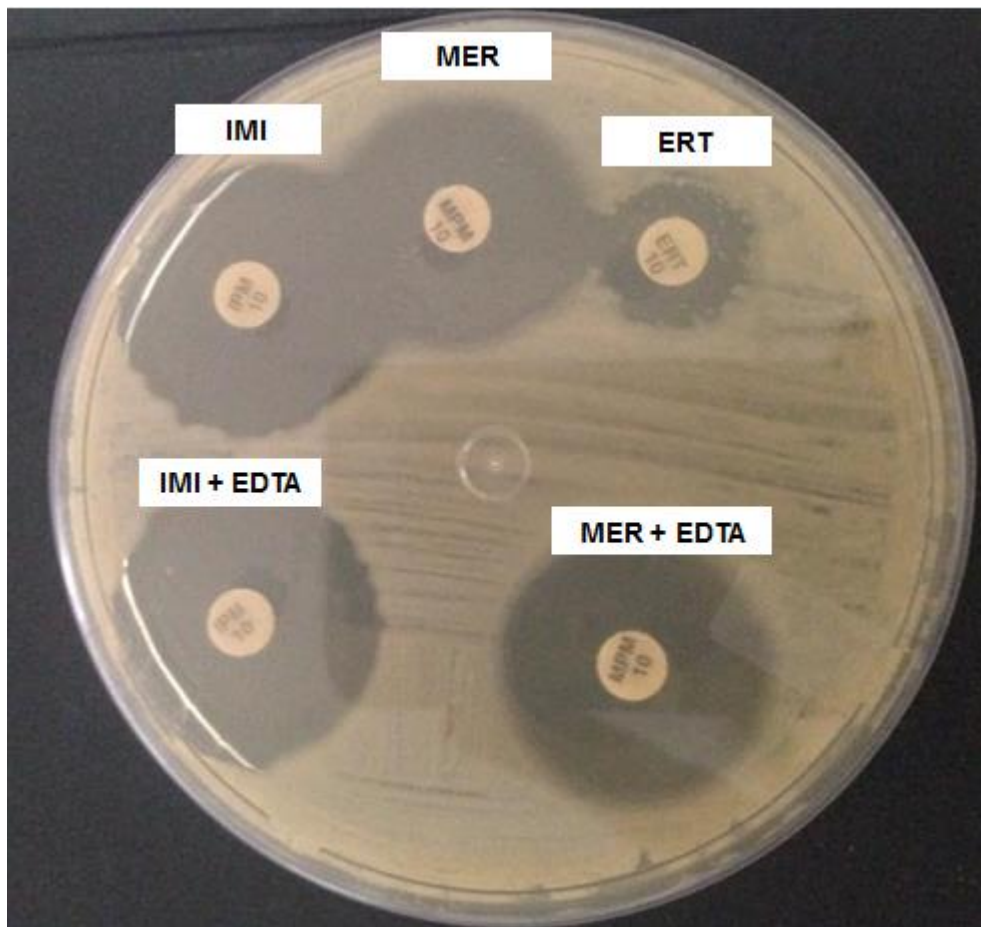


Figura 4. Teste para detecção de metalo- β -lactamase negativo dos isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (Hospital Universitário de Santa Maria de julho de 2013 a agosto de 2014). IMI: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem.

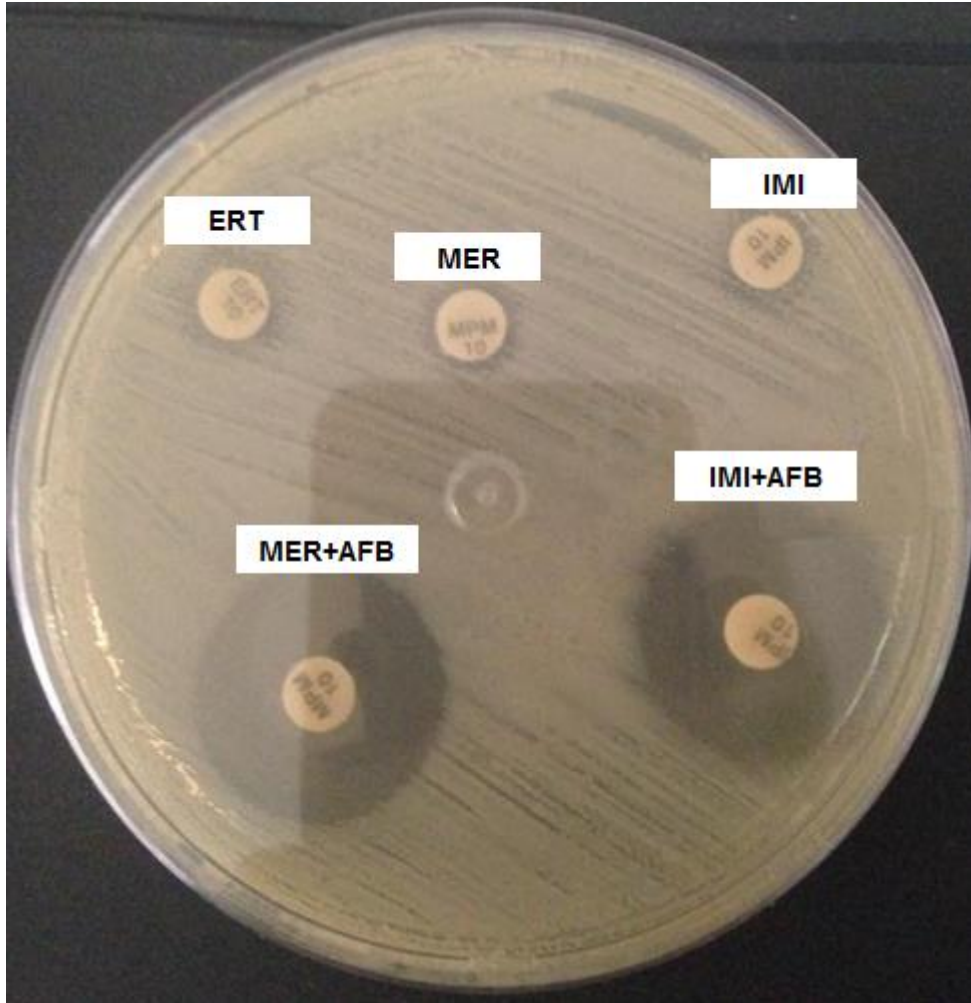


Figura 5. Teste com ácido fenilborônico (AFB) positivo.

IMI: imipenem; MER: meropenem; ERT: ertapenem.

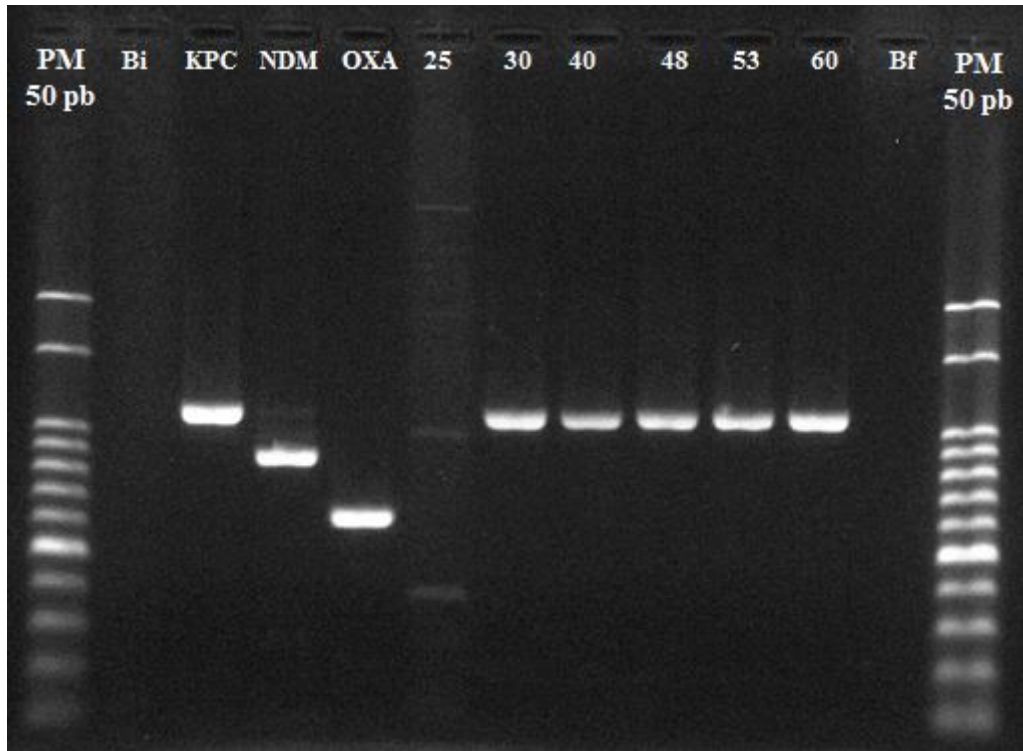
Apêndice D – Fotos dos géis de eletroforese em agarose e SDS-PAGE

Figura 7. Reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para detecção dos genes bla_{KPC} (795 pb) , bla_{NDM} (621 pb) e bla_{OXA-48} (438 pb) de isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Hospital Universitário de Santa Maria de julho de 2013 a agosto de 2014).

PM: Peso molecular; pb: pares de base; Bi: Branco inicial; Bf: Branco final; 25, 30, 40, 48, 53, 60: isolados clínicos; KPC, NDM, OXA: controles positivos.

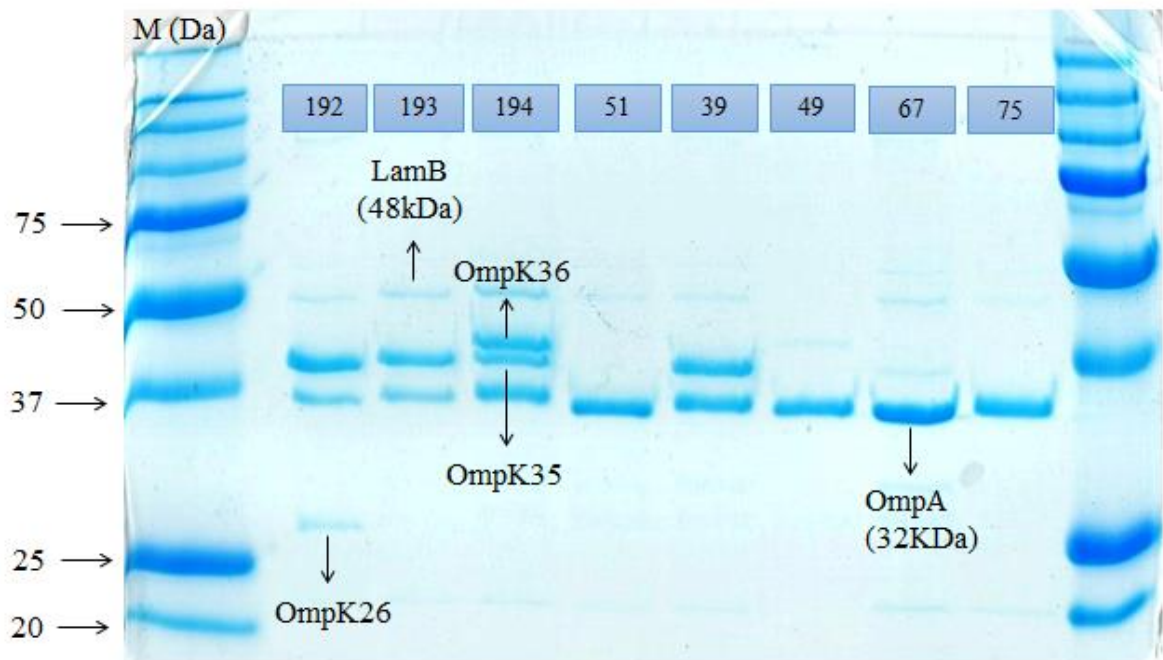


Figura 8. Representação do perfil de bandas obtido a partir do método de SDS-PAGE dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* (Hospital Universitário de Santa Maria de julho 2013 a agosto de 2014).

M: marcador Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad; 192: cepa controle de *K. pneumoniae* apresentando apenas OmpK36 induzível com canamicina (50mg/mL); 193: cepa controle de *K. pneumoniae* apresentando apenas OmpK35 induzível com canamicina (50mg/mL); 194: cepa controle de *K. pneumoniae* apresentando OmpK35/36 induzível com canamicina (50mg/mL); 51, 39, 49, 67, 75: isolados clínicos; OmpA: proteína essencial no metabolismo bacteriano.