



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL

UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



COLONIZAÇÃO POR ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS  
CARBAPENÊMICOS DO TIPO KPC EM UMA INSTITUIÇÃO  
FEDERAL DE SAÚDE.

JAIME ANTONIO ABRANTES

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018



UNIVERSIDADE  
DO BRASIL  
UFRJ

INSTITUTO DE BIOLOGIA – CEDERJ



COLONIZAÇÃO POR ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS  
CARBAPENÊMICOS DO TIPO KPC EM UMA INSTITUIÇÃO  
FEDERAL DE SAÚDE

JAIME ANTONIO ABRANTES

Monografia apresentada como atividade obrigatória à integralização de créditos para conclusão do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas - Modalidade EAD.  
Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
PÓLO UNIVERSITÁRIO DE DUQUE DE CAXIAS

2018

#### FICHA CATALOGRÁFICA

Abrantes, Jaime Antonio

Colonização por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos do tipo KPC em uma Instituição Federal de Saúde. Polo Duque de Caxias, 2018. 37 f. il: 31 cm

Orientadora: Joseli Maria da Rocha Nogueira

Monografia apresentada à Universidade Federal do Rio de Janeiro para obtenção do grau de Licenciado no Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD. 2018.

Referências bibliográficas: f.33-37

1. Palavras Chaves: carbapenemase, KPC, resistência bacteriana

I. NOGUEIRA, Joseli Maria da Rocha

II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Licenciatura em Ciências Biológicas – Modalidade EAD

III. Colonização por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos do tipo KPC em uma Instituição Federal de Saúde.



Dedico este trabalho à minha esposa Luana Abrantes e filhos, por dividir o marido e pai com o mundo acadêmico em mais uma das muitas empreitadas científicas.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, pelo sopro divino da vida e pela oportunidade dada a cada dia de vivê-la junto às pessoas que amo.

À minha esposa Luana, que me deu incentivo nas horas em que esmorecia e foi minha companheira em tempo integral nesta jornada.

Ao meu filho Victor Hugo, por cada sorriso e abraço sem nenhuma cobrança, mesmo com a ausência de seu pai em alguns momentos e à minha filha Helena que acabou de chegar.

Ao meu pai Walzir, mesmo em memória, por me deixar tesouros valiosos, como caráter, honestidade e responsabilidade.

À minha orientadora e amiga, Dra. Joseli Nogueira, por acreditar no meu potencial e compartilhar esta jornada comigo.

À minha turma do CEDERJ do polo Caxias, com ênfase aos colegas de 2014.2, principalmente aos grandes amigos Wallace, Cláudia e Débora.

Ao meu amigo, padrinho e microbiologista, Dr. Juarez Corrêa, pela inspiração e por me fazer descobrir o meu caminho profissional.

À coordenação do curso de graduação pela estrutura oferecida.

Aos membros banca da Defesa pela colaboração prestada e por aumentar a qualidade do trabalho.

Aos professores e tutores que ministraram todas as disciplinas da graduação.

A todos que de alguma forma participaram ou contribuíram para o sucesso deste trabalho e não foram citados nominalmente neste momento.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	11
1.1. <b>Infecções microbianas e resistência aos antimicrobianos</b> .....	12
1.2. <b>Mecanismos de resistência bacteriana</b> .....	16
1.3. <b>Carbapenemases</b> .....	17
1.3.1. Carbapenemases do tipo KPC.....	18
<b>2. OBJETIVO</b> .....	20
2.1. <b>Objetivo Geral</b> .....	20
2.2. <b>Objetivos Específicos</b> .....	20
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	21
3.1. <b>Rastreamento inicial das amostras</b> .....	21
3.2. <b>Preparo do meio de cultura e inóculo bacteriano</b> .....	22
3.3. <b>Método automatizado de identificação e de sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos</b> .....	23
3.4. <b>Testes fenotípicos</b> .....	24
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	26
4.1. <b>Positividade e perfil bacteriano</b> .....	26
4.2. <b>Testes fenotípicos para a detecção de KPC em enterobactérias</b> .....	28
<b>5. CONCLUSÕES</b> .....	32
<b>6. REFERÊNCIAS</b> .....	33

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b> Microbiota normal humana de acordo com o sítio anatômico.....	12
<b>Figura 2.</b> Diferenças morfológicas entre as paredes celulares bacterianas que conferem diferenciação na coloração de Gram.....	14
<b>Figura 3.</b> Estrutura de antimicrobiano beta-lactâmico e mecanismo de ação hidrolítica de beta-lactamase.....	17
<b>Figura 4.</b> Ação da serina no anel beta- lactâmico.....	19
<b>Figura 5.</b> Meio de cultura cromogênico seletivo ChromKPC® (Plast Labor) .....	22
<b>Figura 6.</b> Placa de Mueller-Hinton e discos de antimicrobianos após inoculação bacteriana .....	23
<b>Figura 7.</b> Sistema de identificação e antibiograma automatizado Vitek 2 (bioMérieux).....	24
<b>Figura 8.</b> Teste de Hodge modificado.....	25
<b>Figura 9.</b> Teste de potencialização com Ácido Fenilborônico.....	25



## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Tabela 1** – Micro-organismos encontrados nas amostras positivas.....27

**Tabela 2** – Positividade dos testes fenotípicos e concordância interteste.....29

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**AFB** - ácido fenilborônico

**ATCC** - American Type Culture Collection

**CIM** - Concentração Inibitória Mínima

**ERC** - Enterobactéria Resistente aos Carbapenêmicos

**ESBL** - *Beta*-lactamase de amplo espectro

**GES** - Guiana extended spectrum

**IMI** - Imipenem hydrolyzing carbapenemase

**KPC** - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

**MRSA** - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina

**NMC** - Não Metalo carbapenemase

**SME** - *Serratia marcescens* enzyme

**SUS** - Sistema Único de Saúde

**UFC** - Unidade Formadora de Colônia

**TSA** - Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

**VRE** - Enterococo Resistente à Vancomicina

## RESUMO

As infecções bacterianas são um grande problema de saúde pública no Brasil e no mundo. Visando a prevenção destas infecções em ambientes hospitalares onde há internação, realiza-se a vigilância da colonização de diversos micro-organismos considerados multirresistentes às diversas classes de antimicrobianos, entre eles as enterobactérias produtoras de carbapenemase do tipo KPC, conhecida comumente apenas como KPC. O objetivo central da pesquisa foi avaliar a prevalência de micro-organismos portadores de resistência do tipo KPC no tempo e espaço estudados. O presente trabalho foi baseado em um estudo transversal onde foram rastreadas 18.985 amostras provenientes do Instituto Nacional de Cardiologia no Rio de Janeiro- RJ. As amostras consideradas positivas em meio de triagem foram identificadas em sistema automatizado a sensibilidade aos carbapenêmicos testada e os caso apresentassem sensibilidade reduzida, seriam conduzidos testes fenotípicos para a detecção de KPC. Foram isoladas 859 cepas de diversos micro-organismos, de onde 378 enterobactérias foram consideradas suspeitas de serem produtoras de KPC e 366 apresentaram positividade para pelo menos um dos testes fenotípicos aplicados. A alta prevalência de KPC em relação ao total de micro-organismos encontrados denota a necessidade de cada vez mais estudos sobre o assunto, ao mesmo tempo da importância epidemiológica que estes dados apresentam, estimulando a prática de prevenção das infecções bacterianas em ambiente hospitalar através da vigilância de colonização.

**Palavras-chave:** Carbapenemase, KPC, Resistência Bacteriana.

## 1. INTRODUÇÃO

As infecções bacterianas, em um âmbito geral, são consideradas um grande problema de saúde pública em todo o mundo e afetam milhões de pessoas. Tais infecções podem causar um alto índice de morbimortalidade e reduzem a qualidade de vida da população (PADOVEZE; FORTALEZA, 2014).

A resistência bacteriana aos antimicrobianos está presente no mundo inteiro através de mecanismos diversos, onde podem estar envolvidas estruturas especiais celulares ou até mesmo genes que conferem a redução da sensibilidade aos fármacos bactericidas e bacteriostáticos, dificultando a terapêutica farmacológica (CAMPOS *et al.*, 2016).

Entre as bactérias Gram-negativas, as enterobactérias formam um grupo especial que pode apresentar diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos que variam desde deficiência de porinas, que são proteínas de membrana, até a produção de beta-lactamases, como por exemplo, as carbapenemases, que conferem resistência bacteriana através da expressão de genes que degradam as estruturas químicas de determinados antimicrobianos. Esta ascensão da resistência está, cada vez mais, preocupando toda a equipe hospitalar na incerteza de sucesso no tratamento destas patologias infectocontagiosas (SHENG *et al.*, 2013).

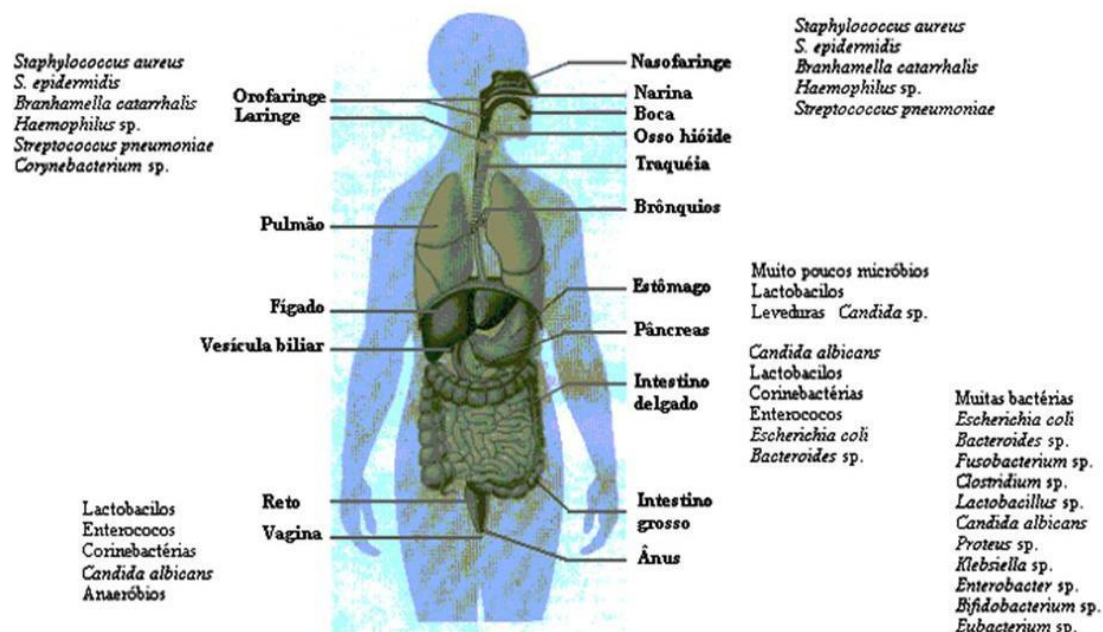
Em ambiente hospitalar, quando os pacientes apresentam alguma baixa de sua imunidade, as bactérias que possuem resistência às principais classes de antimicrobianos podem causar infecções graves e que podem levar ao óbito em pouco tempo. Além da disseminação destas infecções em um curto período, causando os surtos institucionais (RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; SANTOLIN *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016; VIEGAS; SOARES, 2018).

Nesse sentido, o estudo da resistência das enterobactérias aos carbapenêmicos, por meio do gene denominado KPC, é importante porque este tipo de resistência restringe o leque de opções de fármacos normalmente utilizados nas infecções causadas pelos micro-organismos portadores de tal gene e torna-se um problema de saúde pública tanto no Brasil como em muitos outros países (LEE *et al.*, 2016).

## 1.2. Infecções microbianas e resistência bacteriana aos antimicrobianos

Primeiramente, é imprescindível compreender que o homem só está isento de micro-organismos no útero, em condições naturais de gestação, conservando-se intactas as composições placentárias. Essas estruturas, por sua vez, formam uma barreira contra a entrada destes micro-organismos. Quando esta barreira é quebrada, com a ruptura da bolsa, o futuro concepto entra em contato com a microbiota materna e, gradativamente, com micro-organismos de outras pessoas, objetos inanimados e do ambiente. Ao fim da segunda semana de vida, estão microbiologicamente colonizados de forma semelhante aos adultos, sendo esta colonização, conhecida como microbiota normal (FERNANDES, 2000).

A microbiota normal pode ser encontrada tanto na espécie humana como nos outros animais, varia amplamente e está relacionada com fatores como idade, sexo, dieta alimentar e temperatura. Algumas bactérias, conforme demonstrado na **Figura 1**, são encontradas em locais anatômicos particulares, outras estão presentes só ocasionalmente ou somente em alguns momentos da vida do hospedeiro (SILVA, 1999).



**Figura 1.** Microbiota normal humana de acordo com o sítio anatômico. Fonte: (FERNANDES, 2000).

De acordo com Fernandes (FERNANDES, 2000), a microbiota normal tem uma interação altamente específica com os tecidos do hospedeiro, sendo sugestiva de cada sítio. Isso contribui para que haja uma tendência para que a microbiota de indivíduos saudáveis seja semelhante, com pouca variação.

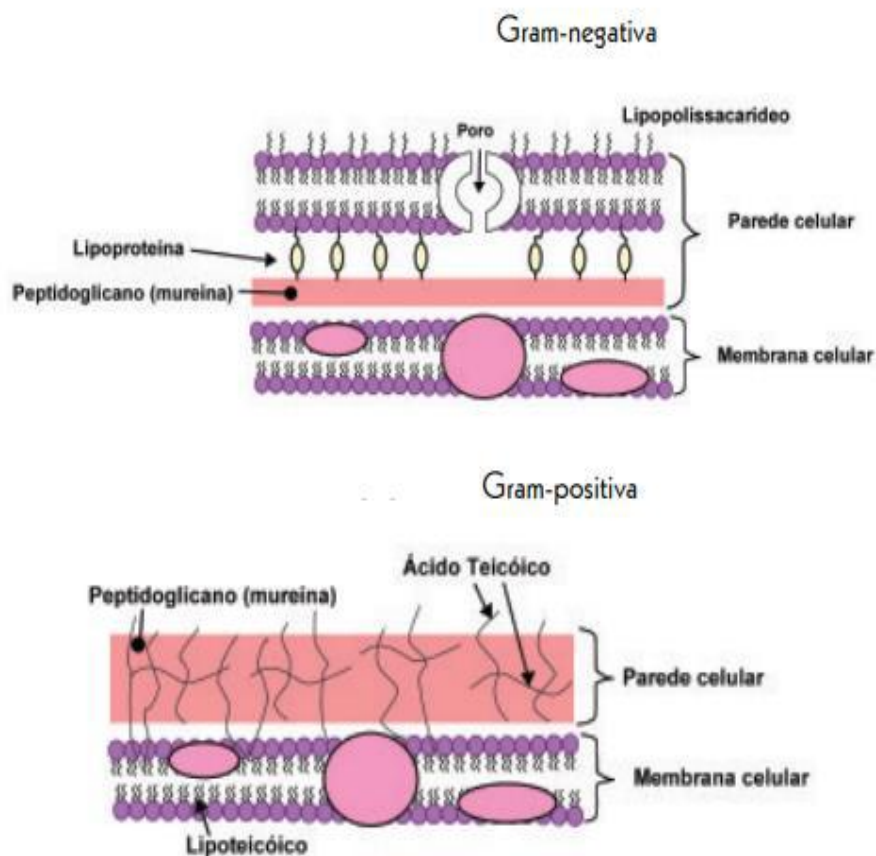
Diferentemente da colonização, a infecção normalmente é causada por bactérias patogênicas, que por suscetibilidade, atacam seus hospedeiros causando variadas doenças. Apesar dessa assertiva, em alguns casos, bactérias patogênicas podem somente colonizar, e por outro lado, pode ocorrer de bactérias da microbiota normal causarem doenças oportunisticamente se estiverem fora de seu *habitat* ou por desequilíbrios, como por exemplo, colonização exacerbada e baixa da imunidade (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009).

Além de bactérias, as infecções podem ser causadas por outros micro-organismos, como vírus, fungos e protozoários, parasitos como os helmintos e até por príons (KONEMAN; CURY, 2001).

Em relação às bactérias, podemos classificá-las em diversas categorias. Porém a classificação mais utilizada é realizada de acordo com a afinidade da sua parede celular a determinados corantes. Segundo Fernandes (FERNANDES, 2000), podemos dividir estes micro-organismos em dois grandes grupos, de acordo com a coloração de Gram (**Figura 2**):

- Gram-positiva: quando existe uma camada espessa de peptidoglicano;
- Gram-negativa: quando esta camada é delgada, mas apresenta uma porção externa de lipopolissacarídeo e lipoproteínas;

A maioria das bactérias pode dividir-se em aproximadamente 20 minutos se estiverem em um meio nutritivo adequado. Durante este processo pode ocorrer alguma alteração em seu genoma, produzindo eventualmente indivíduos com diferentes características em relação à virulência e à resistência a drogas (FERNANDES, 2000).



**Figura 2.** Diferenças morfológicas entre as paredes celulares bacterianas que conferem diferenciação na coloração de Gram.  
Fonte: (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009).

Para o isolamento do micro-organismo causador de uma infecção, é necessário que se faça uma boa coleta, identificação correta do material, transporte em tempo hábil ao setor de microbiologia, processamento do material, isolamento de colônias puras e identificação manual ou automatizada (CLSI, 2016).

O sucesso de todo esse processo depende de toda equipe interdisciplinar envolvido em alguma dessas fases. Alguma falha em uma etapa pode prejudicar o diagnóstico, atrasando o tempo do resultado, o que poderá levar até mesmo ao óbito do paciente (SILVA, 1999).

Entre micro-organismos, que são comumente isolados em infecções estão as principais bactérias Gram-positivas: estafilococos, estreptococos e enterococos. Já nas Gram-negativas observam-se principalmente as enterobactérias e alguns gêneros não fermentadores. (FERNANDES, 2000).

Os *Staphylococcus aureus* são cocos Gram-positivos e podem colonizar narinas, axilas e períneo. São micro-organismos considerados oportunistas, mas têm aumentado sua evidência devido a aquisição de resistência a gama de antimicrobianos, como é o caso MRSA, sigla em inglês para *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

Neste gênero, temos também os estafilococos coagulase negativos, com destaque para o *Staphylococcus epidermidis*, que faz parte da microbiota normal epitelial, mas pode causar infecções graves devido a procedimentos cirúrgicos (SILVA, 1999).

Os *Streptococcus* sp., e os *Enterococcus* sp., também estão entre grandes causadores infecções. Os primeiros implicados em diferentes patologias desde simples tonsilites até sepses fatais, já os *Enterococcus* sp. se destacam por serem bactérias que facilmente adquirirem resistência aos antimicrobianos, como por exemplo, o VRE, sigla em inglês para Enterococo Resistente à Vancomicina (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

As enterobactérias, em sua maioria, fazem parte da microbiota normal gastrointestinal, mas causam sérias complicações se conseguirem se instalar fora de seu habitat natural. Dentro deste grupo têm aparecido várias espécies multirresistentes a antimicrobianos como a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), entre outras (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; SOARES, 2012)

Existem também bactérias Gram-negativas não fermentadoras, tendo como principal representante a *Pseudomonas aeruginosa*, que pode estar presente tanto em organismos vivos, como em superfícies e ambiente pois, aliado ao fato de ser um micro-organismo pouco exigente nutricionalmente (SILVA, 1999), possui vários mecanismos de resistência antimicrobiana (SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015).



## 1.2. Mecanismos de resistência bacteriana

O mecanismo de resistência de uma bactéria depende principalmente do tipo de antibiótico escolhido, sua dose, via de administração, continuidade do tratamento, utilização de grande quantidade e variedade de outros fármacos, o sinergismo e o antagonismo de outros antibióticos. Levando-se também em consideração a resistência intrínseca, natural, e a adquirida a um antibiótico (SILVA, 1999).

De acordo com Rossi e Andreazzi (ROSSI; ANDREAZZI, 2005), um micro-organismo pode ser resistente à um antibiótico através de diversos mecanismos.

Um dos mecanismos mais frequentes é a inativação automática, onde as bactérias produzem enzimas que inativam a droga ou seus efeitos antimicrobianos. Também existe a alteração da permeabilidade da membrana, que dificulta a penetração e conseqüentemente sua ação. O efluxo ativo de antibióticos, outro mecanismo comum, é uma capacidade de expulsar ativamente o antibiótico para fora da célula, não permitindo a concentração ideal para o efeito da droga (SILVA, 1999).

Além destes, há também a alteração do sítio de ligação do antibiótico, onde não ocorre a ligação efetiva do antibiótico com a célula, com perda da atividade antimicrobiana (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

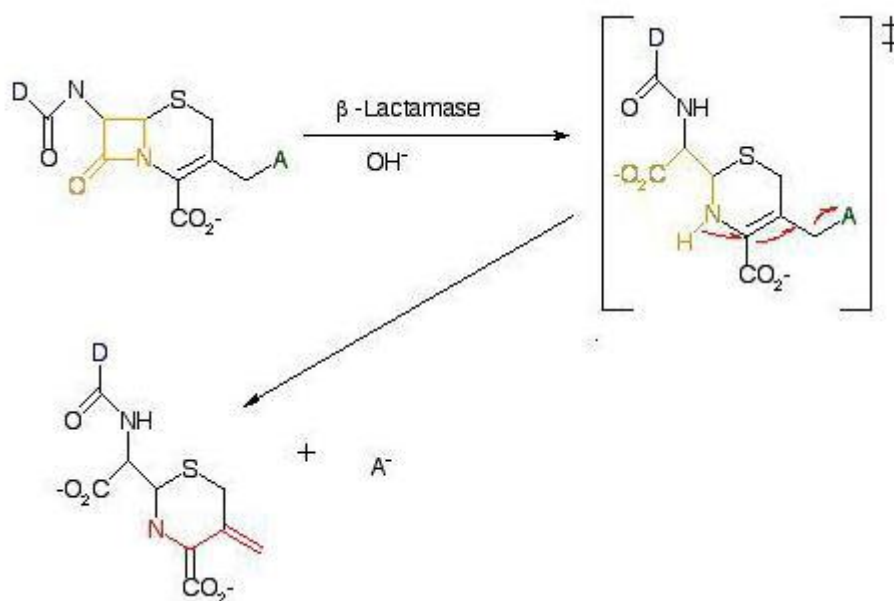
Uma das formas de resistência mais conhecidas é a produção por algumas bactérias, da enzima *Beta*-lactamase, conhecida como ESBL, sigla em inglês para designar *Beta*-lactamase de amplo espectro. Essas bactérias são resistentes aos *beta*-lactâmicos, incluindo as cefalosporinas de terceira e até de quarta geração (SCHECHTER; MARANGONI, 1998).

Tais enzimas podem conferir resistência aos *beta*-lactâmicos carbapenêmicos, como o imipenem, meropenem e ertapenem, sendo chamadas de Carbapenemases (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

### 1.3. Carbapenemases

A produção de enzimas beta-lactamases, tem sido relatada como um importante mecanismo de resistência a antibióticos beta-lactâmicos, hidrolisando o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida (**Figura 3**), perdendo assim, a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana (WILLIAMS, 1999).

Determinados micro-organismos, como as enterobactérias podem apresentar como mecanismo de resistência a produção de beta-lactamase do tipo denominado “carbapenemase” quando há a capacidade enzimática do micro-organismo de hidrolisar um antimicrobiano beta-lactâmico da classe dos carbapenêmicos e outros beta-lactâmicos, reduzindo sua ação bactericida. Sendo assim, uma carbapenemase é um tipo específico de beta-lactamase (BUSH, 2001).



**Figura 3.** Estrutura de antimicrobiano beta-lactâmico e mecanismo de ação hidrolítica de beta-lactamase. Fonte: (ZLOKARNIK *et al.*, 1998).

Foram descritos inúmeros tipos de beta-lactamases, com base em diversos critérios de classificação, porém existem duas classificações que são mais difundidas e utilizadas pela comunidade científica: a classificação de Ambler e a de Bush-Jacoby-Medeiros (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).

A classificação de Ambler foi baseada na sequência de aminoácidos, agrupando em classes de acordo com a estrutura molecular das beta-lactamases. Neste estudo foram propostas quatro classes distintas: A, B, C e D (AMBLER, 1980).

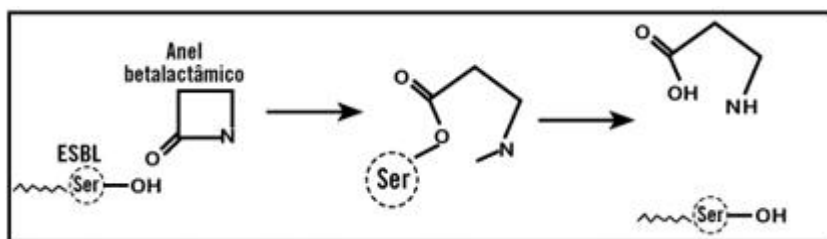
Outra classificação foi baseada na correlação entre o substrato e propriedades inibitórias da enzima, feita por Bush (1989). Anos depois esta classificação foi atualizada, com a introdução de características estruturais junto aos critérios anteriores, se dividindo em quatro grupos: 1, 2, 3, 4.

Embora sejam quatro grupos, o grupo 2 se subdivide em oito outros grupos e o grupo 3 em mais outros três (SHENG *et al.*, 2013). Para o estudo das carbapenemases consideramos as duas classificações, pois se complementam.

Entre as enterobactérias produtoras de carbapenemases a *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* estão entre as mais relatadas em relação à presença deste mecanismo (SHENG *et al.*, 2013). Enterobactérias do gênero *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Providencia* e *Proteus* são reportadas, porém com menos frequência (AMJAD *et al.*, 2011; BIRGY *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Carbapenemases do tipo KPC

Na Classe A de Ambler estão alocadas as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), que são inibidas pelo ácido clavulânico. Conferem resistência a várias cefalosporinas de amplo espectro e estão no grupo 2 de Bush-Jacoby-Medeiros. Já as carbapenemases deste grupo, pertencem ao subgrupo 2f, são serino-carbapenemases, pois tem uma serina como seu principal resíduo catalítico, localizada no seu sítio ativo (**Figura 4**), e contém os tipos KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), NMC (Não Metallo carbapenemase), IMI (Imipenem hydrolyzing carbapenemase), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e GES (Guiana extended spectrum) (AMBLER, 1980; BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995).



**Figura 4.** Ação da serina no anel beta-lactâmico  
 Fonte: (Livermore, 1995).

Os vários tipos de carbapenemases de classe A, começaram a ser notificados a partir de 1982 (SME), 1984 (IMI), 1990 (NMC), 1996 (KPC) e 2000 (GES) (QUEENAN; BUSH, 2007). As GES, carbapenemases da classe A, hidrolisam os beta-lactâmicos, podendo aumentar esta capacidade hidrolítica dependendo do seu subtipo GES-1/2/3/4/5 (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; SMITH *et al.*, 2012).

A *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase* (KPC) é uma enzima produzida por bactérias gram-negativas (enterobactérias), que confere resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos: meropenem, ertapenem e imipenem, classe amplamente utilizada no tratamento de infecções envolvendo este gênero bacteriano. Esta resistência é uma das principais causas de falha terapêutica, principalmente em ambiente hospitalar (SOUZA *et al.*, 2016; VERA-LEIVA *et al.*, 2017)

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

- Avaliar a prevalência dos micro-organismos com a resistência do tipo KPC em uma Instituição Pública Terciária de Saúde localizada na cidade do Rio de Janeiro.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Descrever as espécies bacterianas envolvidas na colonização hospitalar;
- Levantar dados de colonização por micro-organismos portadores de carbapenemases do tipo KPC;
- Analisar o perfil de resistência das enterobactérias, assim como os testes fenotípicos para diagnóstico de micro-organismos portadores de carbapenemases do tipo KPC;

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho compõe-se inicialmente de pesquisa bibliográfica, que fundamentou a base teórica necessária para a realização do estudo, com dados recentes retirados das bases BVS, Scielo e PubMed, utilizando as palavras-chave carbapenemase, KPC, enterobactérias e antimicrobianos. Foram selecionados artigos publicados de 2013 a 2017 visando embasar a pesquisa com dados atuais sobre o assunto, além da literatura de base para a contextualização introdutória.

Logo em seguida foi realizado um estudo observacional, descritivo, do tipo transversal com os experimentos realizados no Instituto Nacional de Cardiologia, no Laboratório de Análises Clínicas, de onde foram retiradas as cepas bacterianas da coleção interna do mesmo. Tais experimentos foram realizados desde janeiro de 2016 até dezembro de 2017, totalizando um período de dois anos.

A coleta e o processamento laboratorial das amostras foram realizado junto à rotina hospitalar, não necessitando da autorização do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição em questão. Os dados foram obtidos a partir do banco de dados OBSERVA, do sistema Vitek2 (bioMérieux).

No período da pesquisa foram analisados 18.985 swabs provenientes de sítio retal, a fim de pesquisar não só enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, mas também enterobactérias produtoras de beta-lactamase de espectro estendido (ESBL), *Acinetobacter* sp. e *Pseudomonas* sp. (bacilos Gram-negativos não fermentadores de glicose) e Enterococos Resistentes à Vancomicina (VRE). Todos esses microorganismos são epidemiologicamente importantes para a vigilância de ambientes hospitalares, principalmente àqueles com procedimentos de alta complexidade como cirurgias cardiovasculares por exemplo (OLIVEIRA; BETTCHER, 2010; LEE *et al.*, 2016; PEROZO-MENA *et al.*, 2016)

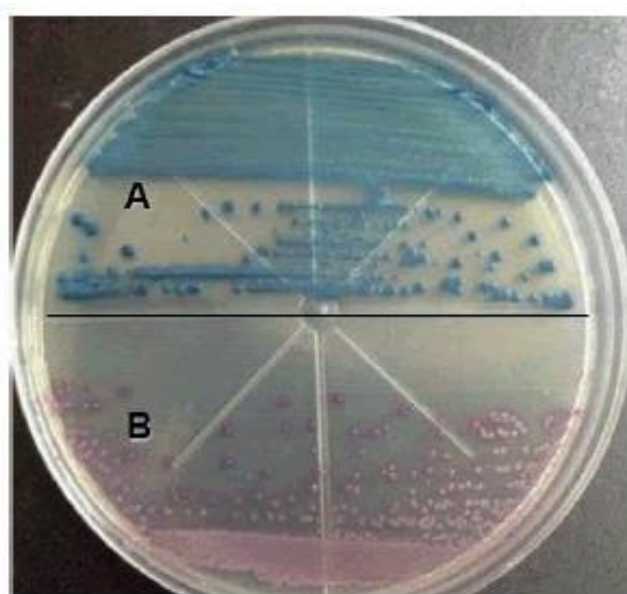
#### 3.1. Rastreamento inicial das amostras

As cepas utilizadas no estudo foram isoladas de amostra clínica de colonização de topografia retal, através de swab. Os swab, com o meio de transporte Stuart,

contendo a amostra clínica foi inicialmente inoculado em uma placa de meio de cultura cromogênico seletivo denominada ChromKPC® (Plast Labor) e colocada em estufa bacteriológica por 16 a 20 horas em temperatura de 35±2°C (ANVISA, 2013; CLSI, 2016).

Durante o período de incubação, eram realizadas leituras periódicas para a verificação de algum crescimento bacteriano de colônias suspeitas (**Figura 5**). Caso fossem encontradas colônias sugestivas do perfil desejado, as mesmas seriam selecionadas e testes posteriores de perfil de resistência e testes fenotípicos realizados (ANVISA, 2013).

Após os testes, as cepas testadas foram congeladas para posteriores testes genéticos, a fim de relacionar os perfis de resistência e os achados nos testes fenotípicos ao padrão-ouro, que é o ensaio molecular (VALI *et al.*, 2014; VAN DER ZEE *et al.*, 2014).



**Figura 5.** Meio de cultura cromogênico seletivo ChromKPC® (Plast Labor). A) *Klebsiella pneumoniae*; B) *Escherichia coli*.  
Fonte: (ERRECALDE *et al.*, 2012).

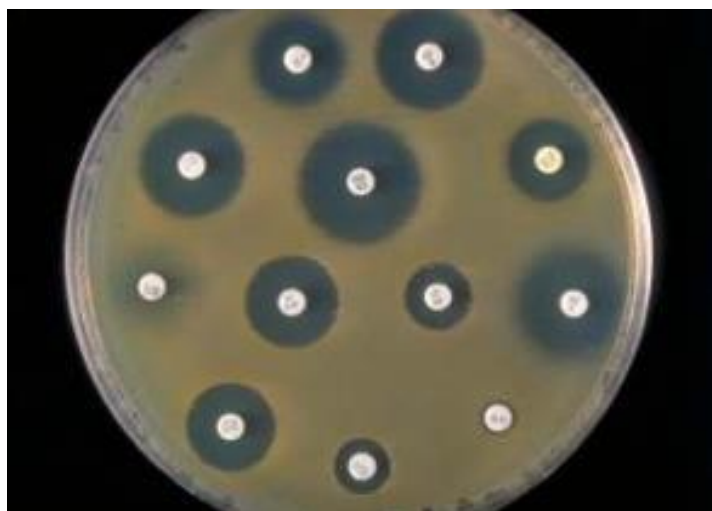
### 3.2. Preparo do meio de cultura e inóculo bacteriano

Como meio de cultura, o ágar Mueller Hinton® foi utilizado para a realização do Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos (TSA) por difusão em disco e também pode

ser utilizado para um teste de difusão em gradiente de concentração (MUELLER; HINTON, 1941; OPLUSTIL, 2010).

Na realização do Teste de Sensibilidade a Antimicrobianos (TSA) (**Figura 6**), foram utilizados diversos antimicrobianos com base no guideline mais utilizado, o americano Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2016).

O preparo do inóculo bacteriano foi baseado na escala de turbidez de Mc Farland (tubo 0,5), que se correlaciona a grandeza de aproximadamente  $10^8$  UFC (Unidades Formadoras de Colônia) por mL (NOGUEIRA; MIGUEL, 2009; CLSI, 2016). Foi utilizada a escala para determinar os padrões de referência de turbidez por comparação visual e, e nos caso de dúvida foi utilizado o turbidímetro (OPLUSTIL, 2010).



**Figura 6.** Placa de Mueller-Hinton e discos de antimicrobianos após inoculação bacteriana  
Fonte: (JJ Farmer, 1978) - CDC Public Health Image Library

### **3.3. Método automatizado de identificação e de sensibilidade bacteriana aos antimicrobianos.**

O método automatizado de identificação bacteriana e antibiograma utilizado foi o sistema Vitek 2 (bioMérieux) (**Figura 7**), que ainda liberam alerta de presença de carbapenemases com alta sensibilidade, porém com baixa especificidade, pois se baseiam na concentração inibitória mínima (WOODFORD *et al.*, 2010).



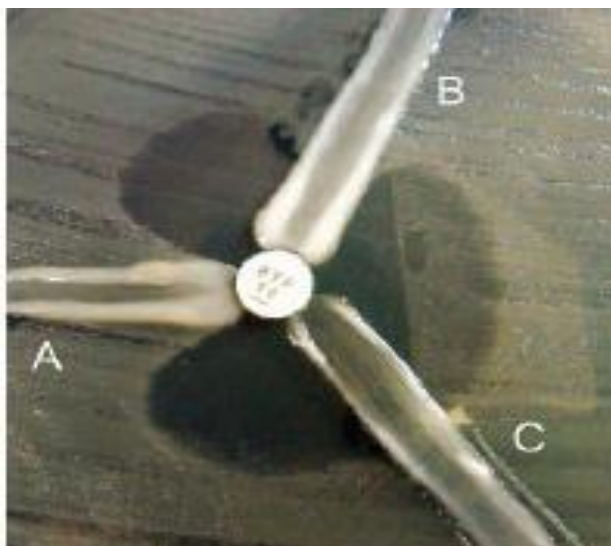


**Figura 7.** Sistema de identificação e antibiograma automatizado Vitek 2 (bioMérieux)  
Fonte: (bioMérieux, 2016).

### 3.4. Testes fenotípicos

O Teste de Hodge Modificado tem como princípio detectar o efeito hidrolítico das carbapenemasas por distorção do halo da cepa padrão ATCC *Escherichia coli* 25922. (AMJAD *et al.*, 2011; RAMANA *et al.*, 2013; AZIMI *et al.*, 2014). Através da suspensão direta de uma colônia recente da cepa *E. coli* ATCC 25922 correspondente ao tubo 0,5 da escala de McFarland e na diluição de inóculo a 1:10, foi realizado o TSA por disco-difusão semeando este material pela técnica de induto contínuo em três direções em uma placa de ágar Mueller-Hinton.

No centro desta placa foi colocado um disco de ertapenem de 10 µg. Inoculou-se perpendicularmente ao disco de carbapenêmico já depositado, uma estria da cepa suspeita e logo após foi incubada em estufa bacteriológica a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 16 a 20 horas (CLSI, 2016).



**Figura 8.** Teste de Hodge modificado. A) teste positivo; B) teste inconclusivo; C) Teste negativo.  
Fonte: (CURY *et al.*, 2012).

Já no teste de potencialização, os discos de carbapenêmicos, meropenem e imipenem, impregnados com ácido fenilborônico (AFB) e sem ele foram utilizados para a detecção fenotípica de carbapenemases de classe A, do tipo KPC (PASTERAN *et al.*, 2009; GARBATI; AL GODHAIR, 2013; VALI *et al.*, 2014).

Um teste é considerado positivo quando há diferença de  $\geq 5$  mm entre os discos de imipenem e meropenem puros em relação aos mesmos discos com ácido fenilborônico, como podemos observar na **Figura 9** (ANVISA, 2013).



**Figura 9.** Teste de potencialização com Ácido Fenilborônico. Da esquerda para a direita situam-se os carbapenêmicos puros e impregnados com o AFB, proporcionando aumento do halo de inibição bacteriana.  
Fonte: (SAMPAIO, 2013).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Positividade e perfil bacteriano

Das 18.985 amostras testadas, 859 (4,5%) foram consideradas positivas com pelo menos um dos micro-organismos pesquisados. Tal achado se apresentou inferior a literatura onde a prevalência de colonização é superior a 10% e média de aproximadamente 15%, fato tal que é influenciado por diversos fatores como o tipo de instituição, o nível de complexidade e os tipos de procedimentos realizados. Em hospitais onde os procedimentos são complexos, tende-se a aumentar os cuidados com relação às infecções devido ao custo de todo o processo e impacto na Saúde (SOARES, 2012; PADOVEZE; FORTALEZA, 2014; RODRÍGUEZ *et al.*, 2014; PEROZO-MENA *et al.*, 2016; SANTOLIN *et al.*, 2017; VIEGAS; SOARES, 2018).

Dentre as amostras positivas, em 729 (85%) foram detectados bacilos Gram-negativos, enquanto somente em 130 amostras (15%) foram encontrados cocos Gram-positivos, a alta prevalência do primeiro morfotipo é um importante motivo pelo qual o mesmo é tão pesquisado nos estudos de colonização e infecção (GÓMEZ-GAMBOA *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016). Entretanto não podemos esquecer da importância dos enteropatógenos Gram-positivos, principalmente o VRE (OLIVEIRA; BETTCHER, 2010).

Em nossa pesquisa foram encontradas duas espécies de enterococos, o *Enterococcus faecium* em 81 amostras (9,4%) e o *Enterococcus faecalis* em 49 amostras (5,6%). Na **Tabela 1** podemos observar a distribuição da positividade entre os tipos bacterianos encontrados, assim como a sua frequência relativa entre os positivos.

Outro grupo importante, agora dentro do grupo dos bacilos Gram-negativos, são os não fermentadores de glicose, que ocupam uma parcela significativa dentro da positividade total, com 283 amostras (33%). Destes não fermentadores, foram detectados 148 (17,3%) de *Acinetobacter baumannii* e 135 (15,7%) de *Pseudomonas aeruginosa*, ambos resistentes aos carbapenêmicos imipenem e meropenem. O ertapenem não foi testado pois estas duas espécies apresentam resistência intrínseca a este antimicrobiano (CLSI, 2016).

Os não fermentadores são também responsáveis pela colonização hospitalar e principalmente da contaminação ambiental dos setores diversos de uma instituição onde haja internações de pacientes (AHMED-BENTLEY *et al.*, 2013; SANTOS; NOGUEIRA; MENDONÇA, 2015; SANTOLIN *et al.*, 2017).

**Tabela 1 - Micro-organismos encontrados nas amostras positivas**

Micro-organismo isolado	Frequência absoluta (n)	Frequência relativa (%)
<i>Enterococcus faecium</i>	81	9,4
<i>Enterococcus faecalis</i>	49	5,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	135	15,7
<i>Acinetobacter baumannii</i>	148	17,3
Enterobactérias ESBL (não ERC)	68	8,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	326	38
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0,1
<i>Escherichia coli</i>	1	0,1
<i>Enterobacter</i> sp.	34	4,0
<i>Providencia</i> sp.	3	0,3
<i>Serratia marcescens</i>	13	1,5

Entre as enterobactérias, foram pesquisadas além de resistência aos carbapenêmicos imipenem, ertapenem e meropenem, também foram testados diversos antimicrobianos para realizar a triagem de ESBL, como a amoxicilina+clavulanato, cefotaxima, ceftazidima e cefepime.

Algumas enterobactérias foram sensíveis a todos os carbapenêmicos, porém resistentes aos outros antimicrobianos testados e com teste de disco-aproximação positivo entre a amoxicilina+clavulanato e as cefalosporinas (cefotaxima, ceftazidima e cefepime) (CLSI, 2016).

De acordo com a **Tabela 1**, foram detectadas 68 amostras (8%) de enterobactérias produtoras de ESBL não-ERC (Enterobactérias não Resistentes aos Carbapenêmicos), ou seja, sem nenhum mecanismo de carbapenemase (ANVISA, 2013; SHENG *et al.*, 2013).

Na triagem pelo meio de cultura seletivo e indicador e através dos discos de Carbapenêmicos no TSA, foram detectadas 378 amostras (44%) de enterobactérias resistentes a pelo menos um dos três carbapenêmicos testados.

Das 378 ERCs, 326 (86%) foram identificadas como *Klebsiella pneumoniae*. Outras enterobactérias também podem expressar a Carbapenemase do tipo KPC, como apresentados em diversos estudos e dependendo das características epidemiológicas, podem estar presentes em maior ou menor número (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; GÓMEZ-GAMBOA *et al.*, 2014; CARRILHO, 2014; BORGES *et al.*, 2015; CLSI, 2016; VIEGAS; SOARES, 2018).

Em nosso estudo foram encontradas 52 (14%) cepas não sensíveis pelo menos a um carbapenêmico e não pertencentes à espécie *Klebsiella pneumoniae*. As cepas mais prevalentes foram *Enterobacter* sp. com 34 amostras (9%) e *Serratia marcescens* com 13 espécimes (3,5%), formando assim 90% das ERCs não-*Klebsiella pneumoniae*. Tais resultados são corroborados por estudos de prevalência pelo mundo (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; GÓMEZ-GAMBOA *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2017).

Os outros gêneros e espécies encontradas somam 5 espécimes (10%), com 3 *Providencia* sp. (6%), 1 *Escherichia coli* (2%) e 1 *Citrobacter* sp. (2%). Estas enterobactérias, assim como qualquer outra pode apresentar uma carbapenemase, assim como outros mecanismos que induzam alguma resistência aos Carbapenêmicos. Tais mecanismos podem ser alguma outra beta-lactamase ou perda de porinas (ANVISA, 2013).

#### **4.2 Testes fenotípicos para detecção de KPC em enterobactérias**

Todas as 378 cepas que apresentaram resistência aos carbapenêmicos foram utilizadas em testes fenotípicos para a detecção de carbapenemase do tipo KPC. Os

testes realizados foram o de potencialização com Ácido Fenilborônico (AFB) e o Teste de Hodge Modificado (THM) e os resultados podem ser observados na **Tabela 2**

**Tabela 2 – Positividade dos testes fenotípicos e concordância interteste.**

Cepa	ERC	AFB+(%)	THM(%)	Concordância %
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	326	306 (94)	320 (98)	95
<i>Enterobacter</i> sp.	34	22 (65)	29 (85)	76
<i>Serratia marcescens</i>	13	13 (100)	13 (100)	100
<i>Providencia</i> sp.	3	1 (33)	3 (100)	33
<i>Escherichia coli</i>	1	1 (100)	1 (100)	100
<i>Citrobacter freundii</i>	1	0 (0)	1 (100)	0

ERC= Enterobactéria Resistente aos Carbapenêmicos; AFB= Ácido Fenilborônico (Teste positivo); THM= Teste de Hodge Modificado.

De acordo com os achados, podemos observar uma positividade alta em ambos os testes (94 e 98%), assim como a concordância (95%) para *Klebsiella pneumoniae*. Esta espécie é a principal produtora de KPC e está relacionada nos estudos como micro-organismo com alta confiabilidade para detecção fenotípica deste mecanismo (DIENSTMANN *et al.*, 2010; MEYER; PICOLI, 2011; ANVISA, 2013; ECHAVARRÍA *et al.*, 2017; VERA-LEIVA *et al.*, 2017).

Segundo a ANVISA (2013), *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* são as únicas espécies padronizadas para o teste de potencialização pelo o AFB, com uma especificidade de 99%, ou seja, 99% dos resultados positivos neste teste são confirmados pela biologia molecular como produtora de Carbapenemase do tipo KPC.

As outras enterobactérias, principalmente as componentes do grupo CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia*, *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*) que apresentam normalmente Beta-lactamases do tipo AmpC. E quando há o advento de uma perda considerável de porinas, estes micro-organismos podem apresentar uma sensibilidade diminuída à carbapenêmicos, que por sua vez deriva um falso positivo no teste fenotípico com AFB (AMJAD *et al.*, 2011; BORBA *et al.*, 2012; ANVISA, 2013).

Em nosso estudo, os gêneros *Enterobacter*, *Providencia* e *Citrobacter* apresentaram baixa positividade para o teste com o AFB e ao mesmo tempo um pouco maior para o THM. Tal fato é explicado pela alta sensibilidade do THM e ao mesmo

tempo baixa especificidade, pois o segundo é inespecífico para KPC, indicando somente uma possível carbapenemase, que pode ser de outro tipo (AMJAD *et al.*, 2011; CLSI, 2016).

Já as cepas de *Serratia marcescens* embora tenham apresentado 100% de positividade nos dois testes, é preciso conduzir experimentos adicionais para confirmação da presença de KPC, pois como dito anteriormente esta espécie faz parte do grupo CESP e apresenta particularidades na condução de diagnóstico laboratorial. Entretanto é importante a triagem desta espécie, pois a mesma está relacionada a infecções sistêmicas (DEL PELOSO; BARROS; SANTOS, 2010; ANVISA, 2013).

Algumas cepas encontradas, apesar de importância epidemiológica e/ou biológica, não podem ser consideradas estatisticamente significativas neste estudo por conta de uma baixa prevalência. Mesmo com algum teste fenotípico positivo, ou até mesmo os dois, não podemos afirmar que se trata de uma KPC. Há a necessidade de testes adicionais, por conta dos raros achados em relação ao total da amostra, como é o caso de *Escherichia coli*, *Providencia* sp. e *Citrobacter* sp., que juntos apresentam apenas 1,3% do total de ERCs (PAGANO; GAUVREAU, 2000).

As enterobactérias do tipo KPC estão disseminadas no ambiente hospitalar no mundo inteiro, seja em colonização como em infecções de diversos sítios. É rotina das instituições de saúde rastrear a colonização de micro-organismos que apresentam resistência às classes diversas de antimicrobianos, principalmente o tipo KPC que confere às bactérias grande resistência aos carbapenêmicos (BORGES *et al.*, 2015; CAMPOS *et al.*, 2016; ECHAVARRÍA *et al.*, 2017)

Neste estudo podemos perceber a prevalência destes micro-organismos e a partir daí é possível definir estratégias para minimizar o número de infecções causadas por eles. A prevalência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de Carbapenemase do tipo KPC é compatível com grandes estudos realizados no mundo inteiro (BORBA *et al.*, 2012; BORGES *et al.*, 2015; ECHAVARRÍA *et al.*, 2017; VERA-LEIVA *et al.*, 2017).

A realização de testes fenotípicos foi de grande utilidade, pois apresentou resultados consistentes neste e em outros estudos e é uma opção rápida e de baixo custo para os países em desenvolvimento como o Brasil, pois a biologia molecular apesar de

padrão-ouro não é ainda a realidade das instituições de saúde de todo o país (ANVISA, 2013; CARRILHO, 2014; SHAHCHERAGHI, 2014; VALI *et al.*, 2014).

As cepas testadas no trabalho foram congeladas e serão posteriormente enviadas para a realização de testes genéticos e as informações serão acrescentadas em uma futura oportunidade de publicação científica. E por último e ainda mais contundente, é essencial a comunicação do Ensino e da Pesquisa com as instituições de Saúde, para que o conhecimento e as novas técnicas consigam penetrar onde realmente possam ser aplicadas de forma a melhorar a saúde da população e do ambiente.



## 5. CONCLUSÕES

- Neste estudo foi observado que a bactéria *Klebsiella pneumoniae* destacou-se como o micro-organismo mais prevalente na colonização hospitalar entre os portadores de resistência aos carbapenêmicos, com perfil fenotípico de KPC para quase a totalidade das cepas;
- A metodologia empregada possibilitou a aquisição de informações necessárias para descrever as principais espécies bacterianas envolvidas em processo de colonização além das enterobactérias produtoras de KPC, como por exemplo os bacilos Gram-negativos não fermentadores e os cocos Gram-positivos (*Enterococcus*). Tais informações proporcionam a montagem de um perfil bacteriano importante para estudos de prevenção de infecções;
- Os testes fenotípicos utilizados em conjunto aumentam a possibilidade da correta detecção do mecanismo de resistência do tipo KPC em enterobactérias, no entanto só estão padronizados para as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*;
- A detecção fenotípica de carbapenemases do tipo KPC é de extrema importância para a realidade de uma instituição pública de assistência, pois apresentou neste estudo, sensibilidade e especificidade satisfatórias;

## 6. REFERÊNCIAS

AHMED-BENTLEY, J. et al. Gram-Negative Bacteria That Produce Carbapenemases Causing Death Attributed to Recent Foreign Hospitalization. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3085–3091, 2013.

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321–331, 1980.

AMJAD, A. *et al.* Modified Hodge test: A simple and effective test for detection of carbapenemase production. **Iranian journal of microbiology**, v. 3, n. 4, p. 189, 2011.

ANVISA. **Nota técnica nº 01/2013**. Plano de contingência dos mecanismos de resistência nas infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por enterobactérias, 2013.

AZIMI, L. *et al.* First report of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Iran. **GMS Hygiene & Infection Control**, v. 9, n. 1, 2014.

BIRGY, A. *et al.* Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated -Lactamases in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1295–1302, 2012.

BORBA, C. M. A. *et al.* Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC). **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 6, p. 427–433, 2012.

BORGES, F. K. *et al.* Perfil dos pacientes colonizados por enterobactérias produtoras de KPC em hospital terciário de Porto Alegre, Brasil. **Clinical and Biomedical Research**, v. 35, n. 1, p. 20–26, 2015.

BUSH, K. Classification of beta-lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 264–270, 1989.

BUSH, K. New -Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 7, p. 1085–1089, 2001.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995.

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

CARRILHO, C. M. D. M. **Caracterização clínica, microbiológica e molecular e tratamento de infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos**. Tese

(Doutorado em Doenças Infecciosas e Parasitárias) - Faculdade de Medicina, University of São Paulo, São Paulo, 2014.

CLSI. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: twentieth informational supplement.** Wayne, Pa.: Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), 2016.

CURY, A. P. *et al.* The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Clinics**, São Paulo, v. 67, n. 12, p. 1427-1431, 2012.

DEL PELOSO, P. F.; BARROS, M. F. L.; SANTOS, F. A. Sepsis por *Serratia marcescens* KPC. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 5, p. 365–367, 2010.

DIENSTMANN, R. *et al.* Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em Enterobacteriaceae de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 1, p. 23–27, 2010.

ERRECALDE, L. *et al.* CHROMagar KPC. Comparación con el método propuesto por los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, EE.UU.) para el estudio de portación rectal y evaluación de falsos positivos. **Revista argentina microbiología**, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, v. 44, n. 2, p. 89-93, 2012.

ECHAVARRÍA, G. L. *et al.* Colonización por *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasa tipo KPC en un hospital universitario. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 77, n. 2, p. 105–110, 2017.

FERNANDES, A. T. **Infecção hospitalar e suas interfaces na área da saúde.** São Paulo: Editora Atheneu, 2000.

GARBATI, M. A.; AL GODHAIR, A. I. The growing resistance of *Klebsiella pneumoniae*; the need to expand our antibiogram: case report and review of the literature. **African Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 8–10, 2013.

GÓMEZ-GAMBOA, L. *et al.* Carbapenemasas KPC en Enterobacteriaceae aisladas en un Hospital de Maracaibo, Venezuela. **Kasmera**, v. 42, n. 2, p. 89–104, 2014.

KONEMAN, E. W.; CURY, A. E. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido.** Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

LEE, C.-R. *et al.* Global Dissemination of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, Genetic Context, Treatment Options, and Detection Methods. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p. 24–31, 2011.

MUELLER, J. H.; HINTON, J. A Protein-Free Medium for Primary Isolation of the Gonococcus and Meningococcus. **Experimental Biology and Medicine**, v. 48, n. 1, p. 330–333, 1941.

NOGUEIRA, J. M. R.; MIGUEL, L. F. S. Bacteriologia. In: AMENDOEIRA, M. R. R. (Ed.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde Vol. 4**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009.

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

OLIVEIRA, A. C.; BETTCHER, L. Aspectos epidemiológicos da ocorrência do *Enterococcus* resistente a Vancomicina. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 44, n. 3, p. 725–731, 2010.

OPLUSTIL, C. P. **Procedimentos básicos em microbiologia clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

PADOVEZE, M. C.; FORTALEZA, C. M. C. B. Healthcare-associated infections: challenges to public health in Brazil. **Revista de Saúde Pública**, v. 48, n. 6, p. 995–1001, 2014.

PAGANO, M.; GAUVREAU, K. **Principles of biostatistics**. 2nd ed ed. Pacific Grove, CA: Duxbury, 2000.

PASTERAN, F. *et al.* Sensitive Screening Tests for Suspected Class A Carbapenemase Production in Species of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 6, p. 1631–1639, 2009.

PEROZO-MENA, A. *et al.* Presencia de carbapenemasa tipo KCP en aislados clínicos de *K. pneumoniae* de pacientes de unidades de cuidados intensivos. **Kasmera**, v. 44, n. 1, p. 44–52, 2016.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.

RAMANA, K. *et al.* Modified Hodge test: A useful and the low-cost phenotypic method for detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* members. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v. 4, n. 2, p. 346, 2013.

RODRÍGUEZ, E. C. *et al.* Diseminación de *Klebsiella pneumoniae* productoras de KPC-3 en hospitales de Bogotá durante un periodo de tres años. **Biomédica**, v. 34, p. 224–231, 2014.

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

SANTOLIN, C. *et al.* Colonización rectal por bacilos gram negativos multirresistentes: importancia de la detección precoz durante la hospitalización. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 51, n. 4, p. 675–680, 2017.

SANTOS, I. A. L.; NOGUEIRA, J. M. R.; MENDONÇA, F. C. R. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 47, p. 5–12, 2015.

SCHECHTER, M.; MARANGONI, D. V. **Doenças infecciosas conduta diagnóstica e terapêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1998.

SHAHCHERAGHI, F. Phenotypic and Genetic Characterization of Carbapenemase and ESBLs Producing Gram-negative Bacteria (GNB) Isolated from Patients with Cystic Fibrosis in Tehran Hospitals. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2014.

SHENG, W.-H. *et al.* Distribution of Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases, AmpC  $\beta$ -Lactamases, and Carbapenemases among Enterobacteriaceae Isolates Causing Intra-Abdominal Infections in the Asia-Pacific Region: Results of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 2981–2988, 2013.

SILVA, D. M. *et al.* Prevalence and antimicrobial susceptibility profile of ESKAPE pathogens from the Federal District, Brazil. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 53, n. 4, p. 240–245, 2017.

SILVA, C. H. P. M. E. **Bacteriologia: um texto ilustrado**. Teresópolis: Eventos, 1999.

SMITH, C. A. *et al.* Structural Basis for Progression toward the Carbapenemase Activity in the GES Family of  $\beta$ -Lactamases. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 48, p. 19512–19515, 5 2012.

SOARES, V. M. Emergência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) em um hospital terciário. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 48, n. 4, p. 251–253, 2012.

SOUZA, S. C. S. *et al.* Fatores associados à mortalidade de pacientes com enterobactéria resistente aos carbapenêmicos. **Medicina (Ribeirão Preto)**, v. 49, n. 2, p. 109–115, 2016.

VALI, P. *et al.* Phenotypic and Genetic Characterization of Carbapenemase and ESBLs Producing Gram-negative Bacteria (GNB) Isolated from Patients with Cystic Fibrosis in Tehran Hospitals. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, 2014.

VAN DER ZEE, A. *et al.* Multi-centre evaluation of real-time multiplex PCR for detection of carbapenemase genes OXA-48, VIM, IMP, NDM and KPC. **BMC infectious diseases**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.

VERA-LEIVA, A. *et al.* KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemasa, principal carbapenemasa en enterobacterias. **Revista chilena de infectología**, v. 34, n. 5, p. 476–484, 2017.

VIEGAS, D. M.; SOARES, V. M. Prevalence of carbapenemase in Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems isolated in a tertiary referral hospital. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 54, n. 2, 2018.

WILLIAMS, J. D.  $\beta$ -Lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 12, p. S3–S7, 1999.

WOODFORD, N. *et al.* Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan Automated Systems for Detection and Inference of Mechanisms Responsible for Carbapenem Resistance in Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 8, p. 2999–3002, 2010.

ZLOKARNIK, G. *et al.* Quantitation of transcription and clonal selection of single living cells with beta-lactamase as reporter. **Science (New York, N.Y.)**, v. 279, n. 5347, p. 84–88, 1998.