

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

Vinícius Victor Lorenzoni

**EPIDEMIOLOGIA E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS EM
BACILOS GRAM-NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES**

Santa Maria, RS
2018

Vinícius Victor Lorenzoni

**EPIDEMIOLOGIA E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS
MULTIRRESISTENTES**

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

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Rosmari Hörner

Santa Maria, RS
2018

Vinícius Victor Lorenzoni

**EPIDEMIOLOGIA E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS
MULTIRRESISTENTES**

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

Aprovado em 28 de setembro de 2018:

Rosmari Hörner, Dra. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Virgínia Maria Cóser, Dra. (UFSM)

Afonso Luis Barth, Dr. (UFRGS) - Parecer

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

A Deus por me amparar, iluminar e dar forças para seguir em frente em momentos difíceis, permanecendo ao meu lado durante esta trajetória.

Aos meus pais, Airton e Ledi, e irmãos, Bruno e Maria Eduarda, por me apoiarem, incentivarem a sempre buscar conhecimento e não permanecer no comodismo.

Aos meus amigos Aline, Verônica, Leísa, Juana, Nadine, Juliana, Vinícia, Suelen, Susana, Franciéli, Dida, Luis Gustavo, Jonatan e Matheus, que sempre estiveram ao meu lado quando mais precisei, sempre apoiando, ouvindo meus desabafos e aconselhando, além da parceria nas horas livres (festas, jantas e jogos).

Às minhas amigas de longa data, Alana e Maria Cláudia, por sempre estarem ao meu lado e no meu coração, mesmo que distantes.

Às minhas amigas Tanise, Luísa e Bianca que tive o imenso prazer de conhecer durante a graduação e por criarmos uma amizade forte e inseparável.

Aos integrantes do LABAC, em especial, Roberta, Danielly e Silvana pela parceria, ensinamentos e amizade construída. Vocês três foram essenciais para eu concluir esta etapa.

À minha orientadora, Dr^a. Rosmari Hörner, por ter me aceitado no laboratório na metade da graduação e possibilitar que construísse meu conhecimento científico.

Ao Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, em especial, professor Dr. Afonso Luis Barth e Tanise Dalmolin pelo suporte físico e intelectual para o desenvolvimento do trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário de Santa Maria, por cederem as amostras clínicas.

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

Ao CNPq pelo auxílio financeiro durante o mestrado.

Por fim, a todos que não foram citados, mas que foram essenciais para a realização do trabalho.

RESUMO

EPIDEMIOLOGIA E INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS EM BACILOS GRAM-NEGATIVOS MULTIRRESISTENTES

AUTOR: Vinícius Victor Lorenzoni

ORIENTADORA: Rosmari Hörner

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública global e acarreta em infecções hospitalares recidivantes, altas taxas de morbimortalidade e elevado impacto financeiro. Os carbapenêmicos e polimixinas são antimicrobianos extensamente utilizados para o tratamento de microrganismos Gram-negativos multirresistentes. Diversos mecanismos de resistência a esses fármacos já foram relatados, como produção de β -lactamases (exemplo, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, metalo- β -lactamases e oxacilinas), modificações na membrana externa (exemplo, alterações em sistemas componentes PmrAB/PhoPQ e no lipídio A) e sistemas de efluxo, limitando as opções terapêuticas. O objetivo deste estudo foi determinar o perfil epidemiológico de 3069 isolados clínicos de bacilos Gram-negativos multirresistentes oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria, entre os anos de 2015 e 2017, e detectar a resistência aos carbapenêmicos e polimixinas por métodos fenotípicos (difusão de disco com inibidores enzimáticos, Carba-NP, Blue-Carba e Polimixina NP) e moleculares (Reação em Cadeia da Polimerase e sequenciamento). Verificou-se a presença de KPC em 80% das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (56/70), bem como a presença do gene *bla*_{KPC} por PCR convencional. Os testes de difusão de disco com inibidores enzimáticos, Carba-NP e Blue-Carba demonstraram 100% de sensibilidade e especificidade para detectar a presença de carbapenemases. O teste Polimixina NP demonstrou 100% de sensibilidade e especificidade para detectar resistência à colistina em 340 bacilos Gram-negativos (enterobactérias, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*) com sensibilidade reduzida às polimixinas. Entre eles, o gene *mcr-1* mediado por plasmídeos esteve presente em um isolado de *Escherichia coli* resistente à colistina (CIM 64 $\mu\text{g/mL}$) recuperado de hemocultura, detectado por PCR convencional e confirmado por método Sanger de sequenciamento. A capacidade de transmissão do gene foi investigada por conjugação bacteriana com *E. coli* J53 resistente a azida, onde obteve-se um transconjugado resistente à colistina (CIM 4 $\mu\text{g/mL}$) e carreador do gene *mcr-1*. Através de uma análise temporal da resistência antimicrobiana em 2659 isolados de *K. pneumoniae* entre os anos de 2015 e 2017, observou-se um aumento de resistência à colistina (532,8%), amicacina (142,8%), meropenem (85,1%), imipenem (79,5%), tigeciclina (77,7%), ciprofloxacino (66,7%), gentamicina (51,9%) e ertapenem (36,1%). Em suma, os principais genes detectados no estudo foram *bla*_{KPC} e *mcr-1* e os testes fenotípicos apresentaram ótima performance, possibilitando a utilização na rotina laboratorial. Frente ao exposto, torna-se fundamental reforçar a implementação de medidas de controle de infecção mais rigorosas e planejamento terapêutico adequado, uma vez que esse fenótipo apresentado é acelerado pela disseminação de clones de alto risco e genes de resistência mediados por elementos genéticos móveis, como plasmídeos, bem como uso indiscriminado de antimicrobianos.

Palavras-chaves: Carbapenêmicos. Infecção hospitalar. Polimixinas. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

EPIDEMIOLOGY AND INVESTIGATION OF CARBAPENEM AND POLYMYXIN RESISTANCE MECHANISMS IN MULTIDRUG-RESISTANT GRAM-NEGATIVE BACILLI

AUTHOR: Vinícius Victor Lorenzoni

ADVISOR: Rosmari Hörner

Bacterial resistance is a global public health problem and leads to relapsing nosocomial infections, high morbidity and mortality rates and high financial impact. Carbapenems and polymyxins are extensively antimicrobials agents used for treatment of multidrug-resistant Gram-negative microorganisms. Several mechanisms of resistance to these drugs have been reported, such as the production of β -lactamases (e.g. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, metallo- β -lactamases and oxacillinases), modifications in outer membrane (e.g. changes in PmrAB/PhoPQ component systems and in lipid A) and efflux systems, limiting therapeutic options. The aim of this study was to determine the epidemiological profile of 3069 multidrug-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates from the Hospital Universitário de Santa Maria between the years 2015 and 2017 and to detect resistance to carbapenems and polymyxins by phenotypic (disc diffusion with enzymatic inhibitors, Carba-NP, Blue-Carba and Polymyxin NP) and molecular methods (Polymerase Chain Reaction and sequencing). Presence of KPC in 80% of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* was verified, as well as the presence of *bla*_{KPC} gene by conventional PCR. Disk diffusion with enzymatic inhibitors, Carba-NP and Blue-Carba phenotypic tests showed 100% sensitivity and specificity to detect the presence of carbapenemases. Polymyxin NP test demonstrated 100% sensitivity and specificity to detect resistance to colistin in 340 Gram-negative bacilli (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*) with reduced sensitivity to polymyxins. Among them, the plasmid-mediated *mcr-1* gene was present in one colistin-resistant *Escherichia coli* isolate (MIC 64 μ g/mL) recovered from blood culture, detected by conventional PCR and confirmed by Sanger sequencing method. The ability to transmit the gene was investigated by bacterial conjugation with azide-resistant *E. coli* J53 and a colistin-resistant transconjugant (MIC 4 μ g/mL) and carrier of the *mcr-1* gene were obtained. A temporal analysis of antimicrobial resistance in 2659 *K. pneumoniae* isolates between the years 2015 and 2017 showed and increase resistance to colistin (532.8%), amikacin (142.8%), meropenem (85.1%), imipenem (79.5%), tigecycline (77.7%), ciprofloxacin (66.7%), gentamicin (51.9%) and ertapenem (36.1%). Therefore, the main genes detected in the study were *bla*_{KPC} and *mcr-1*, and the phenotypic tests presented excellent performance, making possible the use in the laboratory routine. In view of the foregoing, it's fundamental to reinforce the implantation of stricter infection control measures, and adequate therapeutic planning, as this phenotype is accelerated by the dissemination of high-risk clones and resistance genes mediated by mobile genetic elements, such as plasmids, as well as indiscriminate use of antimicrobials agents.

Keywords: Bacterial resistance. Carbapenems. Nosocomial Infection. Polymyxins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas.....	12
Figura 2 – Estruturas químicas do meropenem (a), ertapenem (b), imipenem (c) e doripenem (d)	14
Figura 3 – Estruturas químicas das polimixinas B (a) e E (b).....	25
Figura 4 – Aumento de resistência em isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> entre 2015 e 2017.....	61
Figura 5 – Difusão de disco com inibidores enzimáticos.....	84
Figura 6 – Testes de Carba-NP e Blue-Carba.....	85
Figura 7 – Teste de Polimixina NP.....	85
Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.....	86
Figura 9 – Cromatograma correspondente ao <i>Forward</i>	88
Figura 10 – Cromatograma correspondente ao <i>Reverse</i>	88
Quadro 1 – Sequências de nucleotídeos gerados pelo método Sanger para o isolado clínico de <i>E. coli</i> carreador do gene <i>mcr-1</i>	87
Figure 1 – Increased antimicrobials resistance of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates between 2015 and 2016.....	53

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Klebsiella pneumoniae</i> isoladas em 2017.....	59
Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de <i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente à colistina isoladas em 2017*.....	60
Table 1 – Antimicrobial susceptibility profile of 70 CRE isolated between August and December 2015 at the HUSM, Santa Maria/RS, Brazil.....	36
Table 2 – Phenotypic and molecular evaluation of the isolated clinical specimens.....	38
Table 1 – Antimicrobial susceptibility profile of KPC-Kp, <i>E. coli</i> harboring <i>mcr-1</i> , transconjugant and <i>E. coli</i> J53.....	45
Table 1 – Antimicrobial susceptibility profile of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates between 2015 and 2016.....	52
Table 2 – Antimicrobial susceptibility profile of colistin-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates between 2015 and 2016*.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABC	<i>ATP Binding Cassette</i>
AmpC	Ampicilinas da classe C
ATCC	American Type Culture Collection
CCCP	Carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
ERC	Enterobactérias Resistentes aos Carbapenêmicos
ESBL	β -lactamases de Espectro Ampliado
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
GES	<i>Guiana-extended spectrum</i>
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LPS	Lipopolissacarídeo
MATE	<i>Multidrug and Toxic Compound Extrusion</i>
MBL	Metallo- β -lactamase
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas
MSF	<i>Major Facilitator Superfamily</i>
NDM	<i>New Delhi</i> metallo- β -lactamase
OXA	Oxacilinase
PBP	Proteínas Ligadoras de Penicilina
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RND	<i>Resistance Nodulation Division</i>
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SMR	<i>Small Multidrug Resistance</i>
TSB	Caldo Tripton de Soja
VIM	<i>Verona imipenemase</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	10
1	RESISTENCIA BACTERIANA	10
2	MICROORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS	11
3	β-LACTÂMICOS E ENZIMAS β-LACTAMASES	12
3.1	RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS	16
3.1.1	Enzimas carbapenemases	16
<i>3.1.1.1</i>	<i>Detecção fenotípica e molecular de carbapenemases</i>	18
<i>3.1.1.1.1</i>	<i>Difusão de disco com inibidores enzimáticos</i>	18
<i>3.1.1.1.2</i>	<i>Carba-NP e Blue-Carba</i>	19
<i>3.1.1.1.3</i>	<i>Métodos de inativação de carbapenêmicos modificado (mCIM) e associado ao EDTA (eCIM)</i>	20
<i>3.1.1.1.4</i>	<i>Meios cromogênicos</i>	21
<i>3.1.1.1.5</i>	<i>Detecção de genes de carbapenemases</i>	21
3.1.2	Bombas de efluxo	22
3.1.3	Porinas	23
4	POLIMIXINAS	24
4.1	RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS	27
4.1.1	Modificação da membrana externa	27
<i>4.1.1.1</i>	<i>MCR-1</i>	28
4.1.2	Bombas de efluxo	29
4.1.3	Determinação da resistência às polimixinas na rotina laboratorial	29
<i>4.1.3.1</i>	<i>Concentração Inibitória Mínima</i>	29
<i>4.1.3.2</i>	<i>Polimixina NP</i>	30
	OBJETIVOS	32
	OBJETIVO GERAL	32
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
	ARTIGO CIENTÍFICO 1	33
	ARTIGO CIENTÍFICO 2	43
	ARTIGO CIENTÍFICO 3	48
	RESULTADOS ADICIONAIS	57
	DISCUSSÃO GERAL	62
	CONCLUSÃO	64
	REFERÊNCIAS	65
	APÊNDICE A – MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS	84
	APÊNDICE B – MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DOS GENES <i>bla_{KPC}</i> E <i>mcr-1</i>	86
	ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA	89

INTRODUÇÃO

1 RESISTÊNCIA BACTERIANA

A resistência bacteriana é uma ameaça crescente para a saúde pública e acarreta em infecções hospitalares recidivantes, altas taxas de morbimortalidade e elevado impacto financeiro para as instituições de saúde e pacientes, incluindo custos de diagnósticos, terapia medicamentosa e tempo de internação (WHO, 2014). Seu desenvolvimento é um processo evolutivo normal para os microrganismos, mas é acelerada pela pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, bem como à variedade de genes de resistência em diferentes bactérias e o número de clones dentro de uma espécie, associada à transferência horizontal por elementos genéticos móveis, como plasmídeos e transposons (BASSETTI *et al.*, 2015).

O uso de antimicrobianos é o fator mais importante que leva à resistência, uma vez que estão entre os medicamentos mais prescritos na medicina humana. Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), 50% de todos antimicrobianos são prescritos incorretamente ou desnecessariamente nos Estados Unidos. Ainda, são comumente utilizados em alimentos para prevenir e controlar doenças e promover crescimento de animais. (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2013).

Com a perda de eficácia desses fármacos, os tratamentos tornam-se imprecisos, prejudicando não só a capacidade de combater doenças infecciosas de rotina, mas também o tratamento de outras enfermidades como câncer e doenças crônicas (FRIEDEN, 2013). Recentemente, a Organização Mundial da Saúde lançou uma diretriz listando as principais bactérias que necessitavam o desenvolvimento de novos antibióticos. Dentre elas, estavam enterobactérias, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos (WHO, 2017). Estes microrganismos estão entre as principais causas de infecções nosocomiais, uma vez que possuem múltiplos mecanismos de resistência, como alterações nos lipopolissacarídeos, hiperexpressão de bombas de efluxo, perdas de porinas, mutações na cápsula polissacarídica e produção de enzimas β -lactamases (em especial as carbapenemases) (CAMPOS *et al.*, 2004; MEHRAD *et al.*, 2014; POTRON; POIREL; NORDMANN, 2015; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015).

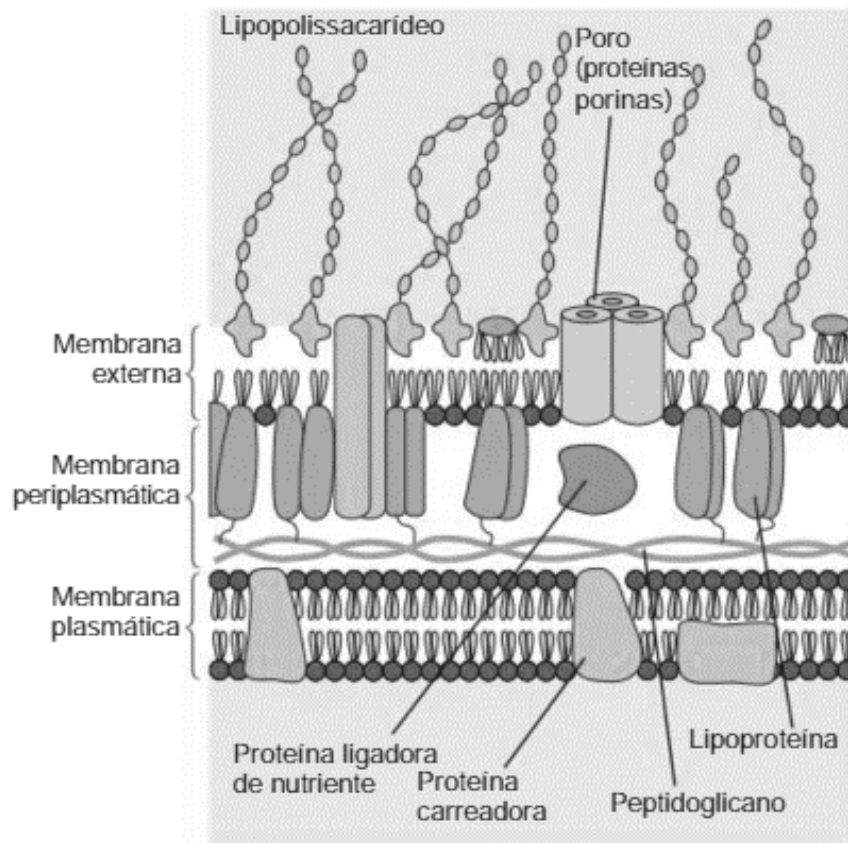
A propagação de carbapenemases levou à resistência aos carbapenêmicos, até então utilizados no tratamento de Gram-negativos multirresistentes, tornando-se necessário o uso de outros fármacos, como aminoglicosídeos (exemplo, amicacina) e polimixinas B e E (colistina) (MORRIL *et al.*, 2015; RAFAILIDIS; FALAGAS, 2014). O uso descontrolado destes e o emprego de monoterapias tem contribuído para a disseminação destes microrganismos e à baixa susceptibilidade a essas classes de antimicrobianos (TEMKIN *et al.*, 2014).

Estudos demonstram que as taxas de resistência aos carbapenêmicos e polimixinas estão crescendo, o que torna necessário investigar os mecanismos de resistência a fim de compreender a epidemiologia nos locais de infecção e promover medidas de controle da disseminação desses microrganismos multirresistentes (AIRES *et al.*, 2016; BARON *et al.*, 2016; PITOUT; NORDMANN; POIREL, 2015; ROSSI *et al.*, 2017).

2 MICRORGANISMOS GRAM-NEGATIVOS

Os microrganismos Gram-negativos podem englobar membros da ordem *Enterobacteriales* (exemplo, gêneros *Escherichia*, *Enterobacter* e *Klebsiella*) e ordem *Pseudomonadales* (exemplo, gêneros *Acinetobacter* e *Pseudomonas*). Eles possuem uma parede celular (Figura 1) complexa constituída de membrana externa contendo lipopolissacarídeos (LPS) e porinas, espaço periplasmático contendo lipoproteína, peptideoglicano e proteína ligadora de nutriente, e uma membrana plasmática contendo proteínas carreadoras. A membrana externa tem papel fundamental na manutenção da estrutura bacteriana e funciona como uma barreira de permeabilidade, dificultando o acesso de enzimas hidrolíticas e moléculas hidrofóbicas (exemplo, antimicrobianos) ao peptideoglicano (ADEOLU *et al.*, 2016; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014).

Figura 1 – Estruturas da parede celular de bactérias Gram-negativas.



Fonte: MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014, p. 111 (modificado).

Uma bactéria Gram-negativa possui uma camada fina de peptidoglicano e uma membrana externa contendo lipopolissacarídeos, fosfolipídios e proteínas. O espaço periplasmático contém proteínas de transporte, degradação e síntese da parede celular.

Os lipopolissacarídeos são constituídos de lipídeo A, núcleo polissacarídico e antígeno O. O lipídeo A é um glicofosfolipídio que serve como endotoxina, conferindo propriedades de patogenicidade sobre o sistema imune. Os microrganismos possuem sistemas capazes de controlar a expressão do LPS, produzindo variantes estruturais usadas para modular a resposta imune do hospedeiro durante a infecção. Concentrações elevadas de LPS podem causar febre, aumento da frequência cardíaca, choque séptico e morte e, concentrações baixas podem induzir a resistência não específica aos antimicrobianos (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2014; UCHIYAMA; JACOBS, 1978).

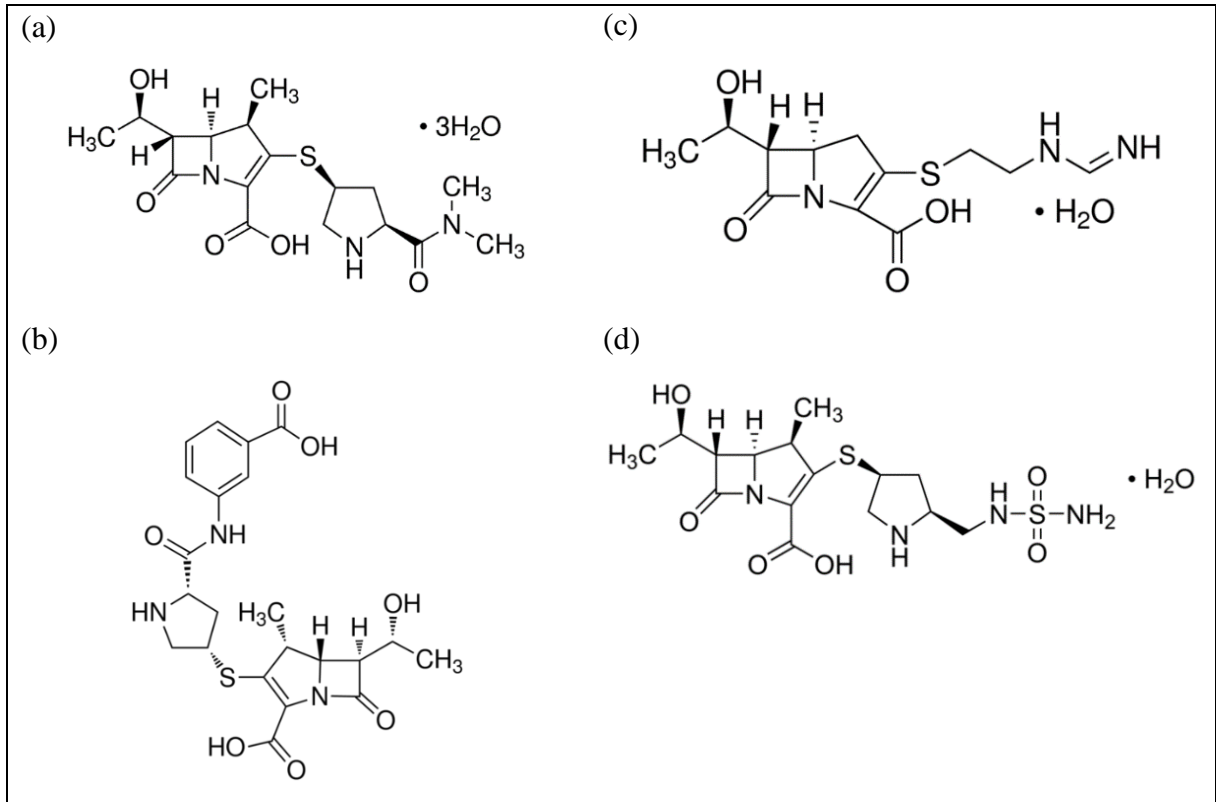
3 β -LACTÂMICOS E ENZIMAS β -LACTAMASES

Os β -lactâmicos são uma classe de antibióticos que atuam na inibição da síntese da parede celular bacteriana. Entre os grupos de β -lactâmicos estão as penicilinas, como a penicilina e seus derivados (exemplo, penicilina G, amoxicilina e ampicilina); cefalosporinas de 1ª geração (exemplo, cefazolina e cefadroxil), 2ª geração (exemplo, cefuroxima e cefoxitina), 3ª geração (exemplo, ceftriaxona e ceftazidima), 4ª geração (exemplo, cefepima) e 5ª geração (exemplo, ceftarolina); carbapenêmicos (exemplo, meropenem, imipenem, ertapenem e doripenem) e monobactâmicos (exemplo, aztreonam) (FERNANDES; AMADOR; PRUDÊNCIO, 2013).

A integridade da parede celular se dá pela presença de proteínas ligadoras de penicilina (PBPs) e glicosiltransferases (GTs). Enquanto as PBPs são responsáveis pela rigidez da parede celular por meio de ligações cruzadas entre cadeias de glicano e remoção de um resíduo terminal D-alanina, as GTs promovem uma estabilização osmótica através de ligações covalentes entre os ácidos N-acilmurâmico (NAM) e N-acetilglucosamina (NAG). Os β -lactâmicos possuem semelhança estrutural com o aminoácido D-alanina, ligando-se às PBPs e inativando-as. A redução da síntese da parede celular leva a ativação de enzimas autolíticas, ruptura da rede de peptideoglicano e lise celular (BONOMO, 2017; NICOLAU, 2008).

Os carbapenêmicos (Figura 2) possuem em suas estruturas um anel β -lactâmico ligado a um anel tiazolidínico por um átomo de nitrogênio e carbono tetraédrico adjacente. Possuem atividade de amplo espectro e são utilizados como primeira linha na terapia empírica inicial para o tratamento de infecções nosocomiais graves, incluindo pneumonias, infecções do trato urinário, septicemias e neutropenia febril. Frente aos microrganismos Gram-negativos, possuem boa atividade contra enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs) ou cefalosporinases do tipo AmpC. Eles possuem um perfil de segurança semelhante ou melhor que outras classes de β -lactâmicos, contudo podem ocorrer complicações como efeitos gastrointestinais, cefaleia, vômitos e baixo risco de convulsões (BONFIGLIO; RUSSO; NICOLETTI, 2002; MORRIL *et al.*, 2015; NICOLAU, 2008).

Figura 2 – Estruturas químicas do meropenem (a), ertapenem (b), imipenem (c) e doripenem (d).



Fonte: Sigma-Aldrich.

As enzimas β -lactamases atuam sobre os antibióticos β -lactâmicos, como penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, rompendo o anel β -lactâmico por hidrólise, inativando-os. A propagação de bactérias produtoras dessas enzimas é clinicamente preocupante, visto que conferem resistência às principais opções terapêuticas utilizadas em diversas doenças infecciosas (BONOMO, 2017).

As β -lactamases podem ser classificadas quanto Ambler (classes de A a D) e pelo sistema Bush-Jacoby (grupos de 1 a 4). Enquanto Ambler leva em consideração sequências de aminoácidos, Bush-Jacoby baseia-se na hidrólise do substrato e agentes inibidores (BUSH; JACOBY, 2010).

As enzimas da classe A são frequentemente codificadas por plasmídeos, mas podem estar localizadas no cromossomo bacteriano. Normalmente hidrolisam carbapenêmicos,

penicilinas, cefalosporinas, aztreonam e são susceptíveis frente a inibidores comercialmente disponíveis, como clavulanato, sulbactam, tazobactam e avibactam. β -lactamases TEM, SHV e CTX-M são encontradas principalmente em *E. coli* e *Klebsiella* spp. Muitas enzimas de classe A atuam frente a cefalosporinas de espectro ampliado, como é o caso de CTX-M, especialmente CTX-M14 e CTX-M15 em *E. coli*. Outras enzimas são codificadas por íntegros, como *Guiana-extended spectrum* (GES-1) em *K. pneumoniae* e VEB-1 em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Poucas enzimas da classe A exercem hidrólise aos carbapenêmicos. As principais carbapenemases da classe A incluem *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), GES, *non-metallo-carbapenemase-A* (Nmc-A) e *Serratia marcescens enzyme* (SME). Com exceção da KPC e GES, a distribuição das demais carbapenemases é relativamente limitada (BONOMO, 2017).

As enzimas da classe B degradam os β -lactâmicos na presença de um cofator metálico (Zn^{2+}). Genes *bla* de MBLs estão localizados em cromossomos, plasmídeos e íntegros. Organismos produtores de metalo- β -lactamases geralmente são resistentes a penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, mas não possuem atividade frente aos monobactâmicos (aztreonam). São resistentes na presença de inibidores comercialmente disponíveis, mas devido à dependência de zinco, a catálise é inibida por agentes quelantes, como EDTA (BONOMO, 2017).

As enzimas da classe C incluem as β -lactamases do tipo AmpC, geralmente codificadas por genes *bla* localizados no cromossomo bacteriano. São resistentes a penicilinas, inibidores de β -lactamases (clavulanato e tazobactam) e a maioria das cefalosporinas, como cefoxitina, ceftriaxona e cefotaxima. Contudo, possuem baixa atividade frente à cefepima e são inativados por carbapenêmicos (BONOMO, 2017; BUSH; JACOBY, 2010)

As enzimas da classe D incluem as oxacilinases, capazes de hidrolisar oxacilina. Diferentes enzimas dessa classe podem conferir resistência às penicilinas, cefalosporinas, cefalosporinas de espectro estendido (ESBL do tipo OXA) e carbapenêmicos (carbapenemases do tipo OXA). Este grupo é capaz de hidrolisar amino e carboxipenicilinas e são inibidos por cloreto de sódio (NaCl) (BONOMO, 2017; BUSH; JACOBY, 2010).

3.1 RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

A utilização dos carbapenêmicos para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas (MDR) levou a propagação da resistência a esta classe, tornando-se um problema de saúde global. A redução da susceptibilidade pode surgir através da hidrólise do anel β -lactâmico por enzimas carbapenemases, alterações da permeabilidade da membrana por mutações em bombas de efluxo e porinas (LOGAN; WEINSTEIN, 2017; POTTER; D'SOUZA; DANTAS, 2016).

3.1.1 Enzimas carbapenemases

A enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) presente principalmente na família *Enterobacteriaceae* está globalmente distribuída de forma endêmica e é responsável por muitos surtos em todo mundo (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). No Brasil, o primeiro relato de KPC-2 foi descrito por Monteiro *et al.* (2009) em quatro isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e cefalosporinas, coprodutores de outras enzimas como TEM-1, CTX-M-2 e SHV-11, coletados de sangue e urina, oriundos da cidade de Recife. Desde então, a enzima também vem sendo descrita em outros gêneros de enterobactérias e não-fermentadores, como *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (MONTEIRO *et al.*, 2009; da SILVA *et al.*, 2018; de PAULA-PETROLI *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2016; ROSA *et al.*, 2017). Outras enzimas pertencentes a classe A, como GES, vem sendo relatadas esporadicamente, principalmente a variante GES-5, em isolados de *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* (PICÃO *et al.*, 2010; POLOTTO *et al.*, 2012; RIBEIRO *et al.*, 2014).

Recentemente, no ano de 2015 em São Paulo, foi relatado o surgimento de uma nova carbapenemase de classe A, a *Brazilian Klebsiella carbapenemase* (BKC-1) em três isolados clínicos de *K. pneumoniae* a partir de amostras de sangue, trato respiratório inferior e *swab* perirretal (NICOLETTI *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Martins *et al.* (2016) avaliou a frequência desta enzima em 635 isolados de *Klebsiella* spp. oriundos de diferentes regiões brasileiras, sendo detectado em apenas 0,3% (2/635) isolados de *K. pneumoniae*, cultivados de amostras de sangue e *swab* retal de pacientes internados em diferentes hospitais da cidade de São Paulo (MARTINS *et al.*, 2016).

A disseminação de metalo- β -lactamases aumentou drasticamente após a descoberta da *New Delhi* metallo- β -lactamase (NDM) em 2008 em um isolado de *K. pneumoniae* na Índia (YONG *et al.*, 2009). Desde então, tem havido uma disseminação global de NDM entre diferentes espécies, de forma endêmica no subcontinente indiano e de forma esporádica em outras regiões (LOGAN; WEINSTEIN, 2017). No Brasil, a enzima vem sendo relatada principalmente em *K. pneumoniae*, e isoladamente em outros microrganismos, como *Enterobacter cloacae*, *E. hormaechei*, *A. baumannii* e *Providencia rettgeri*, coprodutores ou não de KPC-2 (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2015; PILLONETTO *et al.*, 2014; QUILES *et al.*, 2015).

A primeira detecção de *Sao Paulo* metallo- β -lactamase (SPM-1) foi descrita por Toleman *et al.* (2002) em um isolado clínico de *P. aeruginosa* cultivado em urina em São Paulo. Desde então, esta enzima foi descrita em distintas regiões brasileiras, sendo observada em vários surtos hospitalares de *P. aeruginosa* (GASPARETO *et al.*, 2007; MARTINS *et al.*, 2007; POLOTTO *et al.*, 2012; TOLEMAN *et al.*, 2002). Em um estudo realizado por Martins *et al.* (2007), ao investigarem a prevalência de metalo- β -lactamases em dois hospitais terciários de Porto Alegre, constaram a presença de SPM-1 em 19,56% (18/92) e IMP-1 em 5,43% (5/92) dos isolados de *P. aeruginosa* resistentes à ceftazidima e/ou imipenem. A presença de IMP também foi descrita por outros autores, incluindo isolados de *Acinetobacter* spp., *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, coprodutores de KPC e CTX-M, por exemplo (LINCOPAN *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2015; TOGNIM *et al.*, 2006).

O primeiro relato de uma variante (OXA-370) da família OXA-48 no Brasil foi descrito por Sampaio *et al.* (2014) em uma cepa de *Enterobacter hormaechei* recuperada de swab retal, na cidade de Porto Alegre. Desde então, a variante foi relatada em outros espécimes, como *Citrobacter freundii*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *K. pneumoniae*. Magagnin *et al.* (2017) descreveram que esta variante pode não transmitir alto nível de resistência aos carbapenêmicos, uma vez que apresentou sensibilidade de 94,2% ao meropenem, 78,8% ao imipenem e 7,7% ao ertapenem, para os 52 isolados avaliados (MAGAGNIN *et al.*, 2017; PEREIRA *et al.*, 2015; SAMPAIO *et al.*, 2014).

3.1.1.1 Detecção fenotípica e molecular de carbapenemases

3.1.1.1.1 Difusão de disco com inibidores enzimáticos

A detecção de produtores de KPC baseia-se na atividade do ácido borônico e seus derivados (ácido fenilborônico e ácido 3-aminofenilborônico) em inibir β -lactamases do tipo serina. A detecção de produtores de MBL baseia-se na atividade agentes quelantes como EDTA e ácido dipicolínico em impedir o uso de zinco para hidrolisar os β -lactâmicos. Nenhum teste com inibidores é adequado para detectar produtores de OXA, uma vez que são resistentes aos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam, ou qualquer agente quelante de zinco (NORDMANN *et al.*, 2012).

A técnica consiste na suplementação de discos de carbapenêmicos com inibidores enzimáticos e aplicação em uma placa de ágar Mueller-Hinton contendo uma suspensão bacteriana. Após a incubação da placa por 18-24 horas a 35 ± 2 °C, é realizada a medição da formação de halos e comparação dos discos suplementados ou não com os inibidores. Isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm são considerados produtores de carbapenemases (ANVISA, 2013).

O método possui elevada sensibilidade, mas problemas de especificidade podem ocorrer quando há coprodução de AmpC e alguns tipos de ESBLs, uma vez que o ácido borônico pode inibir essas classes de β -lactamases, gerando resultados falso-positivos (BIALVAEI *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Pasteran *et al.* (2011) constatou 97% de sensibilidade para detecção de KPC e MBL, bem como 97% e 81% de especificidade para detecção de KPC e MBL, respectivamente, em isolados de *P. aeruginosa* na presença de ácido aminofenilborônico e dipicolínico. Ansari, Munir e Saad (2018) detectaram a presença de carbapenemases em 95,45% (43/34) isolados de enterobactérias, sendo 88,3% (38/35) produtores de KPC e 11,62% (4/43) coprodutores de MBL, sendo detectados com ácidos fenilborônico e EDTA (ANSARI; MUNIR; SAAD, 2018; PASTERAN *et al.*, 2011).

3.1.1.1.2 Carba-NP e Blue-Carba

O teste bioquímico Carba-NP foi inicialmente desenvolvido por Nordmann, Poirel e Dortet (2012) para identificar a produção de carbapenemases e diferenciar de cepas resistentes aos carbapenêmicos por outros mecanismos, como defeito da permeabilidade da membrana externa associado à produção de cefalosporinases e/ou β -lactamases de espectro estendido, ou ainda, cepas sensíveis que expressam β -lactamases sem atividade carbapenemase (NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012a). Posteriormente, o teste foi adaptado por Dortet, Poirel e Nordmann (2012), denominado *Carba NP test II*, para discriminar as classes A, B e D de Ambler. O método baseia-se na detecção da acidificação resultante da hidrólise do anel β -lactâmico do imipenem, associado ao tazobactam e EDTA, como inibidores. Ele utiliza uma solução de vermelho de fenol, sulfato de zinco e imipenem como substrato e se baseia na mudança de coloração de vermelho para amarelo-laranja (DORTET; POIREL; NORDMANN, 2012; NORDMANN; POIREL; DORTET, 2012b). A técnica é de fácil aplicação, rápida e apresenta elevada especificidade e sensibilidade para detecção ou não da atividade enzimática. Um estudo realizado por Dortet *et al.* (2014) constatou que cepas produtoras de KPC, IMP, VIM e NDM apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade. Contudo, o estudo relatou 91,3% de sensibilidade e 100% de especificidade para OXA-48 (DORTET *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Tijet *et al.* (2013) constatou resultados falsos-negativos associados a cepas mucoides e fraca expressão de OXA-48, demonstrando que o teste não é confiável para identificação precisa de oxacilinases (TIJET *et al.*, 2013).

O teste bioquímico Blue-Carba foi sugerido por Pires, Novais e Peixe (2013) e apresenta 100% de especificidade e sensibilidade. Ele consiste em uma modificação do Carba-NP, substituindo o indicador vermelho de fenol por azul de bromotimol. Este indicador possui faixa ampla de pH (6,0 a 7,6) para a maioria das β -lactamases (pH = 6,8), tornando possível a detecção de cepas produtoras diretamente de culturas bacterianas. A solução teste contém o indicador, sulfato de zinco e imipenem como substrato. Já a solução controle negativo não contém o imipenem, controlando a influência de componentes ou produtos bacterianos no pH da solução. A atividade da enzima carbapenemase é detectada pela mudança de coloração azul para amarelo ou verde quando a solução teste e solução controle negativo apresentam colorações: amarelo e azul, amarelo e verde ou verde e azul, respectivamente. Não produtores de carbapenemases permanecem azul ou verde em ambas as soluções teste e controle negativo (PIRES; NOVAIS; PEIXE, 2013).

Um estudo realizado por Pancotto *et al.* (2018) avaliou a performance do Carba NP, Blue-Carba e método de inativação de carbapenêmicos em 83 isolados de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Verificou-se 62,7%, 95,3% e 74,4% de sensibilidade e 97,5%, 100% e 97,5% de especificidade, respectivamente. Problemas de sensibilidade do Carba NP foram descritos para produtores de OXA-370 (PACOTTO *et al.*, 2018). Bir *et al.* (2018) compararam os testes *In-house* Carba NP (iCarba NP), *Commercial* Carba NP (cCarba NP), Blue Carba (BCarba), teste modificado de Hodge (MHT) e CHROMagar KPC, e verificaram que houve variação de sensibilidade de 63,6% a 96,9%. A menor sensibilidade foi encontrada no MHT (63,6%), e a maior para o CHROMagar KPC e BCarba, ambos com 96,9%, seguidos do cCarba NP, cCarba NP e iCarba NP, ambos com 93,9%. Todos testes tiveram especificidade de 71,4%, com exceção do BCarba (57,1%) (BIR *et al.*, 2018).

3.1.1.1.3 Métodos de inativação de carbapenêmicos modificado (mCIM) e associado ao EDTA (eCIM)

O método de inativação de carbapenêmicos foi desenvolvido por van der Zwaluw *et al.* (2015) para detectar a atividade de carbapenemases, incluindo oxacilinases. Baseia-se na adição de disco de 10 µg de meropenem em uma suspensão bacteriana (alvo de investigação) e incubação por 2 horas a 35 °C. Posteriormente, o disco é transferido a uma placa de ágar Mueller-Hinton contendo uma cepa sensível aos carbapenêmicos (*E. coli* ATCC 25922). A presença de carbapenemases é indicada pela inativação do disco de meropenem e crescimento da cepa sensível aos carbapenêmicos. A ausência de carbapenemases é indicada pela formação de halo de inibição. O método é considerado como triagem, uma vez que não diferencia os tipos de carbapenemases (VAN DER ZWALUW *et al.*, 2015). Um estudo realizado por Tijet, Patel e Melano (2015) em 182 isolados de enterobactérias revelou que o teste apresentou 100% de especificidade e maior sensibilidade (98%) quando comparado com o Carba-NP (100% de especificidade e 90,1% de sensibilidade) (TIJET; PATEL; MELANO, 2015).

Problemas de sensibilidade decorrentes da detecção de OXA-48 levaram a modificações no teste. Descrito por Pierce *et al.* (2017), o método de inativação de carbapenêmicos modificado (mCIM) difere-se na etapa de inativação do meropenem, preparando a suspensão bacteriana em Caldo Triptona de Soja (TSB) e aumento de incubação para 4 horas. A modificação levou aumento de sensibilidade de 82% para 93%. A adição de ácido

edilenodiaminotetracético (EDTA) ao TSB permite a diferenciação entre serino carbapenemases e metalo- β -lactamases (CLSI, 2018; PIERCE *et al.*, 2017).

3.1.1.1.4 Meios cromogênicos

A triagem de carbapenemases pode ser realizada por meios de cultura comercialmente disponíveis contendo inibidores de crescimento de bactérias sensíveis aos carbapenêmicos. Isolados resistentes assumem cores diferentes de acordo com suas propriedades enzimáticas (NORDMANN *et al.*, 2012; PERRY, 2017).

O CHROMagarTM KPC é apenas capaz de detectar isolados produtores de KPC com altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. Nordmann *et al.* (2012) desenvolveram o meio Supercarba, um meio contendo ágar Drigalski, ertapenem, sulfato de zinco e cloxacilina, capaz de detectar produtores com baixa resistência (especialmente produtores de OXA-48), melhorar a expressão de MBL e impedir crescimento de isolados com altos níveis de cefalosporinas (NORDMANN; GIRLICH; POIREL, 2012). Segarra *et al.* (2018), ao avaliarem o meio CHROMagarTM mSuperCARBATM, descreveram 93,05% e 96,21% de sensibilidade e especificidade, respectivamente, para detecção de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, oriundos de *swab* retal para cultura de vigilância epidemiológica. Vasoo *et al.* (2014), descreveram alta sensibilidade (97,8%) e especificidade (86,4%) do meio SpectraTM CRE em comparação ao CHROMagarTM KPC (76,6% sensibilidade, 75,7% especificidade) ao detectarem isolados produtores de KPC de *swab* perirretal (SEGARRA *et al.*, 2018; VASOO *et al.*, 2014).

3.1.1.1.5 Detecção de genes de carbapenemases

As técnicas moleculares são consideradas técnicas de referência para identificação e diferenciação de genes de carbapenemase, como *bla*_{KPC}, *bla*_{SPM}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA-48}. Pode-se utilizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) que possui elevada sensibilidade e especificidade (NORDMANN *et al.*, 2012). A caracterização dos genes é possível através da técnica de sequenciamento, ou seja, quando se faz necessária a identificação

precisa das carbapenemases. Ela é interessante principalmente para a pesquisa e para fins epidemiológicos, mas a identificação concisa das enzimas não é necessária para o tratamento de pacientes ou para prevenção de surtos (NORDMANN; POIREL, 2013).

3.1.2 Bombas de efluxo

As bombas de efluxo são compostas por proteínas presentes na membrana externa bacteriana e atuam no reconhecimento de agentes nocivos (exemplo, antimicrobianos) que tenham penetrado na parede celular, expelindo-os para o exterior da célula bacteriana. A produção intrínseca de algumas bombas de efluxo em bactérias Gram-negativas permite que antimicrobianos de diferentes classes sejam transportados, conferindo a resistência a múltiplas drogas (MDR) (BLAIR, RICHMOND, PIDDOCK, 2014).

As bombas de efluxo podem ser divididas em cinco famílias: *Major Facilitator Superfamily* (MSF), *ATP Binding Cassette* (ABC), *Small Multidrug Resistance* (SMR), *Multidrug and Toxic Compound Extrusion* (MATE) e *Resistance Nodulation Division* (RND). Esta última é responsável pela tolerância de solventes e o efluxo de moléculas lipofílicas e anfifílicas ocorre através de um gradiente de prótons. A família RND está presente em *Klebsiella pneumoniae* (AcrABR), *Pseudomonas aeruginosa* (MexAB-OprM, MexXY-OpmR, MexEF-OprN, MexCD-OprJ), *Acinetobacter baumannii* (AdeIJK), *Escherichia coli* (AcrAB-To1C), *Neisseria gonorrhoeae* (FarmAB-MtrE) e *Salmonella enterica* (AcrAB-To1C) (BLAIR, RICHMOND, PIDDOCK, 2014; LI; NIKAIDO, 2009; MARQUEZ, 2005).

Pan *et al.* (2016), na China, ao avaliarem 75 isolados clínicos de *P. aeruginosa* resistentes aos carbapenêmicos, constataram que a hiperexpressão de MexAB-OprM estava relacionada com a redução da susceptibilidade ao meropenem e imipenem (PAN *et al.*, 2016). Huang *et al.* (2008), na China, ao avaliarem 35 isolados clínicos de *A. baumannii* (27 resistentes e 7 sensíveis aos carbapenêmicos), constataram a expressão de AdeABC em 77% dos isolados e reversão da resistência ao imipenem e meropenem utilizando inibidores de bomba, incluindo nas cepas sensíveis, mas que expressavam o sistema AdeABC (HUANG *et al.*, 2008).

Já para a família *Enterobacteriaceae*, a resistência aos carbapenêmicos pode não estar relacionada a ausência de sistemas de efluxo, como AcrAB ou To1C, mas sim com a alteração da expressão de porinas, como OmpF. Os inibidores de efluxo, como *phenylalanine-arginine*

β -naphthylamide (PA β N), podem não potencializar a atividade dos carbapenêmicos e sim aumentar os níveis de resistência em cepas com produção de carbapenemases (SAW *et al.*, 2016).

3.1.3 Porinas

O envelope da célula de bactérias Gram-negativas é constituído por uma membrana exterior, parede celular de peptidoglicano e uma membrana interna. As porinas são proteínas localizadas na membrana externa atuam como canais que permitem o transporte de pequenas moléculas hidrofílicas como ferro, nutrientes e antibióticos. Ainda, elas servem como receptores para fagos e bacteriocinas que, em conjunto ao peptidoglicano e lipopolissacarídeo, possuem um papel importante na integridade das células (TSAI *et al.*, 2011). As alterações em porinas geralmente estão associadas à inserção de fragmentos de DNA nos genes codificadores das porinas, provocando diferentes resultados à célula bacteriana, variando de uma simples redução da expressão até uma mutação gerando porinas não funcionais (MARTINS, 2014).

Na família *Enterobacteriaceae*, a perda de porinas OmpK35 (OmpF) e OmpK36 (OmpC) geralmente está relacionada à expressão de AmpC e ESBLs (exemplo, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV-1}), levando a redução de susceptibilidade às cefalosporinas e carbapenêmicos (GARCIA-FERNANDEZ *et al.*, 2012; HAMZAOU *et al.*, 2018; SHI *et al.*, 2013). Em *P. aeruginosa*, a resistência aos carbapenêmicos está relacionada a proteína OprD, podendo estar relacionada a sistemas de efluxo (MexAB-OprM, MexXY-OprM) e genes de carbapenemases (exemplo, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{KPC-2} e *bla*_{GES-1}) (CAVALCANTI *et al.*, 2015; TERZI *et al.*, 2015).

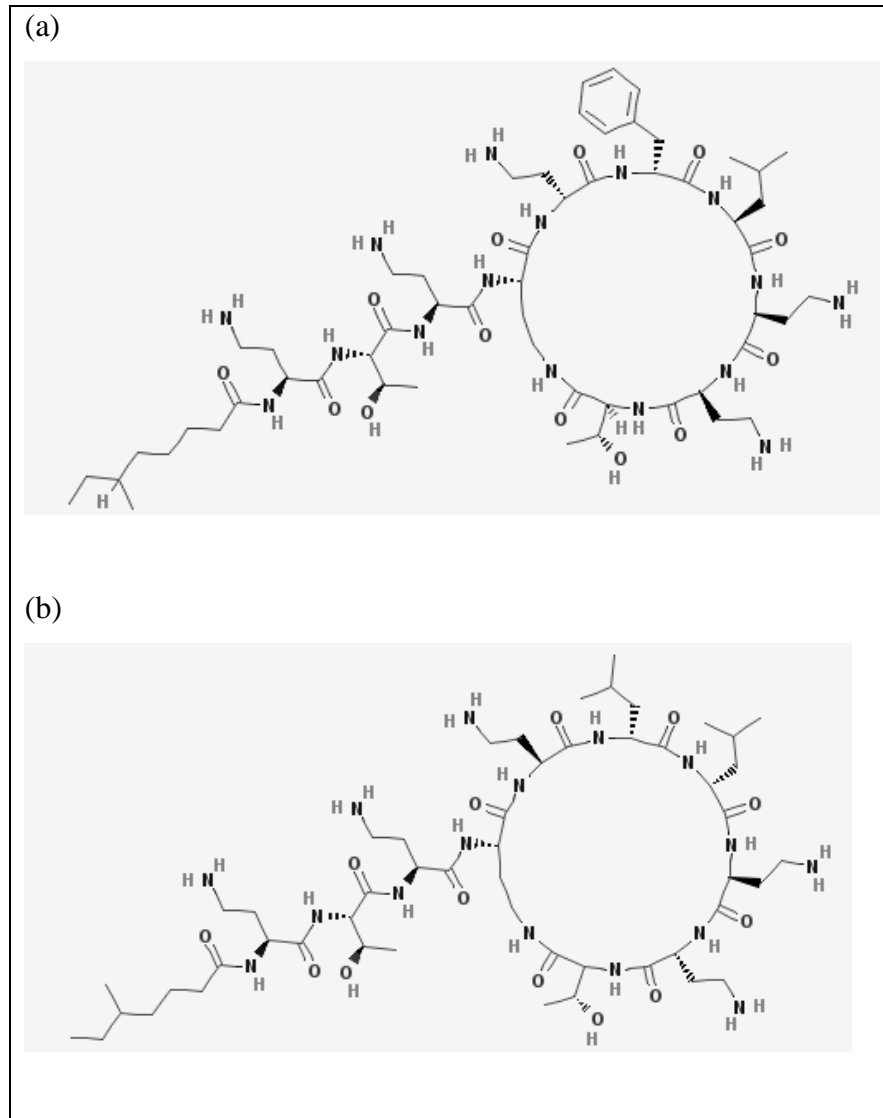
A expressão funcional das porinas pode ser analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE). Tendo em vista que o método por SDS é trabalhoso e demorado, uma alternativa é a detecção rápida por espectrometria de massas em MS MALDI-TOF. Os genes envolvidos podem ser amplificados e sequenciados para verificar a presença de, por exemplo, inserções (LITTLE *et al.*, 2012; HU *et al.*, 2015).

4 POLIMIXINAS

As polimixinas são polipeptídios cíclicos utilizadas no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. Esta classe de antimicrobianos foi introduzida na terapêutica na década de 50, porém foi substituída por outros fármacos devido a sua toxicidade, especialmente neuro e nefrotoxicidade. A toxicidade se dá pelas propriedades hidrofóbicas do segmento N-terminal que também é responsável pela atividade antimicrobiana, além das posições 6 (D-leucina ou D-fenilalanina) e 7 (L-leucina) (KAYE *et al.*, 2016; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

As polimixinas B e E (Figura 3) são as únicas utilizadas clinicamente e se diferem pela adição de fenilalanina e leucina no anel peptídico, respectivamente. Enquanto a polimixina B é administrada como antibiótico ativo, a polimixina E é utilizada como pró-fármaco (colistimetato ou metanossulfonato de colistina), sendo transformada nos fluidos biológicos na forma de colistina e metanossulfonatos. Elas atuam na desestabilização das membranas externa e citoplasmática, na neutralização do lipídeo A (ação antiendotoxina) e inibição de enzimas respiratórias vitais, como NADPH-quinona oxidorreductase tipo II [NDH-2], presente na membrana interna bacteriana. A afinidade do anel peptídico policatiônico do fármaco com a molécula de LPS gera o deslocamento de cátions como Mg^{2+} e Ca^{2+} , essenciais para a estabilidade do polissacarídeo, além de conduzir a formação de superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), interferindo na formação de grupamentos Ferro-Enxofre e conversão de ferro ferroso (Fe^{3+}) para ferro férrico (Fe^{2+}). A presença de íons Fe^{3+}/Fe^{2+} e H_2O_2 induzem a reação de Fenton e formação de radicais hidroxila (OH^-), responsáveis por causar danos no DNA, lipídeos e proteínas, levando a morte celular (DERIS *et al.*, 2014; GUPTA *et al.*, 2009; JAVAN; SHOKOUHI; SAHRAEI, 2015; KAYE *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2015).

Figura 3 – Estruturas químicas das polimixina B (a) e E (b).



Fonte: PubChem Open Chemistry Database.

Apesar da elevada toxicidade, as polimixinas foram reintroduzidas na prática clínica na década de 90 no tratamento de infecções hospitalares por microrganismos Gram-negativos multirresistentes e, atualmente, são consideradas as últimas opções de tratamento frente a enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (GURJAR, 2015).

Na medicina veterinária, a colistina foi utilizada por décadas para o tratamento e prevenção de doenças infecciosas, principalmente infecções gastrointestinais causadas por

Escherichia coli não-invasiva em aves, porcos e gado sendo administrada na forma oral com diferentes formulações (pré-mistura, pó ou soluções) (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Na Europa, ela também vem sendo utilizada para promover a produção de leite para consumo humano e crescimento do animal; ação antiendotoxina contra algumas toxinas produzidas por cepas de *E. coli*; tratamento de colibacilose neonatal em bezerros, entre outros fins. Segundo informações do *European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption* (ESVAC), as polimixinas foram a quinta classe (7%) de agentes antimicrobianos mais vendidos na Europa em 2011, após as tetraciclina (37%), penicilinas (23%), sulfonamidas (11%) e macrolídeos (8%) (EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2016).

Dados do *Food and Drug Administration* (FDA) revelam que nos Estados Unidos é permitida a comercialização de apenas uma formulação injetável de colistina para frangos no controle da mortalidade precoce por *E. coli*, mas proibida para galinhas poedeiras que produzem ovos para consumo humano. Há também formulações oftálmicas de polimixina B associada à oxitetraciclina utilizadas em espécies produtoras de alimentos, além de uma formulação para fins odontológicos em cães (FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2017).

No Brasil, a Instrução Normativa número 45 de 22 de novembro de 2016 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) proíbe a importação e fabricação de colistina com finalidade de aditivo zootécnico para melhorar desempenho na alimentação animal (MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2016).

A resistência as polimixinas, em especial à colistina, vem sendo relatada globalmente entre cepas de enterobactérias de galinhas, suínos e gados. No Brasil, este fenótipo foi descrito inicialmente em 2012 em cepas de *E. coli* e *Salmonella enterica* em suínos (mecanismo não relatado). O primeiro relato de resistência mediada por plasmídeos (gene *mcr-1*) foi descrito na China em 2015 e, no Brasil em 2016, ambos em cepas de *E. coli* de porcos e galinhas (FERNANDES *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016; MORALES *et al.*, 2012).

4.1 RESISTÊNCIA ÀS POLIMIXINAS

4.1.1 Modificação da membrana externa

Os bacilos Gram-negativos podem utilizar distintos mecanismos para sobreviver mediante exposição de antimicrobianos, em especial as polimixinas. Dentre as estratégias de sobrevivência, pode-se citar alterações dos lipopolissacarídeos que são os alvos iniciais das polimixinas. A adição de grupos catiônicos, como 4-amino-4-desoxy-L-arabinose (L-Ara4N) e fosfoetanolamina (PEtn) ao LPS é responsável pela resistência adquirida na família *Enterobacteriaceae*. Uma grande quantidade de genes e operons estão envolvidos na modificação do LPS, incluindo aqueles que codificam enzimas (exemplo, genes *pmrC* e *pmrE*, operons *pmrCAB* e *pmrHFIJKLM*), genes reguladores (gene *mgrB*) e codificadores de proteínas envolvidas nos sistemas de dois componentes PmrAB (genes *prmA* e *pmrB*) e PhoPQ (genes *phoP* e *phoQ*) (MOFFATT *et al.*, 2010; OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

Os sistemas de dois componentes são influenciados por alterações de pH do meio e concentrações de íons ferro, cálcio e magnésio. Alterações no sistema PmrA/PmrB por meio de mutações dos genes *pmrA* e *pmrB*, bem como alterações no sistema PhoP/PhoQ, envolvido na modificação do lipídio A, e perda de função do gene *phoQ*, representam importantes mecanismos de regulação de resistência às polimixinas. Ambos os sistemas promovem modificações na expressão do operon *arnBCADTEF*, responsável pela adição de 4-amino-arabinose no lipídio A, alterando o fenótipo de resistência (OLAITAN; MORAND; ROLAIN, 2014).

A avaliação de alterações cromossômicas exige sequenciamento de genes específicos e avaliação dos níveis de expressão dos genes por PCR em tempo real (CANNATELLI *et al.*, 2013; KIM; KO, 2018).

4.1.1.1 MCR-1

Até os últimos anos, todos os mecanismos de resistência às polimixinas relatados envolviam mutações nos sistemas regulatórios PmrAB e PhoPQ, mediados por genes cromossômicos. Contudo, recentemente, estudos relataram resistência a estes fármacos por meio do gene *mcr-1* mediado por plasmídeos. A MCR-1 é uma enzima pertencente à família fosfoetanolamina transferase, capaz de adicionar fosfoetanolamina no lipídio A. O gene pode ser encontrado em diferentes plasmídeos, como IncI2, incHI2, IncP, IncX4, IncFI e IncFIB, e tamanhos entre 59 a 251 kb. Alguns plasmídeos são capazes de carrear outros genes de resistência a fármacos, como β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, tornando-se preocupante, uma vez que o uso não adequado destes antimicrobianos pode levar à seleção e propagação de isolados carreadores de *mcr-1* (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

O primeiro relato de resistência mediada pelo gene *mcr-1* foi descrito na China, em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* de origem animal e humana (LIU *et al.*, 2016). A presença do gene vem sendo relatada principalmente em isolados de *E. coli* (CAO *et al.*, 2018; FENG *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2018; LIN *et al.*, 2018), e esporadicamente em diferentes espécies, como *E. aerogenes* e *E. cloacae* (ZENG *et al.*, 2016), *K. pneumoniae* (EIAMPHUNGORN *et al.*, 2018; MENDES *et al.*, 2018; TADA *et al.*, 2018), *S. enterica* (CARROLL *et al.*, 2018; QUESADA *et al.*, 2016).

No Brasil, o primeiro relato do gene *mcr-1* foi descrito por Fernandes *et al.* (2016) em 16 isolados de *Escherichia coli* de origem animal (suínos e galinhas) coprodutores de CTX-M e CMY-2 (FERNANDES *et al.*, 2016a). Lentz *et al.* (2016) detectaram a presença do gene em 10 (10/343) isolados de *E. coli* de aves não expostas a polimixinas, sugerindo que a disseminação do gene pode não estar ligado ao uso de polimixinas com fins zootécnicos no Brasil (LENTZ *et al.*, 2016). O primeiro relato em amostra de origem humana foi descrito por Fernandes *et al.* (2016) em *E. coli* em um paciente com infecção de pé diabético (FERNANDES *et al.*, 2016b). A co-ocorrência de *mcr-1* e KPC-2 foram inicialmente descritas em *E. coli* (DALMOLIN *et al.*, 2017) e *K. pneumoniae* (AIRES *et al.*, 2017).

A detecção do gene *mcr-1* pode ser realizada por PCR convencional e amplificação por eletroforese em gel de agarose, bem como PCR em tempo real (CHABOU *et al.*, 2016; LIU *et al.*, 2016).

4.1.3 Bombas de efluxo

Atualmente, o papel de sistemas de efluxo na resistência à colistina não está bem compreendido. Padilla *et al.* (2010) demonstraram aumento de sobrevivência bacteriana na presença de polimixina B em uma cepa de *K. pneumoniae* com mutações no sistema acrAB, mas quando associado a um inibidor de bomba de efluxo (carbonilcianeto m-clorofenil-hidrazona – CCCP), houve redução da taxa de sobrevivência (PADILLA *et al.*, 2010).

Entre as hipóteses de mecanismo de ação do CCCP, estão o desacoplamento da fosforilação oxidativa, interferindo no gradiente de prótons das membranas bacterianas e a restauração da carga negativa da membrana através do rompimento da força próton-motriz, uma vez que um dos mecanismos de resistência à colistina é a modificação do LPS, levando a diminuição da ligação da membrana externa por meio da diminuição da carga negativa (FALAGAS; RAFAILIDIS; MATTHAIYOU, 2010; NI *et al.*, 2016; PARK; KO, 2015).

A presença de sistemas de efluxo pode ser detectada utilizando inibidores de bombas, onde as concentrações inibitórias mínimas para as polimixinas e inibidores são determinadas individualmente e, posteriormente, associam-se às polimixinas concentrações subinibitórias de inibidores a fim de verificar a reversão de resistência. A avaliação pode ser realizada tanto por microdiluição em caldo como curva de tempo-morte (NI *et al.*, 2016). A expressão de genes envolvidos no efluxo pode ser determinada por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) a partir do RNA mensageiro (PADILLA *et al.*, 2010; PARK; KO, 2015).

4.1.4 Determinação da resistência às polimixinas na rotina laboratorial

4.1.4.1 Concentração Inibitória Mínima

Atualmente, a técnica padrão para a determinação da susceptibilidade às polimixinas é a microdiluição em caldo. Existem outras técnicas para determinar a susceptibilidade às polimixinas, como difusão de disco e E-test, contudo, a má difusão do antimicrobiano no ágar pode gerar resultados falsos (CLSI, 2018; HINDLER; HUMPHRIES, 2013; TAN; NG, 2007).

O uso de sistemas automatizados exige menor tempo de execução, quando comparados aos métodos manuais. Contudo, podem apresentar problemas de sensibilidade na detecção de isolados resistentes, bem como subpopulações heterorresistentes (LO-TEN-FOE *et al.*, 2007; POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017). Um estudo realizado por Girardello *et al.* (2018) avaliou a performance do Vitek®2 (bioMérieux) frente a 362 isolados clínicos de bacilos Gram-negativos. O aparelho apresentou melhor desempenho para *K. pneumoniae* e *E. coli*, mas 20,8% de resultados falso-sensíveis para *Enterobacter* spp. e 10,2% para *Acinetobacter* spp., revelando a necessidade de confirmação de resistência por microdiluição em caldo (GIRARDELO *et al.*, 2018).

Alguns pontos importantes devem ser levados considerados, como as propriedades catiônicas das polimixinas que podem levar a aderência às placas de microdiluição comuns (polipropileno e poliestireno) e em materiais utilizados para seus armazenamentos (exemplo, eppendorf). Assim, para evitar variabilidade na execução da microdiluição em caldo, deve-se optar por materiais de vidro para reduzir a adsorção em placas usuais (POIREL; JAYOL; NORDMANN, 2017).

4.1.4.2 Polimixina NP

Inicialmente descrito por Nordmann, Jayou e Poriel (2016), baseia-se na detecção do crescimento de enterobactérias na presença de uma concentração definida de polimixina, resultante da metabolização de carboidratos. O teste utiliza uma solução estoque e outra denominada “solução rápida de Polimixina NP”. A primeira consiste em uma solução contendo sulfato de colistina ou polimixina B, diluídas em caldo Mueller-Hinton cátion-ajustado (MHB-CA) em concentração de 0,2 mg/mL. A segunda solução contém vermelho de fenol (0,005%), MHB-CA (2,5%), d(+)-glicose (1%) e água destilada. Antes de realizar o experimento, misturaram-se as duas soluções a fim de obter uma concentração de 5 µg/mL de polimixina. Em uma placa de poliestireno de 96 poços, adicionam-se a solução (contendo 5 µg/mL de polimixina) e inóculo bacteriano na escala 3.0-3.5 McFarland ($\approx 10^9$ UFC/mL), obtendo concentração final de polimixina 3,7 µg/mL e 10^8 UFC/mL. Posteriormente, incuba-se a placa a 35 ± 2 °C por até 4 horas, sendo realizada leitura visual a cada uma hora. O resultado é considerado positivo (resistente à polimixina) se o isolado crescer e promover a metabolização dos carboidratos na presença de polimixina, indicado pela alteração de cor vermelho/laranja para amarelo (NORDMANN; JAYOU; POIREL, 2016).

Yainoy *et al.* (2018) analisaram 339 isolados de enterobactérias através de Polimixina NP e o teste revelou 100% e 95,9% de especificidade e sensibilidade, respectivamente, para detectar resistência à colistina, assim como em outros estudos que demonstraram boa performance em detectar resistência cromossômica e plasmidial (JAYOL *et al.*, 2018; YAINOY *et al.*, 2018; POIREL *et al.*, 2018).

OBJETIVOS

1 OBJETIVO GERAL

Determinar o perfil epidemiológico e os mecanismos de resistência de isolados cínicos de bacilos Gram-negativos oriundos do Hospital Universitário de Santa Maria, entre os anos de 2015 e 2017.

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.1 Descrever o perfil dos pacientes infectados ou colonizados pelos microrganismos;
- 2.2 Descrever os locais e espécimes clínicos que ocorreram isolamento dos microrganismos;
- 2.3 Avaliar o perfil de susceptibilidade frente a agentes antimicrobianos;
- 2.4 Detectar resistência aos carbapenêmicos e investigar a presença de carbapenemases por métodos fenotípicos e moleculares;
- 2.5 Detectar resistência às polimixinas por métodos fenotípicos e investigar a presença do gene *mcr-1* por métodos moleculares.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

O artigo foi publicado no periódico *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (ISSN 0037-8682), na forma de *Short Communication*.



Rev Soc Bras Med Trop 50(5):685-688, September-October, 2017
doi: 10.1590/0037-8682-0209-2017

Short Communication

Evaluation of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil

Vinícius Victor Lorenzoni^{[1],[2]}, Danielly da Costa Silva^{[1],[2]}, Roberta Filipini Rampelotto^{[1],[2]}, Patrícia Chaves Brites^[3], Bárbara Villa^{[2],[3]} and Rosmari Hörner^[1]

[1]. Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [2]. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [3]. Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

Introduction: The rapid global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is a threat to the health system. **Methods:** We evaluated the antimicrobial susceptibility profiles of 70 CRE isolated in a tertiary hospital in Brazil between August and December 2015, and determined their resistance mechanisms. **Results:** The most prevalent microorganism was *Klebsiella pneumoniae* (95.7%); it showed high-level resistance to carbapenems (>98%), with sensitivity to colistin (91.4%) and amikacin (98.6%). The *bla_{KPC}* gene was detected in 80% of the CRE isolates. **Conclusions:** Evaluation of bacterial resistance contributes to an appropriate treatment, and the reduction of morbimortality and dissemination of resistance.

Keywords: *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Multiresistance.

Bacterial resistance is a serious health problem, leading to relapsing nosocomial infections, reduced drug efficacy, and expensive and imprecise treatment, and resulting in high morbidity and mortality rates¹. The spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is threatening the health system, since the bacteria show multiple resistance mechanisms, such as the production of carbapenemases [e.g., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); metallo- β -lactamases (MBL); and oxacillinases (OXA)] and efflux pumps, and porin loss².

Since the spread of CRE is a worldwide problem, studies focusing on the characterization of resistance mechanisms and on the understanding of epidemiology at infection sites are required to inform an adequate empirical therapy and control the dissemination of resistance³. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profiles of 70 CRE isolates obtained between August and December 2015 at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) and to determine their resistance mechanisms. The isolates were obtained from several clinical specimens and identified using the Vitek® 2 automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Antimicrobial resistance of the isolates was evaluated against antimicrobial agents described in **Table 1**. The minimum

inhibitory concentration (MIC) values were determined using the Advanced Expert System (AES) program in Vitek® 2; these values were interpreted according to the criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the technical standard no. 01/2013 from the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA)^{4,5}. Phenotypic methods, such as disc diffusion tests with enzymatic inhibitors [phenylboronic acid (PBA); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)], biochemical tests Carba NP [Carbapenemase Nordmann-Poirel (CN)] and Blue-Carba (BC), and molecular methods [polymerase chain reaction (PCR)] were used to evaluate the resistance mechanisms. The disk diffusion method identifies KPC-producing strains using carbapenem disks supplemented with PBA; it identifies MBL-producing strains using the chelating agent EDTA⁴. The CN biochemical test is based on the hydrolysis of the β -lactam ring of imipenem. The strains were considered to be carbapenemase producers when a color change of a solution containing the phenol red indicator was observed. The BC test is based on the same principle as CN, except that the bromothymol blue indicator is used⁶. To confirm the production of carbapenemases, PCR was performed to detect the presence of the *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, and *bla_{GES}* genes⁷. The sensitivity and specificity of the different phenotypic methods were calculated considering PCR as the standard methodology⁶.

During the study period, 70 isolates were obtained from patients infected or colonized by CRE, being that each isolate corresponded to only one clinical specimen per patient. *K. pneumoniae* was the prevailing microorganism (67 isolates; 95.7% of all CRE isolates), followed by *Escherichia coli* (1; 1.4%), *Citrobacter freundii* (1; 1.4%), and *Enterobacter cloacae* (1;

Corresponding author: Dra. Rosmari Hörner.
e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com
Received 19 May 2017
Accepted 30 June 2017

Evaluation of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in a tertiary-level reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil

Vinícius Victor Lorenzoni^{[1],[2]}, Danielly da Costa Silva^{[1],[2]}, Roberta Filipini Rampelotto^{[1],[2]}, Patrícia Chaves Brites^[3], Bárbara Villa^{[2],[3]}, Rosmari Hörner^[1]

[1] Departamento de Análises Clínicas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [2] Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil. [3] Laboratório de Biologia Molecular, Hospital Universitário de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: The rapid global spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is a threat to the health system. **Methods:** We evaluated the antimicrobial susceptibility profiles of 70 CRE isolated in a tertiary hospital in Brazil between August and December 2015, and determined their resistance mechanisms. **Results:** The most prevalent microorganism was *Klebsiella pneumoniae* (95.7%); it showed high-level resistance to carbapenems (>98%), with sensitivity to colistin (91.4%) and amikacin (98.6%). The *bla_{KPC}* gene was detected in 80% of the CRE isolates. **Conclusions:** Evaluation of bacterial resistance contributes to an appropriate treatment, and the reduction of morbimortality and dissemination of resistance.

Keywords: *Enterobacteriaceae*. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. Multiresistance.

Bacterial resistance is a serious health problem, leading to relapsing nosocomial infections, reduced drug efficacy, and expensive and imprecise treatment, and resulting in high

morbidity and mortality rates¹. The spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE) is threatening the health system, since the bacteria show multiple resistance mechanisms, such as the production of carbapenemases [e.g., *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC); metallo- β -lactamases (MBL); and oxacillinases (OXA)] and efflux pumps, and porin loss².

Since the spread of CRE is a worldwide problem, studies focusing on the characterization of resistance mechanisms and on the understanding of epidemiology at infection sites are required to inform an adequate empirical therapy and control the dissemination of resistance³. Therefore, the aim of the present study was to evaluate the antimicrobial susceptibility profiles of 70 CRE isolates obtained between August and December 2015 at the Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) (Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil) and to determine their resistance mechanisms. The isolates were obtained from several clinical specimens and identified using the Vitek[®]2 automated system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France).

Antimicrobial resistance of the isolates was evaluated against antimicrobial agents described in Table 1. The minimum inhibitory concentration (MIC) values were determined using the Advanced Expert System (AES) program in Vitek[®] 2; these values were interpreted according to the criteria established by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and the technical standard no. 01/2013 from the *Agência Nacional de Vigilância Sanitária* (ANVISA)^{4,5}. Phenotypic methods, such as disc diffusion tests with enzymatic inhibitors [phenylboronic acid (PBA); ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)], biochemical tests Carba NP [Carbapenemase Nordmann-Poirel (CN)] and Blue-Carba (BC), and molecular methods [polymerase chain reaction (PCR)] were used to evaluate the resistance mechanisms. The disk diffusion method identifies KPC-producing strains using carbapenem disks supplemented with PBA; it identifies MBL-producing strains using the chelating agent EDTA⁴. The CN biochemical test is based on the hydrolysis of the β -lactam ring of imipenem. The

strains were considered to be carbapenemase producers when a color change of a solution containing the phenol red indicator was observed. The BC test is based on the same principle as CN, except that the bromothymol blue indicator is used⁶. To confirm the production of carbapenemases, PCR was performed to detect the presence of the *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, and *bla*_{GES} genes⁷. The sensitivity and specificity of the different phenotypic methods were calculated considering PCR as the standard methodology⁶.

TABLE 1: Antimicrobial susceptibility profile of 70 CRE isolated between August and December 2015 at the HUSM, Santa Maria/RS, Brazil.

Antimicrobial agents	MIC Range (µg/mL)	MIC50 (µg/mL)*	Resistant n (%)
Amikacin	2-64	≤ 16	1 (1.42)
Ampicillin	1-32	≥ 32	70 (100.0)
Cefepime	1-64	≥ 64	68 (97.1)
Ceftazidime	1-64	≥ 64	69 (98.6)
Ceftriaxone	1-64	≥ 64	67 (95.7)
Ciprofloxacin	0.25-4	≥ 4	66 (94.3)
Colistin	0.5-16	≤ 0.5	6 (8.6)
Ertapenem	0.5-8	≥ 8	70 (100.0)
Gentamicin	1-16	≥ 16	46 (65.7)
Imipenem	0.25-16	≥ 16	69 (98.6)
Meropenem	0.25-16	≥ 16	69 (98.6)
Piperacillin-tazobactam	4-128	≥ 128	69 (98.6)
Tigecycline	0.25-8	≥ 8	66 (94.3)

CRE: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*; **HUSM:** Hospital Universitário de Santa Maria; **MIC:** minimum inhibitory concentration. *MIC50, concentration required to inhibit the growth of 50% of microorganisms.

During the study period, 70 isolates were obtained from patients infected or colonized by CRE, being that each isolate corresponded to only one clinical specimen per patient. *K. pneumoniae* was the prevailing microorganism (67 isolates; 95.7% of all CRE isolates), followed by *Escherichia coli* (1; 1.4%), *Citrobacter freundii* (1; 1.4%), and *Enterobacter cloacae* (1; 1.4%). The specimen type from which the CRE were isolated most frequently was

the rectal swab used in the epidemiological surveillance research (32; 45.7% of 70 clinical specimens), followed by the urine (21; 30%), sputum (3; 4.3%), feces (3; 4.3%), blood (2; 2.9%), sacral lesion biopsy (1; 1.4%), fibrin (1; 1.4%), bronchoalveolar lavage (1; 1.4%), leg lesion (1; 1.4%), abdominal fluid (1; 1.4%), catheter tip (1; 1.4%), axillary secretion (1; 1.4%), surgical wound fluid (1; 1.4%), and tracheal secretion (1; 1.4%). Considering the patient gender and age, there was a prevalence of males (50; 71.4% of 70 patients) over-60-year-olds (37; 52.9% of 70 patients), 21-59-year-olds (29; 41.4%), and zero-20-year-olds (4; 5.7%). The adult intensive care unit (ICU) was the hospital unit with the highest CRE isolation rate (19; 27.2% of 70 patients), followed by the general surgery unit (18; 25.7%), the semi-intensive care unit (8; 11.4%), adult emergency room (8; 11.4%), the clinic (6; 8.6%), nephrology unit (3; 4.3%), treatment center for children and adolescents with cancer (3; 4.3%), cardiac intensive care unit (2; 2.9%), the maternal-infant and women's health unit (1; 1.4%), psychiatric unit (1; 1.4%), and surgical block (1; 1.4%). Antimicrobial susceptibility profiles of the isolates are shown in Table 1. Genotypic analysis based on PCR revealed the presence of the *bla*_{KPC} gene in 56 isolates (56/70; 80%), with the KPC activity also phenotypically demonstrated by the disk diffusion, CN, and BC techniques (Table 2). The OXA (*bla*_{OXA-48}) and MBL (*bla*_{NDM} and *bla*_{GES}) genes were not detected. All phenotypic methods (disk diffusion, CN and BC) detected the KPC enzyme with 100% sensitivity and specificity.

TABLE 2: Phenotypic and molecular evaluation of the isolated clinical specimens.

Microorganism	Unit	Specimen	n	Phenotype				Genotype
				PBA	EDTA	CN	BC	PCR
<i>Citrobacter freundii</i>	Clinic	Urine	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
<i>Enterobacter cloacae</i>	Adult emergency room	Urine	1	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	Semi-intensive care unit	Rectal swab	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		SLB	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	Clinic	Feces	1	-	-	-	-	-
		Rectal swab	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			1	-	-	-	-	-
		Urine	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	Surgical block	Fibrin	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	TCCAC	Axillary secretion	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Rectal swab	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Urine	1	-	-	-	-	-
	Nephrology	Rectal swab	2	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	Adult emergency room	Sputum	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Blood	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Urine	3	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			2	-	-	-	-	-
	Psychiatric	Urine	1	-	-	-	-	-
		Sputum	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Feces	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	Semi-intensive care unit	Rectal swab	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			3	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Urine	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	MIWHU	Feces	1	-	-	-	-	-
		Sputum	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		BAL	1	-	-	-	-	-
		Catheter tip	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
Blood		1	-	-	-	-	-	
General surgery unit		SWF	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Rectal swab	6	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
	3		+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}	
Cardiac intensive care unit	Urine	3	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}	
		1	-	-	-	-	-	
		1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}	
	Intensive care unit	Rectal swab	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Leg lesion	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Abdominal fluid	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Tracheal secretion	1	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
		Rectal swab	7	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
			2	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}
Urine	1	-	-	-	-	-		
	2	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}		
	2	+	-	+	+	<i>bla</i> _{KPC}		
		2	-	-	-	-	-	

n: numer of clinical specimens; **PBA:** phenylboronic acid; **EDTA:** ethylenediaminetetraacetic acid; **CN:** carba NP; **BC:** blue-carba; **PCR:** polymerase chain reaction; **SLB:** sacral lesion biopsy; **TCCAC:** treatment center for children and adolescents with cancer; **MIWHU:**

maternal-infant and women's health unit; **BAL**: bronchoalveolar lavage; **SWF**: surgical wound fluid; +: positive; -: negative.

Carbapenem-resistant gram-negative bacilli may exhibit low susceptibility to antimicrobials, mainly to β -lactam antibiotics, because the production of carbapenemases is associated with porin loss, overexpression of efflux pumps, and the production of another β -lactamase [e.g., extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and AmpC β -lactamase]⁸. This may explain why the *bla*_{KPC} gene was not detected in 14 (out of 70) isolates in the present study. Similarly, Ribeiro et al., observed high-level resistance against β -lactams and ciprofloxacin, and sensitivity to polymyxin B and amikacin in Enterobacteriaceae isolates in southern Brazil. In the same study, the *bla*_{KPC} gene was identified in only 14 (14/345) isolates and, among the non-carbapenemase-producing isolates, ESBL and AmpC phenotypes were observed⁹. Differentiating a carbapenemase-producing CRE from a non-carbapenemase-producing CRE is important. The selective pressure caused by indiscriminate use of broad-spectrum antibiotics in treating hospital infections may lead to resistance of endogenous bacteria (from the intestinal microbiota), but the reduction of susceptibility may also be associated with a rapid horizontal transmission (e.g., via healthcare workers, equipment contamination, and mobile genetic elements), contributing to the spread of heterogeneous resistance¹⁰.

In recent years, multiple resistance mechanisms have reduced the available therapeutic options, leading to an extensive use of aminoglycosides and polymyxins¹¹. Although colistin showed good activity against CRE, 6 (6/70) *K. pneumoniae* isolates were resistant to this antimicrobial agent (MIC \geq 16 μ g/mL). Santos et al. described a similar resistance profile of colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (9/231) isolated at the same hospital (HUSM) as in the present study¹². This phenotype may be due to the lipopolysaccharides changes, such as

modifications in lipid A by the addition of 4-amino-4-deoxy-L-arabinose (L-Ara4N) and phosphoethanolamine (pEtN), and *mgrB* gene mutations, responsible for the regulation of the PmrAB and PhoPQ two-component systems, as well as through plasmid-mediated *mcr-1* gene, responsible for horizontal transfer of colistin resistance, necessitating monitoring of colistin use during therapy and reinforcing control practices during hospital infections to avoid the dissemination of resistance and loss of efficacy of this drug¹³.

In the present study, all phenotypic methods (disk diffusion, CN and BC) detected the KPC enzyme activity with 100% sensitivity and specificity. Similarly, Giske et al. reported 100% sensitivity and 98% specificity of an assay that relied on the 3-aminophenylboronic acid for the detection of KPC in *K. pneumoniae* strains¹⁴. Further, García-Fernández et al. reported 100% specificity of both methodologies, with 100% and 98% sensitivity of CN and BC, respectively¹⁵.

As demonstrated, the disk diffusion (PBA and EDTA) method, and CN and BC tests are characterized by high sensitivity and specificity, similarly to PCR. They might be incorporated into the workflow of a clinical microbiology laboratory, as they are quick, practical, and low-cost.

Simultaneous use of two or more of these methods increases the reliability of CRE detection and, together with the antimicrobial susceptibility profile data, they may inform the adequate treatment, assisting in the reduction of mortality and dissemination of resistance. The phenotype found in the Institution is worrying and the adoption of nosocomial infection control and prevent measures are necessary.

This research presented limitations of the study in terms of non-detection of other carbapenemases enzymes (OXA, MBL), which could interfere with sensitivity and specificity.

Posteriorly, mechanisms such as efflux pump and porin loss will be evaluated, as well as molecular typability for outbreak analysis.

Ethical considerations

This research was approved by the Ethical Research Committee, *Universidade Federal de Santa Maria*, under approval number 38850614.4.0000.5346.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Laboratório de Biologia Molecular of the Hospital Universitário de Santa Maria for the help provided in the performance of molecular methods.

References

1. World Health Organization (WHO). Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Geneva, Switzerland: WHO; 2014. 257 p.
2. Pitout JDD, Nordmann P, Poirel L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(10):5873-84.
3. Nordmann P, Gniadkowski M, Giske CG, Poirel L, Woodford N, Miriagou V, et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Clin Microbiol Infect.* 2012;18(5):432-8.
4. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota Técnica N° 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. Brasília: ANVISA; 2013. 22 p.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement. Vol 35, n° 3. M100-S25. Wayne, PA: CLSI, 2015. 240 p.
6. García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, Beatobe L, Ruiz-Garbajosa P, Domínguez L, et al. Detection of Carbapenemase Production in a collection of *Enterobacteriaceae* with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):464-6.

7. Monteiro J, Widen RH, Pignatari AC, Kubasek C, Silbert S. Rapid detection of carbapenemase gene by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(4):906-9.
8. 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. *PLoS One.* 2013;8(11):e79640.
9. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2013;62(11):1721-7.
10. Goodman KE, Simner PJ, Tamma PD, Milstone AM. Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2016;14(1):95-108.
11. Rafailidis PI, Falagas ME. Options for treating carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Curr Opin Infect Dis.* 2014;27(6):479-83.
12. Santos SO, La Rocca SM, Hörner R. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. *Braz J Infect Dis.* 2016;20(6):649-50.
13. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017;30:557-96.
14. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen O, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- β -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17(4):552-6.
15. García-Fernández S, Morosini MI, Gijón D, Beatobe L, Ruiz-Garbajosa P, Domínguez L, et al. Detection of carbapenemase production in a collection of *Enterobacteriaceae* with characterized resistance mechanisms from clinical and environmental origins by use of both Carba NP and Blue-Carba tests. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):464-6.

Received: May 19, 2017; Accepted: June 30, 2017.

Corresponding author : Dra. Rosmari Hörner. **e-mail**: rosmari.ufsm@gmail.com

Conflict of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

O artigo foi publicado no periódico *The Brazilian Journal of Infectious Diseases* (ISSN 1678-4391), na forma de *Letter to the Editor*.

356

BRAZ J INFECT DIS. 2018;22(4):355-357

Roberto Focaccia^{a,*}, Adriana Silva de Moraes^b, Maria Luiza Alessi Ribeiro^c, Karla Fabiana Begosso Sampaio da Fonseca Carbonari^c, Bruna de Souza Quevedo^c

^a Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Departamento de Infectologia, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu, Santos, São Paulo, Brazil

^b Universidade Paulista (UNIP), Serviço de Enfermagem de Doenças Infecciosas, Santos, SP, Brazil

^c Universidade Metropolitana de Santos (UNIMES), Departamento de Infectologia, Mentoria Científica em Infectologia, Santos, SP, Brazil

* Corresponding author.

E-mail address: focaccia@uol.com.br (R. Focaccia).

Received 9 April 2018

1413-8670/

© 2018 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Infectologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.006>

Available online 16 August 2018

Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* in a cancer patient in southern Brazil



Dear Editor,

The rapid spread of plasmid-mediated *mcr-1* gene has become a worldwide concern since it confers resistance to polymyxins considered as a last resource for treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli.¹ Despite its low frequency in Brazil, the *mcr-1* gene has been reported in *Escherichia coli*² and *Klebsiella pneumoniae*³ clinical isolates. In this study, we report a case of bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *E. coli* in southern Brazil.

The presence of *mcr-1* gene was investigated in 340 polymyxin-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*) collected between August 2015 and January 2018 in a university hospital located in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Among clinical isolates, one *E. coli* harbored the *mcr-1* gene isolated from blood cultures in September 2017. The patient was a 59-year-old woman with malignant neoplasm of middle third of esophagus and intrahepatic cholangiocarcinoma admitted to the hospital for a transthoracic esophagectomy. Four days after the proce-

dure, the patient was transferred to the Adult Intensive Care Unit (ICU) due to hemodynamic instability and ventilatory discomfort. Empirical treatment with ceftriaxone (1 g 12/12 h) and metronidazole (1.5 mg/day) was initiated. Laboratory tests revealed leukocytosis ($27,115 \pm 7684.20/\text{mm}^3$) with left shift ($8997.75 \pm 1619.14/\text{mm}^3$ immature leukocytes) and increased C-reactive protein ($>25 \text{ mg/dL}$; reference value: $<0.3 \text{ mg/dL}$). *E. coli* isolate was recovered in two blood cultures from different peripheral sites and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) isolate in a rectal swab culture for epidemiological surveillance. Based on antimicrobial susceptibility testing (Table 1) by the VITEK[®] 2 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), the antibiotic regimen was switched to amikacin (250 mg 12/12 h) and meropenem (1 g 8/8 h). Nine days after transthoracic esophagectomy, the patient had complications such as septic shock, peritonitis, surgical wound dehiscence and died.

Resistance to colistin was verified by broth microdilution according to EUCAST (<http://www.eucast.org>) and confirmed by polymyxin-NP test.⁴ Presence of the *mcr-1* gene was verified by conventional PCR using specific primers⁵ and detected

Table 1 – Antimicrobial susceptibility profile of KPC-Kp, *E. coli* harboring *mcr-1*, transconjugant and *E. coli* J53.

Antimicrobial agent	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)	KPC-Kp	<i>E. coli</i> harboring <i>mcr-1</i>	Transconjugant	<i>E. coli</i> J53
Amikacin	2–64	4	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Cefepime	1–64	≥ 64	≥ 64	32	≤ 1
Ceftazidime	1–64	16	≥ 64	16	≤ 1
Ceftriaxone	1–64	≥ 64	≥ 64	32	≤ 1
Ciprofloxacin	0.25–128	64	32	≤ 0.25	≤ 0.25
Colistin	0.25–128	≥ 128	64	4	≤ 0.25
Ertapenem	0.5–8	≥ 8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
Gentamicin	1–16	≥ 16	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Imipenem	0.25–16	8	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Meropenem	0.25–16	≥ 16	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Piperacillin/tazobactam	4–128	≥ 128	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Tigecycline	0.5–8	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5

Bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *Escherichia coli* from cancer patient in southern Brazil

Dear Editor,

The rapid spread of plasmid-mediated *mcr-1* gene has become a worldwide concern since it confers resistance to polymyxins considered as a last resource for treatment of infections caused by multidrug-resistant Gram-negative bacilli [1]. Despite its low frequency in Brazil, the *mcr-1* gene has been reported in *Escherichia coli* [2] and *Klebsiella pneumoniae* [3] clinical isolates. In this study, we report a case of bloodstream infection by *mcr-1*-harboring *E. coli* in southern Brazil.

The presence of *mcr-1* gene was investigated in 340 polymyxin-resistant Gram-negative bacilli clinical isolates (*Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*) collected between August 2015 and January 2018 in a university hospital located in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. Among clinical isolates, one *E. coli* harbored the *mcr-1* gene isolated from blood cultures in September 2017. The patient was a 59-year-old woman with malignant neoplasm of middle third of esophagus and intrahepatic cholangiocarcinoma admitted to the hospital for a transthoracic esophagectomy. After four days of the procedure, the patient was transferred to the Adult Intensive Care Unit (ICU) due to hemodynamic instability and ventilatory discomfort. The empirical treatment with ceftriaxone (1 g 12/12 hours) and metronidazole (1.5 mg/day) was initiated. Laboratory tests revealed leukocytosis ($27115 \pm 7684.20/\text{mm}^3$) with left shift ($8997.75 \pm 1619.14/\text{mm}^3$ immature leukocytes) and increased C-reactive protein ($> 25 \text{ mg/dL}$; reference value: $< 0.3 \text{ mg/dL}$). *E. coli* isolate was recovered in two blood cultures from different peripheral sites and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (KPC-Kp) isolate in a rectal swab culture for epidemiological surveillance research. Based on antimicrobial susceptibility testing

(Table 1) by the VITEK®2 system (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France), the antibiotic regimen was changed to amikacin (250 mg 12/12 hours) and meropenem (1 g 8/8 hours). After nine days of transthoracic esophagectomy, the patient had complications such as septic shock, peritonitis, surgical wound dehiscence and died.

Table 1 – Antimicrobial susceptibility profile of KPC-Kp, *E. coli* harboring *mcr-1*, transconjugant and *E. coli* J53.

Antimicrobial agent	MIC range (µg/mL)	KPC-Kp	<i>E. coli</i> harboring <i>mcr-1</i>	Transconjugant	<i>E. coli</i> J53
Amikacin	2-64	4	≤ 2	≤ 2	≤ 2
Cefepime	1-64	≥ 64	≥ 64	32	≤ 1
Ceftazidime	1-64	16	≥ 64	16	≤ 1
Ceftriaxone	1-64	≥ 64	≥ 64	32	≤ 1
Ciprofloxacin	0.25-128	64	32	≤ 0.25	≤ 0.25
Colistin	0.25-128	≥ 128	64	4	≤ 0.25
Ertapenem	0.5-8	≥ 8	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5
Gentamicin	1-16	≥ 16	≤ 1	≤ 1	≤ 1
Imipenem	0.25-16	8	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Meropenem	0.25-16	≥ 16	≤ 0.25	≤ 0.25	≤ 0.25
Piperacillin/ Tazobactam	4-128	≥ 128	≤ 4	≤ 4	≤ 4
Tigecycline	0.5-8	2	≤ 0.5	≤ 0.5	≤ 0.5

The resistance to colistin was verified by broth microdilution according to EUCAST (<http://www.eucast.org>) and confirmed by polymyxin-NP test [4]. Presence of the *mcr-1* gene was verified by conventional PCR using specific primers [5] and detected only in the *E. coli* isolate, being confirmed by Sanger sequencing. Specie identification of the *mcr-1*-positive isolate was confirmed using MALDI-TOF MS system (Bruker Daltonics, Germany). To assess the transfer ability of the *mcr-1* gene, conjugation experiment with azide-resistant *E. coli* J53 were performed. We were able to obtain one transconjugant carrying *mcr-1* gene and it was selected on Luria-Bertani agar supplemented with 150 µg/mL sodium azide and 2 µg/mL colistin. The transconjugant presented elevated MIC for colistin in comparison with *E. coli* J53.

This study reports the first detection of *mcr-1* gene in Santa Maria, RS, Brazil and emphasizes the need to strengthen hospital infection prevention and control measures to prevent its spreads.

Financial support

None reported.

Conflicts of interest

All authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Acknowledgements

The authors would like to thank Silvana Silveira Coelho and Roberta Filipini Rampelotto for technical support.

References

1. Poirel L, Jayol A, Nordmann P. Polymyxins: Antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. *Clin Microbiol Rev.* 2017; 30:557-596.
2. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2017; 72:2404-2406.
3. Aires CAM, da Conceição-Neto OC, Oliveira TRTE, et al. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61:e00317-17.
4. Nordmann P, Jayol A, Poirel L. Rapid detection of polymyxin resistance in *Enterobacteriaceae*. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22:1038-43.

5. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.* 2016. 16: 161-8.

Vinícius Victor Lorenzoni ^{a,b}, Tanise Vendruscolo Dalmolin ^c, Laísa Nunes Franco ^a, Afonso Luis Barth ^c, Rosmari Hörner ^{a,b,*}

^a *Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Laboratório de Bacteriologia, Santa Maria, RS, Brazil*

^b *Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brazil*

^c *Hospital de Clínicas, LABRESIS – Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana, Porto Alegre, RS, Brazil*

* Corresponding author.

E-mail address: rosmari.ufsm@gmail.com (R. Hörner).

Received 29 May 2018

1413-8670/

© 2018 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Sociedade Brasileira de Infectologia. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.001>

Available online 7 August 2018.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

O artigo foi publicado no periódico *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* (ISSN 0037-8682), na forma de *Short Communication*.

Rev Soc Bras Med Trop 51(5):676-679, Sep-Oct, 2018
doi: 10.1590/0037-8682-0362-2017



Short Communication

Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital in Rio Grande do Sul, Brazil

Vinícius Victor Lorenzoni^{[1],[2]}, Francieli da Costa Rubert^[3],
Roberta Filipini Rampelotto^{[1],[2]} and Rosmari Hörner^[2]

[1]. Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brasil.

[2]. Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, RS, Brasil.

[3]. Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Farmácia, Santa Maria, RS, Brasil.

Abstract

Introduction: The spread of multidrug-resistant Gram-negative bacilli is a health threat, limiting therapeutic options and increasing morbimortality rates. **Methods:** This study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of 1805 *Klebsiella pneumoniae* isolates collected from *Hospital Universitário de Santa Maria* between January 2015 and December 2016. **Results:** Resistance to colistin (239.3%), meropenem (74.2%), ciprofloxacin (68%), gentamicin (35.1%), tigecycline (33.9%), imipenem (29.7%), ertapenem (26.8%), and amikacin (21.4%) was found increased. **Conclusions:** Infection control measures in the hospitals are necessary for reducing the spread of multidrug-resistant microorganisms and preventing efficacy loss of these drugs.

Keywords: Colistin. *Klebsiella pneumoniae*. Multi-drug resistance.

In recent years, antimicrobial resistance has become a global threat to public health. The extensive and indiscriminate use of antimicrobial agents in human and veterinary medicine has led to the dissemination of high-risk clones, capable of accumulating mutations and resistance genes in mobile genetic elements¹. With the emergence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli, polymyxins have become the drug of choice for the treatment of these pathogens². However, recent studies have shown increased resistance rates due to changes in outer membrane, involving component systems (e.g. *mgrB* gene) and lipid A (e.g. *mcr-1* gene)^{3,4}.

Increased infections by multidrug-resistant bacteria, associated with limited therapeutic options, imply the failure of empirical treatments, reinforcing the need for antibacterial therapies based on antimicrobial-susceptibility tests⁵. Therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolates collected during the period of January 2015 till December 2016 at *Hospital Universitário de Santa Maria* (HUSM), Santa Maria-RS, Brazil.

This was a retrospective observational study, developed in a university hospital in the Central-West region of Rio Grande do Sul. HUSM is a reference institution for emergency care that

has 403 hospital beds, and serves approximately 1.2 million inhabitants from 45 municipalities. The isolates were collected from several clinical specimens of hospitalized patients, and identified according to the automated system VITEK[®]2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Besides gender, age, and hospital unit of the patient, susceptibility profile against the antimicrobial agents amikacin, ciprofloxacin, colistin, ertapenem, gentamicin, imipenem, meropenem, and tigecycline were evaluated. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was analyzed using the Advanced Expert System (AES) program, included in VITEK[®]2. For the interpretation of susceptibility to colistin and tigecycline, the criteria established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) were used⁶. For the other antimicrobials, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines were used⁷.

During the study period, 1805 isolates were collected from patients infected or colonized by *K. pneumoniae*, with 784 (43.4%) isolated in 2015 and 1021 (56.6%) isolated in 2016. The specimen from which isolation was maximum was urine (685; 38%), followed by rectal swab (322; 18%), tracheal secretion (230; 12.7%), sputum (137; 7.6%), blood (97; 5.3%), feces (65; 3.6%), surgical wound fluid (25; 1.4%), abdominal fluid (19; 1.1%), peritoneal fluid (17; 0.9%), bronchoalveolar lavage (14; 0.8%), lesion swab (11; 0.6%), catheter tip (11; 0.6%), pleural fluid (9; 0.5%), and others (163; 9%).

Regarding gender and age, there was a prevalence among males (940; 52.1%) over 60 years of age (925; 51.3%), followed

Corresponding author: Dr^ª Rosmari Hörner.
e-mail: rosmari.ufsm@gmail.com.
Received 5 October 2017
Accepted 20 April 2018



**Increased antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* from a University Hospital
in Rio Grande do Sul, Brazil**

Lorenzoni VV et al. - Drug-resistant *K. pneumoniae* in Brazil

Vinícius Victor Lorenzoni^{[1],[2]}, Franciéli da Costa Rubert^[3], Roberta Filipini

Rampelotto^{[1],[2]}, and Rosmari Hörner^[2]

[1]. Universidade Federal de Santa Maria, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Santa Maria, RS, Brasil. [2]. Universidade Federal de Santa Maria, Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Santa Maria, RS, Brasil. [3]. Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Farmácia, Santa Maria, RS, Brasil.

ABSTRACT

Introduction: The spread of multidrug-resistant Gram-negative bacilli is a health threat, limiting therapeutic options and increasing morbimortality rates. **Methods:** This study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of 1805 *Klebsiella pneumoniae* isolates collected from *Hospital Universitário de Santa Maria* between January 2015 and December 2016. **Results:** Resistance to colistin (239.3%), meropenem (74.2%), ciprofloxacin (68%), gentamicin (35.1%), tigecycline (33.9%), imipenem (29.7%), ertapenem (26.8%), and amikacin (21.4%) was found increased. **Conclusions:** Infection control measures in the hospitals are necessary for reducing the spread of multidrug-resistant microorganisms and preventing efficacy loss of these drugs.

Keywords: Colistin. *Klebsiella pneumoniae*. Multi-drug resistance.

In recent years, antimicrobial resistance has become a global threat to public health. The extensive and indiscriminate use of antimicrobial agents in human and veterinary medicine has led to the dissemination of high-risk clones, capable of accumulating mutations and resistance genes in mobile genetic elements¹. With the emergence of carbapenem-resistant Gram-negative bacilli, polymyxins have become the drug of choice for the treatment of these pathogens². However, recent studies have shown increased resistance rates due to changes in outer membrane, involving component systems (e.g. *mgrB* gene) and lipid A (e.g. *mcr-1* gene)^{3,4}.

Increased infections by multidrug-resistant bacteria, associated with limited therapeutic options, imply the failure of empirical treatments, reinforcing the need for antibacterial therapies based on antimicrobial-susceptibility tests⁵. Therefore, this study aimed to evaluate the antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolates collected during the period of January 2015 till December 2016 at *Hospital Universitário de Santa Maria* (HUSM), Santa Maria-RS, Brazil.

This was a retrospective observational study, developed in a university hospital in the Central-West region of Rio Grande do Sul. HUSM is a reference institution for emergency care that has 403 hospital beds, and serves approximately 1.2 million inhabitants from 45 municipalities. The isolates were collected from several clinical specimens of hospitalized patients, and identified according to the automated system VITEK[®]2 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, France). Besides gender, age, and hospital unit of the patient, susceptibility profile against the antimicrobial agents amikacin, ciprofloxacin, colistin, ertapenem, gentamicin, imipenem, meropenem, and tigecycline were evaluated. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was analyzed using the Advanced Expert System (AES) program, included in VITEK[®]2. For the interpretation of susceptibility to colistin and tigecycline, the criteria established by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

(EUCAST) were used⁶. For the other antimicrobials, the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines were used⁷.

During the study period, 1805 isolates were collected from patients infected or colonized by *K. pneumoniae*, with 784 (43.4%) isolated in 2015 and 1021 (56.6%) isolated in 2016. The specimen from which isolation was maximum was urine (685; 38%), followed by rectal swab (322; 18%), tracheal secretion (230; 12.7%), sputum (137; 7.6%), blood (97; 5.3%), feces (65; 3.6%), surgical wound fluid (25; 1.4%), abdominal fluid (19; 1.1%), peritoneal fluid (17; 0.9%), bronchoalveolar lavage (14; 0.8%), lesion swab (11; 0.6%), catheter tip (11; 0.6%), pleural fluid (9; 0.5%), and others (163; 9%).

Regarding gender and age, there was a prevalence among males (940; 52.1%) over 60 years of age (925; 51.3%), followed by those between 21 to 59 years (717; 39.7%), and zero to 20 years (163; 9%). The Intensive Care Unit (319; 17.7%) was the hospital sector with the highest isolation rates, followed by the Semi-Intensive Care Unit (295; 16.4%), clinic (290; 16.1%), General Surgery Unit (253; 14.1%), Adult Emergency Room (245; 13.6%), Cardiac Intensive Care Unit (93; 5.2%), Nephrology Unit (60; 3.4%), Surgical Block (50; 2.8%), Medical Clinic Unit (34; 1.9%), Recovery Room (31; 1.8%), Obstetric Center (30; 1.7%), Treatment Center for Children with Cancer (29; 1.6%), Child and Adolescent Health Care, Child Intensive and Semi-Intensive Care (28; 1.5%), Maternal-Infant and Women's Health Unit (14; 0.8%), and others (25; 1.4%).

The antimicrobial susceptibility profile is described in **Table 1**. We observed that *K. pneumoniae* showed increased resistance to colistin (239.3%), meropenem (74.2%), ciprofloxacin (68%), gentamicin (35.1%), tigecycline (33.9%), imipenem (29.7%), ertapenem (26.8%), and amikacin (21.4%). **Figure 1** represents the percentage of antimicrobial resistance per quarter.

TABLE 1: Antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella pneumoniae* isolates between 2015 and 2016.

Antimicrobial agent	MIC Range (µg/mL)	2015 (n = 784)			2016 (n = 1021)		
		MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)	MIC ₅₀ / MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)
AMI	0.5-64	2/16	22; 2.8	762; 97.2	2/16	35; 3.4	986; 96.6
CIP	0.25-16	4/4	321; 40.9	463; 59.1	4/4	701; 68.7	320; 31.3
COL	0.5-16	0.5/0.5	48; 6.1	736; 93.9	0.5/16	211; 20.7	810; 79.3
ERT	0.5-8	0.5/8	328; 41.8	456; 58.2	4/8	541; 53	480; 47
GEN	1-16	1/16	326; 41.6	458; 58.4	16/16	574; 56.2	447; 43.8
IMI	0.25-16	0.25/16	245; 31.3	539; 68.7	0.25/16	414; 40.6	607; 59.4
MER	0.25-16	0.25/16	237; 30.2	547; 69.8	2/16	537; 52.6	484; 47.4
TIG	0.25-8	0.5/8	250; 31.9	534; 68.1	1/8	436; 42.7	585; 57.3

MIC50: minimum inhibitory concentration required to inhibit the growth of 50 % of microorganisms; **MIC90:** minimum inhibitory concentration required to inhibit the growth of 90 % of microorganisms; **R:** resistant and intermediate; **S:** sensitive; **AMI:** amikacin; **CIP,** ciprofloxacin; **COL:** colistin; **ERT:** ertapenem; **GEN,** gentamicin; **IMI:** imipenem; **MER:** meropenem; **TIG:** tigecycline.

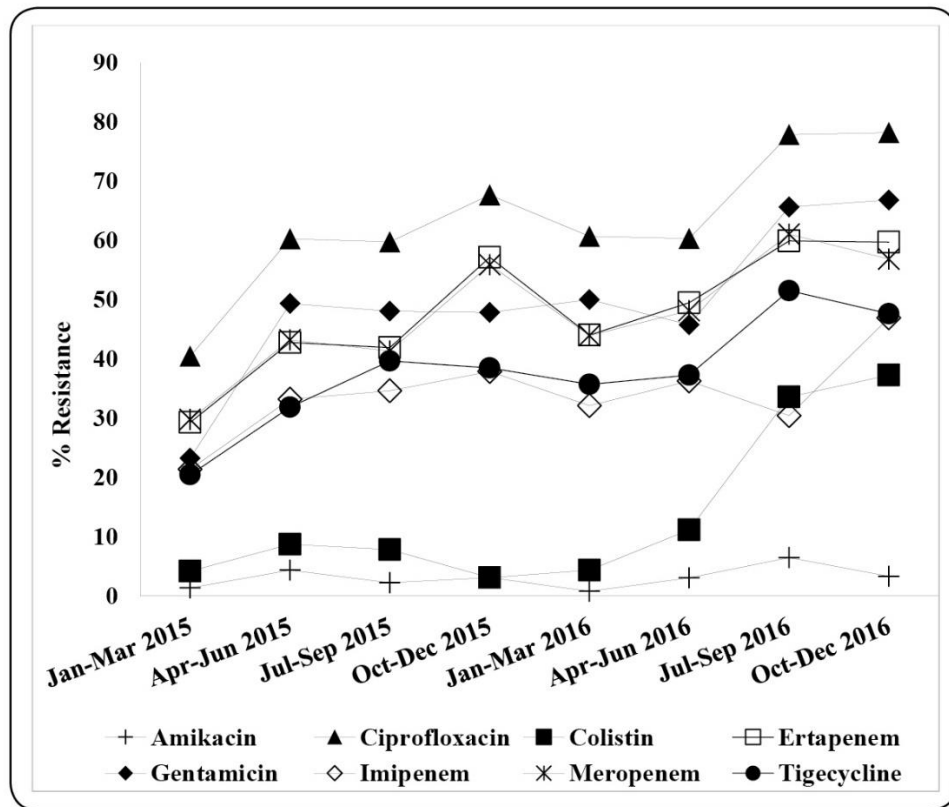


FIGURE 1: Increased antimicrobial resistance of *Klebsiella pneumoniae* isolates between 2015 and 2016.

The phenotype of multi-resistance can be explained by the spread of carbapenemases, especially *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), as well as the extensive use of monotherapy in this hospital⁸. A study by Santos, La Rocca and Hörner⁹ had also described low susceptibility to carbapenem and ciprofloxacin in colistin-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates during the same period. Rossi et al.¹⁰ have observed an increase in colistin-resistant *K. pneumoniae* between 2010 and 2014 at *Hospital de Clínicas in São Paulo* (Brazil).

In our study, all colistin-resistant *K. pneumoniae* isolates showed high resistance to carbapenems and tigecycline (**Table 2**), which is alarming, considering that these antimicrobials are used for the treatment of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* in combination with amikacin, which has demonstrated good activity against the isolates, with susceptibility greater than 80%².

TABLE 2: Antimicrobial susceptibility profile of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates between 2015 and 2016*.

Antimicrobial agent	MIC Range (µg/mL)	2015 (n = 48)			2016 (n = 211)		
		MIC ₅₀ /MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)	MIC ₅₀ /MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)
AMI	0.5-64	8/16	6; 12.5	42; 87.5	4/16	13; 10.9	198; 89.1
CIP	0.25-16	4/4	46; 95.8	2; 4.2	4/4	208; 98.6	3; 1.4
ERT	0.5-8	8/8	40; 83.3	8; 16.7	8/8	201; 95.3	10; 4.7
GEN	1-16	16/16	32; 66.7	16; 33.3	16/16	195; 92.4	16; 7.6
IMI	0.25-16	16/16	40; 83.3	8; 16.7	8/16	203; 96.2	8; 3.8
MER	0.25-16	16/16	40; 83.3	8; 16.7	16/16	203; 96.2	8; 3.8
TIG	0.25-8	8/8	42; 87.5	6; 12.5	2/8	187; 88.6	24; 11.4

MIC₅₀: minimum inhibitory concentration required to inhibit the growth of 50 % of microorganisms; **MIC₉₀**: minimum inhibitory concentration required to inhibit the growth of 90 % of microorganisms; **R**: resistant and intermediate; **S**: sensitive; **AMI**: amikacin; **CIP**, ciprofloxacin; **ERT**: ertapenem; **GEN**, gentamicin; **IMI**: imipenem; **MER**: meropenem; **TIG**: tigecycline; *MIC₅₀/MIC₉₀ 16 µg/mL in both years.

The colonization of carbapenemase-producing microorganisms, prolonged antimicrobial therapy, and previous use of polymyxins contributed to the emergence of heteroresistance^{11,12}. Giani et al.¹³, had observed an outbreak of colistin-resistant KPC-3-producing *K. pneumoniae* due to the deletion of *mgrB* gene. The presence of *mcr-1* gene in carbapenemase-producing isolates had also been reported by some authors^{14,15}.

The resistance profile observed in this institution, during the period of analysis, raises concern, since *K. pneumoniae* showed increased resistance to the antimicrobial agents tested, prompting the adoption of control and preventive measures against multidrug-resistant

microorganisms to reduce their spread in the hospital environment and avoid efficacy loss of these drugs.

Ethical considerations

This research was approved by the Ethical Research Committee, Universidade Federal de Santa Maria, under approval number 38850614.4.0000.5346.

Acknowledgements

We gratefully acknowledge the pharmaceutical staff of the *Laboratório de Análises Clínicas* of *Hospital Universitário de Santa Maria*.

References

1. Ruiz-Garbajosa P, Cantón R. Epidemiología de los bacilos gram negativos multirresistentes. *Rev Esp Quimioter*. 2016;29(Suppl1):21-5.
2. Morrill HJ, Pogue JM, Kaye KS, LaPlante KL. Treatment options for carbapenem-resistant Enterobacteriaceae infections. *Open Forum Infect Dis*. 2015;2(2):ofv050.
3. Aires CAM, Pereira PS, Asensi MD, Carvalho-Assef ANA. mgrB mutations mediating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates from rectal surveillance swabs in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(11):6969-72.
4. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, Silva KC, Cunha MP, Esposito F, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the mcr-1 gene. *Euro Surveill*. 2016;21(17):pii=3021.
5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Nota técnica n.1/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes. Brasília: ANVISA, 2013.
6. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, Version 7.1; 2017.
7. Clinical Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Six Informational Supplement. Document M100-S26, Wayne, PA; 2016.
8. Silva DC, Rampelotto RF, Lorenzoni VV, Santos SO, Damer J, Hörner M, et al. Phenotypic methods for screening carbapenem-resistant Enterobacteriaceae and assessment of their antimicrobial susceptibility profile. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2017;50(2):173-8.
9. Santos SO, La Rocca SM, Hörner R. Colistin resistance in non-fermenting Gram-negative bacilli in a university hospital. *Braz J Infect Dis*. 2016;20(6):649-50.

10. Rossi F, Giardello R, Cury AP, Di Gioia TSR, Almeida Jr JN, Duarte AJS. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. *Braz J Infect Dis.* 2017;21:98-101.
11. Jayol A, Nordmann P, Brink A, Poirel L. Heteroresistance to colistin in *Klebsiella pneumoniae* associated with alterations in the PhoPQ regulatory system. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(5):2780-4.
12. Gaspar GG, Bellissimo-Rodrigues F, Andrade LN, Darini AL, Martinez R. Induction and nosocomial dissemination of carbapenem and polymyxin-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015;48(4):483-7.
13. Giani T, Arena F, Vaggelli G, Conte V, Chiarelli A, Henrici de Angelis L, et al. Large nosocomial outbreak of colistin-resistant, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* traced to clonal expansion of an mgrB deletion mutant. *J Clin Microbiol.* 2015;53(10):3341-4.
14. Dalmolin TV, Castro L, Mayer FQ, Zavascki AP, Martins AF, Lima-Morales D, et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *bla_{KPC-2}* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2017;72(8):2404-6.
15. Delgado-Blas JF, Ovejero CM, Abadia-Patiño L, Gonzalez-Zorn B. Coexistence of *mcr-1* and *bla_{NDM-1}* in *Escherichia coli* from Venezuela. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(10):6356-8.

Received: October 05, 2017; Accepted: April 20, 2018.

Corresponding author : Dr^a Rosmari Hörner. **e-mail**: rosmari.ufsm@gmail.com.

Conflicts of interest: The authors declare that there is no conflict of interest.

RESULTADOS ADICIONAIS

Realizou-se um estudo retrospectivo observacional no Hospital Universitário de Santa Maria a fim de avaliar o perfil de susceptibilidade antimicrobiana de isolados clínicos de *K. pneumoniae* coletados entre janeiro a dezembro de 2017. Os isolados foram coletados de diversos espécimes clínicos de pacientes hospitalizados e identificados pelo sistema automatizado Vitek®2 (bioMérieux, França). Foram analisados o gênero, idade e setor hospitalar, bem como o perfil de susceptibilidade frente aos agentes antimicrobianos amicacina, ciprofloxacino, colistina, ertapenem, gentamicina, imipenem, meropenem e tigeciclina. Para a interpretação da susceptibilidade à colistina e tigeciclina, utilizaram-se os critérios estabelecidos pelo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2017). Para os demais agentes antimicrobianos, utilizou-se *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017).

Durante o período de estudo, 854 isolados clínicos de *K. pneumoniae* foram coletados. O espécime clínico em que ocorreu maior isolamento foi urina (344; 40,3%), seguido de *swab* retal (150; 17,6%), secreção traqueal (106; 12,4%), sangue (74; 8,7%), escarro (55; 6,4%), biópsias em geral (21; 2,4%), fezes (19; 2,2%), líquido abdominal (11; 1,3%), lavado broncoalveolar (9; 1,1%), líquido peritoneal (7; 0,8%), aspirado traqueal (6; 0,7%), entre outros (52; 6,1%).

Em relação ao gênero e idade, houve maior prevalência no sexo masculino (531; 62,2%) com idade superior aos 60 anos (417; 48,8%), 21 a 59 anos (361; 42,3%) e zero a 20 anos (76; 8,9%). A Unidade de Terapia Intensiva (167; 19,5%) foi o setor hospitalar que ocorreram as maiores taxas de isolamento, seguido o Ambulatório (142; 16,6%), Pronto Atendimento Adulto (141; 16,5%), Cirurgia Geral (116; 13,6%), Cuidados Intensivos e Semi-Intensivos Adulto (92; 10,8%), Clínica Médica (37; 4,3%), Nefrologia (35; 4,1%), Bloco cirúrgico (34; 4%), Unidade Coronariana Intensiva (29; 3,4%), Centro Obstétrico (18; 2,1%), Centro de Tratamento da Criança e Adolescente com Câncer (12; 1,4%), Atenção à Saúde da Criança e Adolescente e Cuidados Intensivos e Semi-Intensivos Infantil (8; 0,9%), Internação Materno-Infantil e Saúde da Mulher (3; 0,4%), entre outros (20; 2,4%).

O perfil de susceptibilidade antimicrobiana está descrito nas Tabela 1. Podemos observar que apenas a amicacina demonstrou boa atividade (88,48%) frente aos isolados resistentes à colistina (Tabela 2). Quando comparados os anos de 2015 (Artigo Científico 2) e

2017, observamos um aumento de resistência à colistina (532,8%), amicacina (142,8%), meropenem (85,1%), imipenem (79,5%), tigeciclina (77,7%), ciprofloxacino (66,7%), gentamicina (51,9%), ertapenem (36,1%). A figura 4 representa a porcentagem de resistência antimicrobiana por trimestre, correlacionado com os resultados obtidos nos anos de 2015/2016 (Artigo Científico 2) e 2017.

Tabela 1 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* isoladas em 2017.

Agente antimicrobiano	MIC Range (µg/mL)	2017 (n= 854)		
		MIC ₅₀ /MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)
AMI	0,5-64	4/16	58; 6,8	796; 93,2
CIP	0,25-4	4/4	582; 68,2	272; 31,8
COL	0,5-16	0,5/16	330; 38,6	524; 61,4
ERT	0,5-8	8/8	486; 56,9	368; 43,1
GEN	1-16	16/16	540; 63,2	314; 36,8
IMI	0,25-16	8/8	480; 56,2	380; 43,8
MER	0,25-16	16/16	477; 55,9	377; 44,1
TIG	0,25-8	2/8	484; 56,7	370; 43,3

Fonte: Autores.

MIC₅₀, concentração inibitória mínima para inibir crescimento de 50% dos microrganismos; MIC₉₀, concentração inibitória mínima para inibir crescimento de 90% dos microrganismos; R, Resistente e Intermediário; S, Sensível; AMI, Amicacina; CIP, Ciprofloxacino; COL, Colistina; ERT, Ertapenem; GEN, Gentamicina; IMI, Imipenem; MER, Meropenem; TIG, Tigeciclina.

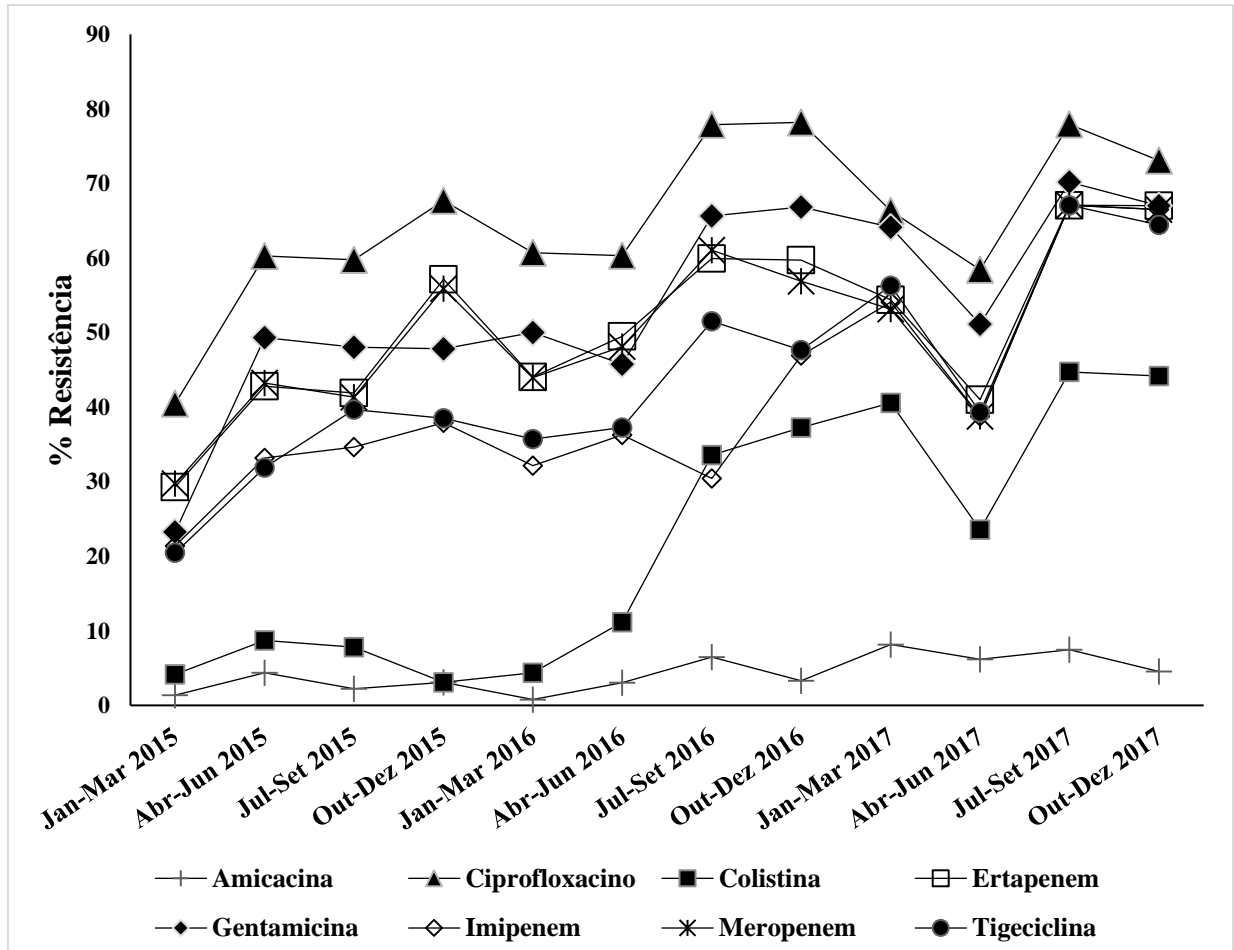
Tabela 2 – Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de *Klebsiella pneumoniae* resistente à colistina isoladas em 2017*.

Agente antimicrobiano	MIC Range (µg/mL)	2017 (n= 330)		
		MIC ₅₀ /MIC ₉₀	R (n;%)	S (n;%)
AMI	0,5-64	4/16	38; 11,5	292; 88,5
CIP	0,25-4	4/4	329; 99,7	1; 0,3
ERT	0,5-8	8/8	327; 99,1	3; 0,9
GEN	1-16	16/16	322; 97,6	8; 2,4
IMI	0,25-16	8/8	327; 99,1	3; 0,9
MER	0,25-16	16/16	327; 99,1	3; 0,9
TIG	0,25-8	2/8	322; 97,6	8; 2,4

Fonte: Autores.

MIC₅₀, concentração inibitória mínima para inibir crescimento de 50% dos microrganismos; MIC₉₀, concentração inibitória mínima para inibir crescimento de 90% dos microrganismos; R, Resistente e Intermediário; S, Sensível; AMI, Amicacina; CIP, Ciprofloxacino; ERT, Ertapenem; GEN, Gentamicina; IMI, Imipenem; MER, Meropenem; TIG, Tigeciclina; *MIC₅₀/MIC₉₀ 16 µg/mL.

FIGURA 4 – Aumento de resistência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* entre 2015 e 2017.



Fonte: Autores.

DISCUSSÃO GERAL

Baseado no aumento global de resistência bacteriana, buscou-se investigar a presença de bacilos Gram-negativos multirresistentes em pacientes internados no Hospital Universitário de Santa Maria, o perfil de susceptibilidade a agentes antimicrobianos e determinar os mecanismos de resistência. Inicialmente, verificou-se a prevalência de KPC e altos níveis de resistência aos β -lactâmicos, em especial carbapenêmicos. A baixa susceptibilidade à colistina em alguns isolados levou à investigação da presença do gene *mcr-1* em isolados resistentes às polimixinas, tendo em vista sua disseminação global, estando presente em um isolado de *E. coli* em uma paciente imunocomprometida. Paralelamente à investigação dos genes *bla_{KPC}* e *mcr-1*, realizou-se uma análise temporal a fim de determinar as taxas de resistência em *K. pneumoniae* durante dois anos, uma vez que foi o microrganismo mais isolado durante todo o estudo. Observou-se um aumento de resistência em todos antimicrobianos analisados e em diferentes locais de internação, como unidades críticas (UTI e UCI), Pronto Atendimento e Ambulatório. Este cenário é preocupante, visto que surtos de *K. pneumoniae* multirresistente podem levar a tratamentos imprecisos e aumento nas taxas de mortalidade.

A aquisição de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos está ligada à uma transmissão horizontal e exposição exógena durante a hospitalização, seja por uma disseminação de clones ou elementos genéticos móveis, uma vez que genes de carbapenemases são mediados por plasmídeos. A introdução destes microrganismos no ambiente nosocomial pode ocorrer por meio de pacientes colonizados ou infectados por profissionais da saúde ou contaminação ambiental (GOODMAN *et al.*, 2016; TEMKIN *et al.*, 2014). Um estudo realizado por Rock *et al.* (2014), em Maryland (EUA), constatou que 14% (31/220) dos casos de contaminação por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (produtores ou não de KPC) estavam relacionados à contaminação por meio de luvas ou jalecos, e 25,58% (11/43) estavam relacionadas à contaminação ambiental, como equipamentos hospitalares (exemplo, pias e tubos de drenagem) e médicos (exemplo, duodenoscópios) (GOODMAN *et al.*, 2016; ROCK *et al.*, 2014).

Apesar da baixa frequência no Brasil, o gene *mcr-1* já foi relatado em isolados de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *S. enterica* de origem animal e humana (DALMOLIN *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2016a; FERNANDES *et al.*, 2016b; RAU *et al.*, 2018). Alterações cromossômicas, como mutações nos genes *mgrB*, *pmrA* e *yciM*, relacionadas à resistência adquirida, normalmente induzida pelo uso extensivo de polimixinas e, associadas à rápida disseminação de clones, pode explicar a baixa susceptibilidade a esta classe de antimicrobianos

encontrada nos isolados resistentes à colistina (*mcr-1*-negativos) (AIRES *et al.*, 2016; DE MAIO CARRILLHO *et al.*, 2017).

Segundo o *European Centre for Disease Prevention and Control*, houve um aumento de resistência aos carbapenêmicos (5,1%), fluorquinolonas (6,9%), cefalosporinas de terceira geração (8,5%) e aminoglicosídeos (6,3%) em isolados de *K. pneumoniae* na Europa, entre os anos de 2009 e 2013. Em um estudo transversal realizado por Prim *et al.* (2017) na Espanha entre os anos de 2012 e 2015, 0,67% (91/13579) dos isolados de enterobactérias eram resistentes à colistina, sendo 31 multirresistentes produtores de ESBL, AmpC, KPC e/ou OXA-48. Ainda, o gene *mcr-1* estava presente em 15 isolados de *E. coli*, entre 76 enterobactérias selecionados para investigação plasmidial. Ku *et al.* (2015), ao avaliarem a resistência aos carbapenêmicos em *A. baumannii* em um estudo longitudinal de 18 anos na China, constataram redução da susceptibilidade de 88.1% (2001-2003) a < 25% (2010-2012) em decorrência da variabilidade de alelos de oxacilinasas, como OXA-58 e OXA-72, e metalo- β -lactamases, como VIM e IMP. No estudo realizado por Rossi *et al.* (2017) no Brasil entre os anos de 2010 e 2014, 7% (1159/16533) dos isolados de enterobactérias, 1,4% (102/7446) isolados de *Acinetobacter* spp. e 0,9% (85/9786) isolados de *Pseudomonas* spp. eram resistentes à colistina (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2014; KU *et al.*, 2015; PRIM *et al.*, 2017, ROSSI *et al.*, 2017).

Entre as medidas de prevenção e controle de infecções por bacilos Gram-negativos multirresistentes, estão a higienização das mãos e do ambiente, o isolamento adequado de pacientes, a correta paramentação e uso de equipamentos de proteção individual (exemplo, luvas, jalecos), a implementação de políticas institucionais de uso racional de antimicrobianos e sistemas de vigilância epidemiológica que permitam monitoramento de patógenos resistentes (ADLER; FRIEDMAN; MARCHAIM, 2016; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013, 2016; LANDELLE; MARIMUTHU; HARBARATH, 2014).

CONCLUSÃO

Os microrganismos multirresistentes foram isolados principalmente em pacientes do sexo masculino, com idade superior aos 60 anos e internados na Unidade de Terapia Intensiva, coletados de espécimes clínicos como *swab* retal e urina.

Altos níveis de resistência aos antimicrobianos foram observados, especialmente nos isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e colistina, com exceção da amicacina que demonstrou boa atividade (superior a 88%).

O gene *bla_{KPC}* esteve presente em 80% dos isolados de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos analisados molecularmente, podendo estar relacionado ao fenótipo de multirresistência observado entre os anos de 2015 e 2017.

O gene *mcr-1* esteve presente em um isolado (0,29%) de *Escherichia coli* resistente à colistina coletado em setembro de 2017. Destaca-se o primeiro relato de sua detecção em Santa Maria e a necessidade de sua investigação na rotina laboratorial, uma vez que sua disseminação global é rápida e silenciosa.

Os métodos fenotípicos para detecção de carbapenemases e resistência às polimixinas apresentaram 100% de sensibilidade e especificidade, em relação aos métodos moleculares, possibilitando a implementação na rotina laboratorial, uma vez que são testes rápidos e práticos.

O aumento de resistência aos antimicrobianos observado no período de três anos é preocupante, reforçando a necessidade de implementação de medidas de controle de infecção mais rigorosas e planejamento terapêutico adequado, uma vez que este processo é acelerado pela disseminação de genes de resistência e uso indiscriminado de antimicrobianos.

REFERÊNCIAS

ADEOLU, M. et al. Genome-based phylogeny and taxonomy of the '*Enterobacteriales*': proposal for *Enterobacterales* ord. nov. divided into the families *Enterobacteriaceae*, *Erwiniaceae* fam. nov., *Pectobacteriaceae* fam. nov., *Yersiniaceae* fam. nov., *Hafniaceae* fam. nov., *Morganellaceae* fam. nov., and *Budviciaceae* fam. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 66, n. 12, p. 5575-5599, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620848>>. Acesso em: 08 out. 2018. DOI: 10.1099/ijsem.0.001485.

ADLER, A.; FRIEDMAN, N. D.; MARCHAIM, D. Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacilli: Infection Control Implications. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 30, n. 4, p. 967-997, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27660090>>. Acesso em: 02 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.idc.2016.08.001.

AIRES, C. A. et al. mgrB Mutations Mediating Polymyxin B Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from Rectal Surveillance Swabs in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 21; n. 60, p. 6969-6972, Oct. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27620478>>. Acesso em: 02 ago. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01456-16.

AIRES, C. A. M. et al. Emergence of the Plasmid-Mediated mcr-1 Gene in Clinical KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 392 in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 61, n. 7, pii: e00317-17, Jun. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28438940>>. Acesso em 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00317-17.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Nota Técnica Nº 01/2013: Medidas de prevenção e controle de infecções por Enterobactérias multiresistentes.** Brasília: ANVISA; 2013. 22 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Comunicado de risco nº 01/2016 – GVIMS/GGTES/ANVIS: Detecção do gene responsável pela resistência à polimixina mediada por plasmídeos (*mcr-1*) no Brasil.** Brasília: ANVISA; 2016. 14 p.

ANSARI, M.; MUNIR, T.; SAAD, N. Phenotypic Identification, Frequency Distribution and Antibiogram of Carbapenemase Producing *Enterobacteriaceae* in Clinical Isolates. **J. Coll. Physicians Surg. Pak.**, v. 28, n. 4, p. 274-278, Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29615166>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.29271/jcpsp.2018.04.274.

BARON, S. et al. Molecular mechanisms of polymyxin resistance: knowns and unknowns. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 48, n. 6, p. 583-591, Dec. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27524102>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2016.06.023.

BASSETTI, M. et al. Preventive and therapeutic strategies in critically ill patients with highly resistant bacteria. **Intensive Care Med.**, v. 41, n. 5, p. 776-795, May 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25792203>>. Acesso em 27 jul. 2018. DOI: 10.1007/s00134-015-3719-z.

BIALVAEI, A.Z. et al. Current methods for the identification of carbapenemases. **J. Chemother.**, v. 28, n. 1, p. 1-19, 2016. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256147>>. Acesso em 26 jul. 2018. DOI: 10.1179/1973947815Y.0000000063.

BIR, R. et al. Comparative evaluation of in-house Carba NP test with other phenotypic tests for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 20, e22652, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30129058>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1002/jcla.22652.

BLAIR, J. M.; RICHMOND, G. E.; PIDDOCK, L. J. Multidrug efflux pumps in Gram-negative bacteria and their role in antibiotic resistance. **Future Microbiol.**, v. 9, n. 10, p. 1165-1177, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25405886>>. Acesso em 27 jul. 2018. DOI: 10.2217/fmb.14.66.

BOMFIGLIO, G; RUSSO, G; NICOLETTI, G. Recent developments in carbapenems. **Expert Opin. Investig. Drugs**, v. 11, n. 4, p. 529-544, Apr. 2002. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11922861>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

BONOMO, R. A. β -Lactamases: A Focus on Current Challenges. **Cold. Spring Harb. Perspect. Med.**, v. 3, n. 7, pii: a025239, Jan. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27742735>>. Acesso em 09 out. 2018.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemoth.**, v. 54, n. 3, p. 969-976, Mar. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19995920>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01009-09.

CAMPOS, M.A. et al. Capsule polysaccharide mediates bacterial resistance to antimicrobial peptides. **Infect. Immun.**, v. 72, n. 12, p. 7107-7114, Dec. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15557634>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

CANNATELLI, A. et al. In vivo emergence of colistin resistance in *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-type carbapenemase mediated by insertional inactivation of the PhoQ/PhoP mgrB regulator. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 11, p. 5521-5526, Nov. 2013. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23979739>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01480-13.

CAO, L. et al. Prevalence and molecular characteristics of *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli*: isolates of clinical infection from a Chinese University Hospital. **Infect. Drug Resist.**, v. 11, p. 1597-1603, Set. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30310295>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.2147/IDR.S166726.

CARROLL, L. M. et al. First report of an *mcr-1*-harboring *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype 4,5,12:i:- strain isolated from blood of a patient in Switzerland. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, pii: S0924-8579(18)30229-2, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30099057>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.08.003.

CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 12, p. 2956-2957, Dec. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869051>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkt298.

CAVALCANTI, F.L. et al. Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, Dec 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26676375>>. Acesso em 26 jul. 2018. DOI: 10.1590/0074-02760150233.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Antibiotic resistance threats in the United States, 2013**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

CHABOU, S. et al. Real-time quantitative PCR assay with Taqman(®) probe for rapid detection of MCR-1 plasmid-mediated colistin resistance. **New Microbes New Infect.**, v. 5, n. 13, p. 71-74, Jul. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27489722>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.nmni.2016.06.017.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-ED28.** Wayne (PA): CLSI; 2018. Acesso em: 26 jul. 2018.

CONCEIÇÃO-NETO, O.C. et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 50, n. 2, p. 282-284, Aug. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28579456>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2017.05.003.

DALMOLIN, T. V. et al. Co-occurrence of *mcr-1* and *blaKPC-2* in a clinical isolate of *Escherichia coli* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 72, n. 8, p. 2404-2406, Aug. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28505353>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkx142.

DALMOLIN, T. V. et al. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 90, n. 2, p. 132-133, Feb. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29169659>>. Acesso em: 28 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016.

DA SILVA, K. E. et al. High mortality rate associated with KPC-producing *Enterobacter cloacae* in a Brazilian hospital. **Am. J. Infect. Control.**, v. 46, n. 1, p. 108-110, Jan. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28844375>>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 10.1016/j.ajic.2017.07.011.

DE MAIO CARRILLHO, C. M. et al. Colistin-resistant *Enterobacteriaceae* infections: clinical and molecular characterization and analysis of in vitro synergy. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 87, n. 3, p. 253-257, Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27939820>>. Acesso em 02 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2016.11.007.

DE PAULA-PETROLI, S. B. et al. Early detection of a hypervirulent KPC-2-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST235 in Brazil. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 12, p. 153-154, Mar. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29391216>>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.01.014.

DERIS, Z. Z. et al. A secondary mode of action of polymyxins against Gram-negative bacteria involves the inhibition of NADH-quinone oxidoreductase activity. **J. Antibiot (Tokyo)**, v. 67, n. 2, p. 147-151, Feb. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3943757/>>. Acesso em 09 out. 2018. DOI: 10.1038/ja.2013.111.

DORTET, L.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Rapid identification of carbapenemase types in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas* spp. by using a biochemical test. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 12, p. 6437-6440, Dec. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070158>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01395-12.

DORTET, L. et al. Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* from blood cultures. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 20, n. 4, p. 340-344, Apr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23889766>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1111/1469-0691.12318.

EIAMPHUNGORN, W. et al. Prevalence of the colistin resistance gene *mcr-1* in colistin-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from humans in Thailand. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, v. 15, p. 32-35, Jun. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29935331>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.06.007.

EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING (EUCAST). **Clinical breakpoints: breakpoint tables for bacteria (v 8.1)**. Disponível em: <http://www.eucast.org/clinical_breakpoints>. Acesso em: 26 jul. 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Antimicrobial resistance in Europe - Overview of the data on antimicrobial resistance in Europe released in 2014**. 2014. Disponível em: <<https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/antimicrobial-resistance-europe>>. Acesso em: 07 ago. 2017.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Updated advice on the use of colistin products in animals within the European Union: development of resistance and possible impact on human and animal health**. 2016. Disponível em: <http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/07/WC500146813.pdf>. Acesso em: 10 ago. 2017.

FALAGAS, M.E.; RAFAILIDIS, P.I.; MATTHAIIOU, D.K. Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. **Drug Resist. Updat.**, v. 13, n. 4-5, p. 132-138, Aug-Oct. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20843473>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.drug.2010.05.002.

FENG, S. et al. Co-production of MCR-1 and NDM-5 in *Escherichia coli* isolated from a colonization case of inpatient. **Infect. Drug Resist.**, v. 11, p. 1157-1161, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30147343>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.2147/IDR.S171164.

FERNANDES, M.R. et al. (a) Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. **Euro Surveill.**, v. 21, n. 17, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27168587>>. Acesso em: 26 Jul. 2018. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30214.

FERNANDES, M. R. et al. (b) First Report of the Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the *mcr-1* Gene in a Colistin-Resistant *Escherichia coli* Sequence Type 101 Isolate from a Human Infection in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 10, p. 6415-6417, Sep. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27503650>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01325-16.

FERNANDES, R.; AMADOR, P.; PRUDÊNCIO, C. β -Lactams: chemical structure, mode of action and mechanisms of resistance. **Rev. Med. Microbiol.**, v. 24, n. 1, p. 7-17, Jan. 2013. Disponível em: <https://journals.lww.com/revmedmicrobiol/Fulltext/2013/01000/___Lactams___chemical_structure,_mode_of_action_and.2.aspx>. Acesso em: 09 Out. 2018. DOI: 10.1097/MRM.0b013e3283587727.

FRIEDEN, T. Antibiotic resistance threats in the United States. **Centers for Disease Control and Prevention**, p. 24, 2013.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Approved Animal Drug Products (Green Book)**. 2017. Disponível em: <<https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/default.htm>>. Acesso em: 26 Jul. 2018.

GARCIA-FERNANDEZ, A. et al. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 4, p. 2143-2145, Apr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22252815>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.05308-11.

GASPARETO, P. B. et al. Occurrence of *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Braz. J. Microbiol.**, v. 38, n. 1, p. 108-109, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1517-83822007000100022>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 10.1590/S1517-83822007000100022.

GIRARDELLO, R. et al. Colistin susceptibility testing and Vitek-2™: is it really useless?. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 91, n. 4, p. 309-311, Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29731389>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.03.019.

GOODMAN, K. E. *et al.* Infection control implications of heterogeneous resistance mechanisms in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* (CRE). **Expert Rev. Anti. Infect. Ther.**, v. 14, n. 1, p. 95-108, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26535959>>. Acesso em: 02 ago. 2018.

GUPTA, S. *et al.* Colistin and polymyxin B: a re-emergence. **Indian J. Crit. Care Med.**, v.13, n. 2, p.49-53, Apr.-Jun. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19881183>>. Acesso em: 27 jul. mar. 2016. DOI: 10.4103/0972-5229.56048.

GURJAR, M. Colistin for lung infection: an update. **J. Intensive Care**, v.3, n. 1, p. 3, Jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25705428>>. Acesso em: 28 jul. 2018. DOI: 10.1186/s40560-015-0072-9.

HAMZAOU, Z. *et al.* Role of association of OmpK35 and OmpK36 alteration and blaESBL and/or blaAmpC in conferring carbapenem resistance among non-producing carbapenemase-*Klebsiella pneumoniae*. **Int. J. Antimicrob. Agents**. pii: S0924-8579(18)30098-0. Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29621592>>. Acesso em 01 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.03.020.

HINDLER, J. A.; HUMPHRIES, R. M. Colistin MIC variability by method for contemporary clinical isolates of multidrug-resistant Gram-negative bacilli. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1678-1684, Jun. 2013. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/51/6/1678.full>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1128/JCM.03385-12.

HU, Y.Y. *et al.* Rapid detection of porins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight mass spectrometry. **Front. Microbiol.**, v. 6, p. 784, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4524100>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2015.00784.

HUANG, L. *et al.* Differential susceptibility to carbapenems due to the AdeABC efflux pump among nosocomial outbreak isolates of *Acinetobacter baumannii* in a Chinese hospital. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 62, n. 3, p. 326-332, Nov. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18687557>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.06.008.

JAVAN, A. O.; SHOKOUHI, S.; SAHRAEI, Z. A review on colistina nephrotoxicity. **Eur. J. Clin Pharmacol**, v. 71, n. 7, p. 801-810, Jul. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26008213>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1007/s00228-015-1865-4.

JAYOL, A. et al. Comparison of methods for detection of plasmid-mediated and chromosomally encoded colistin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 24, n. 2, p. 175-179, Feb. 2018. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28606644>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.06.002.

KAYE, K. S. et al. Agents of Last Resort: Polymyxin Resistance. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 30, n. 2, p. 391-414, Jun. 2016. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208765>>. Acesso em: 2 jul. 2016. DOI: 10.1016/j.idc.2016.02.005.

KIM, S.J.; KO, K.S. Diverse genetic alterations responsible for post-exposure colistin resistance in populations of the same strain of *Klebsiella pneumoniae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**. pii: S0924-8579(18)30177-8, Jun. 2018. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29944953>>. Acesso em 28 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2018.06.010.

KU, W.W., et al. Evolution of carbapenem resistance in *Acinetobacter baumannii*: an 18-year longitudinal study from a medical center in northern Taiwan. **J. Microbiol. Immunol. Infect.**, v. 48, n. 1, p. 57-64, Feb. 2015. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24064289>>. Acesso em 07 ago. 2018.

LANDELLE, C.; MARIMUTHU, K.; HARBARTH, S. Infection control measures to decrease the burden of antimicrobial resistance in the critical care setting. **Curr. Opin. Crit. Care.**, v. 20, n. 5, p. 499-506, Oct. 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25032821>>. Acesso em 02 ago. 2018.

LENTZ, S. A. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. **Euro Surveill.**, v. 21, n. 26, pii=30267, Jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27390134>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.26.30267.

LI, X. et al. Detection and characterization of a clinical *Escherichia coli* ST3204 strain coproducing NDM-16 and MCR-1. **Infect. Drug Resist.**, v. 11, p. 1189-1195, Aug. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30147347>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.2147/IDR.S175041.

LI, X. Z.; NIKAIDO, H. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria: an Update. **Drugs**, v. 69, n. 12, p. 1555-1623, Aug. 2009. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2847397>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.2165/11317030-000000000-00000.

LIN, Y. C. Emergence of an *Escherichia coli* strain co-harboring *mcr-1* and *bla*_{NDM-9} from urinary tract infection in Taiwan. **J. Glob. Antimicrob. Resist.**, pii: S2213-7165(18)30192-9, Oct 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30312830>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1016/j.jgar.2018.10.003.

LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J. Med. Microbiol.**, v. 55, Pt 11, 1611-1613, Nov. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030928>>. Acesso em: 13 out. 2018.

LITTLE, M. L. Molecular diversity in mechanisms of carbapenem resistance in paediatric *Enterobacteriaceae*. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 39, n. 1, p. 52-57, Jan. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3237943>>. Acesso em: 28 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2011.09.014.

LIU, Y.Y. et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. **Lancet Infect. Dis.**, v. 16, n. 2, p. 161-168, Feb. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26603172>>. Acesso em: 10 jul. 2016. DOI: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

LOGAN, L.K.; WEINSTEIN, R.A. The Epidemiology of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: The Impact and Evolution of a Global Menace. **J. Infect. Dis.**, v. 15, n. 215(Suppl 1), p. S28–S36, Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28375512>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1093/infdis/jiw282.

LO-TEN-FOE, J. et al. Comparative evaluation of the VITEK 2, disk diffusion, etest, broth microdilution, and agar dilution susceptibility testing methods for colistin in clinical isolates, including heteroresistant *Enterobacter cloacae* and *Acinetobacter baumannii* strains. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 10, p. 3726–3730, Oct. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17646414>>. Acesso em: 28 jul. 2018.

MARQUEZ, B. Bacterial efflux systems and efflux pumps inhibitors. **Biochimie**, v. 87, n. 12, p. 1137-1147, Dec. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15951096>>. Acesso em: 29 jul. 2018.

MARTINS, A. F. et al. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1-like and IMP-1-like metallo-beta-lactamases in hospitals from southern Brazil. **Infection**, v. 35, n.

6, p. 457-460, Dec. 2007. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18034208>>. Acesso em: 11 out. 2018.

MARTINS, W. **Estudo de mecanismos de resistência e virulência em isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase**. 2014. 40 p. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Fundação Oswaldo Cruz, Recife, PE, 2014.

MARTINS, W. M. B. S. et al. Frequency of BKC-1-Producing *Klebsiella* Species Isolates. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 8, p. 5044-5046, Jul. 2016. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27216068>>. Acesso em 11 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00470-16.

MEHRAD, B. et al. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. **Chest**, v. 147, n. 5, p. 1413-1421, May 2015. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25940252>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: : 10.1378/chest.14-2171.

MENDES, A. C. mcr-1 in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* with Hospitalized Patients, Portugal, 2016-2017. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 24, n. 4, p. 762-766, Apr. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29553327>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.3201/eid2404.171787.

MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **Instrução Normativa nº 45, de 22 de novembro de 2016**. 2016. Disponível em:
<<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/legislacao/instrucaonormativa-no-45-de-22-de-novembro-de-2016.pdf>>. Acesso em 29 jul. 2018.

MOFFATT, J. H. et al. Colistin resistance in *Acinetobacter baumannii* is mediated by complete loss of lipopolysaccharide production. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 54, n. 12, p. 4971-4977, Dec. 2010. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20855724>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00834-10.

MONTEIRO, J. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 1, p. 333-334, Jan 2009. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015350>>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 1128/AAC.00736-08.

MORALES, A. S. et al. Colistin Resistance in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* Strains Isolated from Swine in Brazil. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 109795, Aug 2012. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3432351/>>. Acesso em 28 jul. 2018. DOI: 10.1100/2012/109795.

MORRIL, H. J. et al. Treatment options for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* infections. **Open Forum Infect. Dis.**, v. 2, n. 2, ofv050, Apr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462593/>>. Acesso em 28 jul. 2018. DOI: 10.1093/ofid/ofv050.

MURRAY, P.; ROSENTHAL, K.; PFALLER, M. **Microbiologia médica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014. 888 p.

NI, W. et al. Effects of efflux pump inhibitors on colistin resistance in multidrug resistant Gram-negative bacteria. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 60, n. 5, p. 3215-3218, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26953203>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00248-16.

NICOLAU, D.P. Carbapenems: a potent class of antibiotics. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**. v. 9, n. 1, p. 23-37, Jan. 2008. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18076336>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

NICOLETTI, A. G. et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemoter.**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, Sep. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26055384>>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00158-15.

NORDMANN, P. et al. Identification and screening of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 18, n. 5, p. 432-438, May 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507110>>. Acesso em 28 jul. 2018. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2012.03815.x.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. (a) Rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, n. 9, p. 1503-1507, Sep. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22932472>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.3201/eid1809.120355.

NORDMANN, P.; DORTET, L.; POIREL, L. (b) Carbapenem resistance in *Enterobacteriaceae*: Here is the storm! **Trends Mol. Med.**, v. 18, n. 5, p. 263-272, May 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22480775>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. **J. Clin. Microbiol.**, v. 50, n. 8, p. 2761-2766, Aug. 2012. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22357501>>. Acesso em 10 out. 2018. DOI: 10.1128/JCM.06477-11.

NORDMANN, P.; POIREL, L. Strategies for identification of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 68, n. 3, p. 487-489, 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23104494>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1093/jac/dks426.

NORDMANN, P.; JAYOL, A.; POIREL, L. Rapid detection of polymyxin resistance in Enterobacteriaceae. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 22, n. 6, p. 1038-1043, Jun. 2016. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/22/6/15-1840_article>. Acesso em 27 jul. 2018. DOI: 10.3201/eid2206.151840.

OLAITAN, A. O.; MORAND, S.; ROLAIN, J. M. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. **Front. Microbiol.**, v. 5, n. 5, p. 643, Nov. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25505462>>. Acesso em: 1 ago. 2018. DOI: 10.3389/fmicb.2014.00643.

PADILLA, E. et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 51, n. 1, p. 177-183, Jan. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19858254>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00715-09.

PAN, Y.P. et al. Overexpression of MexAB-OprM efflux pump in carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. **Arch. Microbiol.**, v. 198, n. 6, p. 565-571, Aug. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27060003>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1007/s00203-016-1215-7.

PANCOTTO, L. R. Performance of rapid tests for carbapenemase detection among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Braz. J. Microbiol.**, v. 49, n. 4, p. 914-918, Oct-Dec. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6175730>>. Acesso em 13 out. 2018. DOI: 10.1016/j.bjm.2018.07.002.

PARK, Y. K.; KO, K. S. Effect of carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone (CCCP) on killing *Acinetobacter baumannii* by colistina. **J. Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 53-59, Jan. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557480>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1007/s12275-015-4498-5.

PASTERAN, F. et al. A simple test for the detection of KPC and metallo- β -lactamase carbapenemase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, n. 9, p. 1438-1441, Sep. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21689207>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1111/j.1469-0691.2011.03585.x.

PEREIRA, P. S. Coproduction of NDM-1 and KPC-2 in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Microb. Drug Resist.**, v. 21, n. 2, p. 234-236, Apr. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25473727>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1089/mdr.2014.0171.

PERRY, J. D. A Decade of Development of Chromogenic Culture Media for Clinical Microbiology in an Era of Molecular Diagnostics. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 2, p. 449-479, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5355637/>>. Acesso em: 10 out. 2018. DOI: 10.1128/CMR.00097-16.

PFEIFER, Y. et al. Emergence of OXA-48-type carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in German hospitals. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 56, n. 4, p. 2125-2128, Apr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290940>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.05315-11.

PICÃO, R. C. et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 65, n. 4, p. 786-797, Apr. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20139141>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkq024.

PIERCE, V. M. et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among *Enterobacteriaceae*. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 55, n. 8, p. 2321-2333, Apr. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381609>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/JCM.00193-17.

PILLONETTO, M. et al. First report of NDM-1-producing *Acinetobacter baumannii* sequence type 25 in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 12, p. 7592-7594, Dec. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25288087>>. Acesso em 13 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.03444-14.

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.**, v. 51, n. 12, p. 4281-4283, Dec. 2013. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24108615>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/JCM.01634-13.

PITOUT, J. D.; NORDMANN, P.; POIREL, L. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. **Antimicrob. Agents Chemot.**, v. 59, n. 10, p. 5873-5884, Oct. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26169401>>. Acesso em 29 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01019-15.

POIREL, L.; JAYOL, A.; NORDMANN, P. Polymyxins: antibacterial activity, susceptibility testing, and resistance mechanisms encoded by plasmids or chromosomes. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 30, n. 2, p. 557-96, Apr 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28275006>>. Acesso em 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/CMR.00064-16

POIREL, L. et al. Rapid Polymyxin NP test for the detection of polymyxin resistance mediated by the mcr-1/mcr-2 genes. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 90, n. 1, p. 7-10, Jan. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29146285>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.012.

POLOTTO, M. et al. Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC Infect. Dis.**, v. 12, p. 176, Aug. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22863113>>. Acesso em 11 out. 2018. DOI: 10.1186/1471-2334-12-176.

POTRON, A.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Emerging broad-spectrum resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: Mechanisms and epidemiology. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 45, n. 6, p. 568-585, Jun. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25857949>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2015.03.001.

POTTER, R.F.; D'SOUZA, A.W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Drug Resist. Updat.**, v. 29, p. 30-46. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27912842>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.drug.2016.09.002.

PRIM, N. et al. Prevalence of colistin resistance in clinical isolates of *Enterobacteriaceae*: A four-year cross-sectional study. **J. Infect.**, v. 75, n. 6, p. 493-498, Dec. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28919348>>. Acesso em: 07 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.jinf.2017.09.008.

QUESADA, A. et al. Detection of plasmid mediated colistin resistance (MCR-1) in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* isolated from poultry and swine in Spain. **Res. Vet. Sci.**, v. 105, p. 134-135, Apr. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27033921>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1016/j.rvsc.2016.02.003.

QUILES, M. G. et al. Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian *Enterobacteriaceae* isolates. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 48, n. 2, p. 174-177, Feb. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466163>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1590/1414-431X20144154.

RAFAILIDIS, P. I.; FALAGAS, M. E. Options for treating carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 27, n. 6, p. 479-483, Dec. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25259809>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1097/QCO.000000000000109.

RAU, R. B. et al. Emergence of mcr-1 Producing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium from Retail Meat: First Detection in Brazil. **Foodborne Pathog. Dis.**, v. 15, n. 1, p. 58-59, Jan. 2018. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29048947>>. Acesso em: 02 ago. 2018. DOI: 10.1089/fpd.2017.2346.

RIBEIRO, P. C. et al. Phenotypic and molecular detection of the bla_{KPC} gene in clinical isolates from inpatients at hospitals in São Luis, MA, Brazil. **BMC Infect. Dis.**, v. 16, n. 1, p. 737. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27927163>>. Acesso em 11 out. 2018.

RIBEIRO, V. B. et al. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v. 18, n. 2, p. 231-232, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24513485>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1016/j.bjid.2013.12.002.

ROCK, C. et al. Frequency of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing and non-KPC-producing *Klebsiella* species contamination of healthcare workers and the environment. **Infect. Control Hosp. Epidemiol.**, v. 35, n. 4, p. 426-429, Apr. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24602950>>. Acesso em: 02 ago. 2018. DOI: 10.1086/675598.

ROSA, J. F. et al. Clonality, outer-membrane proteins profile and efflux pump in KPC-producing *Enterobacter* sp. in Brazil. **BMC Microbiol.**, v. 17, n. 1, p. 69, Mar. 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28302074>>. Acesso em 11 out. 2018. DOI: 10.1186/s12866-017-0970-1.

ROSSI, F. et al. Emergence of colistin resistance in the largest university hospital complex of São Paulo, Brazil, over five years. **Braz J Infect Dis.**, v. 21, n. 1, p. 98-101, Jan-Feb. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867016304421>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.bjid.2016.09.011.

SAMPAIO, J. L. M. Detection of OXA-370, an OXA-48-Related Class D β -Lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 58, n. 6, p. 3566-3567, Jun. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4068428>>. Acesso em: 11 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.02510-13.

SAW, H.T. et al. Inactivation or inhibition of AcrAB-TolC increases resistance of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* to carbapenems. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 6, p. 1510-1519, Jun. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26945714>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkw028.

SEGARRA, C. I. S., et al. Utility of CHROMagar mSuperCARBA for surveillance cultures of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **New Microbes New Infect.**, v. 26, p. 42-48, Nov. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6138884/>>. Acesso em: 10 out. 2018. DOI: 10.1016/j.nmni.2018.08.005.

SILVA, K. E. et al. Coproduction of KPC-2 and IMP-10 in Carbapenem-Resistant *Serratia marcescens* Isolates from an Outbreak in a Brazilian Teaching Hospital. **J. Clin. Microbiol.**, v. 53, n. 7, p. 2324-2328, Jul. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25878341>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1128/JCM.00727-15.

SHI, W. et al. Carbapenem and cefoxitin resistance of *Klebsiella pneumoniae* strains associated with porin ompK36 loss and DHA-1 β -lactamase production. **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 2, p. 435-442, Oct. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24294234>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1590/S1517-83822013000200015.

TADA, T. et al. Emergence of IncX4 plasmids encoding mcr-1 in a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae* in Japan. **Int. J. Infect. Dis.**, v. 75, p. 98-100, Oct. 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30149089>>. Acesso em: 15 out. 2018. DOI: 10.1016/j.ijid.2018.08.011.

TAN, T. Y.; NG, S. Y. Comparison of Etest, Vitek and agar dilution for susceptibility testing of colistin. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 13, n. 5, p. 541-544, May 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17371537>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

TEMKIN, E. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: biology, epidemiology, and management. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 1323, n. 22, p. 22-42, Sep. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25195939>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1111/nyas.12537.

TERZI, H.A. et al. Investigation of OprD Porin Protein Levels in Carbapenem-Resistant *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. **Jundishapur J. Microbiol.**, v. 8, n. 12, p. e25952, Dec. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26865937>>. Acesso em 27 jul. 2018. DOI: 10.5812/jjm.25952.

TIJET, N. et al. Evaluation of the Carba NP test for rapid detection of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 57, n. 9, p. 4578–4580, Sep. 2013. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23817380>>. Acesso em: 26 jul. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00878-13.

TIJET, N.; PATEL, S.; MELANO, R. Detection of carbapenemase activity in *Enterobacteriaceae*: comparison of the carbapenem inactivation method versus the Carba NP test. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 71, n. 1, p. 274-276, Jan. 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26374613>>. Acesso em: 27 jul. 2018. DOI: 10.1093/jac/dkv283.

TOGNIM, M. C. et al. Dissemination of IMP-1 metallo-beta-lactamase-producing *Acinetobacter* species in a Brazilian teaching hospital. **Infect. Control. Hosp. Epidemiol.**, v. 27, n. 7, p. 742-747, Jul. 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16807851>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI:

TOLEMAN, M. A. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 50, n. 5, p. 673-679, Nov. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407123>>. Acesso em: 11 out. 2018.

TSAI, Y. K. et al. *Klebsiella pneumoniae* outer membrane porins OmpK35 and OmpK36 play roles in both antimicrobial resistance and virulence. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 55, n. 4, p. 1485–1493, Apr. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21282452>>. Acesso em 1 ago. 2018. DOI: 10.1128/AAC.01275-10.

VASOO, S. et al. Comparison of the CHROMagar™ KPC, Remel Spectra™ CRE, and a direct ertapenem disk method for the detection of KPC-producing *Enterobacteriaceae* from perirectal swabs. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v. 78, n. 4, p. 356-359, Apr. 2014.

Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24439449>>. Acesso em: 10 out. 2018.

World Health Organization (WHO). **Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014**. Geneva, Switzerland: WHO; 2014. 257 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics**. Geneva, Switzerland: WHO; 2017. 257 p. Disponível em: <http://www.who.int/medicines/publications/WHO-PPL-Short_Summary_25Feb-ET_NM_WHO.pdf>. Acesso em: 01 ago. 2018.

YAINOY, S. et al. Evaluation of the Rapid Polymyxin NP test for detection of colistin susceptibility in Enterobacteriaceae isolated from Thai patients. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, pii: S0732-8893(18)30153-6, May 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889318301536>>. Acesso em: 29 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.05.009.

YONG, D. et al. Characterization of a new metallo- β -lactamase gene, blaNDM-1, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, Dec. 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2786356>>. Acesso em: 13 out. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00774-09.

YU, Z. et al. Antibacterial Mechanisms of Polymyxin and Bacterial Resistance. **BioMed Research International**. v. 2015, Article ID 679109, 11 pages, 2015. Disponível em <<https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/679109/>>. Acesso em 09 out. 2018. DOI: 10.1155/2015/679109.

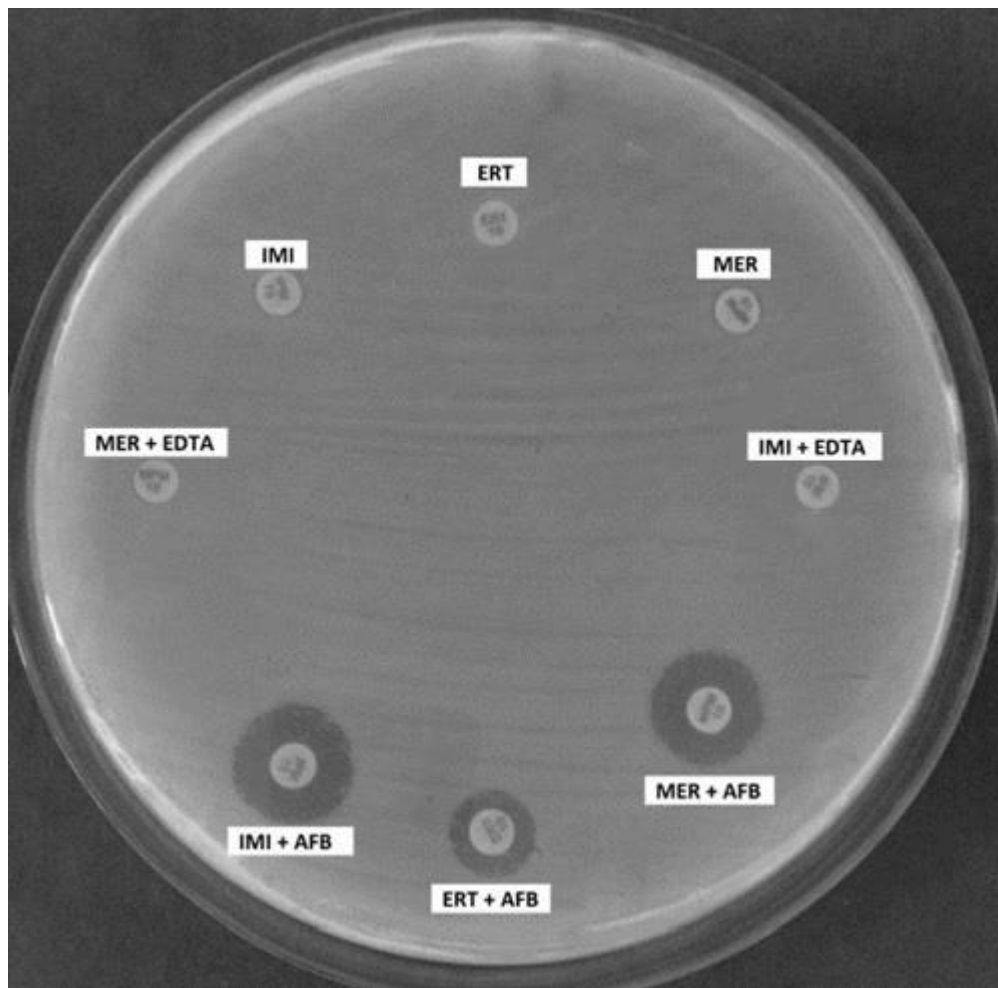
UCHIYAMA, T.; JACOBS, D. M. Modulation of immune response by bacterial lipopolysaccharide (LPS): multifocal effects of LPS-induced suppression of the primary antibody response to a T-dependent antigen. **J. Immunol.**, v. 121, n. 6, p. 2340-2346, Dec. 1978. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/content/121/6/2347.long>> . Acesso em: 01 ago. 2018.

VAN DER ZWALUW, K. et al. The carbapenem inactivation method (CIM), a simple and low-cost alternative for the Carba NP test to assess phenotypic carbapenemase activity in gram-negative rods. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0123690, Mar. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25798828>>. Acesso em 29 jul. 2018. DOI: 10.1371/journal.pone.0123690.

ZENG, K.J. et al. Emergence of the Plasmid-Mediated *mcr-1* Gene in Colistin-Resistant *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 60, n. 6, p. 3862-3863, May 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26976876>>. Acesso em: 01 ago. 2018. DOI: 10.1128/AAC.00345-16.

APÊNDICE A – MÉTODOS FENOTÍPICOS PARA DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E POLIMIXINAS

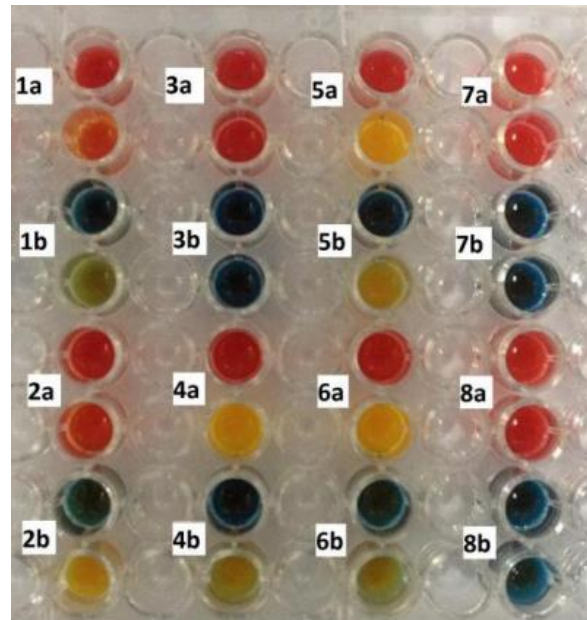
Figura 5 – Difusão de disco com inibidores enzimáticos.



Fonte: Autores.

(ERT) Ertapenem; (IMI) Imipenem; (MER) Meropenem; (EDTA) Ácido etilenodiaminotetracético; (AFB) Ácido fenilborônico.

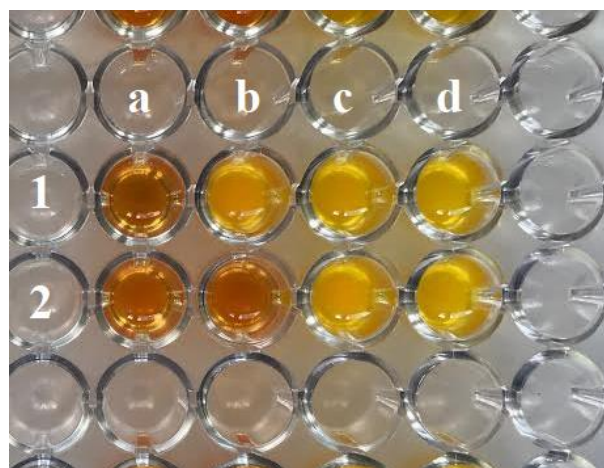
Figura 6 – Testes de Carba-NP e Blue-Carba.



Fonte: Autores.

a: Carba-NP; b: Blue-Carba; 1: Controle positivo OXA (bla_{OXA-48}); 2: Controle positivo MBL (bla_{IMP-1}); 3: Controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); 4: Controle positivo KPC (bla_{KPC-1}); 5 e 6: Isolados clínicos positivos para KPC; 7 e 8: Isolados clínicos negativos para OXA, MBL e KPC.

Figura 7 – Teste de Polimixina NP.



Fonte: Autores.

1: Solução isenta de sulfato de colistina; 2: Solução contendo sulfato de colistina; a: Solução salina; b: Controle negativo (*E. coli* ATCC 25922); c: Controle positivo (isolado clínico *Serratia marcescens*); d: Isolado clínico resistente à colistina.

APÊNDICE B – MÉTODOS MOLECULARES PARA DETECÇÃO DOS GENES
bla_{KPC} E *mcr-1*

Figura 8 – Eletroforese em gel de agarose dos produtos de PCR.



Fonte: Autores.

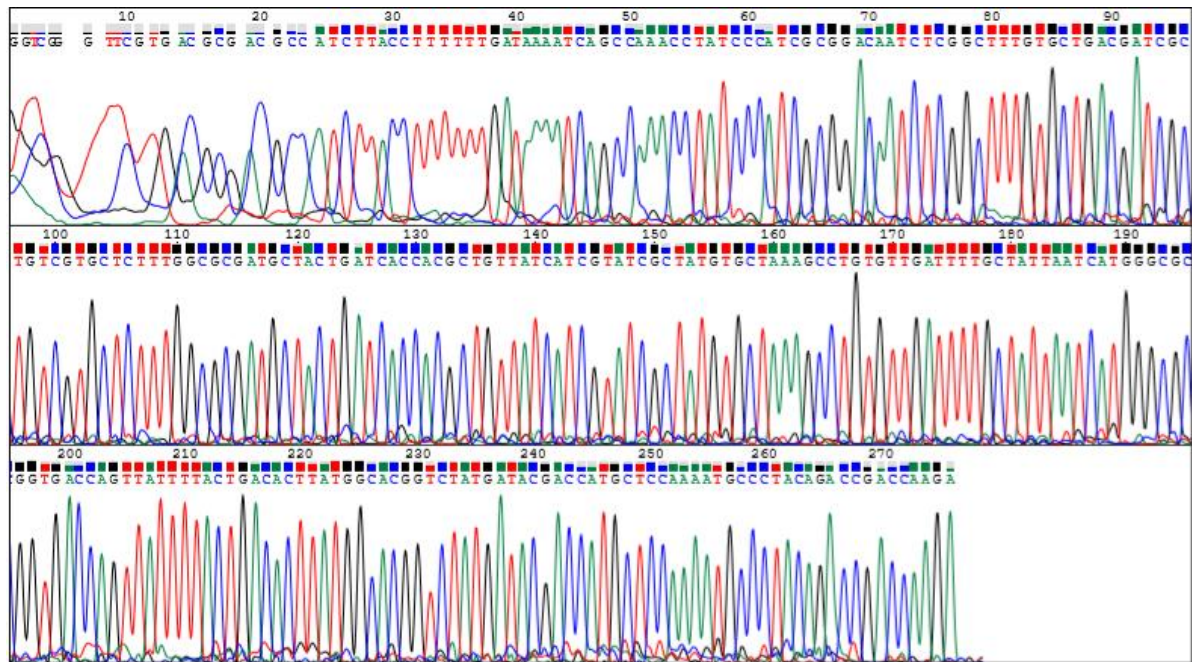
PM: Marcador de peso molecular; mcr-1: Controle positivo para gene *mcr-1* (peso molecular: 309 pb); KPC: Controle positivo para gene *bla_{KPC}* (peso molecular: 795 pb); 1: Isolado clínico *E. coli* *mcr-1*-positivo; 2: Transconjugado *mcr-1*-positivo; 3: Isolado clínico *K. pneumoniae* KPC-positivo; Br: Branco.

Quadro 1 – Sequências de nucleotídeos gerados pelo método Sanger para o isolado clínico de *E. coli* carreador do gene *mcr-1*.

<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
GGT CGG GTT CGT GAC GCG ACG CCA	GAC CGA TCA TAG ACG TGC ATA AGT
TCT TAC CTT TTT TGA TAA AAT CAG	GTC AGT AAA ATA ACT GGT CAC CGC
CCA AAC CTA TCC CAT CGC GGA CAA	GCC CAT GAT TAA TAG CAA AAT CAA
TCT CGG CTT TGT GCT GAC GAT CGC	CAC AGG CTT TAG CAC ATA GCG ATA
TGT CGT GCT CTT TGG CGC GAT GCT	CGA TGA TAA CAG CGT GGT GAT CAG
ACT GAT CAC CAC GCT GTT ATC ATC	TAG CAT CGC GCC AAA GAG CAC GAC
GTA TCG CTA TGT GCT AAA GCC TGT	AGC GAT CGT CAG CAC AAA GCC GAG
GTT GAT TTT GCT ATT AAT CAT GGG	ATT GTC CGC GAT GGG ATA GGT TTG
CGC GGT GAC CAG TTA TTT TAC TGA	GCT GAT TTT ATC AAA AAA GGT AAG
CAC TTA TGG CAC GGT CTA TGA TAC	ATT GGC GGT CGC GGT CAA GAA AAC
GAC CAT GCT CCA AAA TGC CCT ACA	GGC AAC ACT CGC CAC AAG AAC AAA
GAC CGA CCA AGA	CGG ACT GAC CGA

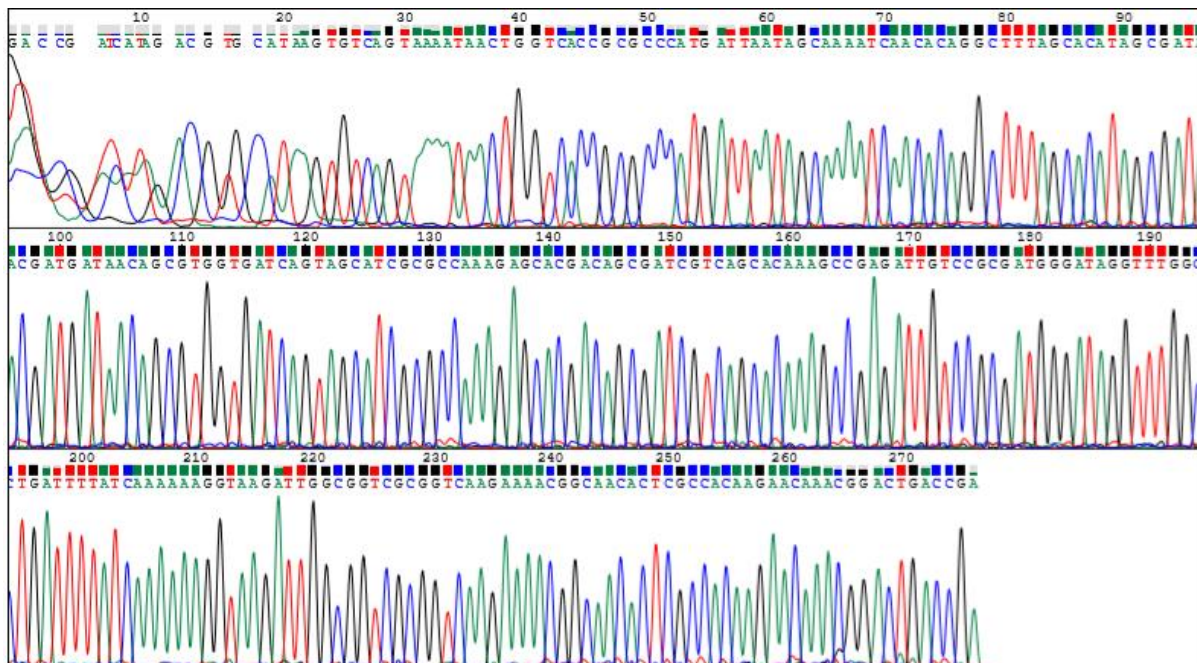
Fonte: Autores.

Figura 9 – Cromatograma correspondente ao *Forward*.



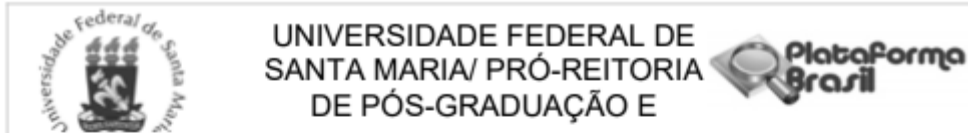
Fonte: *Software Chromas* (Technelysium Ply Ltd, v. 2.6.5).

Figura 10 – Cromatograma correspondente ao *Reverse*.



Fonte: *Software Chromas* (Technelysium Ply Ltd, v. 2.6.5).

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE AOS ANTIBACTERIANOS E DOS MECANISMOS DE RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS ISOLADAS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO DE SANTA MARIA

Pesquisador: Rosmari Horner

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 38850614.4.0000.5346

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 928.497

Data da Relatoria: 12/01/2015

Apresentação do Projeto:

As infecções hospitalares constituem uma importante causa de aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes e contribui diretamente na elevação dos custos assistenciais. Nas últimas décadas, o grande problema têm sido os surtos de infecções hospitalares provocados por microrganismos multirresistentes (MDR) como por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina e *Staphylococcus Coagulase Negativa* (SCoN), família Enterobacteriaceae, principalmente as produtoras de carbapenemases tipo KPC, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter* spp.

O Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM), um hospital terciário, centro de referência em diagnóstico e tratamento na região central do Rio Grande do Sul que recebe pacientes de mais de 30 municípios representa um nosocômio onde este tipo de microrganismo tem probabilidade frequente de isolamento. Torna-se evidente a crescente importância destas bactérias como agentes etiológicos de infecções hospitalares, especialmente pela escassez de esquemas terapêuticos efetivos e pela presença desses microrganismos potencialmente causadores de infecções. Assim, devido à importância no ambiente hospitalar e sua grande capacidade de disseminação, o objetivo deste projeto será efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi

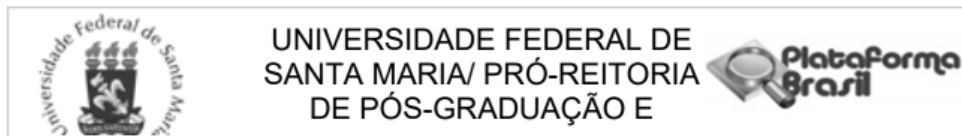
CEP: 97.105-970

UF: RS

Município: SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 928.497

epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria, com a finalidade de contribuir de forma significativa na escolha do tratamento empírico a ser administrado a cada paciente.

Objetivo da Pesquisa:

Efetuar a identificação e avaliação do perfil de sensibilidade frente os antimicrobianos e dos mecanismos de resistência bem como o perfil epidemiológico das bactérias isoladas no Hospital Universitário de Santa Maria.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Descritos de maneira adequada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma: aquele apresentado no projeto não é detalhado;

Orçamento: cfme apresentado no projeto, o custo do Material de Consumo é de cerca de R\$ 34 mil, que seria obtido com a submissão do projeto a editais públicos internos e externos.

Termo de Confidencialidade: Ok;

Autorização Institucional: foi apresentada autorização da GEPE;

Registro no GAP: Ok;

Folha de Rosto: Ok;

Registro na GEPE: foi apresentada;

TCLE: foi solicitado, formalmente a dispensa, o que é adequado ao tipo de projeto.

Recomendações:

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

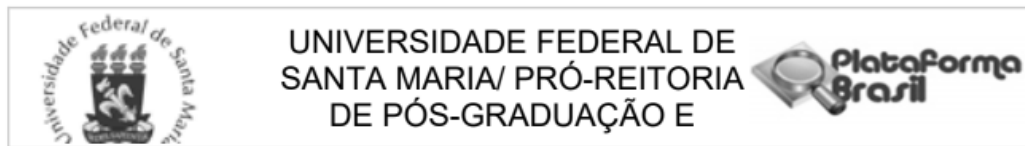
Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970

UF: RS **Município:** SANTA MARIA

Telefone: (55)3220-9362

E-mail: cep.ufsm@gmail.com



Continuação do Parecer: 928.497

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Como a amostra é de material biológico, optou-se pela aprovação do projeto, mesmo que a mesma não tenha sido justificada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SANTA MARIA, 05 de Janeiro de 2015

Assinado por:
CLAUDEMIR DE QUADROS
(Coordenador)

Endereço: Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar
Bairro: Camobi **CEP:** 97.105-970
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-9362 **E-mail:** cep.ufsm@gmail.com