

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

CLÁUDIA CASTELO BRANCO ARTIAGA KOBAYASHI

Fenótipos de β -lactamases e fatores de risco associados com
Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase em um hospital
de referência estadual em urgência e emergência de Goiânia, Goiás

Goiânia
2013

CLÁUDIA CASTELO BRANCO ARTIAGA KOBAYASHI

**Fenótipos de β -lactamases e fatores de risco associados com
Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase em um hospital
de referência estadual em urgência e emergência de Goiânia, Goiás**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Patologia, Clínica e Tratamento das Doenças Humanas

Orientador (a): Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta

Coorientador (a): Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

**Goiânia
2013**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
da Universidade Federal de Goiás**

**BANCA EXAMINADORA
Tese de Doutorado**

Aluno(a): Cláudia Castelo Branco Artiaga Kobayashi

Orientador(a): Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta

Coorientador(a): Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

Membros:

1. Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira

2. Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal

3. Prof. Dr. Geraldo Batista Melo

4. Prof. Dr. Evandro Leão Ribeiro

5. Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Dantas Porfirio Borges André

Suplentes:

1. Prof^a. Dr^a. Lúcia Kioko Hasimoto e Souza

2 Prof. Dr. Marco Tulio Antonio Garcia-Zapata

Data: 12/04/2013

Dedico este trabalho

A minha linda

família: meu marido Márcio Zaccaro Kobayashi e meus filhos Patrick Artiaga Kobayashi e Mickael Artiaga Kobayashi, minhas maiores bênçãos recebidas. Perdoe-me pelos momentos ausentes. Obrigada pela paciência em esperar por todos os momentos e pela ternura sempre... Amo muito vocês. Ao meu adorado pai Gilmar de Souza Artiaga (in memoriam) que está sempre comigo, deixando-me metade do seu coração. À minha mãe Antonietta Castelo Branco Artiaga e irmã Petra Ruskaya Castelo Branco Artiaga pelo companheirismo e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, em nome da Coordenadora Prof^a. Dr^a. Marília Dalva Turchi, por estes longos e prazerosos momentos de convivência e aprendizagem.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás em nome do coordenador Prof. Dr. Paulo César B. Veiga Jardim pela oportunidade de continuação de minha vida acadêmica e profissional.

A toda a equipe do Laboratório de Microbiologia Médica, Ambiental e Biotecnologia/LAMMAB do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP/UFG) os meus sinceros agradecimentos.

Aos alunos do curso de Biotecnologia da UFG pelo grande auxílio na limpeza dos materiais, importante etapa para o sucesso das nossas pesquisas. Obrigada pela dedicação.

Ao Serviço de Arquivo Médico e Estatístico - SAME do Hospital de Urgências de Goiânia por toda a colaboração e gentileza oferecida para este estudo.

A todos os professores desse curso pelas oportunidades de compartilhar, ensinar e aprender.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Fabiana Cristina Pimenta, dedico esta dissertação pela confiança.

Aos meus queridos e inesquecíveis professores meu coorientador Prof. Dr. José Daniel Gonçalves Vieira e Prof. Dr. Geraldo Sadoyama Leal pela compreensão e paciência. Jamais esquecerei a atenção dispensada. Obrigada pela amizade, simplicidade e sinceridade. Meu grande carinho e respeito sempre.

Ao colega de todas as horas, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, obrigada pelo apoio, auxílio e solidariedade.

Especialmente, a minha querida amiga e batalhadora Aysha Jussara Ivonilde Carrim (Ju), agradeço sempre pela força, companheirismo, tempos dispensados e pela sincera amizade. Obrigada por tudo. Sempre a terei no meu coração, onde nossa amizade será cultivada com muito amor.

Ao hospital de referência estadual em urgência e emergência de Goiânia, Hospital de Urgências de Goiânia, em nome do diretor Dr. Ciro Ricardo Pires de Castro, onde exerço minha profissão como biomédica há 14 anos, minha gratidão pelo respeito e reconhecimento.

Ao Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Urgências de Goiânia, onde executo prazerosamente o meu trabalho, em nome da coordenadora Dr^a. Darcy Arruda Vilela, agradeço pelo apoio, confiança e por fazer parte da minha segunda família.

A prestativa e atual equipe de microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital de Urgências de Goiânia pela competência, profissionalismo, confiança e admiração. Obrigada por serem excelentes colaboradoras, colegas e companheiras.

Àquele, a quem sempre confiei, que nos guia com carinho, mostrando-nos as oportunidades de paciência, sabedoria, espera e o valor de uma realidade. Eu lhe sou grata por mais este merecimento.

Definitivo

*Definitivo, como tudo o que é simples.
Nessa dor não advém das coisas vividas,
mas das coisas que foram senhadas e não se cumpriram.
Sofremos por quê? Porque automaticamente esquecemos
o que foi desfrutado e passamos a sofrer pelas nossas projeções
irrealizadas, por todas as cidades que gostaríamos de ter conhecido ao lado
de nosso amor e não conhecemos, por todos os filhos que gostaríamos de ter
tido junto e não tivemos, por todos os shows e livros e silêncios que
gostaríamos de ter compartilhado,
e não compartilhamos.
Por todos os beijos cancelados, pela eternidade.
Sofremos não porque nosso trabalho é desgastante e paga pouco, mas por todas
as horas livres que deixamos de ter para ir ao cinema, para conversar com um
amigo, para nadar, para namorar.
Sofremos não porque nossa mãe é impaciente conosco, mas por todos os
momentos em que poderíamos estar confidenciando a ela nossas mais profundas
angústias se ela estivesse interessada em nos compreender.
Sofremos não porque nosso time perdeu, mas pela euforia sufocada.
Sofremos não porque envelhecemos, mas porque o futuro está sendo
confiscado de nós, impedindo assim que nossas aventuras nos aconteçam,
todas aquelas com as quais sonhamos e nunca chegamos a experimentar.
Por que sofremos tanto por amor?
O certo seria a gente não sofrer, apenas agradecer por termos conhecido uma
pessoa tão bacana, que gerou em nós um sentimento intenso e que nos fez
companhia por um tempo razoável, um tempo feliz.
Como aliviar a dor de que não foi vivido? A resposta é simples como um
verso:
Se iludindo menos e vivendo mais !!!
A cada dia que vive, mais me convence de que o desperdício da vida
está no amor que não damos, nas forças que não usamos,
na prudência egoísta que nada arrisca, e que, esquivando-se do
sofrimento, perdemos também a felicidade.
A dor é inevitável.
O sofrimento é opcional...*

[Carlos Drummond de Andrade]

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xi
LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xiii
RESUMO	xiv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS	3
1.2 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO DAS β -LACTAMASES ASSOCIADAS COM RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS	6
1.3 EPIDEMIOLOGIA DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASE	11
1.4 FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO OU INFECÇÃO POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASE	14
1.5 RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ISOLADOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORES DE CARBAPENEMASE	16
1.6 DETECÇÃO DE ISOLADOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORES DE CARBAPENEMASE E DA ENZIMA KPC	18
1.7 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA INFECÇÕES POR <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE KPC	21
1.8 MEDIDAS DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ISOLADOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORES DE KPC	27
2 OBJETIVOS	31
3 MÉTODOS	32
3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO	32
3.2 DEZENHO DO ESTUDO	33
3.2.1 Pacientes	33
3.2.2 Critério de elegibilidade	35
3.2.3 Definição de variáveis	35
3.3. PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS	36

3.3.1 Espécimes clínicos e isolados bacterianos	36
3.3.2 Testes fenotípicos para a detecção das enzimas β-lactamases	38
3.3.2.1 Detecção de serina-carbapenemase (Hodge modificado)	38
3.3.2.2 Detecção fenotípica da enzima KPC	39
3.3.2.3 Detecção de β -lactamases de espectro estendido	40
3.3.2.4 Detecção de metalo- β -lactamase (M β L)	42
3.3.2.5 Detecção de β -lactamase AmpC induzível	43
3.3.2.6 Detecção da enzima AmpC plasmidial	44
3.3.3 Prova de suscetibilidade aos antimicrobianos	45
3.3.3.1 Teste de suscetibilidade por disco-difusão	45
3.3.3.2 Teste de suscetibilidade por diluição para polimixina B e tigeciclina (método de microdiluição em caldo)	46
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
3.5 ASPECTOS ÉTICOS	49
4 PUBLICAÇÕES	50
Artigo 1 - Carbapenem-resistant <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates harboring multiple phenotypes of β -lactamases from urgency and emergency hospital of Goiânia, Goiás – Brazil	51
Artigo 2 - <i>In vitro</i> activity of polymyxin B and tigecycline against carbapenemase- producing <i>Klebsiella pneumoniae</i> from hospitalized patients at a tertiary-care hospital	76
Artigo 3 - Risk factors associated with carbapenemase-producing <i>Klebsiella</i> <i>pneumoniae</i> infection or colonization in hospitalized patients	91
5 RESULTADOS E CONCLUSÕES	111
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	113
REFERÊNCIAS	116
GLOSSÁRIO	145
ANEXOS	146
ANEXO 1a – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	147
ANEXO 1b – Informações quanto à formulação do termo de consentimento livre e esclarecido	148

ANEXO 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos	149
ANEXO 3 – Levantamento de características associadas aos pacientes dos grupos caso e controle	170
ANEXO 4 – Metodologias de preparo das soluções reagentes	172

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição geográfica mundial de KPC	5
Figura 2 – Mapa de localização do hospital investigado	32
Figura 3 – Esquema de obtenção da população, a partir da detecção de isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de carbapenemase	34
Figura 4 – Estudo dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes aos carbapenêmicos	37
Figura 5 – Teste de Hodge modificado positivo	39
Figura 6 – Detecção específica de KPC com os substratos meropenem e ceftazidima com e sem ácido borônico	40
Figura 7 – Teste de triagem positiva para ESBL	41
Figura 8 – Confirmação da presença da enzima ESBL com ceftazidima com e sem ácido clavulânico	42
Figura 9 – Triagem positiva para metalo- β -lactamase em isolado de <i>K. pneumoniae</i>	43
Figura 10 – Teste de antagonismo entre ceftazidima e imipenem	44
Figura 11 – Detecção de AmpC plasmidial	45
Figura 12 – Diâmetros dos halos de inibição obtidos por método de disco-difusão	46
Figura 13 – Leitura das CIMs frente polimixina B	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Esquema de classificação modificada de β -lactamases (de acordo com Ambler, 1980) 7

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ampC</i>	gene estrutural que codifica para a produção de β -lactamases cromossômicas
AmpC	enzima β -lactamase (cefalosporinase)
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
<i>blaKPC</i>	gene estrutural que codifica para a produção de β -lactamases tipo KPC
CIAT	Teste de antagonismo ceftazidima-imipenem
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ERC	<i>Enterobacteriaceae</i> resistente aos carbapenêmicos
ESBL (s)	<i>Extended Spectrum β-lactamase (s)</i>
GES	<i>Guiana extended spectrum</i>
IMI	<i>Imipenem hydrolysing β-lactamase</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae carbapenemase</i>
KPRC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> resistente aos carbapenêmicos
MβL	Metallo- β -lactamase ou metaloenzimas
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
NmcA	<i>Not metallo enzyme carbapenemase</i>
OXA	<i>Oxacilinas hydrolysing</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
Sme	<i>Serratia marcescens enzyme</i>
THM	Teste de Hodge modificado
UCI (s)	Unidade de Cuidados Intermediários Adulto
UTI (s)	Unidade (s) de Terapia Intensiva

RESUMO

Klebsiella pneumoniae produtora de carbapenemase é uma enterobactéria, comumente associada à resistência aos múltiplos antimicrobianos. A presença deste fenótipo de multirresistência consiste em um importante desafio do ponto de vista epidemiológico, quanto ao manejo terapêutico e ao controle de infecção. Um estudo observacional retrospectivo foi conduzido em um hospital público terciário em Goiânia, Go, Brasil, no período entre 2006 e 2011, para investigar os fenótipos de carbapenemases, a atividade *in vitro* da tigeciclina e polimixina B e determinar os fatores de risco associados à infecção ou colonização por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. A presença de serina carbapenemase foi detectada por meio do teste de Hodge modificado e disco combinado com ácido borônico; metalo- β -lactamases – M β L por sinergismo de disco duplo com imipenem e EDTA; β -lactamases de espectro estendido – ESBL, através do disco combinado com cefotaxima e ceftazidima com e sem ácido clavulânico e AmpC plasmidial por disco combinado com ácido borônico e cefoxitina. A atividade *in vitro* da tigeciclina e polimixina B foi avaliada através do método de microdiluição em caldo e dos antimicrobianos não β -lactâmicos por disco-difusão e sistema semiautomatizado. A associação entre fatores de risco independentes e colonização ou infecção foi determinada através de regressão logística. A resistência aos carbapenêmicos foi verificada em 8,06% do total de *K. pneumoniae* e a atividade de carbapenemase em 6,90%. Dentre os isolados produtores de carbapenemases, 77,78% foram considerados β -lactamase tipo KPC, 37,04% demonstraram a produção simultânea de AmpC plasmidial e KPC, 29,63% associação com M β L ou ESBL e KPC, 11,11% M β L/ESBL/KPC e 7,41% M β L/ESBL/KPC/AmpC plasmidial. Altas taxas de resistência aos antimicrobianos não β -lactâmicos foram observadas, variando de 61,10% - 74,70% para fluoroquinolonas e 52,10% - 54,30% para aminoglicosídeos. A polimixina B apresentou baixa atividade *in vitro* contra estes isolados (35,70%) e a tigeciclina foi o único antimicrobiano que inibiu 75,0% dos mesmos. Os fatores de risco independentes para *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foram a internação prévia prolongada ($p = 0,031$), uso prévio de carbapenêmicos ($p = 0,041$) e exposição a mais de três antimicrobianos ($p = 0,034$). A detecção de isolados produtores de

carbapenemase multirresistentes e o conhecimento dos diferentes mecanismos de resistência podem resultar em significativo impacto nos resultados terapêuticos e estratégias de controle de infecção e prevenção.

Palavras-chave: *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase, fenótipos β -lactamases, tigeciclina, polimixina B, fatores de risco.

ABSTRACT

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* is an enterobacteria, commonly associated with resistance to multiple antibiotics. The presence of multidrug resistance phenotype is an important challenge in the epidemiological point of view, regarding the therapeutic management and infection control. A retrospective observational study was conducted in a tertiary-care hospital in Goiânia, Brazil, in the period of 2006 to 2011 to investigate the carbapenemases phenotypes, the *in vitro* activity of tigecycline and polymyxin B and determine the risk factors associated with infection or colonization by carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. The serine-carbapenemase production was detected by modified Hodge test and combined disk test with boronic acid; metallo- β -lactamases - M β L by double-disk synergy test with imipenem and EDTA; extended spectrum β -lactamases - ESBL by combined disk with cefotaxime and ceftazidime with and without clavulanate, and plasmid AmpC type by combined disk with boronic acid and ceftoxitin. The *in vitro* activity of tigecycline and polymyxin B against the enzyme-producing isolates was assessed using the broth microdilution method and for not β -lactam antimicrobials by disk diffusion and semi-automated system. The association between independent risk factors and colonization or infection by carbapenemase-producing *K. pneumoniae* was determined by logistic regression analysis. The carbapenem resistance was found in 8.06% of all isolates *K. pneumoniae* and 6.90% were carbapenemase producers. Among carbapenemases producers isolates, 77.78% were KPC type β -lactamase, 37.04% demonstrated the simultaneous production of plasmid AmpC β -lactamase and KPC, 29.63% associated with M β L or ESBL and KPC, 11.11% M β L/ESBL/KPC and 7.41% M β L/ESBL/KPC/plasmid AmpC. High percentages of not β -lactams antimicrobial resistance were observed, ranging from 61.10% - 74.70% to fluoroquinolones and 52.10% - 54.30% to aminoglycosides. Polymyxin B showed limited activity against the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* (35.70%) and tigecycline was the only antimicrobial that inhibited 75.0% of these multidrug-resistant strains. The independent risk factors for *K. pneumoniae* carbapenemase producers were prolonged hospitalization ($p = 0.031$), previous use of carbapenems ($p = 0.041$) and exposure to more than three antimicrobials ($p = 0.034$). The detection of multidrug-

resistant carbapenemase-producing isolates and the knowledge of different resistance mechanisms can result in significant impact on the treatment outcomes and strategies for infection control and prevention.

Keywords: Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamases phenotypes, tigecycline, polymyxin B, risk factors.

1 INTRODUÇÃO

A pressão seletiva devido ao uso de antimicrobianos, particularmente carbapenêmicos, como opção terapêutica eficaz para infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtores de β -lactamases Amp C (cefalosporinase) e β -lactamase de espectro estendido (*extended spectrum β lactamases* - (ESBL) (WOODFORD et al., 2008), tem causado o desenvolvimento de resistência *in vivo* e a emergência de isolados multi e panresistentes que degradam estes fármacos (MEYER; PICOLI, 2011; RODRÍGUEZ-AVIAL et al., 2012). Este fenômeno tem sido associado, principalmente com mecanismos de resistência enzimática, devido à excessiva produção de β -lactamases AmpC ou ESBLs associada com modificações da permeabilidade de membrana externa (perda de porinas) (DOUMITH et al., 2009) e sistema de efluxo (POIREL et al., 2004). O desenvolvimento de resistência também se deve à aquisição de β -lactamases que hidrolisam os carbapenêmicos, denominadas carbapenemases (CARMELI et al., 2010; NORDMAN; CUZON; NAAS, 2009; RODRÍGUEZ-AVIAL et al., 2012).

A emergência de *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos (ERC), mundialmente, é considerada um importante desafio clínico para as infecções relacionadas à assistência à saúde (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Esta propagação global tem sido atribuída à disseminação de uma cepa dominante de *Klebsiella pneumoniae* produtora da enzima serina β -lactamase, denominada *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* (KPC) (MATHERS et al., 2011).

As KPCs são enzimas serina carbapenemases da classe A de Ambler mais comuns entre os membros de *Enterobacteriaceae*, particularmente *K. pneumoniae* (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Estas espécies bacterianas produtoras de KPC têm sido cada vez mais isoladas no mundo, sendo consideradas uma preocupação emergente de saúde pública na Europa (ZAGORIANOU et al., 2012), China (MENDES et al., 2008), Américas Central e do Sul (VILLEGAS et al., 2006).

Enterobacteriaceae produtoras de KPC têm sido envolvidas em infecções nosocomiais, especialmente sistêmicas e associadas a dispositivos invasivos (CARMELI et al., 2010; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Dentre estas, merece

destaque as infecções urinárias relacionadas ao uso de cateteres (GUPTA et al., 2011). Estas infecções podem implicar em esforços adicionais de controle de infecção, terapêuticos e de diagnósticos, que se tornam onerosos para os estabelecimentos assistenciais de saúde (MUNOZ-PRICE, 2010). Estes micro-organismos apresentam prevalência crescente e uma grande habilidade de disseminação de genes de resistência, responsáveis por vários surtos (BRATU et al, 2005b; NORDMAN, CUZON; NAAS; 2009; QUEENAN; BUSH, 2007; VILLEGAS et al, 2006; WOODFORD et al, 2004).

As KPCs são, em sua maioria, mediadas por plasmídeos ou elementos genéticos móveis, responsáveis pela transferência horizontal de determinantes de resistência entre isolados de *K. pneumoniae* (QI et al., 2010; RICHTER et al., 2012). Estas estruturas genéticas têm contribuído tanto para o aumento da resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* como a várias outras classes de antimicrobianos, incluindo não β -lactâmicos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, devido à existência de múltiplos mecanismos de resistência associados com plasmídeos contendo KPC (CHMELNITSKY et al., 2009; SCHWABER et al., 2008; SCHWABER; CARMELI, 2008; BRINCK et al., 2012). Essa multi ou panresistência tem limitado as opções para o tratamento de infecções graves causadas por isolados produtores de carbapenemase, dificultando os processos de controle de infecção e terapêuticos (DUGAL; FERNANDES, 2011; LEE et al, 2009; MONTEIRO et al 2009).

O aumento da incidência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase tem causado um grande problema quanto ao diagnóstico e tratamento das infecções por estes patógenos. A maioria das carbapenemases presentes nestes micro-organismos confere suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos, podendo ser fenotipicamente identificados como sensíveis. Além disso, existe a possibilidade de coexistência de outras β -lactamases, o que resulta em falsa detecção (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; RODRÍGUEZ-AVIAL et al., 2012). Desse modo, é importante a detecção das enzimas carbapenemases para evitar a ampla disseminação desta espécie de *Enterobacteriaceae* panresistente, que pode se propagar no estabelecimento hospitalar, a partir de pacientes colonizados (SAMRA et al., 2007). Uma cuidadosa análise do perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos em

Enterobacteriaceae e a identificação laboratorial dos isolados produtores de KPC são fundamentais para o controle epidemiológico, para a adequação da terapia antimicrobiana e medidas de controle de infecção e de disseminação deste mecanismo de resistência (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; TSAKRIS et al., 2009).

1.1 ASPECTOS HISTÓRICOS

O termo *Klebsiella pneumoniae carbapenemase* surgiu após isolamento inicial em *K. pneumoniae* na Carolina do Norte, Estados Unidos da América, em 1996, com a identificação do gene *blaKPC-1*, limitando-se a este país até 2005 (BRADFORD et al., 2004; YIGIT et al., 2001). Posteriormente, outras variantes da enzima (KPC-3 a 7) foram detectadas em outros estados dos Estados Unidos da América e em Porto Rico, além de outros países, envolvendo distintas espécies bacterianas (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter* spp.) (CAI et al, 2008; LEAVIT et al, 2007; MIRIAGOU et al, 2003; MONTEIRO et al, 2009; ROBLEDO et al., 2007; 2010; TIBBETTS et al, 2008; WOODFORD et al, 2004; YIGIT et al, 2003).

Onze variantes subsequentes do gene *blaKPC* foram nomeadas em ordem numérica sequencial de KPC-2 a KPC-11 (CHEN et al., 2012). Atualmente, considerando-se que o gene *blaKPC-1*, em análise de re-sequenciamento, é idêntico ao *blaKPC-2* (YIGIT et al., 2001, errata, 2008), a designação de KPC-1 não é mais utilizada, compreendendo estas enzimas dez variantes genéticas diferentes (KPC-2 a KPC-11), com KPC-2 e KPC-3 mais frequentemente reportadas (KITCHEL et al., 2009; NORDMAN; CUZON; NAAS, 2009; WOLTER et al., 2009; YIGIT et al., 2001).

Após o primeiro isolamento nos Estados Unidos da América, a rápida disseminação intercontinental de clones epidêmicos de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC, principalmente *K. pneumoniae*, a partir de hospitais da cidade de Nova York foi relatada (BRATU et al., 2005a; b; c; DESHPANDE et al, 2006; WOODFORD et al. 2004).

O primeiro surto fora dos Estados Unidos da América ocorreu em Israel e a outra evidência epidemiológica de propagação intercontinental de KPC foi relatada na França

e Suécia, a partir de pacientes transferidos de hospitais dos Estados Unidos da América, Israel e Grécia, sendo estes países considerados endêmicos para isolados produtores de KPC (DORTET et al., 2008; LEAVITT et al., 2007; NAAS et al., 2005; NAVON-VENEZIA et al., 2009; POURNARAS et al., 2009; SOULI et al., 2010; TEGMARK-WISELL et al., 2007; ZAGORIANOU et al., 2012).

Casos importados de países como Grécia e Itália foram descritos, recentemente (BABOUEE et al., 2011; POIREL et al., 2011a). O primeiro relato de isolamento de KPC na Itália ocorreu em 2009 (GIANI et al., 2009). A descrição dos primeiros casos de infecção ou colonização por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase KPC-3 ocorreu a partir de 2009, na Espanha (ROBUSTILLO RODELA et al., 2012). Casos envolvendo outras espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo *Citrobacter freundii*, *E. coli* e *Serratia marcescens* foram relatados na China (CAI et al., 2008; JIANG et al., 2012; MOLAND et al., 2007).

A disseminação de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foi inicialmente relatada na América do Sul, em 2006, na Colômbia e, subsequentemente, a enzima foi detectada em outras *Enterobacteriaceae* e espécies não *Enterobacteriaceae* (KATTAN et al., 2007; VILLEGAS et al., 2006; 2007), seguido de relato na Argentina (PASTERAN et al., 2008) (Figura 1).

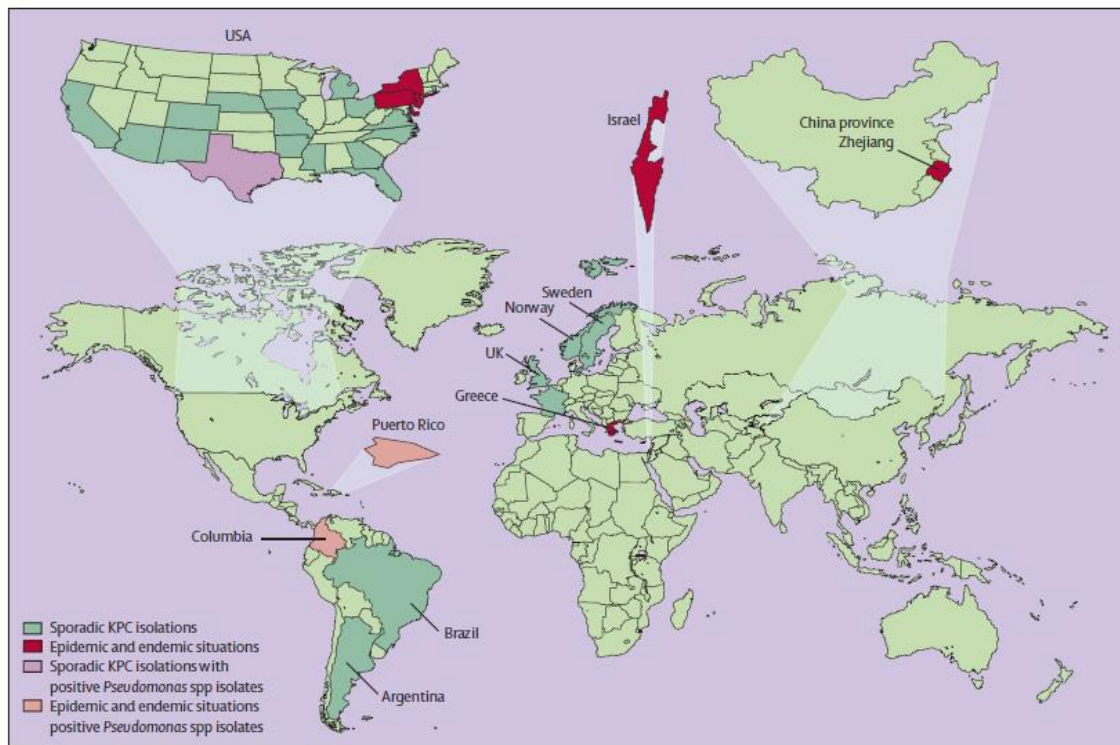


Figura 1 - Distribuição geográfica mundial de KPC

Fonte: NORDMANN, CUZON, NAAS, 2009

O primeiro caso relatado de *K. pneumoniae* produtora de KPC, no Brasil, ocorreu na região Nordeste, em Recife, Pernambuco (MONTEIRO et al., 2009). Desde então, somente casos esporádicos de isolamento de KPC têm sido descritos, não sendo, portanto, reconhecida a prevalência destes micro-organismos. Relatos também ocorreram no Sudeste (Rio de Janeiro) (PEIRANO et al., 2009), com evidência de emergência desta carbapenemase desde 2005, em São Paulo (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009), seguido de outros relatos neste estado (BEIRÃO et al., 2011).

Posteriormente, a enzima foi demonstrada na região Sul, em Santa Catarina, Florianópolis (ZAVASCHI et al., 2010) e em Porto Alegre, onde foi relatada a associação de outras β -lactamases responsáveis por resistência aos carbapenêmicos (MEYER; PICOLI, 2011).

A detecção de coinfeção por espécies diferentes produtoras de KPC, incluindo *K. pneumoniae* e *E. coli*, também foi descrita, recentemente (LEÃO et al., 2011), assim como a propagação de distintos clones de KPC entre *Enterobacteriaceae* no Brasil (ANDRADE et al., 2011).

Após o primeiro relato do isolamento de *K. pneumoniae* produtora de KPC na região Nordeste brasileira, nova detecção referente ao acúmulo de genes de resistência aos carbapenêmicos, nesta espécie, foi descrita nesta localidade, em Recife, Pernambuco (CABRAL et al., 2012). Posteriormente, em outra cidade nordestina, João Pessoa, Paraíba, foi relatada a coprodução de carbapenemases (KPC e oxacilinase) e a emergência de *K. pneumoniae* produtora da enzima KPC em uma Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital escola (FEHLBERG et al., 2012).

1.2 CONCEITOS E CLASSIFICAÇÃO DAS β -LACTAMASES ASSOCIADAS COM RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

As carbapenemases são enzimas que hidrolisam os carbapenêmicos (imipenem, meropenem, ertapenem), tornando-os inativos. Entre estas enzimas, estão representantes da classificação de Ambler, baseada em sua estrutura molecular, e incluem as β -lactamases classes moleculares A e D (serinas β -lactamases) e B (metalo- β -lactamases ou metaloenzimas) (AMBLER et al., 1991; POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007) (Tabela 1).

Tabela 1 – Esquema de classificação modificada de β -lactamases (de acordo com Ambler,1980)

	β -lactamase-class	β -lactamases	Important examples	Preferential occurrence	Important phenotypic resistance traits ^a
Serine- β -lactamases	A	Broad-spectrum β -lactamases	TEM-1, TEM-2 SHV-1, SHV-11	Enterobacteriaceae and nonfermenters ^b	ampicillin, cephalotin
		ESBL TEM-type	TEM-3, TEM-52		penicillins, 3rd gen. cephalosporins
		ESBL SHV-type	SHV-5, SHV-12		
		ESBL CTX-M-type	CTX-M-1, CTX-M-15		
		Carbapenemases	KPC, GES, SME		all β -Lactams ^c
	C	AmpC cephamycins (chromosomal-encoded)	AmpC	Enterobacter spp. Citrobacter spp.	cephamycins (cefotaxime), 3rd gen. cephalosporins
		AmpC cephamycins (plasmid-encoded)	CMY, DHA, MOX FOX, ACC,	Enterobacteriaceae	cephamycins (cefotaxime), 3rd gen. cephalosporins
	D	Broad-spectrum β -lactamases	OXA-1, OXA-9	Enterobacteriaceae; A. baumannii	oxacillin, ampicillin cephalotin
		ESBL OXA-type	OXA-2, OXA-10		penicillins, 3rd gen. cephalosporins
		Carbapenemases; Carbapenemases	OXA-48; OXA-23,-24,-58		ampicillin, imipenem; all β -lactams ^c
Metallo- β -lactamases	B	Metallo- β -lactamases (Carbapenemases)	VIM IMP	Enterobacteriaceae and nonfermenters	all β -lactams ^c

^a Characteristical resistances that are partially used used for diagnostic purposes;

^b Broad-spectrum β -lactamase TEM-1 frequently occurs in nonfermenters (*P. aeruginosa*, *A. baumannii*);

^c Broad hydrolytic spectrum including carbapenems.

Fonte: PFEIFER, CULLIK, WITTE, 2010

As carbapenemases pertencentes ao grupo A são β -lactamases que apresentam serina como sítio ativo para o seu mecanismo hidrolítico e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN; BUSH, 2007; WALLACE et al., 1010). Apresentam como principal característica a capacidade hidrolítica sobre todos os β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, motivo da sua definição (QUEENAN; BUSH, 2007).

Dentre as carbapenemases da classe A, destacam-se as cromossomicamente codificadas e as mediadas por plasmídeos. As primeiras incluem: o grupo IMI/NMC-A, que formam os subgrupos IMI – *imipenem-hydrolysing β -lactamase* e NMC-A - *not metalloenzyme carbapenemase*, com ocorrência em *Enterobacter cloacae* e SME – *Serratia marcescens enzyme* em *Serratia marcescens* (QUEENAN et al., 2000; RASMUSSEN et al., 1996), os quais foram, esporadicamente, detectados nos Estados Unidos da América, França e Argentina (GALES et al., 2001; NORDMANN et al., 1993; POTTUMARTHY et al., 2003; RADICE et al., 2004). Dentre as carbapenemases encontradas em plasmídeos transferíveis são citadas: GES – *Guiana extended*

spectrum em *Pseudomonas aeruginosa* (POIREL et al., 2005) e raramente relatada em isolados de *K. pneumoniae* na Grécia (VOURLI et al., 2004), Coréia (JEONG et al., 2005), Portugal (DUARTE et al., 2003) e Japão (WACHINO et al., 2004) e KPC – *Klebsiella pneumoniae carbapenemase*, comumente detectada em *K. pneumoniae* (NAAS et al., 2005; YIGIT et al., 2001), além de outras espécies de *Enterobacteriaceae*, como *Enterobacter* e *Salmonella* (BRATU et al., 2005d; MIRIAGOU et al., 2003) e em *P. aeruginosa* (VILLEGAS et al., 2007).

As enzimas KPC são codificadas pelo gene *blaKPC*, o qual é transportado dentro de um transposon Tn4401 de 10 kb, da família Tn3 (NAAS et al., 2008), inserido em diferentes *locus* e em distintos plasmídeos transferíveis, o que indica um processo dinâmico e frequente de transposição e disseminação do gene *blaKPC* (CUZON et al., 2010). Este transposon serve como um suporte de estrutura genética para o gene e é altamente conservado, sendo bem caracterizado em mais de sete diferentes plasmídeos, variando de 12 a 80 Kb em tamanho, cada qual com distintos sítios de inserção (GOOTZ et al., 2009; NAAS et al., 2008).

Dessa forma, tem sido sugerido que este elemento genético é a origem da aquisição e disseminação do gene *blaKPC* (NAAS et al., 2008). A crescente propagação de KPC se deve à transferência horizontal de plasmídeos ou mobilização de elementos genéticos em plasmídeos, tais como transposons ou sequências de inserção, responsáveis pela fácil transmissão entre pacientes (QI et al. 2010, SHEN et al. 2009). Vários casos de transferência horizontal de *blaKPC* através de plasmídeos têm sido descritos (CAI et al., 2008; SIDJABAT et al., 2009).

Estas carbapenemases apresentam, portanto, um grande potencial de disseminação, especialmente por serem mais frequentemente encontradas em espécies de *Enterobacteriaceae*, micro-organismos com capacidade de acumular e transferir determinantes de resistência (QUEENAN; BUSH, 2007).

A capacidade hidrolítica das enzimas KPC sobre todos os β -lactâmicos pode levar à falsa detecção do isolado bacteriano como produtor de ESBL, por também hidrolisarem cefalosporinas de amplo espectro. No entanto, ao contrário de ESBLs, as enzimas KPC exibem atividade hidrolítica sobre os carbapenêmicos, reduzindo a suscetibilidade a estes antimicrobianos e são apenas fracamente inibidas pelo ácido

clavulânico e tazobactam (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; QUEENAM; BUSH, 2007; YIGIT et al., 2001). Além disso, isolados produtores de KPC apresentam resistência aos antimicrobianos não β-lactâmicos, incluindo as quinolonas e aminoglicosídeos (CASTANHEIRA et al., 2010) ou demonstram ser panresistentes (ELEMAM; RAHIMIAN; MANDELL, 2009).

As carbapenemases classe D (*oxacilinases hydrolysing* - OXA enzimas) têm sido frequentemente relatadas em *Acinetobacter baumannii* (BOU et al., 2000a; AFZAL-SHAH; WOODFORD; LIVERMORE, 2001) e hidrolisam fracamente os carbapenêmicos e não as cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam (NORDMANN, POIREL, 2002). A sua atividade não é inibida pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido clavulânico (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Os genes β-lactamase associados com resistência aos carbapenêmicos nesta espécie têm sido representados por *blaOXA* (*blaOXA-23*, *blaOXA-48*, *blaOXA24/40*, *blaOXA51/69*) (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011; PEREZ et al., 2010).

As oxacilinases podem contribuir para a resistência aos carbapenêmicos quando outros mecanismos de resistência a estes antimicrobianos estão presentes, como impermeabilidade e efluxo (BOU et al., 2000b; NORDMANN; POIREL, 2002). Um exemplo ocorre com isolados de *K. pneumoniae* ou *E. coli*, nos quais o nível de resistência aos carbapenêmicos é usualmente mais alto quando ESBL e alterações de permeabilidade são associados (CUZON et al., 2011; MOQUET et al., 2011). A enzima OXA possuindo significativa atividade carbapenemase foi identificada em isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos na Turquia (AKTAS et al., 2008; GÜLMEZ et al., 2008) e, desde então, isolados produtores desta carbapenemase têm sido relatados como fonte de surtos nosocomiais em países europeus, no Mediterrâneo e África (CUZON et al., 2011; MOQUET et al., 2011; POIREL et al., 2011b).

As metalo-β-lactamases são enzimas β-lactamases, cujo mecanismo de hidrólise é dependente da interação do anel β-lactâmico com íons de zinco no seu sítio ativo. São, portanto, sensíveis à inibição por agentes quelantes de íons de Zn^{+2} e outros cátions divalentes, como EDTA ou compostos derivados do ácido tiolático (ácido 2-mercaptopropiônico) (QUEENAN; BUSH, 2007). Esta classe é caracterizada pela resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam e capacidade de hidrólise

sobre todos os β -lactâmicos, exceto o monobactâmico aztreonam (HARUTA et al., 2000).

Inicialmente descritas como enzimas cromossômicas em patógenos oportunistas, tais como *Aeromonas* spp. (IACONIS et al., 1990) e *Stenotrophomonas maltophilia* (SAINO et al., 1982), as famílias destas metaloenzimas têm aumentado, devido à localização de genes codificantes em integrons de classe 1, cuja transferência tem sido facilitada pela associação com plasmídeos ou transposons (POIREL; NORDMANN; 2002; QUEENAN; BUSH, 2007). Dentre estas carbapenemases, as metaloenzimas clinicamente mais significantes pertencem aos grupos IMP (*Imipenemase*), VIM (*Verona integron-encoded metallo- β -lactamase*) (LAURETTI et al., 1999), SPM (*São Paulo metallo- β -lactamase*) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (*German imipinemase*) (CASTANHEIRA et al., 2004) e SIM (*Seoul-imipinemase*) (LEE et al., 2005).

As metaloenzimas são encontradas em uma ampla diversidade de espécies bacterianas, incluindo *P. aeruginosa* e *A. baumannii* e algumas espécies de *Enterobacteriaceae* (HIRAKATA et al., 1998; LEE et al., 2005; POIREL et al., 2000; YAN et al., 2001). São reportadas, mundialmente, principalmente no sudeste da Ásia e Europa, particularmente na Grécia e Itália (CAGNACCI et al., 2008; GIAKKOUPIS et al., 2003; ZAGORIANOU et al., 2012). O sul da Europa parece ser um importante foco de micro-organismos gram-negativos produtores de metalo- β -lactamase, em sua maioria *K. pneumoniae* nosocomial multirresistente (QUEENAN; BUSH, 2007; WALSH et al., 2005).

Surtos têm sido reportados na América do Sul devido, particularmente às carbapenemases tipo SPM e VIM (JONES et al., 2005; SADER et al., 2005), sendo SPM mais limitado ao Brasil (MARRA et al., 2006; ZAVASCKI et al., 2005).

Mais recentemente, surtos de *K. pneumoniae* transportando carbapenemase *New Delhi metallo- β -lactamase* (NDM-1) foram descritos na Índia, Paquistão e Reino Unido (KUMARASAMY et al., 2010) e, desde então, em todos os continentes (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011). Casos nas Américas Central (Guatemala) e Sul (Uruguai, Paraguai e Colômbia), envolvendo *Providencia rettgeri*, *A. baumannii*, além de *K. pneumoniae*, sem relatos de ligações com antecedentes de viagens internacionais, também foram descritos (PAHO/OMS, 2012). A disseminação de MBLs tipo NDM para

regiões como a América do Norte, Europa e Austrália tem sido associada a pacientes transferidos do subcontinente indiano e tem recebido atenção considerável devido ao seu perfil extensivamente resistente (NORDMANN et al., 2011).

Os plasmídeos que transportam o gene *bla*NDM podem abrigar um número elevado de determinantes de resistência associados com outros genes de carbapenemase, em muitas espécies bacterianas, o que os torna fonte de panresistência (KUMARASAMY et al., 2010). Além disso, a aquisição deste gene é frequente em *K. pneumoniae* e *E. coli*, ambos considerados principais patógenos humanos nosocomiais e adquiridos na comunidade, respectivamente, outro grande desafio do ponto de vista de saúde pública (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

As enzimas do tipo KPC podem tornar-se clinicamente preocupantes entre *Enterobacteriaceae*, devido à ocorrência de diversidade de plasmídeos carreadores de genes de outras carbapenemases distintas. Isto tem possibilitado o surgimento de alto número de diferentes tipos de isolados produtores destas β -lactamases associadas, considerados uma fonte de multi ou panresistência (KUMARASAMY et al., 2010). Isolados de *K. pneumoniae* coprodutores de carbapenemases (KPC/VIM) têm se propagado nos hospitais gregos, onde a enzima KPC tem sido considerada predominante (GIAKKOUPIS et al., 2009 a; b; ZAGORIANOU et al., 2012), bem como na Itália (RICHTER et al., 2012) e no subcontinente indiano (NDM-1, OXA-48, VIM) (KUMARASAMY et al., 2010). Isto se deve à aquisição de plasmídeos transferíveis carreadores de *bla*KPC por isolados endêmicos locais (CURIAO et al., 2010).

1.3 EPIDEMIOLOGIA DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE

Até 2004, isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos eram encontrados apenas nos Estados Unidos da América (BRATU et al., 2005a; WOODFORD et al., 2004). Desde então, a prevalência de isolados *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases tem sido estimada, mundialmente, ao longo de um período de seis anos (2000-2005) em 0,2%, com as carbapenemases tipo KPC-2 e KPC-3 mais frequentemente detectadas (70,2%) (CASTANHEIRA et al., 2008). A

incidência de resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, no Brooklyn, Nova York, foi de 22% em 2006 (LANDMAN et al., 2007).

O programa de vigilância de resistência antimicrobiana *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) relatou um aumento significativo da resistência ao meropenem entre os isolados clínicos de *K. pneumoniae* de 0,6% em 2004 para 10,8% em 2007 (RHOMBERG; JONES, 2009). Da mesma forma, dados de 2006-2007 do sistema de vigilância nacional *National Healthcare Safety Network*, obtidos de vários estabelecimentos assistenciais de saúde dos Estados Unidos da América, incluindo Nova York, demonstraram uma percentagem de resistência aos carbapenêmicos, variando de 3,6% a 10,8% entre os isolados de *K. pneumoniae*, os quais foram associados, principalmente com infecções da corrente sanguínea associadas ao uso de cateter central (HIDRON et al., 2008).

Dados notificados e relatados pelo *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) em 2007, referentes às infecções relacionadas à assistência à saúde indicaram que 8,0% de todos os isolados de *Klebsiella* eram *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, em comparação com < 1% em 2000 (SRINIVASAN; PATEL, 2008).

Taxas elevadas de resistência aos carbapenêmicos, variando entre 46,7% e 83,3% entre os isolados de *Klebsiella* spp. produtores de carbapenemase foram verificadas não só nos Estados Unidos da América como em alguns países europeus (CASTANHEIRA et al, 2008). Alta prevalência de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos também foi verificada na Grécia (53%) (EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM, 2008; ZAGORIANOU et al., 2012). Um crescente aumento na prevalência de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foi observado em Israel, em um período de três anos consecutivos de estudo (0,4%, 0,07% e 3,1%) (LEAVITT et al., 2007).

Dados de *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net, formerly EARSS) demonstraram taxas de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *K. pneumoniae* causadores de infecções invasivas de 17,0% em Chipre; 1,3% na Itália; 1,2% na Bélgica e abaixo de 1% em outros países europeus que apresentaram registro de dados, incluindo a Suécia, Noruega e Reino Unido (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2010).

Na América Latina, prevalência de 15% de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi relatada em um hospital de cuidados terciários na Colômbia (LOPEZ et al., 2011). Enquanto no Brasil, a exata prevalência de isolados produtores de KPC ainda não foi estudada, uma vez que somente casos esporádicos têm sido relatados (BEIRÃO et al., 2011; FEHLBERG et al., 2012; MONTEIRO et al., 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Dados do programa de vigilância antimicrobiana SENTRY da América Latina, incluindo Brasil, mostraram uma taxa de resistência aos carbapenêmicos, particularmente ao meropenem em *K. pneumoniae* de 1,4%, durante a última década (SADER et al., 2004).

K. pneumoniae produtora de KPC tem se tornado, portanto, um problema de saúde pública emergente na Europa (Polônia, França, Noruega, Suécia, Escócia) (BARANIAK et al., 2009; NAAS et al., 2005; SAMUELSEN et al., 2009; WOODFORD et al., 2008), China (MENDES et al., 2008; WEI et al., 2007) e América do Sul (Brasil, Colômbia) (MONTEIRO et al., 2009; VILLEGAS et al., 2006).

A grande disseminação de KPC a partir dos Estados Unidos da América foi sugerida ser clonal (KITCHEL et al., 2009). Estudos moleculares mostraram que muitos isolados de *K. pneumoniae* com enzimas KPC pertenceram a um único complexo clonal, CC258, incluindo suas variantes de sequências tipo (ST) (ST258, ST11 e ST437) (ANDRADE et al., 2011; CUZON et al., 2010; KITCHEL et al., 2009). Estes isolados corresponderam, predominantemente, à sequência *multilocus*, ST258, responsável por aproximadamente 70% dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC nos Estados Unidos da América e considerada a mais distribuída globalmente, associada aos tipos de KPC-2 e KPC-3 (KITCHEL et al., 2009).

O clone ST258 está principalmente associado ao surgimento e disseminação de isolados produtores de KPC em diferentes países da América do Norte, Europa e Ásia (CUZON et al., 2010; KITCHEL et al., 2009; NAVON-VENEZIA et al., 2009; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Além deste perfil alélico, a heterogeneidade entre os isolados produtores de carbapenemases tem sido demonstrada em várias regiões geográficas, incluindo as variantes ST11 predominantes na China, Coreia do Sul e Hungria (CUZON et al., 2010; KO et al., 2010; QI et al., 2011; TÓTH et al., 2010) e, esporadicamente detectadas em diferentes cidades brasileiras, além das sequências

ST437 e o ST258, clones de *K. pneumoniae* contendo o gene *blaKPC* disseminados no Brasil (ANDRADE et al., 2011; FEHLBERG et al., 2012; SEKI et al., 2011).

Dessa forma, essa diversidade de isolados produtores de KPC em suas características moleculares (diferentes clones de KPC – STs, transportados em diferentes plasmídeos auto transferíveis e com estrutura genética idêntica (transposon Tn4401) beneficia a sua propagação rápida para *K. pneumoniae* e outras espécies bacterianas, o que resulta em importantes implicações epidemiológicas e de saúde pública (CUZON et al., 2010; MATHERS et al., 2011).

1.4 FATORES DE RISCO PARA COLONIZAÇÃO OU INFECÇÃO POR *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASE

Os fatores de riscos que predispõem à colonização ou infecção por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos ou produtora de KPC incluem, principalmente: tempo de hospitalização prolongado; permanência em unidades de terapia intensiva; uso de dispositivos invasivos (cateter urinário, cateter venoso central, drenos cirúrgicos), uso de ventilação mecânica, exposição prévia aos antimicrobianos, além de condição funcional do paciente, cirurgias, transplantes de órgãos ou de células tronco e imunossupressão (BRATU et al, 2005b; FALAGAS et al., 2007; GASINK et al., 2009; SCHWABER et al., 2008).

A prolongada hospitalização tem sido considerada um importante fator de risco para colonização por micro-organismos multirresistentes, incluindo os produtores de KPC (FALAGAS et al., 2007; PATEL et al., 2008). O risco aumentado de infecção se deve à colonização de ambiente e superfícies, fontes de transmissão cruzada dentro de uma instituição, onde *K. pneumoniae* pode sobreviver ou persistir durante meses (KRAMER et al., 2006). Além disso, o tempo longo de permanência no hospital implica em maior exposição a outros fatores de risco importantes, uma vez que este ambiente é onde o uso de antimicrobianos é considerável e os pacientes frequentemente são provenientes ou permanecem em UTI, requerendo uso de ventilação mecânica e de dispositivos invasivos (MUNOZ-PRICE, 2009).

A permanência em UTI também tem sido considerada um importante fator de risco para colonização ou infecção por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemases (FALAGAS et al., 2007). Este micro-organismo resistente aos carbapenêmicos pode colonizar e, conseqüentemente, infectar pacientes hospitalizados que são frequentemente debilitados e criticamente doentes (PATEL et al., 2008). E a alta prevalência de colonização entérica por isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase em pacientes internados em UTI pode contribuir para a restrição das opções terapêuticas, com conseqüente falha clínica neste serviço hospitalar (PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS et al., 2012).

O uso prévio de antimicrobianos, particularmente carbapenêmicos, como opção terapêutica para infecções causadas por bactérias multirresistentes em geral, pode ser um fator para a colonização primária de isolados produtores de KPC e, portanto, representa um risco indireto para a propagação do mecanismo de resistência a estes fármacos (ROBUSTILLO RODELA et al., 2012; WIENER-WELL et al., 2010). Isso se deve à presença de determinantes de resistência adicionais em plasmídeos que conferem resistência cruzada às várias outras classes de antimicrobianos não relacionados, não apenas β -lactâmicos (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

As classes de antimicrobianos que têm sido associadas com colonização ou infecção por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase incluem: carbapenêmicos, cefalosporinas de amplo espectro, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e vancomicina (FALAGAS et al., 2007; GASINK et al., 2009; GUPTA et al., 2011; PATEL et al., 2008; SCHWABER et al., 2008; WIENER-WELL et al., 2010), sendo a exposição a estes fármacos associada com infecção por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (FALAGAS et al., 2007).

A administração prévia de fluoroquinolonas para o tratamento de infecções por micro-organismos gram-negativos resulta em uma pressão seletiva ou ativação de mecanismos intrínsecos, por exemplo, efluxo de droga, que confere resistência às múltiplas classes de antimicrobianos (FALAGAS et al., 2007). O uso prévio de penicilina antipseudomonas em combinação com um inibidor de β -lactamase também foi relatado como um fator de risco independente para o desenvolvimento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (FALAGAS et al., 2007).

Mesmo na ausência de pressão seletiva dos antimicrobianos, isolados provenientes de áreas endêmicas para a enzima carbapenemase, são capazes de propagar genes *blaKPC* (BARBIER et al., 2010). A transferência entre unidades hospitalares também foi descrita como outro fator de risco para aquisição nosocomial de *K. pneumoniae* produtora de KPC (GREGORY et al., 2010). A transferência *in vivo* de *blaKPC* entre isolados clínicos de *K. pneumoniae* e da microbiota de um mesmo paciente tem suscitado preocupações adicionais sobre a propagação da resistência aos carbapenêmicos entre *Enterobacteriaceae* (BARBIER et al., 2010).

1.5 RELEVÂNCIA CLÍNICA DE ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC são frequentemente identificados entre os patógenos nosocomiais (LANDMAN et al., 2007). Dessa forma, a resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* deve ser sempre investigada, uma vez que a maioria das infecções por *Enterobacteriaceae* associadas à KPC são infecções sistêmicas adquiridas em hospitais, especialmente associadas a dispositivos invasivos (CARMELI et al., 2010; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). Dentre estas, incluem infecções urinárias associadas ao uso de cateter, pneumonia e bacteremia em pacientes graves (BRATU et al., 2005b; GUPTA et al., 2011).

K. pneumoniae produtora de carbapenemase, além de ser considerada um importante desafio clínico, é um preocupante problema de saúde pública, uma vez que seus principais reservatórios nosocomiais são equipamentos médicos e superfícies contaminados, mãos de profissionais de saúde e trato gastrointestinal do paciente (NAVON-VENEZIA et al., 2009; WARNER; HIGHMORE; KEEVIL, 2012). Este micro-organismo consiste em uma ameaça para a segurança dos pacientes, pois as infecções por este patógeno têm sido associadas com pior prognóstico, prolongada hospitalização e taxas de mortalidade elevadas (PATEL et al., 2008).

Observa-se a ocorrência de uma alta mortalidade em pacientes infectados por isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC quando comparados com indivíduos infectados por *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos (GASINK et al., 2009).

Infecções causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase têm sido relacionadas com taxas de mortalidade hospitalar superiores a 50,0%, constituindo um fator de risco independente de morte (PATEL et al., 2008; SCHWABER et al. 2008; WOODFORD et al., 2004). Dentre estas, bacteremia tem sido relatada como a infecção mais associada à mortalidade (BRATU et al, 2005b, MATHERS et al. 2011). Além disso, fatores como idade, o uso de ventilação mecânica, doenças malignas, cardíacas e a permanência na UTI são considerados predisponentes para um aumento da mortalidade entre os pacientes com infecções por *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos (PATEL et al., 2008; SCHWABER et al., 2008).

K. pneumoniae é causa comum de infecções tanto em estabelecimentos de saúde como na comunidade, o que aumenta a possibilidade de propagação de resistência aos carbapenêmicos para a comunidade, tornando estes micro-organismos de grande importância epidemiológica em nível nacional (GUPTA et al., 2011). Em função dos fatores relacionados à disseminação dos isolados produtores de carbapenemases na comunidade serem associados com a falta de higienização (principalmente das mãos), o amplo uso de antimicrobianos e aumento de viagens internacionais, torna-se difícil o seu controle (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

Além disso, o potencial de promover a disseminação de resistência aos carbapenêmicos às outras espécies de *Enterobacteriaceae*, incluindo micro-organismos de baixa virulência, ocasionando o estabelecimento de reservatórios de genes de resistência aos carbapenêmicos em pacientes e/ou ambientes, aumenta o espectro de infecções associadas à comunidade não tratáveis (MATHERS et al., 2011). Da mesma forma, o isolamento de diferentes tipos de carbapenemase em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* demonstra a possibilidade deste micro-organismo desempenhar importante papel de disseminação de genes de carbapenemase em estabelecimentos assistenciais de saúde (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

1.6 DETECÇÃO DE ISOLADOS DE *K. pneumoniae* PRODUTORES DE CARBAPENEMASE E DA ENZIMA KPC

Vários métodos de tipagem fenotípica e moleculares têm sido descritos para investigar a origem da infecção, rota de disseminação e prevalência de isolados em uma população bacteriana de uma determinada região. Uma identificação rápida dos isolados envolvidos em um surto tem importância para limitar a sua gravidade e detectar a fonte do micro-organismo (CARTELLE et al., 2004).

A dificuldade de detecção da produção de KPC com testes rotineiros, tanto pelo método padronizado (suscetibilidade por disco-difusão) como pelo sistema semi ou automatizado (TOYE et al., 2009), pode interferir nos processos terapêuticos, contribuindo para o pior prognóstico das infecções causadas por bactérias produtoras de KPC (ARNOLD et al 2011). Estes métodos podem falhar consistentemente na detecção de tais micro-organismos (TOYE et al., 2009).

O teste de suscetibilidade por disco-difusão usando imipenem ou meropenem não é considerado sensível para a detecção específica de KPC (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). No entanto, este método de rotina, ao demonstrar resistência geral a todos β -lactâmicos e total ou intermediária ao meropenem aumenta a possibilidade de detecção de carbapenemase entre os isolados testados, cuja confirmação do tipo KPC deve ser realizada com métodos moleculares, além de determinados testes fenotípicos, para detecção específica desta enzima (TOYE et al., 2009).

A identificação de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos com sistemas semi ou automatizados pode ser problemática, uma vez que estes sistemas podem reportar isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase como sendo sensíveis ao imipenem ou meropenem. A presença de KPC pode causar aumentos da Concentração Inibitória Mínima (CIM) que permanecem dentro da variação sensível ou intermediária, podendo passar despercebidos se nenhum teste fenotípico confirmatório for realizado (HIRSCH; TAM, 2010). Isto se deve à expressão, inerente às cepas, de níveis variáveis de resistência aos carbapenêmicos, além do tamanho do inóculo, abaixo dos valores recomendados, não sendo detectados pelo método automatizado (ANDERSON et al., 2007; GORDON et al., 2009; TENOVER et al., 2006). Além disso, a

falha do sistema automatizado em detectar resistência mediada por KPC tem sido observada quando o ertapenem não é avaliado (ANDERSON et al. 2007).

A triagem, portanto, com ertapenem é preferível, uma vez que este é considerado o antimicrobiano mais suscetível à atividade hidrolítica da carbapenemase KPC do que os outros carbapenêmicos e é recomendado pelo CDC (ANDERSON et al., 2007). Além disso, a resistência a este antimicrobiano não é afetada pelo efeito inóculo, que pode resultar em suscetibilidade aos demais carbapenêmicos (BRATU et al. 2005b). Dessa forma, deve-se suspeitar de produção de KPC se os testes *in vitro* mostram resistência ou reduzida suscetibilidade a um dos carbapenêmicos. Além disso, isolados de *K. pneumoniae* resistentes à qualquer cefalosporina de amplo espectro e sensíveis aos carbapenêmicos devem também ser avaliados quanto à possível produção de carbapenemase (CLSI, 2012a). Assim, o *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) tem recomendado, desde 2010, mudanças dos *breakpoints* para os carbapenêmicos (Imipenem e meropenem: CIM ≤ 1 $\mu\text{g/mL}$ – Sensível; CIM = 2 $\mu\text{g/mL}$ – Intermediário; CIM ≥ 4 $\mu\text{g/mL}$ – Resistente; Ertapenem: CIM $\leq 0,25$ $\mu\text{g/mL}$ – Sensível; CIM = 0,5 $\mu\text{g/mL}$ – Intermediário; CIM ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$ – Resistente), para melhorar a detecção de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemase (CLSI, 2010).

Alguns testes confirmatórios para a presença de carbapenemase têm sido propostos. A técnica com ágar MacConkey e discos contendo carbapenêmicos é utilizada para a detecção rápida de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, colonizante do trato gastrointestinal dos pacientes portadores. Este método demonstrou uma sensibilidade de 92,7% e especificidade 95,9% para a detecção de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos quando comparado à técnica molecular *Polymerase chain reaction* (PCR). Outra técnica rápida e direta de detecção de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos a partir de espécimes clínicos é o meio de ágar cromogênico – CHROMagar KPC, o qual apresentou uma sensibilidade de 100% e especificidade de 98,4% em relação a PCR (LANDMAN et al., 2005; SAMRA et al., 2008).

O teste de Hodge modificado, um teste mais facilmente realizado, é muito útil para auxiliar na confirmação da presença de carbapenemase, com 100% de sensibilidade para a sua detecção, principalmente quando são utilizados *breakpoints*

interpretativos para a resistência aos carbapenêmicos desatualizados (CIM ≥ 16 $\mu\text{g/mL}$ para imipenem e meropenem; CIM ≥ 8 $\mu\text{g/mL}$ para ertapenem) (CLSI, 2009a), apesar de não detectar exclusivamente o tipo KPC (ANDERSON et al., 2007). Este teste fenotípico apresenta grande utilidade para propostas de controle de infecção (CLSI, 2012a).

Alternativamente, um ensaio de disco-difusão usando carbapenêmicos como substratos e ácido 3-aminofenil borônico como um inibidor de KPC foi capaz de diferenciar isolados produtores de β -lactamase tipo KPC de outros tipos de β -lactamases (TSAKRIS et al., 2009). Entretanto, este teste é considerado demorado e apresenta baixa especificidade na presença de isolados produtores de AmpC mediada por plasmídeo (CASTANHEIRA et al., 2011; MIRIAGOU et al., 2010). Sinergismo ocorre entre ácido 3-aminofenil borônico e o disco com ertapenem, o que leva à falsa detecção de β -lactamase AmpC, subestimando a presença do tipo KPC (PASTERAN et al., 2008). Dessa forma, o teste de inibição baseado em ácido borônico tem sido reportado como específico para a detecção de KPC em *K. pneumoniae* quando realizado com imipenem ou meropenem, mas não com ertapenem, se os isolados são coprodutores de β -lactamase AmpC mediada por plasmídeos (MIRIAGOU et al. 2010; THOMSON, 2010).

Uma abordagem viável para a identificação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC inclui a triagem da enzima carbapenemase por meio do teste de suscetibilidade por disco-difusão com ertapenem, seguido da confirmação com o teste de inibição com disco de ertapenem ou meropenem e ácido borônico, uma vez que a resistência ao ertapenem tem sido relatada como um excelente indicador da presença de β -lactamase tipo KPC, com uma sensibilidade superior a 90% (ANDERSON et al., 2007).

Baseada na definição de carbapenemase, que se refere à capacidade hidrolítica sobre os carbapenêmicos, e não na habilidade de conferir resistência a estes antimicrobianos, o padrão ouro para confirmar a presença da carbapenemase é o ensaio de espectrofotometria (para detectar a hidrólise de um carbapenêmico), seguido de técnicas moleculares para a detecção do gene *blaKPC* que codifica a enzima (ANDERSON et al, 2007). A técnica de PCR tem sido considerada útil para a

diferenciação das diferentes variantes das enzimas do tipo KPC (PITOUT; LAUPLAND, 2008; VILLEGAS et al., 2006), assim como a tipagem plasmidial. Outros métodos genotípicos, incluindo *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e tipagem de sequência *multilocus* têm sido usados para análise clonal e de similaridade genômica (QI et al., 2010; SCHECHNER et al., 2009).

A combinação da análise genética molecular com avaliação de investigações epidemiológicas clássicas, baseadas no risco para aquisição/infecção por *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos, tem fornecido informações hipotéticas valiosas sobre a dinâmica de transmissão de resistência aos antimicrobianos e possíveis rotas de disseminação de *blaKPC* entre pacientes durante surtos (MATHERS et al. 2011). Além da importância epidemiológica, os testes moleculares são necessários para a detecção enzimática em isolados com múltiplas β -lactamases ou com uma enzima específica ou genes responsáveis pela sua produção, nos casos em que são conferidos baixos níveis de resistência e não são identificadas por testes fenotípicos (MOLAND et al., 2007; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Entretanto, estes métodos genotípicos ainda apresentam, atualmente, alto custo para um laboratório de microbiologia clínica, demandam equipamentos e pessoal qualificado, sendo difícil para implementação em rotina e, geralmente, requerem que os isolados sejam enviados para laboratórios de referência (HIRSCH; TAM, 2010; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

1.7 OPÇÕES TERAPÊUTICAS PARA INFECÇÕES POR *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE KPC

Bactérias produtoras de KPC apresentam um importante problema em situações clínicas, nas quais a administração de antimicrobianos empíricos efetivos é essencial para prevenir a mortalidade. Entre estas, estão infecções graves como bacteremia e outras infecções em pacientes submetidos a transplantes de órgãos e tratamento de doenças malignas, nos quais a condição de imunocomprometidos requer terapia empírica efetiva (ARNOLD et al., 2011).

Poucas opções terapêuticas são disponíveis para tratar infecções por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, sendo basicamente polimixinas, tigeciclina

ou terapia combinada (CARMELI et al., 2010; ELEMAN; RAHIMIAN; MANDELL, 2010). Resultados clínicos de tratamentos específicos de infecções por *K. pneumoniae* produtora de KPC com aminoglicosídeos, combinações de polimixina e de tigeciclina mostraram-se com taxas de sucesso superiores a 70%, em contraste à monoterapia com carbapenêmicos ou polimixina B (HIRSCH; TAM, 2010).

Diversos isolados produtores de KPC permanecem sensíveis à amicacina ou gentamicina e, neste caso, estes fármacos podem ser usados em combinação com outros antimicrobianos ativos para o tratamento de infecções graves por estes micro-organismos (BRATU et al., 2005a; KOSMIDIS et al., 2012; TOYE et al., 2009). Estudo retrospectivo de bacteriúria por *Klebsiella* resistente aos carbapenêmicos demonstrou que o tratamento com um aminoglicosídeo, particularmente a gentamicina, quando ativo *in vitro*, foi associado com uma taxa significativamente mais elevada de erradicação da bacteriúria do que com polimixina B ou tigeciclina (SATLIN e al., 2011). Isto é devido à gentamicina ser o aminoglicosídeo mais ativo contra isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de VIM e KPC, os quais apresentam o gene *aac(6')-I* (gene envolvido na resistência à amicacina, tobramicina e netilmicina) concomitantemente com genes de carbapenemase, a maioria *blaKPC* (KOSMIDIS et al., 2012).

Os antimicrobianos tigeciclina e polimixinas têm sido cuidadosamente avaliados, devido à ausência de resistência cruzada com β -lactâmicos (CARMELI et al., 2010), apesar de apresentarem limitado uso clínico em função de suas propriedades farmacocinéticas e toxicidade (ARIAS; MURRAY, 2009). Entretanto, diferentes perfis de resistência têm sido verificados, incluindo taxas elevadas de suscetibilidade reduzida à tigeciclina e polimixina B. As razões para isto podem incluir a presença de mecanismos adicionais, como a frequente coexistência de enzimas β -lactamases, a concomitante existência de várias variantes de carbapenemases e o aumento das taxas de resistência à tigeciclina e/ou polimixinas como resultado do emprego desses antimicrobianos para o tratamento de infecções por micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos (ZAGORIANOU et al., 2012).

As polimixinas (polimixina B e colistina) há muito abandonadas em favor de alternativas mais eficazes e menos tóxicas, tornaram-se agora nova arma para o tratamento de infecções por *K. pneumoniae* produtora de KPC (YUAN; TAM, 2008). A

atividade bactericida da polimixina sobre a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC tem sido demonstrada por alguns pesquisadores (BRATU et al., 2005c; CASTANHEIRA et al., 2008). A combinação de polimixina B e rifampicina contra isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC demonstrou um efeito sinérgico para a maioria dos isolados, podendo ser uma opção terapêutica útil (BRATU et al., 2005c). Da mesma forma, o uso da terapia combinada com polimixinas ou tigeciclina e um carbapenêmico pode proporcionar maior benefício em pacientes criticamente doentes, incluindo aqueles com bacteremia devido *K. pneumoniae* produtora de KPC, em função da atividade sinérgica observada *in vitro* entre ambas às drogas (QURESHI et al., 2012).

Aumentos significativos da CIM para polimixina B subsequentes ao tratamento de pacientes com monoterapia com este antimicrobiano, podem ser decorrentes de reinfecção por um isolado resistente, a partir de uma população bacteriana heterogênea, sob pressão seletiva do uso do antimicrobiano. A terapia combinada com polimixina e tigeciclina pode evitar esta ocorrência. Ambos antimicrobianos podem ter um efeito aditivo quando usados conjuntamente, pois não são antagonistas (LEE et al., 2009).

A colistina tem sido usada como monoterapia ou em esquemas de combinação, sendo a resistência a este fármaco esporadicamente relatada entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC durante o tratamento (BRATU et al., 2005a; CASTANHEIRA et al., 2008; ELEMAM; RAHIMIAN; MANDELL, 2009; LEE et al., 2009; ZARKOTOU et al, 2010). A cura clínica com colistina em combinação com tigeciclina foi verificada em casos de pneumonia causada por isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, descrita em uma revisão retrospectiva de um surto na Grécia (MALTEZOU et al., 2009). Da mesma forma, a sua combinação com carbapenêmicos quando a CIM dos mesmos é ≤ 4 $\mu\text{g/mL}$ tem sido considerada útil (DAIKOS; MARKOGIANNAKIS , 2011).

Um estudo de caso controle, ao comparar as características de pacientes portadores de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC resistentes à colistina com aqueles com KPC sensíveis, demonstrou que os isolados pertenciam a um único tipo, baseado no PFGE, com cinco subtipos proximamente relacionados, sendo que o

subtipo predominante incluiu a grande maioria dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC resistentes e sensíveis à colistina. Estes resultados indicam que provavelmente a resistência foi inicialmente desenvolvida, a partir de isolado KPC sensível à colistina, sob pressão do uso deste antimicrobiano; e este isolado resistente foi posteriormente disseminado horizontalmente para outros pacientes (ZARKOTOU et al, 2010).

Devido à sua atividade bacteriostática, a tigeciclina não é considerada uma opção como monoterapia de infecções sistêmicas nosocomiais. Taxas de mortalidade com a utilização deste antimicrobiano, particularmente nos casos de pneumonia associada ao uso de ventilação mecânica, têm sido relatadas pelo FDA (*American Food and Drug Administration*) (FDA, 2010). A tigeciclina, portanto, tem se mostrado inferior ao imipenem/cilastatina no tratamento de pneumonia associada à ventilação mecânica, motivo de precaução quanto ao seu uso para esta infecção (FREIRE et al., 2010). Além disso, em função desta droga alcançar concentrações relativamente baixas no plasma, altos índices de mortalidade por bacteremia têm sido relatados (SOULI et al., 2008).

A tigeciclina foi aprovada pelo FDA apenas para o tratamento de infecções complicadas de pele, intra-abdominais e pneumonia comunitária, exceto infecções sanguíneas e urinárias (HAWKEY; FINCH, 2007). No entanto, tem demonstrado boa atividade *in vitro* contra patógenos produtores de KPC, assim como eficácia no tratamento quando em terapia combinada e/ou administrada em dose prolongada (ANTHONY et al., 2008; CASTANHEIRA et al., 2008; NICASIO; CRANDON; NICOLAU, 2009).

A atividade deste antimicrobiano, frente aos isolados multirresistentes em geral, não é afetada pela alteração de permeabilidade de membrana externa (perda de porinas), mecanismo comum que contribui para a resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Enterobacteriaceae* (WOODFORD et al., 2007). Do mesmo modo, baseada na atuação deste fármaco inibindo a síntese proteica, a tigeciclina também supera mecanismos de resistência mediados por efluxo e proteção ribossômica, comuns à classe de antimicrobiano que lhe deu origem: as tetraciclina (LIVERMORE, 2005).

Portanto, a tigeciclina mostra excelente atividade *in vitro* contra isolados multirresistentes, incluindo *K. pneumoniae* produtores de ESBL e/ou β -lactamase tipo

AmpC mediada por plasmídeos (CONEJO; HERNANDEZ; PASCUAL, 2008). Casos de bacteremia e pneumonia nosocomial foram tratados com sucesso com este antimicrobiano, incluindo causados por isolados de *K. pneumoniae* expressando metalo- β -lactamase, β -lactamase de espectro estendido e produtora de serina-carbapenemase (COBO et al., 2008; DALY et al., 2007). A combinação entre tigeciclina e polimixina B demonstrou ser uma alternativa para resolução destas infecções (COBO et al., 2008).

Estudo clínico acerca da eficácia clínica e da atividade microbiológica da tigeciclina frente espécies de *Enterobacteriaceae* multirresistentes demonstrou que 69,7% dos pacientes tratados com este fármaco apresentaram resolução de infecção causada por *Enterobacteriaceae* resistente aos carbapenêmicos ou produtores de ESBL ou multirresistentes. A suscetibilidade cumulativa à tigeciclina dos isolados de *Klebsiella* spp. com diminuída suscetibilidade aos carbapenêmicos foi de 71,9%, segundo os critérios do *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (KELESIDIS et al., 2008).

Isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemases com resistência à tigeciclina foram recuperados durante o tratamento com este antimicrobiano (DALY et al., 2007; RODRÍGUEZ-AVIAL et al., 2012). A resistência à tigeciclina tem aumentado em algumas áreas geográficas, como a Grécia, onde apenas 15,4% dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC, testados durante o período 2007- 2008 apresentaram-se sensíveis (SOULI et al 2010).

A fosfomicina é considerada outra opção para o tratamento de infecções graves por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, devido sua mínima toxicidade, habilidade de rapidamente alcançar altos níveis no soro e tecidos e a atividade *in vitro* contra patógenos resistentes aos carbapenêmicos, polimixinas ou tigeciclina (FALAGAS et al., 2008; MICHALOPOULOS et al., 2010; SOULI et al., 2008). Este antimicrobiano é um derivado de ácido fosfônico com um amplo espectro de atividade, contra vários patógenos gram-positivos e gram-negativos, incluindo *Enterobacteriaceae* produtores de β -lactamase de espectro estendido ou de carbapenemase (ENDIMIANI et al., 2010). A atividade *in vitro* contra *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases apresenta suscetibilidade variando entre 54,0% e 94,9%, apesar dos dados quanto aos

resultados clínicos de infecções por estes micro-organismos serem limitados (FALAGAS et al., 2010a; b; MICHALOPOULOS et al., 2010; SOULI et al., 2010).

A fosfomicina alcança boa eficácia clínica no tratamento de infecções urinárias, no entanto, não se encontra disponível em muitos países, ou está disponível apenas como uma formulação oral para infecções não complicadas do trato urinário. Questionamentos sobre o seu uso como monoterapia para infecções graves em outros sítios corporais são feitos, tendo em vista a suscetibilidade *borderline* de muitos isolados de *Klebsiella* spp. e o potencial para o surgimento de resistência (FALAGAS et al., 2010a). Combinações deste antimicrobiano com carbapenêmicos ou colistina, por exemplo, têm mostrado uma melhor atividade bactericida comparada à monoterapia, podendo prevenir o desenvolvimento de resistência na maioria dos isolados sensíveis (SOULI et al., 2011).

Antimicrobianos para o tratamento de infecções por isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases encontram-se em fase de desenvolvimento. Dentre eles, são citados derivados sintéticos de polimixinas, menos nefrotóxicos com igual atividade bacteriana, incluindo compostos denominados NAB (metanossulfonatos de polimixina B), em estudos pré-clínicos (VAARA et al., 2008) e plazomicin (ACHN-490), um novo aminoglicosídeo em fase II de desenvolvimento, que não é inativado por enzimas modificadoras de aminoglicosídeos, com atividade contra *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas* (AGGEN et al., 2010), exceto bactérias produtoras de carbapenemases NDM-1 (KOSMIDIS et al., 2012). Além destes, a combinação de oxi-imino-cefalosporina (ceftazidima) com Avibactam (NXL104), um novo inibidor de β -lactamase não β -lactâmico, em início de fase III de desenvolvimento, que neutraliza a atividade hidrolítica das serina carbapenemases sobre os β -lactâmicos, incluindo KPC e OXA, tem sido considerada uma opção (LIVERMORE et al., 2008; STACHYRA et al., 2009). Uma nova tetraciclina, PTK-0796, em ensaio clínico fase II completa, também tem sido analisada como opção para superar alguns mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae*, como sistema de efluxo (LIVERMORE, 2009).

1.8 MEDIDAS DE VIGILÂNCIA E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORES DE KPC

É de grande importância, para controlar um surto de modo eficaz, intensificar as medidas de controle de infecção, no momento do aparecimento do primeiro caso, de forma a minimizar a transmissão cruzada de micro-organismos produtores de KPC (ROBUSTILLO RODELA et al., 2012).

O conhecimento dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, principalmente entre isolados bacterianos ocasionais que apresentam combinação de impermeabilidade e β -lactamase AmpC ou ESBL, além da possibilidade de importação de isolados produtores de carbapenemase é crítico para uma adequada vigilância, controle de infecção e propostas terapêuticas (WOODFORD et al., 2010).

As medidas de controle de infecção para reduzir a propagação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de carbapenemases demandam, portanto, a detecção precoce dos portadores, pois é uma prioridade para o adequado tratamento dos pacientes. A falha em detectar estes micro-organismos, quando da sua primeira ocorrência, pode subestimar a sua prevalência em uma instituição (CARMELI et al., 2010; GUPTA et al., 2011; MIRIAGOU et al., 2010). Esta dificuldade de detecção de isolados suspeitos de produção de carbapenemase pode resultar em uma perda de oportunidade para intervir antes que ocorra uma maior disseminação (CDC, 2009).

Medidas de controle diferenciadas em estabelecimentos quanto à ocorrência esporádica ou a presença de surtos ou endemias têm sido sugeridas, com intuito de evitar uma iminente epidemia ou contê-la. Estas têm que ser adaptadas às condições locais e aos setores hospitalares específicos, considerando-se a prevalência e a incidência de bactérias produtoras de carbapenemases. O desenvolvimento e a implementação de programas de controle de infecção por micro-organismos multirresistentes são, portanto, os primeiros passos antes do surgimento de um primeiro caso índice, o qual deve ser detectado precocemente pelo laboratório de microbiologia (CARMELI et al., 2010).

Dessa forma, um levantamento microbiológico nos últimos seis a doze meses, no caso de não endemicidade é necessário para determinar a ocorrência de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos, a fim de se identificar casos não

reconhecidos (CDC, 2009). Culturas de vigilância ativa em áreas de alto risco ou de casos prévios, para identificar pacientes com colonização gastrointestinal, que são potenciais fontes de transmissão, e prevenir a disseminação horizontal, tornam-se imprescindíveis para auxiliar no controle de infecção, tanto em situações epidêmicas quanto endêmicas (GUPTA et al. 2011; KOCHAR et al., 2009; NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009). A associação de culturas de vigilância em swabs retais obtidos na admissão e semanalmente de pacientes provenientes de áreas endêmicas; hospitalizados no exterior e transferidos para outro país; internados em unidades de terapia intensiva; transplantados e imunocomprometidos, com outras medidas de controle, como isolamento até obtenção de resultados do rastreio, levam a uma redução na incidência de infecções por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos (KOCHAR et al., 2009).

Precauções de contato, incluindo isolamento e coorte de pacientes infectados ou colonizados com KPC em quartos individuais, bem como profissionais exclusivos para o cuidado aos pacientes colonizados ou infectados, são medidas que devem ser implementadas e estritamente aplicadas para a contenção e interrupção da transmissão de *K. pneumoniae* produtora de KPC (CARMELI et al., 2010; MUNOZ-PRICE et al., 2010). A limitação da transferência de pacientes contato e casos para outras áreas; sinalização da presença dos casos e adesão à prática de higienização das mãos são consideradas medidas eficazes de controle de ocorrência de surto por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (CARBONNE et al., 2009).

O uso racional de antimicrobianos tem sido considerado efetivo no controle de *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenêmicos (SIEGEL et al., 2007), assim como a limitação do uso de dispositivos invasivos, os quais têm sido associados com infecções por estes micro-organismos, especialmente do trato urinário associadas ao uso de cateter (GUPTA et al., 2011). A higienização/desinfecção de superfícies e ambientes com desinfetante à base de álcool e cloreto de benzalcônio e didecildimetilamônio, respectivamente, foi relatada como uma medida de controle eficaz de propagação de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (ROBUSTILLO RODELA et al., 2012).

As medidas de controle podem tornar-se mais complicadas e dispendiosas em estabelecimentos com surtos ou onde é endêmica a presença destes patógenos (CARMELI et al., 2010). Estas podem incluir:

- ✚ Emissão de relatórios mensais sobre o controle de bactérias produtoras de carbapenemases para instituições de controle de infecção;
- ✚ Avaliação dos hospitais envolvidos e identificação de áreas problemáticas por uma agência de saúde pública com competência no controle de infecção;
- ✚ Treinamentos e medidas para manter a equipe, os gestores e a administração dos hospitais informados quanto à ocorrência de surtos;
- ✚ Participação dos profissionais em seminários educacionais e *workshops* sobre higiene das mãos e isolamento dos pacientes;
- ✚ Vigilância permanente com coleta prospectiva de dados e busca diária de portadores de isolados produtores de carbapenemase;
- ✚ Transferência de informações entre as instituições como procedimento padrão sempre que um paciente é transferido a partir de um hospital para outro;
- ✚ Confirmação de casos suspeitos;
- ✚ Avaliação da epidemiologia molecular;
- ✚ Detecção de novos mecanismos de resistência;
- ✚ Desenvolvimento de protocolos de rotina com as descrições de métodos adequados, padronizados e atualizados, incluindo controle de qualidade pelos laboratórios de microbiologia clínica.

De acordo com o exposto, *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase está associada à resistência aos múltiplos antimicrobianos. A presença deste fenótipo de multirresistência consiste em um importante desafio para os hospitais, devido à sua difícil detecção laboratorial, com consequentes implicações negativas quanto ao manejo terapêutico e controle de infecção.

A detecção aumentada de *Klebsiella* spp. resistente aos múltiplos antimicrobianos, particularmente de classes não relacionadas (KOBAYASHI et al., 2009) e a emergência de resistência aos carbapenêmicos em um hospital público estadual de referência em urgência e emergência de Goiânia, Goiás, nos últimos seis anos, evidenciou a necessidade de identificação dos principais mecanismos de

resistência a estes antimicrobianos e o conhecimento dos fatores de risco para infecção ou colonização por este micro-organismo, como um elemento essencial no auxílio à terapêutica e controle da propagação de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase nesta instituição.

2 OBJETIVOS

Diante do exposto, o presente trabalho consistiu nos seguintes objetivos:

2.1 GERAL:

- Determinar a frequência de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e produtores de carbapenemases e identificar os fatores de risco relacionados à colonização ou infecção por estes micro-organismos.

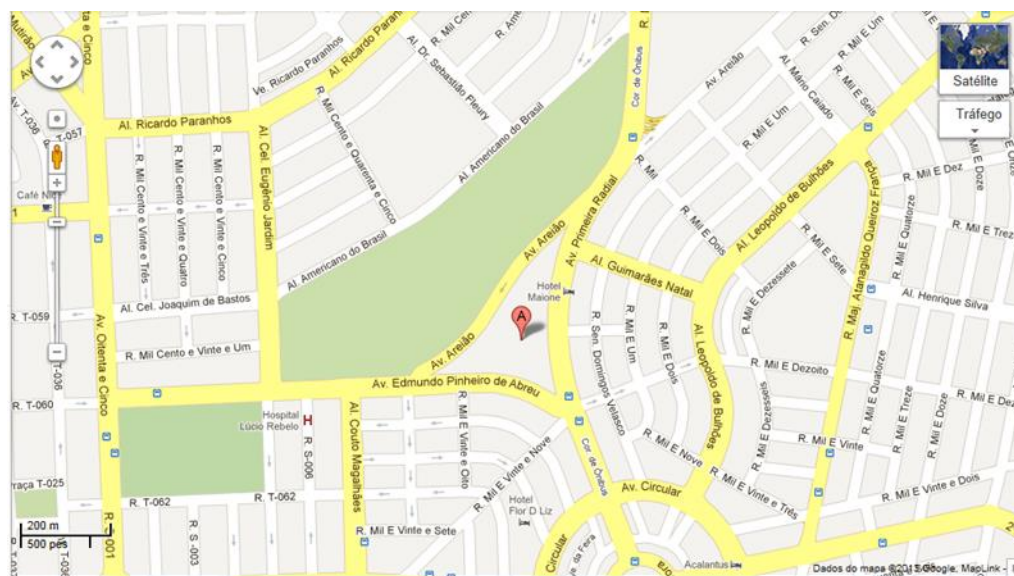
2.2 ESPECÍFICOS:

- Identificar a enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em isolados de *K. pneumoniae* e outras β -lactamases, incluindo β -lactamases de espectro estendido, β -lactamases classe C ou cefamicinases AmpC e metalo- β -lactamases;
- Determinar a sensibilidade ou resistência dos isolados bacterianos à polimixina B e à tigeciclina;
- Avaliar os fatores de risco independentes associados à colonização ou infecção por isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase.

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Goiânia, Goiás, Brasil (Figura 2).



Fonte: <http://maps.google.com.br>

especialidades:

- Cirúrgica (34 de clínica cirúrgica e 69 de traumatologia);
- Clínica (32 de clínica médica e 24 de enfermarias masculina e feminina);
- Complementar (duas de emergência de trauma/internação e 60 de Unidades de terapia intensiva, totalizando quatro UTIs);
- Centro cirúrgico (17 de salas/recuperação pós-anestésica)
- Pediátrica (oito)

Além destas especialidades, são disponibilizados sete leitos de emergência/consultas.

A instituição apresenta um perfil de atendimento de pacientes predominantemente traumáticos, em sua maioria, pertencentes ao sexo masculino, na faixa etária entre 18 e 34 anos.

O quantitativo de pacientes admitidos a partir do setor de pronto atendimento (serviços de emergência, classificação de risco e retorno) deste hospital, no ano anterior, demonstrou o equivalente a 59.949 admissões, com uma média diária de 164 pacientes.

Quanto ao número de internações, foram 15.300 de ocorrência, principalmente nas especialidades cirúrgica e clínica (SAME/HUGO, 2012, dados não publicados).

O hospital de estudo também conta com um laboratório de apoio, durante o período de 24 horas, para a realização de exames diagnósticos, incluindo bioquímicos, hematológicos, uranálise e microbiológicos, dentre os quais, 7.498 culturas são processadas anualmente.

3.2 DEZENHO DO ESTUDO

3.2.1 Pacientes

Pacientes internados durante 48 h ou mais no hospital de estudo, cujas amostras clínicas apresentaram um primeiro isolamento de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos e subsequente positividade para a presença de enzimas carbapenemases, consistiram a população deste estudo. Portanto, esta investigação foi realizada mediante a detecção inicial de colonização ou infecção dos pacientes por isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, no período entre 1º de janeiro de 2006 e 31 de Dezembro de 2011.

Estes indivíduos foram identificados a partir do banco de dados da Seção de Microbiologia do Laboratório de Análises Clínicas do hospital de cuidados terciários investigado.

Dessa forma, baseando-se na análise de todas as culturas microbiológicas, processadas no período de seis anos pelo laboratório de microbiologia, foram considerados para a investigação todos os pacientes portadores ou infectados por isolados suspeitos de produção de *K. pneumoniae carbapenemase*, consistindo, portanto, em uma amostra por conveniência. Esta amostra foi escolhida, a princípio, a partir do acompanhamento, iniciado em 2006, do perfil de resistência dos isolados clínicos de *Enterobacteriaceae* aos carbapenêmicos.

Assim, 111 isolados resistentes aos carbapenêmicos de um total de 1377 *K. pneumoniae*, dentre todas as espécies de *Enterobacteriaceae* isoladas no período deste estudo, provenientes de espécimes clínicos não repetidos e distintos, submetidos à cultura microbiológica, segundo a demanda espontânea, consistiram a amostragem inicial. A partir desta amostra, mediante método de detecção fenotípica de carbapenemase, foram detectados 95 isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase provenientes de 68 pacientes com cultura bacteriológica positiva para este micro-organismo. Estes pacientes foram, então, elegíveis uma única vez para inclusão no estudo, para identificação dos fatores de risco associados com colonização ou infecção por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (Figura 3).

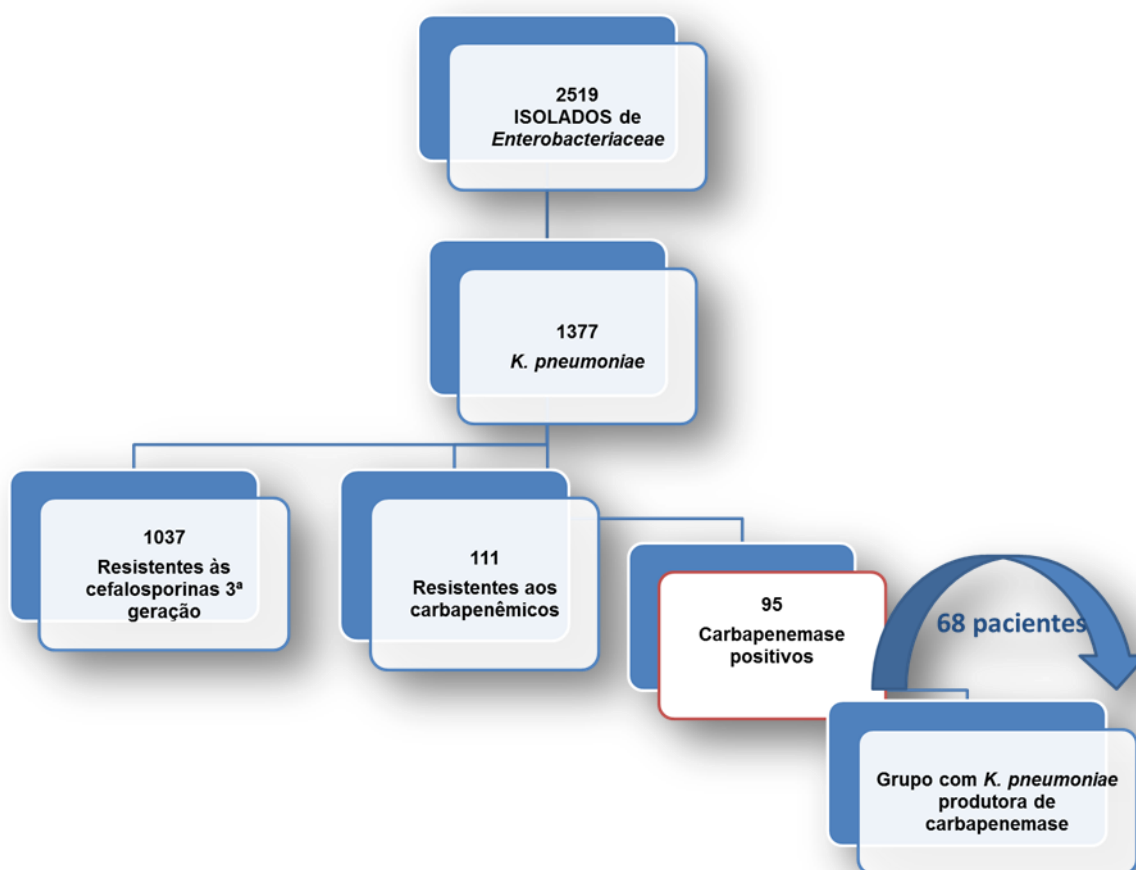


Figura 3 – Esquema de obtenção da população, a partir da detecção de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase

A partir dos pacientes com *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, foi selecionado, aleatoriamente, um grupo controle correspondente para determinar os fatores de risco associados com o isolamento de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. A seleção deste grupo foi feita, retrospectivamente, dentre o total de pacientes com *K. pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos. Isso ocorreu a partir

de dados microbiológicos de pacientes que preencheram alguns critérios de correspondência, dentre eles: sítio de infecção ou colonização e distribuição temporal (identificação no período entre 2006 e 2011) de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase, por serviço hospitalar.

3.2.2 Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão

Pacientes infectados ou colonizados por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase, internados em serviços de especialidades cirúrgica, clínica e complementar, tornaram-se elegíveis uma única vez para inclusão no estudo, após o primeiro isolamento de *K. pneumoniae*, independente de subseqüentes identificações deste micro-organismo.

Critérios de exclusão

Pacientes infectados ou colonizados por outras espécies de *Enterobacteriaceae*, que não *K. pneumoniae*, e bactérias não fermentadoras, internados em serviços de especialidades cirúrgica, clínica e complementar foram excluídos.

3.2.3 Definição de variáveis

Um paciente caso foi definido como aquele que foi internado nos serviços de especialidades cirúrgica, clínica e complementares, incluindo unidade de terapia intensiva (áreas de primeiro isolamento bacteriano) durante o período de Janeiro de 2006 a Dezembro de 2011, tornando-se clinicamente infectado ou colonizado por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. Pacientes admitidos nas unidades acima mencionadas, durante o mesmo período de estudo, cujas culturas foram positivas para isolados de *K. pneumoniae* sensíveis aos carbapenêmicos foram designados como grupo controle.

Dados demográficos e clínicos referentes aos casos e controles foram coletados a partir da revisão dos prontuários médicos (ANEXO 3). Os parâmetros investigados incluíram idade, gênero, comorbidades, sítio do primeiro isolamento, área e duração da hospitalização no momento do isolamento, permanência em UTI,

procedimentos invasivos (cateterização vesical e/ou intravascular, intubação endotraqueal), uso de ventilação mecânica, cirurgia, hemodiálise, exposição prévia a um ou múltiplos antimicrobianos antes do isolamento de *K. pneumoniae* resistente/sensível aos carbapenêmicos e resultado (alta/transferência ou óbito).

3.3 PROCEDIMENTOS MICROBIOLÓGICOS

3.3.1 Espécimes clínicos e isolados bacterianos

Foi realizada uma vigilância laboratorial, no período entre Janeiro de 2006 e Dezembro de 2011, na qual isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos foram subcultivados no Laboratório de Análises Clínicas – Seção de Microbiologia e congelados para montagem de uma bacterioteca, com a finalidade de estudos fenotípicos e genotípicos posteriores. Apenas o isolado inicial recuperado a partir de cada paciente foi incluído no estudo.

Isolados clínicos de *K. pneumoniae* com resistência ou reduzida suscetibilidade aos carbapenêmicos e produtores de carbapenemase foram obtidos a partir de culturas microbiológicas de amostras de urina, sangue, sítios cirúrgicos, pele e partes moles, líquidos corpóreos, secreções em geral e do trato respiratório. Estes isolados constituíram a casuística do presente trabalho.

Os micro-organismos foram identificados pelo laboratório de microbiologia clínica, utilizando-se testes bioquímicos padronizados e sistema semi-automatizado MicroScan Walkaway (Siemens), analisados no período entre 2010 e 2011 e comparados com os últimos 4 anos (2006 a 2009).

Cada isolado foi reportado ser resistente aos carbapenêmicos e aos outros antimicrobianos pelo laboratório clínico, onde sistema semi-automatizado MicroScan Walkaway (Siemens) e o método de disco-difusão como descrito pelo *Clinical Laboratory Standard Institute* (CLSI) foram usados (CLSI, 2009b; 2012a). Dentre o total de isolados resistentes aos carbapenêmicos, produtores ou não de serina-carbapenemase, 28 foram submetidos aos testes para investigar o mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, através da detecção das diferentes β -lactamases. Os isolados positivos para a presença de carbapenemase foram revisados e

analisados como parte do grupo com *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (grupo caso) (Figura 4).

A seleção dos isolados bacterianos ocorreu a partir da observação de dados microbiológicos disponibilizados pela seção de microbiologia do laboratório de análises clínicas do hospital de estudo. Os isolados foram posteriormente estocados em freezer entre 18°C e 20°C negativos para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana - determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e demais testes laboratoriais fenotípicos.

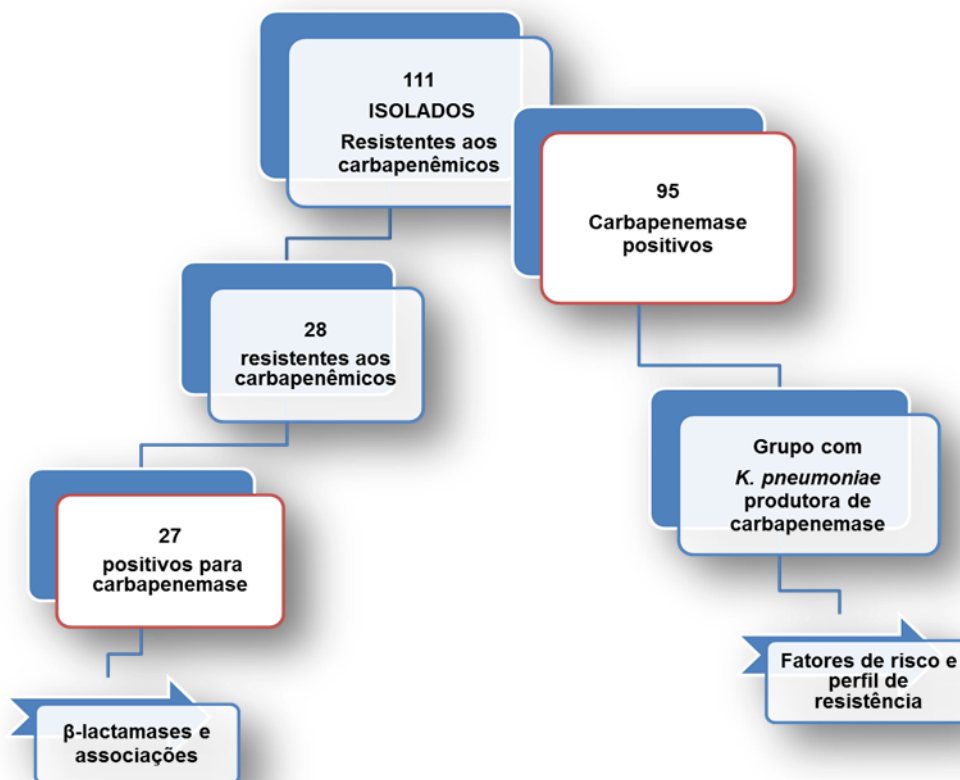


Figura 4 – Estudo dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos

3.3.2 Testes fenotípicos para a detecção das enzimas β -lactamases

3.3.2.1. Detecção de serina-carbapenemase (Hodge modificado)

Os carbapenêmicos ertapenem, meropenem e imipenem foram usados como substratos na triagem para o fenótipo KPC, seguida pelo teste de Hodge modificado (THM) para confirmação da presença da enzima carbapenemase, utilizando-se ertapenem como droga indicadora, de acordo com as recomendações do CLSI (2012a). Devido ao fato do painel utilizado pelo laboratório de microbiologia não testar concentrações tão baixas quanto 1 $\mu\text{g/mL}$ para os carbapenêmicos, a triagem com ertapenem, imipenem e meropenem foi realizada rotineiramente, seguida pelo teste de Hodge como método fenotípico confirmatório da produção de carbapenemase.

O teste de Hodge modificado foi realizado a partir da preparação de uma suspensão inicial em salina da cepa *Escherichia coli* ATCC 25922, correspondente à escala de Mc Farland 0,5, seguida da realização de uma diluição 1/10 em solução fisiológica. Após a semeadura do inóculo diluído em uma placa de ágar Müller Hinton, um disco de ertapenem (10 μg) foi colocado com auxílio de uma pinça flambada e fria no centro do meio de cultura Müller Hinton, seguido da semeadura do isolado a ser testado em linha reta da borda do disco para a placa. A incubação ocorreu em estufa microbiológica, durante 16-20 horas à $35^\circ \pm 2^\circ \text{C}$.

Resultado positivo foi interpretado como crescimento aumentado ao redor da semeadura do isolado testado, na intersecção da semeadura e o halo de inibição da cepa de *E. coli* pelo ertapenem, visualizado pelo aparecimento de uma endentação do halo (Figura 5).

Controle de qualidade foi realizado com *Escherichia coli* ATCC 25922 (controle negativo) e *Klebsiella pneumoniae* BAA 1705 (controle positivo).



Figura 5 – Teste de Hodge modificado positivo
1: ertapenem

3.3.2.2. Detecção fenotípica da enzima KPC

A pesquisa da enzima KPC foi realizada empregando-se dois discos de meropenem (10 μ g), ertapenem (10 μ g) e ceftazidima (30 μ g), sendo um com 20 μ L de solução de ácido borônico (3-aminophenylboronic acid; APB, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) diluído em dimetilsulfóxido (20 mg/mL) (400 μ g) e outro sem ácido borônico (ANEXO 4). Após 60 minutos para a secagem dos discos, o teste foi realizado segundo o método de disco-difusão, acrescentando-se os discos de carbapenêmicos e ceftazidima com e sem a solução de ácido borônico, seguido de incubação a 37° C durante 24 horas. A presença de um halo maior ou igual a 5 mm no disco combinado em relação ao disco contendo somente o substrato caracterizou a presença de KPC (TSAKRIS *et al.*, 2009) (Figura 6).

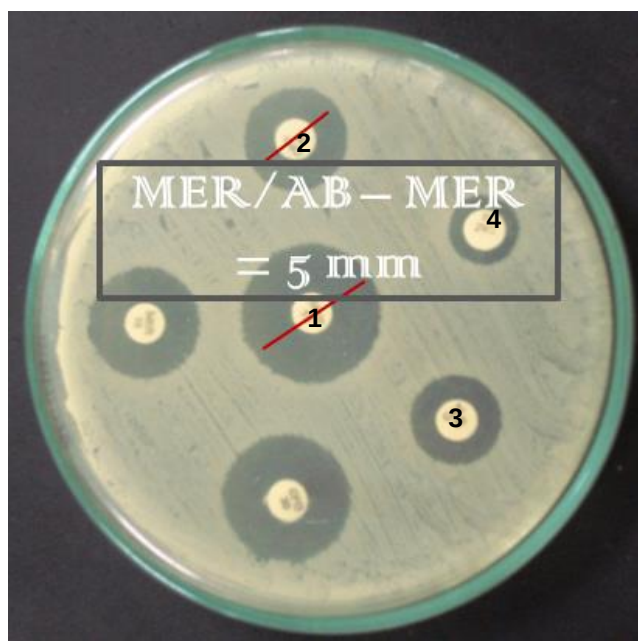


Figura 6 – Detecção específica de KPC com os substratos meropenem e ceftazidima com e sem ácido borônico
1: meropenem com ácido borônico; 2: meropenem; 3: ceftazidima com ácido borônico; 4: ceftazidima

3.3.2.3. Detecção de β -lactamase de espectro estendido (ESBL)

Foram realizados testes específicos para a triagem e confirmatório para detecção de ESBL. A triagem foi realizada, segundo o método de Jarlier et al. (1988), conhecido como teste de aproximação dos discos. Consistiu na utilização de disco de amoxicilina-ácido clavulânico no centro e, lateralmente a este, discos de cefotaxima, ceftriaxona, ceftazidima e aztreonam a uma distância de 20 mm, centro a centro, em relação à amoxicilina-ácido clavulânico, após inoculação da suspensão dos micro-organismos ajustada na escala 0,5 de McFarland, em uma placa de ágar Müller Hinton. A presença de ESBL foi indicada pela detecção do aumento ou distorção do halo de inibição ao redor do oximino-beta-lactâmico (*ghost zone* ou *zona fantasma*), após um período de 18 a 24 horas de incubação em temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}$ (Figura 7).



Figura 7 – Teste de triagem positiva para ESBL. Presença de distorção do halo de inibição ao redor do β -lactâmico ceftazidima

A confirmação da presença da enzima baseou-se no uso dos discos de ceftazidima e cefotaxima, ambos com e sem ácido clavulânico. Após preparação dos discos combinados, segundo documento M100-S22 (CLSI, 2012a) (ANEXO 4), discos de ceftazidima (30 μ g) e ceftazidima/ácido clavulânico (30/10 μ g), cefotaxima (30 μ g) e cefotaxima/ácido clavulânico (30/10 μ g) foram aplicados em meio de ágar Mueller Hinton semeado com o inóculo bacteriano diluído, conforme escala 0,5 de McFarland. Após incubação adequada (18 a 24 horas em temperatura de $35 \pm 2^\circ \text{C}$), foi considerado resultado positivo a verificação do aumento ($\geq 5 \text{ mm}$) no diâmetro do halo de inibição dos discos contendo o antibiótico em combinação com o ácido clavulânico quando comparados ao mesmo antibacteriano sem a presença deste inibidor. Controle de qualidade foi realizado com *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (Figura 8).

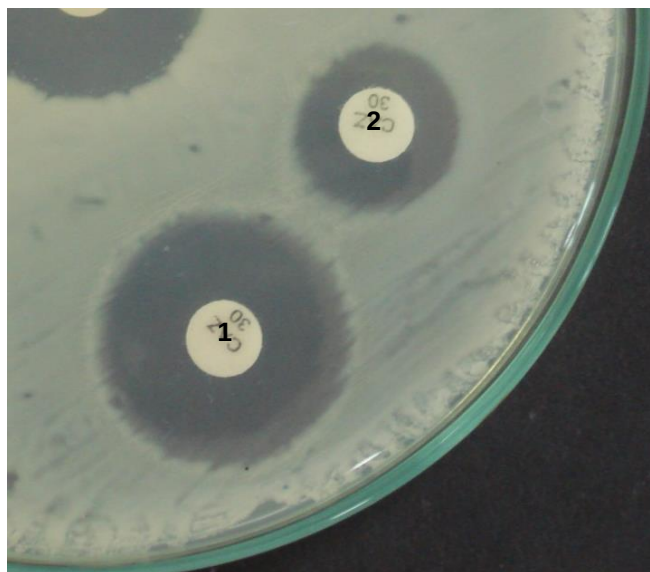


Figura 8 – Confirmação da presença da enzima ESBL com ceftazima com e sem ácido clavulânico
1: ceftazidima com ácido clavulânico; 2: ceftazidima

3.3.2.4. Detecção de metalo- β -lactamase (M β L)

A produção de metalo- β -lactamase foi detectada por meio do teste de sinergismo de duplo disco com substrato imipenem e o agente inibidor EDTA (disco combinado com imipenem e EDTA), como descrito previamente (YONG et al, 2002). Este teste consistiu na colocação inicial de dois discos de um mesmo substrato (imipenem) no ágar Müller Hinton semeado com a suspensão bacteriana correspondente à escala 0,5 de McFarland. Em seguida, a um dos discos foram adicionados 10 μ L de EDTA (0,5 M ou 750 μ g) (ANEXO 4), seguido de incubação a $35 \pm 2^\circ$ C, por 16 a 24 horas. Para interpretação, os halos de substrato com e sem EDTA foram comparados e o achado de diferença maior ou igual a 5 mm no halo de substrato/EDTA em relação ao substrato sozinho foi considerado positivo para M β L. Controle de qualidade foi realizado com *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 como controle negativo (Figura 9).

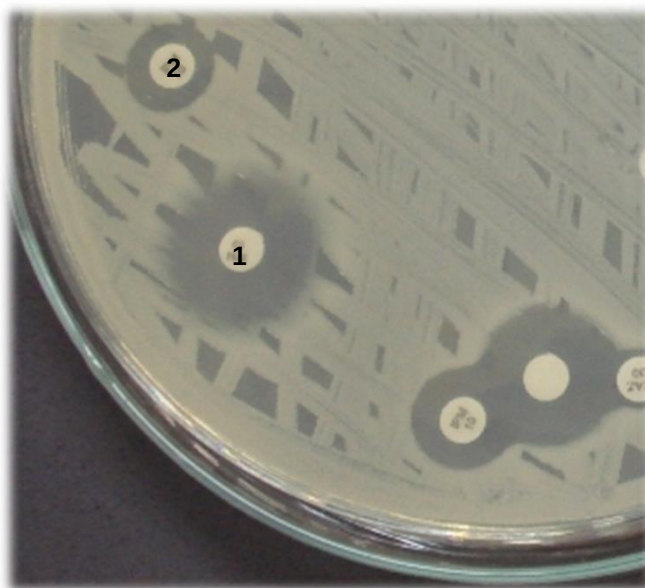


Figura 9. Triagem positiva para metalo β -lactamase em isolado de *K. pneumoniae*
1: Imipenem com EDTA; 2: Imipenem

3.3.2.5. Detecção de β -lactamase AmpC induzível

O teste de antagonismo ceftazidima-imipenem (CIAT) foi utilizado para confirmar a presença de enzimas β -lactamases AmpC induzíveis, entre os isolados de *K. pneumoniae*, segundo Cantarelli et al. (2007). Este teste consistiu de um disco de imipenem (10 ug) colocado a 20 mm (borda a borda) de um disco de ceftazidima (30 ug) sobre uma placa de ágar Müller-Hinton previamente inoculada com uma suspensão bacteriana, correspondente à escala 0,5 de McFarland, e incubada durante 24 horas a 35° C. Para fins de comparação, um disco de cefoxitina (30 μ g) também foi colocado a 20 mm a partir do disco ceftazidima. Antagonismo, indicado por uma redução visível no halo de inibição em torno do disco de ceftazidima adjacente ao imipenem ou disco cefoxitina, foi considerado positivo para a produção de β -lactamase AmpC induzível (Figura 10).

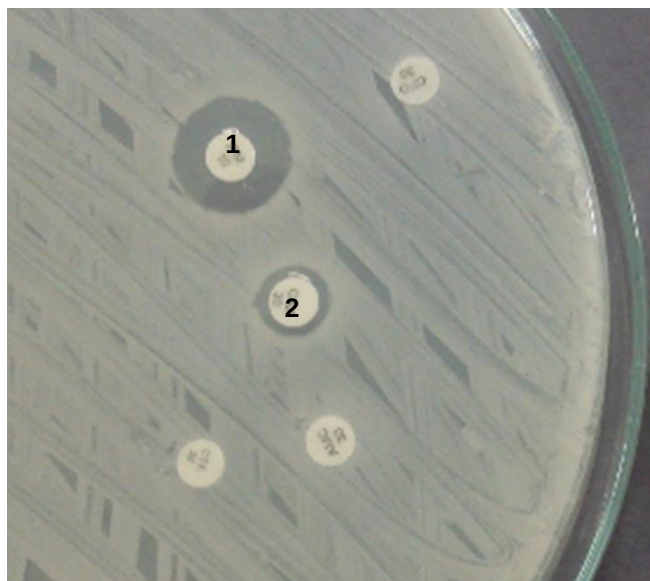


Figura 10 – Teste de antagonismo entre ceftazidima e imipenem
1: imipenem; 2: ceftazidima

3.3.2.6. Detecção da enzima *AmpC* plasmidial

A detecção fenotípica de isolados de *K. pneumoniae* produtores de β -lactamase *AmpC* mediada por plasmídeo foi avaliada utilizando-se dois discos de cefoxitina (30 μ g): um contendo 6 μ L (300 μ g) de solução de ácido borônico diluído em dimetilsulfóxido (50 mg/mL) e outro sem ácido borônico, conforme Pitout et al. (2010) (ANEXO 4). Ambos foram acrescentados em uma placa de ágar Müller Hinton após semeadura do inóculo correspondente à escala 0,5 de McFarland. A incubação ocorreu a $35 \pm 2^\circ$ C, por 16 a 24 horas. A apresentação de um halo maior ou igual a 5 mm no disco combinado em relação ao disco de cefoxitina configurou a presença da enzima (Figura 11).

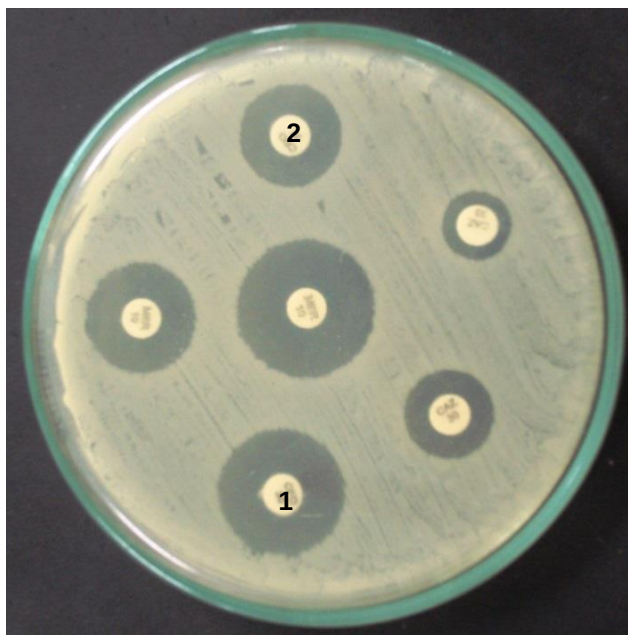


Figura 11 – Detecção de AmpC plasmidial
1: cefoxitina com ácido borônico; 2: cefoxitina

3.3.3. Prova de suscetibilidade aos antimicrobianos

3.3.3.1. Teste de suscetibilidade por disco-difusão

O teste de suscetibilidade foi realizado pelo método de disco-difusão, segundo normas padronizadas pelo documento M2-A10 (CLSI, 2009), suplementado pelo M100-S22 (CLSI, 2012a).

Todos os isolados foram categorizados como sensíveis ou resistentes aos seguintes agentes antimicrobianos sugeridos pelos documentos mencionados: cefotaxima (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), ceftazidima (30 μ g), cefepima (30 μ g), aztreonam (30 μ g), imipenem (10 μ g), meropenem (10 μ g), ertapenem (10 μ g), ampicilina-sulbactam (10/10 μ g), piperacilina-tazobactam (100/10 μ g), levofloxacin (5 μ g), ciprofloxacina (5 μ g), sulfametoxazol-trimetoprim (23,75/1,25 μ g), tetraciclina (30 μ g), gentamicina (10 μ g) e amicacina (30 μ g).

Uma suspensão bacteriana em salina ajustada para uma turbidez correspondente à escala de McFarland 0,5 (1 a 2×10^8 UFC/mL) foi preparada a partir de colônias isoladas de uma placa de ágar McConckey, após 18 a 24 horas de incubação. Esta suspensão foi inoculada em, no máximo 15 minutos, após a preparação do inóculo em placas de ágar Müller Hinton, com auxílio de um swab

esterilizado, em toda superfície do ágar em três direções, girando a placa aproximadamente 60° a cada vez, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. Posteriormente à secagem da placa entreaberta por 5 minutos (máximo 15 minutos), à temperatura ambiente, os discos de antimicrobianos selecionados foram aplicados a uma distância de centro a centro, não excedente a 24 mm sobre o inóculo absorvido, com uma pinça flambada e fria. Após a colocação dos discos, os mesmos foram pressionados levemente para garantia do contato completo com o ágar e difusão do antimicrobiano e as placas foram incubadas invertidas a $35^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 18 a 24 horas.

As leituras dos diâmetros dos halos de inibição em milímetros foram realizadas usando-se uma régua milimetrada, sob luz refletida. O controle de qualidade foi realizado por meio de testes com cepas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (Figura 12).



Figura 12 – Diâmetros dos halos de inibição obtidos por método de Disco-Difusão

3.3.3.2. *Teste de suscetibilidade por diluição para polimixina B e tigeciclina (método de microdiluição em caldo)*

A concentração inibitória mínima foi determinada por método de microdiluição em caldo usando tigeciclina e polimixina B para testar e reportar para 28 isolados

não repetidos resistentes aos carbapenêmicos e/ou com suspeita de atividade de carbapenemase (CLSI, 2012b).

Uma suspensão bacteriana em salina, padronizada na escala de Mc Farland 0,5 (1 a 2×10^8 UFC/mL), foi diluída 1/20 em caldo Müeller Hinton para obter um inóculo de 5×10^6 UFC/mL. A CIM da tigeciclina foi determinada por microdiluição em caldo usando caldo fresco preparado com até 12 horas, de acordo com as recomendações do CLSI (2012b). Os isolados foram testados em duplicata.

Cerca de 100 μ L da suspensão bacteriana foram adicionados à microplaca contendo 100 μ L dos antimicrobianos diluídos em caldo Müeller Hinton, em concentrações seriadas variando de 0,5 a 256 μ g/mL de polimixina B e 0,125 a 32 μ g/mL de tigeciclina (ANEXO 4). A concentração final do inóculo foi correspondente a 5×10^5 UFC/mL (5×10^4 UFC/poço). Cada placa incluiu um poço controle de crescimento (contendo 100 μ L de caldo e 100 μ L de suspensão bacteriana), para avaliar a viabilidade do micro-organismo a ser testado e um poço negativo (não inoculado, contendo apenas antimicrobiano diluído). Cepas controle apropriadas de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram utilizadas a cada bateria de teste de diluição. As microplacas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 16-20 horas completas em aerobiose.

A leitura do teste consistiu na determinação da CIM, correspondente à menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível de um micro-organismo nos poços de microdiluição (Figura 13).

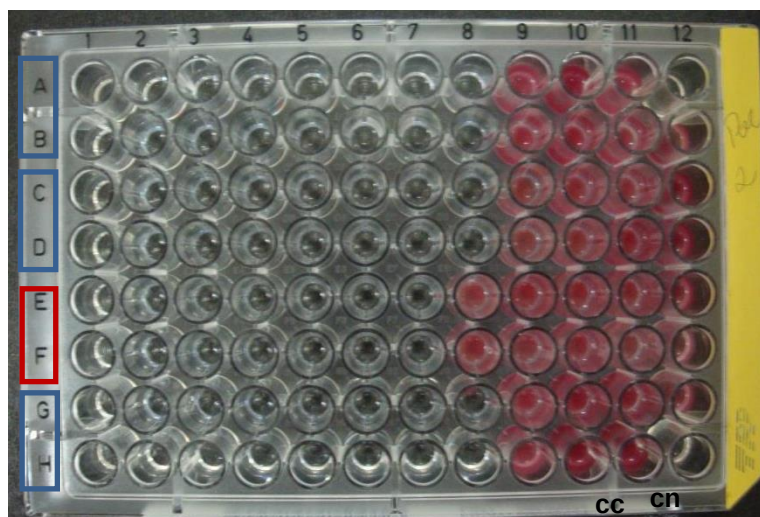


Figura 13 – Leitura das CIMs frente polimixina B

Isolados A/B, C/D e G/H = 2 μ g/mL;

Isolado E/F = 4 μ g/mL

Os *breakpoints* clínicos e critérios de interpretação da CIM da tigeciclina para *Enterobacteriaceae* foram aplicados, segundo o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST, 2011). Devido a ausência de *breakpoints* universalmente aceitos para polimixina B para as interpretações de suscetibilidade contra *Enterobacteriaceae*, os *breakpoints* para *Acinetobacter* spp. foram usados como comparação (≤ 2 μ g/mL para sensibilidade), de acordo com o documento M100-S22 (CLSI, 2012a).

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise bivariada foi conduzida para determinar a associação entre fatores de risco potenciais e a presença de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase. As variáveis categóricas foram comparadas usando-se o teste exato de Fisher ou o teste qui-quadrado, quando apropriado. Odds ratio (OR) e intervalos de confiança de 95% (IC) foram calculados para avaliar a força de qualquer associação. As variáveis contínuas foram comparadas pelo teste t de Student, após checagem de normalidade (Shapiro-Wilk and Liliefors). A análise multivariada foi realizada usando-se regressão logística. Variáveis para os quais os valores de p foram $\leq 0,20$ na análise bivariada foram incluídas em um modelo multivariado. Na análise estatística, variáveis com $p \leq 0,05$ foram consideradas significantes. A análise de regressão

logística foi usada para determinar quais variáveis foram independentemente associadas com a colonização ou infecção por *K. pneumoniae* produtora de KPC. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL), versão 20.0.

3.5. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho fez parte de um projeto, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Urgências de Goiânia, atendendo a resolução 196/96, sob o protocolo CEP/HUGO/SES N° 084/08 (ANEXO 1a).

Quanto à formulação do termo de consentimento livre e esclarecido, a mesma não se fez necessária, após esclarecimentos dos objetivos do trabalho. Este se tratou de um estudo observacional retrospectivo de dados demográficos e clínicos de pacientes hospitalizados, infectados ou colonizados por isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase, micro-organismos manipulados posteriormente à liberação dos resultados microbiológicos (ANEXO 1b).

4. PUBLICAÇÕES

Artigo 1 – Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring multiple phenotypes of β -lactamases from urgency and emergency hospital of Goiânia, Goiás, Brazil

Autores: Cláudia Castelo Branco Artiaga Kobayashi, Aysha Jussara Ivonilde Carrim, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira, Geraldo Leal Sadoyama, José Daniel Gonçalves Vieira and Fabiana Cristina Pimenta

Revista: Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Qualis B2) (Aceito)

Artigo 2 – *In vitro* activity of polymyxin B and tigecycline against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from hospitalized patients at a tertiary-care hospital

Autores: Kobayashi, C. C. B. A.; Carrim, A. J. I., Sadoyama, G.; Vieira, J. D. G., Pimenta, F. C.

Revista: Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (Qualis B3) (A ser submetido)

Artigo 3 – Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections or colonization in hospitalized patients at a tertiary-care hospital

Autores: Kobayashi, C. C. B. A., Carrim, A. J. I., Sadoyama, G., Vieira, J. D. G., Pimenta, F. C.

Revista: The Brazilian Journal of Infectious Diseases (Qualis B2) (Submetido)

Artigo 1

CARBAPENEM-RESISTANT *Klebsiella pneumoniae* ISOLATES HARBORING MULTIPLE PHENOTYPES OF B-LACTAMASES FROM URGENCY AND EMERGENCY HOSPITAL

Cláudia Castelo Branco Artiaga Kobayashi^{1,2}, Aysha Jussara Ivonilde Carrim³, Bruno Francesco Rodrigues de Oliveira³, Geraldo Sadoyama Leal⁴, José Daniel Gonçalves Vieira³ & Fabiana Cristina Pimenta³

¹Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

²Hospital de Urgências de Goiânia, Goiás, Brasil.

³Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

⁴Universidade Federal de Goiás-Campus Catalão, Goiânia, Goiás, Brasil

Address correspondence to:

Dr. José Daniel Gonçalves Vieira. Instituto de Patologia Tropical, Universidade Federal de Goiás. Rua 235 s/n, Laboratório de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia, Sala 418, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brasil

Fone: 62-3209-6361; Fax: 62-3209-6363

E-mail:

jdgvieira62@yahoo.com.br

Abstract

The rapid spread of *Kebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to carbapenems has become an emerging public health problem, due to its potential threat to reducing therapeutic option of serious nosocomial infections. Carbapenems-resistant *K. pneumoniae* from patients admitted to a public hospital in Goiânia, in 2010 and 2011, were tested for production of carbapenemases using modified Hodge test. Twenty-seven positive carbapenemase isolates were subjected to other phenotypic tests to investigate the associations of main mechanisms of resistance to β -lactams, including KPC-type, ESBL, M β L and AmpC β -lactamases. Reduced

carbapenem susceptibility was verified in 8.06% out of total *K. pneumoniae* isolated in years 2006 to 2011. The carbapenemase production was observed as growing increase in 2010 (19.71%) and 2011 (21.65%) compared to the previous periods (0.65% in 2006 and 1.03% in 2009). Of the 27 carbapenemases producers, 77.78% were considered KPC-type β -lactamase, 37.04% demonstrated the simultaneous production of plasmidial AmpC and KPC, 29.63% association with M β L or ESBL and KPC, 11.11% M β L/ESBL/KPC and 7.41% M β L/ESBL/KPC/plasmidial AmpC. The identification of different resistance mechanisms among carbapenemases-producing isolates will help to determine the epidemiology, appropriate therapeutic strategies and immediate proposals to control of infection and spread, considering the emerging nature of this microorganism.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*, β -lactamases phenotypes, carbapenemases-producing clinical isolates

Introduction

The antibiotic selective pressure, particularly of carbapenem, has caused the *in vivo* development of resistance to this antimicrobial under by acquisition of the carbapenem-hydrolyzing enzyme gene (metallo- β -lactamases (M β LS) and serine carbapenemases)^{8,46}. Besides, this phenomenon is associated with a mechanism of enzymatic resistance due to extended spectrum β lactamases enzymes (ESBL) and overproduction of AmpC β -lactamases (cephalosporinases) associated with loss of outer membrane porins¹⁵. The widespread use of carbapenems as effective therapeutic option of infections caused by ESBLs and AmpC β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae*⁵³, has been contributed to unfavorable clinical outcomes, impacts the utilization of hospital resources, increase the burden of effective infection control practice and the overall health economic cost²⁹.

The horizontal transfer within *K. pneumoniae* strains has been provided very efficiently by KPC genes that have different mobility ability⁴⁵. This transmissibility of resistance determinants mediated by plasmids, transposons and gene cassettes has contributed to the increase of carbapenem resistance by *Enterobacteriaceae*⁴⁷. A rapid and global dissemination of strains carrying plasmid-encoded *ampC* genes, M β L and Ambler class A serine carbapenemases, especially *Klebsiella pneumoniae*

carbapenemases (KPCs) producing-variants has been associated with multiple antibiotic resistance¹⁶. It might interfere in the therapeutic and infection-control processes, particularly involving KPC and M β L producing strains, because they exhibit an unrivaled resistance spectrum to carbapenems, as well as several other classes of antimicrobial agents, reducing or leaving no option for treatment of serious infections caused by carbapenemase-producing isolates^{16,35}.

The resistance to carbapenems in *Enterobacteriaceae* family should be under constant observation, particularly KPC-type, because most of KPC-associated enterobacterial infections are hospital-acquired³⁷, specially systemic infections and device-associated infections, particularly catheter-associated urinary tract infections^{21,28}.

Detection is a challenge for clinical microbiologists because most of these carbapenemases confer only reduced susceptibility to carbapenems besides their possible coexistence with other β -lactamases⁴⁶. So, the early identification of carbapenem-resistant isolates by clinical microbiology laboratories is utmost importance in allowing adequate antimicrobial therapy to be initiated and in avoiding cross-transmission and it's critical for limiting the spread of this resistance mechanism⁴⁸, particularly in regions where the β -lactam resistance determinants are frequently detected among these *K. pneumoniae* isolates.

This study investigated the phenotypes of carbapenemases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* resistant to third generation cephalosporin and carbapenems and the phenotypic frequency of the others main β -lactamases associated with positive KPC isolates, in a tertiary-care hospital in Goiânia, Goiás, Brazil.

Material and methods

Nonrepeating clinical isolates were obtained from urine, blood, surgical site, skin and soft tissue, respiratory tract, body fluids and secretion in general from hospitalized patients at the tertiary-care public Brazilian hospital in Goiânia, Goiás. They were identified as *Klebsiella pneumoniae* by standard laboratory methods and studied in detail in periods 2010 and 2011 and compared with over the 4 year period (2006 to

2009). This study was approved by the Ethics in Research of the Emergency Hospital of Goiânia, in view of Resolution 196/96⁵, under the protocol N^o.084/08.

Species identification was confirmed by standard biochemical tests and MicroScan system when necessary. Each was reported to be resistant to imipenem and meropenem and multiple other antimicrobials by the clinical laboratory, where semi-automated systems MicroScan Walkaway (Siemens) and disk diffusion methods as described by Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) were used^{11,12}.

Klebsiella pneumoniae isolates with reduced susceptibility to ertapenem, meropenem or imipenem were tested for production of carbapenemases. The carbapenems were used as a screen for the presence of a carbapenemase, followed by the modified Hodge test for confirmation enzyme presence using ertapenem as the indicator drug¹⁰.

Phenotypic screening for KPC-type Ambler classes A carbapenemases was performed for 28 isolates exhibiting reduced susceptibility to carbapenems (MIC $\geq$ 2 µg/ml) by using the combined disk test with meropenem, ertapenem and ceftazidime with and without 3-aminophenylboronic acid⁴⁸.

Among *K. pneumoniae* strains showing a reduced susceptibility to carbapenems, 28 were also tested to additional antimicrobial testing to phenotypic detection of β-lactamases. It's was realized using specific tests for screening and confirmatory using ceftazidime plus cefotaxime disks, both with and without clavulanate for ESBL¹¹ and the double-disk approximation test¹³, besides metallo β-lactamase production screening by the imipenem-etilenodiaminotetracetic acid (EDTA) double-disk synergy test⁵⁴. The ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) was used to confirm the presence of inducible AmpC β-lactamases enzymes, among *Klebsiella pneumoniae* strains⁷ and combination-disk test with 3-aminophenylboronic acid and cefoxitin to detect plasmid-mediated class C β-lactamase⁴⁴.

Quality control was performed in susceptibility assays and phenotypic confirmatory test with *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 and BAA 1705 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Results

A total of 1377 (54.67%) *K. pneumoniae* isolates were detected among 2519 *Enterobacteriaceae* collected in 2006 to 2011, being 1045 considered multiresistant (75.89%). Seventy five percent (1037) of these study strains demonstrated resistance to one or more agents in cephalosporin subclass III (cefotaxime or ceftriaxone).

Reduced carbapenem susceptibility was verified in 8.06% out of total *K. pneumoniae* isolated in years 2006 to 2011, initially detected in 12 isolates among 938 evaluated. They were isolated in the 2006 (4/2.61%), 2007 (1/0.37%) and 2009 (7/2.40%) period, except for 2008. This phenotype of resistance has been recovered in the growing frequency from 2010 and 2011. Forty five (21.63%) isolates were recovered in this period among 208 *K. pneumoniae* strains in year 2010 and 54 (23.38%) of 231 in 2011. The temporal distribution of the carbapenem resistant *K. pneumoniae* isolates among various hospital services over the 6 year period is summarized in Figure 1.

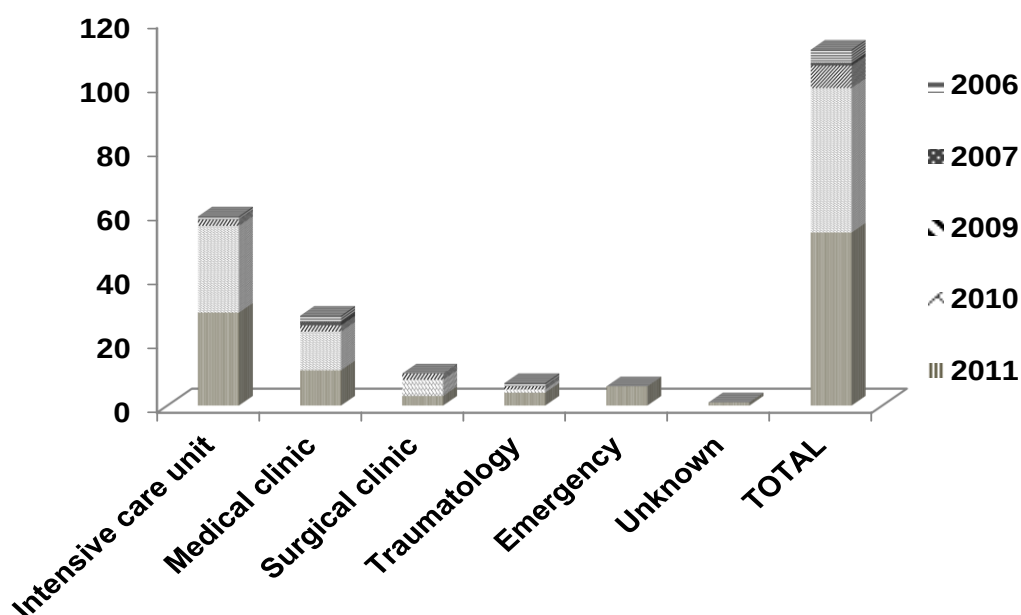


Figure 1. Temporal distribution of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* by hospital service during 2006-2011

Ninety-five strains were carbapenemase-producing, showing an overall prevalence of 6.9% in phenotypic screening for production of carbapenemases, among 1377 isolates. We observed a growing increase in the percentage of isolation {1 (0.65%) in 2006 and 3 (1.03%) in 2009}, compared to the subsequent periods: 41 (19.71%) in 2010 and 50 (21.65%) in 2011 (Figure 2).

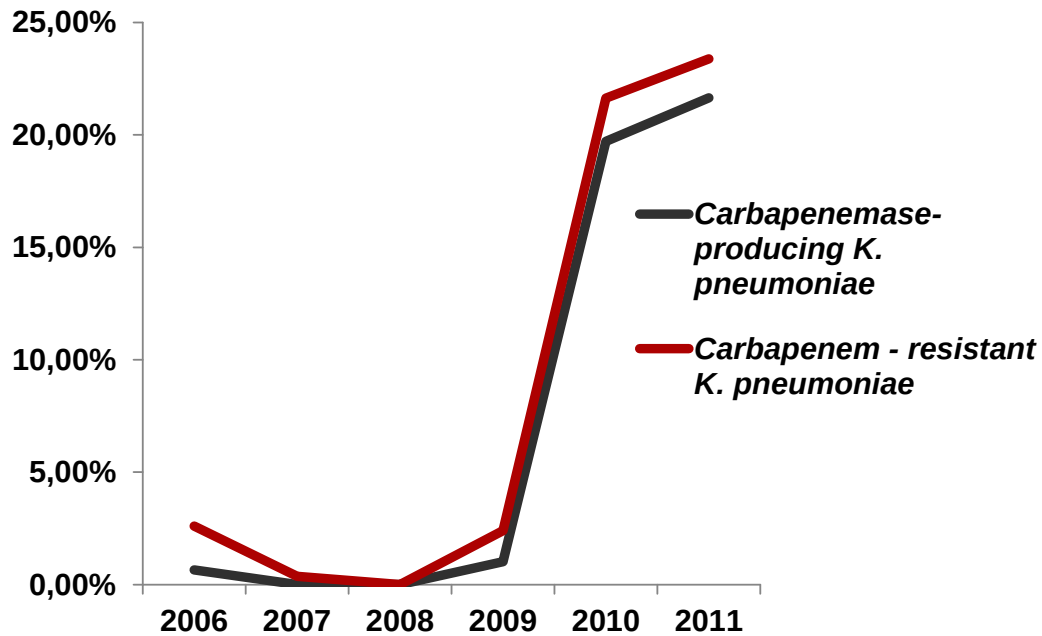


Figure 2. Carbapenem-resistant and carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in period of 2006 to 2011

The majority of these positive isolates were obtained from urine specimens (38; 40.0%), respiratory tract (26; 27.37%) and blood (14; 14.74%). Fifty three of 95 strains (55.79%) were isolated from patients admitted to intensive care unit, with most of isolation in the urine (45.28%) and respiratory tract (33.96%), superior to 23 (24.21%) strains isolated in medical wards patients that were from urine (43.48%), blood and respiratory tract (21.74%), respectively (Figure 3).

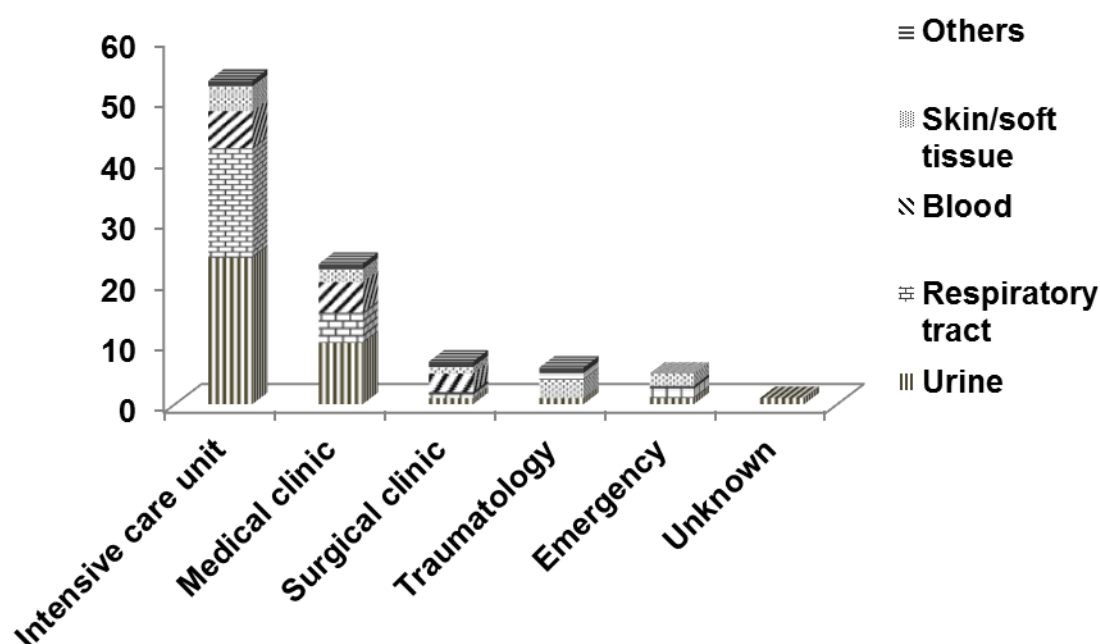


Figure 3. Distribution of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* by hospital service and clinical specimens during 2006 - 2011

Three isolates tested positive for carbapenemase production with susceptibility to imipenem in three isolates and meropenem for two. While eight showed Hodge test negative, despite resistance to ertapenem in all isolates, meropenem for six strains and to imipenem for four.

Despite all of the isolates were resistant to oxyimino cephalosporins, fourteen (50.0%) were inferred to produce an positive confirmatory test for ESBL in phenotypic detection of β -lactamases of 28 isolates tested intermediate or resistant to one or more carbapenems, 51.85% among 27 carbapenemase-producing isolates.

Twenty-one (77.78%) isolates were screened for the presence of KPC-type β -lactamase with 3-aminophenyl boronic acid when combined with meropenem, ertapenem or ceftazidime (Figure 4a).

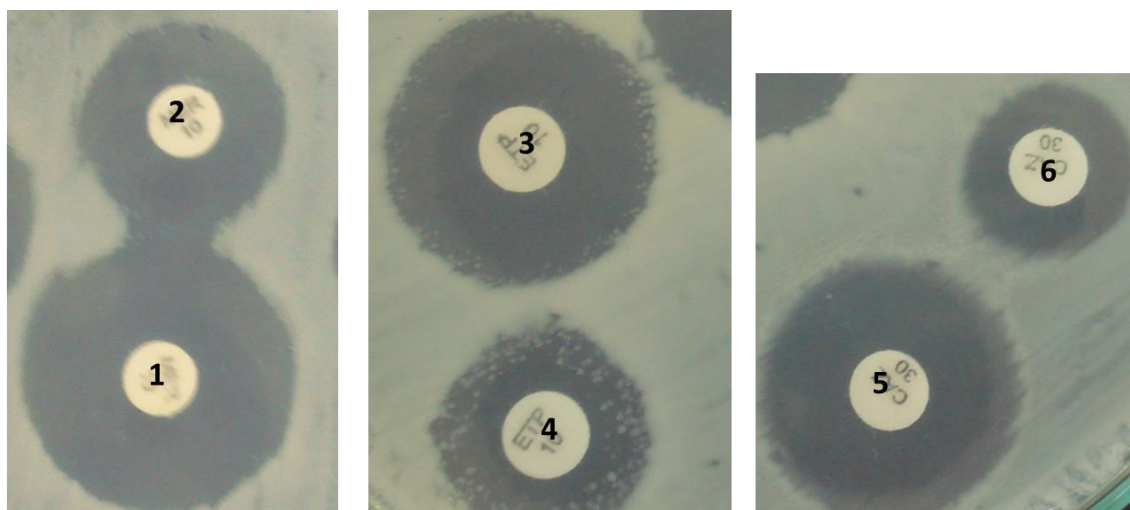


Figure 4a. Positives isolates for KPC-type β -lactamase with 3-aminophenyl boronic acid when combined with meropenem, ertapenem or ceftazidime. 1: Meropenem with boronic acid; 2: Meropenem; 3: Ertapenem with boronic acid; 4: Ertapenem; 5: Ceftazidime with boronic acid; 6: Ceftazidime

Four (14.82%) isolates were positive only with this simple disk-based method. Ten (37.04%) out of the 27 carbapenemase positive isolates were produced AmpC and KPC, eight (29.63%) M β L associated with KPC or ESBL + KPC. Three (11.11%) isolates have presented KPC, M β L and ESBL. Two isolates (7.41%) were positive for all beta-lactamases phenotypes, including plasmid-mediated class C β -lactamase (Figure 5).

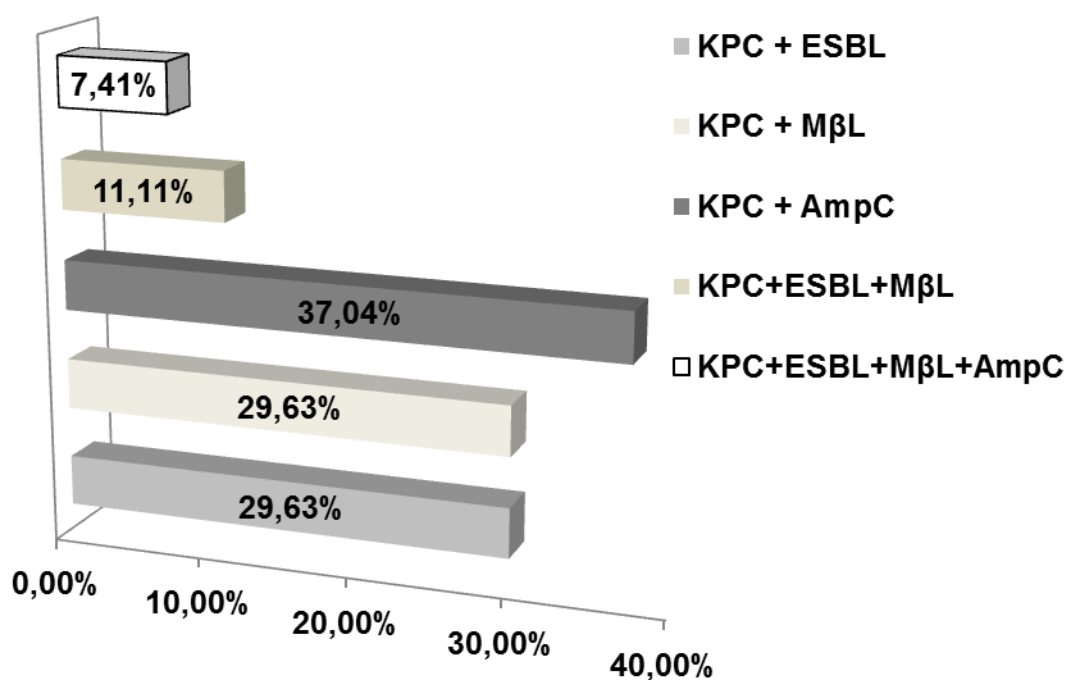


Figure 5. β -lactamases phenotypes associated with positive KPC isolates

The imipenem-EDTA double-disk synergy test was positive for 10 (37.04%) carbapenemase-producing strains (Figure 6).

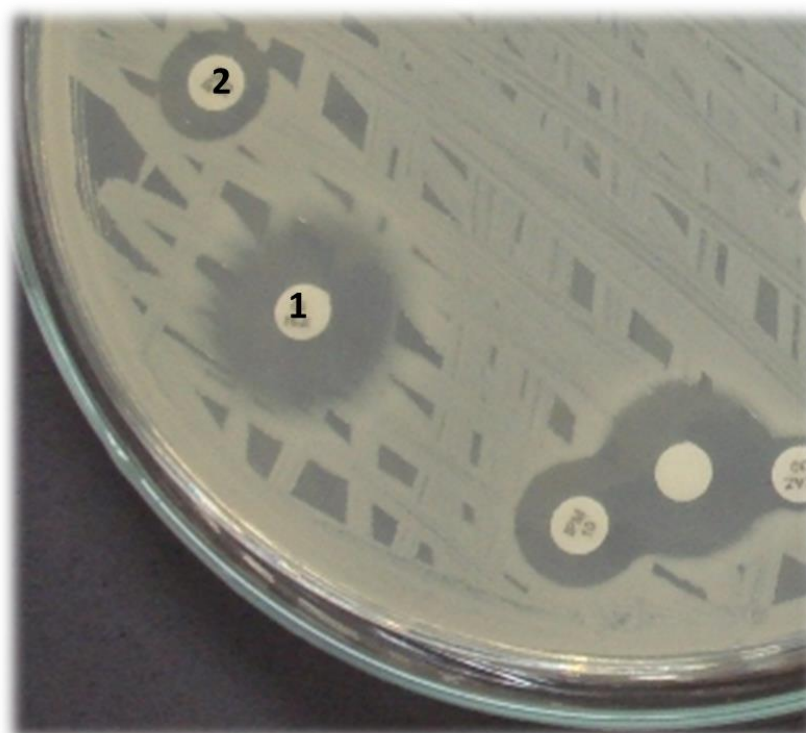


Figure 6. Positive screening to metallo β -lactamase in *K. pneumoniae* isolate.
 1: Imipenem with EDTA; 2: Imipenem

Twenty-two (81.48%) isolates had produced inducible AmpC β-lactamases. Fourteen cefuroxime-resistant strains (14/27) were negative for ESBL; ten of them (71.43%) showed evidence of inducible AmpC β-lactamase production, as judged by the ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT). Eleven (40.74%) of 27 carbapenemases-producing isolates were plasmid-mediated class C β-lactamase producer in combination-disk test with 3-aminophenylboronic acid with cefoxitin, being five (45.45%) screened for the presence of extended-spectrum β-lactamase. Six (42.86%) out of 14 isolates negative for ESBL were positive for plasmidial AmpC β-lactamase production.

Among six of twenty-seven (22.22%) isolates producing other non-KPC broad-spectrum β-lactamases, 4 (66.67%) were producing only extended-spectrum β-lactamase (ESBLs), one (16.67%) producing plasmid-mediated class C β-lactamase associated with ESBL and one ESBL and MβL (16.67%). One (3.85%) out of the 26 ertapenem-resistant isolates (MIC ≥4 µg/ml) without KPC-type β-lactamase and negative screening for the presence of carbapenem-hydrolyzing activity was identified as MβL-producing strain.

Discussion

Nosocomially acquired carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates seems to have emerged at the investigated public hospital in 2006 and has been detected so far, particularly in year of 2010, when it had being realized confirmatory test for suspected carbapenemase production in *Enterobacteriaceae*. Pavez, Mamizuk, Lincopan³⁹ have presented evidence that KPC β-lactamase in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* strains has been emerging in Brazilian hospitals since at least 2005, in the southeastern region of Brazil and was later observed in other state of this region⁴⁰, besides of the northeastern³⁵ and southern regions⁵⁷.

Carbapenemase spread rapidly in the hospital becoming increasingly prevalent. This enzyme was showed by Navon-Venezia et al.³⁶ with the growing frequency in period of 2004 to 2006, when 45 isolates were tested positive in 2006 stand up to only six strains in 2004 and 2005, with annual proportion of this resistance mechanism of 0.4%, 0.7% e 3.1% in three years of study, similar to the first three years of the

present work. Gaibani et al.¹⁸ demonstrated a consistent increase in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* isolations monthly during their study period. In the same way, a dramatic rise in the number of *K. pneumoniae* isolates with increased MIC of imipenem (≥ 2 mg/L) starting in 2009 was revealed in the intensive-care units from two main public hospitals of the city of Padua, in North-East Italy (increase of 17 and 12% to 87% and 54% in two hospitals)⁴⁵.

Infections by imipenem-resistant *K. pneumoniae* have been increasing at a hospital in China since the first imipenem-resistant *K. pneumoniae* isolation from the neonatal ward in June 2006²². The increasing rate of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* had been estimated by Lopez et al.²⁷ in 2008 (32/208 - 15% prevalence) compared to 2007 (4/ 206 - 1.9% prevalence). Twenty-nine single-patient isolates of *K. pneumoniae* with decreased susceptibility to carbapenems were also identified by Perez et al.⁴¹, with 16 present at the tertiary-care hospital. Report of the overall prevalence of these microorganisms in the hospital of northern Greece showed an increase from 0% in 2003 to 38.3% in 2010⁵⁶.

Data from the *European Antimicrobial Resistance Surveillance Network* (EARS-Net, formerly EARSS) have been demonstrated rates of carbapenems-resistance among invasive *K. pneumoniae* infections of 43.5% in Greece, nowadays endemic for this pathogen; 17.0% in Cyprus; 1.3% in Italy; 1.2% in Belgium and below 1% in the other 23 reporting countries, including Sweden, Norway and United Kingdom¹⁷. The present study observed high frequency of carbapenem-resistant isolates since year 2010, showing an overall prevalence of 6.9% phenotypic screening for production of carbapenemases.

In this study, carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* were isolated mostly in the ICU. This finding is similar to other study in case of a seven-year research of the microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* endemic in tertiary-care hospital in northern Greece since 2006, where 27% of isolates derived, predominantly, from intensive care unit (ICU)⁵⁶. Data from the Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance¹⁹ had been showed that among *K. pneumoniae* blood isolates, carbapenem resistance increased

from <1% in 2001 to 37.1 - 45.0% in hospital wards and to 70.1% in intensive care units in 2010.

High frequency of carbapenemase-producing *Klebsiella* detected in ICU patients in tract respiratory and urine specimen has being speculate is related to the use of different invasive devices during the hospitalisation: urinary catheters for medical and surgical patients, many other devices (intubation tubes, surgical drains, intravascular devices) for ICU patients¹⁸. These sites of sample isolation of the infected patients also were verified by Lopez et al.²⁷. Furthermore, the finding of KPC mediated resistance in no-ICUs highlights to subsequent dangerous possible spreading to the community⁴⁵.

The present study demonstrated the susceptibility among isolates tested positive for carbapenemase production and resistance to ertapenem among isolates exhibiting negative test Hodge. McGettigan et al.³² showed that 12% of KPC-positive *K.pneumoniae* isolates by the modified Hodge test were susceptible to meropenem, when tested by the disk diffusion method. Current evidence suggests that the significance and prevalence of carbapenemases may be clinically unrecognized⁴⁹. This is due to the fact that KPC carbapenemases may not confer resistance to carbapenems but only reduced susceptibility, and also to the fact that most KPC producers are ESBL producers leading to their misidentification as ESBL-producing strains³, besides an inoculum effect for some isolates in the low-inoculum type tests employed by some automated systems⁶.

Regarding resistance to ertapenem among isolates without KPC-type β -lactamase and with negative screening for the presence of carbapenem-hydrolyzing activity, according to the report by Woodford et al.⁵², this nonsusceptibility is not specific for carbapenemase production, especially when carbapenemase production is uncommon. Besides, *Enterobacteriaceae* with extended spectrum β -lactamases and porin mutations may also be ertapenem resistant³². However, this antimicrobial has been a more sensitive indicator of KPC resistance than meropenem and imipenem independently of the method used, including Microscan Autoscan and disk diffusion, although the use of criterion of a carbapenem MIC of >1 μ g/ml increase the sensitivity of detecting KPC-mediated resistance for carbapenems³. So, it is

suggested that clinical laboratories may consider using the ertapenem disc diffusion test routinely⁴⁰.

Fourteen *K. pneumoniae* isolates were inferred to produce a positive confirmatory test to ESBL among 28 tested to presence of β -lactamase, demonstrating the importance of confirmatory tests. This data suggest that a second level of investigation in most of isolates with resistance to oxyimino cephalosporins and reduced susceptibility to carbapenem is required to confirm and evaluate to the resistance mechanism to these β -lactamics.

ESBL- producing strains among *Klebsiella* clinical isolates tend to cause nosocomial outbreaks appear to be common in Latin American countries with prevalence of 45.4%⁵¹. Villegas et al.⁵⁰ demonstrated a high prevalence of ESBL producers isolates in Colombia (32.6%) and Meyer and Picoli³³ detected a greater frequency of ESBL (48.3%) in Brazil. ESBL production among isolates of *K. pneumoniae* in studies reviewed by Kelesidis et al.²³ ranged from 5.3% to 52.0%.

The simultaneous presence, following imipenem therapy, of an ESBL and a carbapenemase-producing isolates has been documented²⁰. The first detection of KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains in Brazil that also was coproduced an extended-spectrum β -lactamases (CTX-M-2) had described by Monteiro et al.³⁵. Mathers et al.³¹, before the first case of identification of *Enterobacteriaceae* resistant to carbapenems in 2007, through screening of clinical isolates of ESBL producers, detected 5.7% (16/280) of these carbapenemase-producing strains in the test of carbapenemase phenotype (Hodge modified), including four isolated from *K. pneumoniae*, all carriers of *blaKPC*.

Studies of Curiao et al.¹⁴ and Andrade et al.⁴ had been demonstrated the frequent association of ESBLs or metallo- β -lactamases (MBLs) with *K. pneumoniae* KPC producers. It seems to reflect acquisition of transmissible plasmids carrying *blaKPC* by local endemic strains or transmissible plasmids carrying *blaESBL* by epidemic clones of KPC producers¹⁴.

High frequency of carbapenemase (KPC and M β L) and carbapenemase not M β L was demonstrated, contrary to Meyer and Picoli³³ that showed two (3.4%) carbapenemase strains (1KPC and M β L e the other KPC with M β L and ESBL) in *Klebsiella pneumoniae* after phenotypic detection of β -lactamases of these isolates. KPC and M β L-producing (VIM-type) *K. pneumoniae* were isolated in 53% and 47%, respectively, with two clinical isolates carrying both KPC and VIM in a Greek tertiary hospital⁵⁶ and in Italy, where four KPC isolates were additionally positive for this metallo- β -lactamase⁴⁵.

Data from the present study may suggest an increased presence of the enzyme KPC in the hospital investigated. It has not been confirmed with PCR for gene *blaKPC*, method which has the advantage of confirming the type of enzyme carbapenemase found, considered a limitation of this study. Besides this, the frequent co-existence of an ESBL-type enzyme and M β L may contributing to different resistance patterns or the concurrent existence of several clones of carbapenemases-producing strains, another limitation of this research conducted in Goiânia, since the data of genetic relationships haven't been determined.

This study was the first report of isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from patients in Goiânia, Go, Brazil, whose first detection of this strain occurred in 2006. The detection of M β L-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates could be associated with high frequency of *Pseudomonas aeruginosa* strains and other nonfermentative species, endemic microorganisms at the hospital investigated²⁴. According to Castanheira et al.⁹, *Enterobacteriaceae* isolates are likely to have acquired metallo- β -lactamase-encoding genes from these strains that could be the primary reservoir for M β L-genetic elements.

High prevalence of inducible AmpC β -lactamases was detected, as plasmid-mediated. Because the chromosomal *ampC* genes are original deficient in *Klebsiella* spp it may be due to transfer of chromosomal *ampC* genes from particular organisms (*Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *C. freundii* and *Enterobacter cloacae*, besides *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Acinetobacter* spp), since some plasmid-mediated AmpC β -lactamases descend from chromosomal *ampC* genes, whose origins are the *ampC* genes of these phylogenetic groups^{26, 42}, which has been very

common in the institution analyzed. Plasmids containing derivatives of the chromosomally encoded AmpC cephalosporinases are becoming disseminated among enterobacteria, thus providing a new mechanism of resistance for those originally *ampC* deficient bacterial strains⁴³.

The prevalence (0.16%) of plasmid-mediated AmpC β-lactamases in *Enterobacteriaceae* isolates lacking an inducible chromosomal *ampC* gene at University Hospital in Switzerland was reported. Although *K. pneumoniae* has been considered putative *ampC* producers none carrying an *ampC* gene known to be plasmid-encoded were found¹. Alvarez et al.² reported that 8.5% of *K. pneumoniae* (64 strains) expressed plasmid-mediated AmpC β-lactamases from United States. Eighteen percent of *K. pneumoniae* (34 strains) from blood specimen recovered from patients, in United States hospitals, carrying plasmid-encoded *ampC* were described by Coudron et al.¹³. Forty plasmid-encoded *ampC* (identified as *blaDHA-1* and *blaCMY*) strains were detected in 75 positive ESBLs *K. pneumoniae* strains which were collected from several hospitals of South Korea from 2002 to 2003⁵⁵. Meyer and Picoli³³ detected a frequency of *ampC* plasmid/ESBL of 15.5%, in Porto Alegre, Brazil.

The high frequency of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase and AmpC plasmid/ESBL in current study could reflect epidemiologically important data that may explain failures in treatment of patients using third-generation cephalosporins³³. Three ESBL, carbapenemase KPC-2 and AmpC type-β-lactamases were reported by Jiang et al.²² in *K. pneumoniae* isolates obtained from hospital in China. High rates of ESBL and ESBL/AmpC lead to the therapeutic use of carbapenems, antimicrobial agents considered one of the few therapies for *Klebsiella* infections with this phenotype⁴⁶, consequently, the massive use of carbapenems creates selective pressure favoring the more resistant strains, such as carbapenemase producing (KPC and/or MβL)³³.

KPC-producing isolates were found to accumulate other β-lactam resistance enzymes, including AmpC in study of Molland et al.³⁴. Plasmid-mediated or chromosome-mediated AmpC β-lactamases can reduce the susceptibility to carbapenem accompanying decreased permeability of outer membrane protein²⁶ due

to loss of porins protein achieving clinically significant levels of resistance³⁰. The results of Jiang et al.²² showed that *K. pneumoniae* producing ESBL, carbapenemase KPC-2 and AmpC without the loss of porins induces low imipenem resistance, while *K. pneumoniae* that produces the listed above β -lactamases with the loss of porins results in high imipenem resistance.

The transferability of the resistance genes can cause nosocomial cross-infection and result in the dissemination of resistant strains, which is important challenge to the treatment of infection²⁶, since there might be serious risks involved in the selection of antimicrobial agents for the treatment of infections caused by these strains²⁵. Therefore, clinical microbiology laboratories should be able to detect them.

This study showed a high frequency of isolates producers of several β -lactamases and distinct carbapenem resistance mechanisms at hospital analyzed. This suggests the need of highly sensitive and specific methods and fully applicable for routine use in clinical microbiology laboratories, for detection of carbapenemases-producing *K. pneumoniae* isolates⁴⁸, especially KPC-type, the most common class A serine carbapenemase in these isolates³⁷, considered the enzymes most identified in institution.

The practical, highly specific and sensitive methods for the detection of KPC-possessing isolates are needed for regions where other carbapenem-resistant determinants are also prevalent. Detection of this carbapenemase could become cumbersome because carriage of these genes does not always confer obvious resistance¹³. Boronic acid tests using disks of ertapenem and meropenem was also highly sensitive in the detection of KPC producers⁴⁸. However, the synergism between 3-aminophenylboronic acid and disk with carbapenems, particularly ertapenem, that could lead to the false assumption of AmpC-type β -lactamase production, thereby underestimating the presence of KPC-type β -lactamase³⁸. A viable approach in identifying KPC-producing *K. pneumoniae* could be using the screening for ertapenem nonsusceptibility followed by confirmation with a disk potentiation test between ertapenem or meropenem and boronic acid, since the nonsusceptibility to ertapenem has been reported to be an excellent indicator of the presence of KPC-type β -lactamase with sensitivity exceeding 90%³.

The identification of resistance mechanisms will help to determine the epidemiology, risk factors and appropriate therapeutic strategies for carbapenem resistant isolates⁴⁰. Further studies to genetic analysis of *blaKPC* genes and risk factors which determine the emergence and dissemination of carbapenemase-producing *K. pneumoniae* in Goiânia hospitals and their impact on clinical and economic outcomes at such institution would be useful.

RESUMO

ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS PORTADORES DE MÚLTIPLOS FENÓTIPOS DE β -LACTAMASES DE UM HOSPITAL DE URGÊNCIA E EMERGÊNCIA EM GOIÂNIA, GOIÁS - BRASIL

A rápida disseminação de *Klebsiella pneumoniae* com sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos tornou-se um problema emergente de saúde pública, devido à sua potencial ameaça de reduzir as opções terapêuticas de infecções hospitalares graves. Isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos obtidos de pacientes internados em um hospital público de Goiânia, em 2010 e 2011, foram testados para a produção de carbapenemases pelo teste de Hodge modificado. Vinte e sete isolados carbapenemase positivos foram submetidos a testes fenotípicos para investigar as associações dos principais mecanismos de resistência aos β -lactâmicos (KPC, ESBL, M β L e AmpC). Suscetibilidade reduzida aos carbapenêmicos foi verificada em 8,06% do total de *K. pneumoniae* entre 2006 e 2011. A produção de carbapenemase foi observada com crescente aumento em 2010 (19,71%) e 2011 (21,65%), em comparação com os períodos anteriores (0,65% em 2006 e 1,03% em 2009). Dos 27 produtores de carbapenemases, 77,78% foram considerados β -lactamase KPC, 37,04% demonstraram a produção simultânea de AmpC plasmidial e KPC; 29,63% de M β L ou ESBL e KPC; 11,11% M β L/ESBL/KPC e 7,41% M β L/ESBL/KPC/AmpC plasmidial. A identificação dos diferentes mecanismos de resistência entre isolados produtores de carbapenemases ajudará a determinar a epidemiologia, estratégias terapêuticas apropriadas e propostas imediatas para controle de infecção e disseminação, considerando a natureza emergente deste micro-organismo.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Postgraduate Program in Health Sciences of Federal University of Goiás and Microbiology Department of the Laboratory of Clinical Analysis of tertiary care hospital investigated for all kind of facilities provided to us for this study.

References

1. Adler H, Fenner L, Walter P, Hohler D, Schultheiss E, Oezcan S *et al.* Plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking inducible chromosomal AmpC genes: prevalence at a Swiss university hospital and occurrence of the different molecular types in Switzerland. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 61: 457-58.
2. Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC β -lactamases in the United States. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 533-37.
3. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, Mcdougal LK *et al.* Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol.* 2007; 45: 2723–25.
4. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R *et al.* Dissemination of *blaKPC-2* by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55: 3579–83.
5. Brasil Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde, MS/CNS. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Disponível: <http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>.
6. Bratu S, Mooty M, Nichani S, Landman D, Gullans C, Pettinato B *et al.* Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 3018–20.
7. Cantarelli VV, Inamine E, Brodt TCZ, Secchi C, Cavalcante BC, Pereira FS. Utility of the ceftazidime-imipenem antagonism test (CIAT) to detect and confirm the presence of inducible AmpC beta-lactamases among *Enterobacteriaceae*. *Braz J Infec Dis.* 2007; 11: 237-39.
8. Carmeli Y, Akova M, Cornaglia G, Daikos GL, Garau J, Harbarth S *et al.* Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 16: 102-11.

9. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase and Metallo- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52: 570–73.
10. Clinical and Laboratory Standards Institute - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Nineteenth informational supplement. Wayne, CLSI, 2009. (CLSI document M100-S19).
11. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard. Eleventh Edition. Wayne, CLSI, 2012. (CLSI document M02-A11).
12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Twenty-second informational supplement. Wayne, CLSI, 2012. (CLSI document M100-S22).
13. Coudron PE, Hanson ND, Climo MW. Occurrence of extended spectrum and AmpC β -lactamases in bloodstream isolates of *Klebsiella pneumoniae*: isolates harbor plasmid-mediated FOX-5 and ACT-1 AmpC β -lactamases. *J Clin Microbiol.* 2003; 41: 772-77.
14. Curiao T, Morosine MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1608–14.
15. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 659-67.
16. Dugal S, Fernandes A. Carbapenem hydrolysing metallo β -lactamases: A review. *Int J Curr Pharm Res.* 2011; 3: 9-16.
17. European Centre for Disease Prevention and Control. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2010.
18. Gaibani P, Ambretti S, Berlinger A, Gelsomino F, Bielli A, Landini MP et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March – 30 September 2010. *Euro*

- Surveill. 2011; 16: pii=19800. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19800>
19. Greek System for the Surveillance of Antimicrobial Resistance. Available at: <http://www.mednet.gr/whonet>. Accessed 07 April 2012.
 20. Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y *et al*. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. *Int J Antimicrob Agents*. 2008; 31: 523–26.
 21. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 60-7.
 22. Jiang MJ, Zhao ShP, Li JM. Resistance of β -lactamase–producing *Klebsiella pneumoniae* to imipenem with Ompk36 loss. *Afr J Microbiol Res*. 2012; 6: 1312-17.
 23. Kelesidis T, Karageorgopoulos DE, Kelesidis I, Falagas ME. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 895–04.
 24. Kobayashi CCBA, Sadoyama G, Vieira JDG. Determinação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital público de Goiânia, Estado de Goiás. *Rer Soc Bras Med Trop*. 2009; 42: 404-10.
 25. Lee W, Jung B, Hong SG, Song W, Jeong SH, Lee K. Comparison of 3 Phenotypic-detection Methods for Identifying Plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* Strains. *Korean J Lab Med*. 2009; 29:448-54.
 26. Li JB, Cheng J, Yin J, Zhang XN, Gao F, Zhu YL *et al*. Progress on AmpC β -lactamases. *Curr Bioinformatics*. 2009; 4: 218-25.
 27. Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Bricenõ DF *et al*. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect*. 2011; 17: 52–6.
 28. Marchaim D, Navon-Venzia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species; emergence of KPC-carbapenemase, molecular

- characterization, epidemiology and outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2008; 52: 1413–18.
29. Marra AR, Wey SB, Castelo A, Gales AC, Cal RG, Filho JR *et al.* Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. BMC Infect Dis. 2006; 6: 24.
30. Marsik FJ, Nambiar S. Review of Carbapenemases and AmpC-beta Lactamases. Pediatr Infect Dis J. 2011; 30: 1094–95.
31. Mathers AM, Heather LC, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AKC, Carroll JW *et al.* Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* reveals intergenus KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. MBio. 2011; 2: e00204-11.
32. Mcgettigan SE, Andreacchio K, Edelstein PH. Specificity of ertapenem susceptibility screening for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. J Clin Microbiol. 2009; 47: 785-86.
33. Meyer G, Picoli SU. Fenótipos de betalactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. J Bras Patol Med Lab. 2011; 47: 25-31.
34. Molland ES, Hong SG, Thomson KS, Larone DH, Hanson ND. *Klebsiella pneumoniae* producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC β -lactamases. Antimicrob Agents Chemother. 2007; 51: 800–01.
35. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 333–34.
36. Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenemhydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenemresistant *Escherichia coli* clones in Israel. Antimicrob Agents Chemother. 2006; 50: 3098-01.
37. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. Lancet Infect Dis. 2009; 9: 228–36.
38. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M *et al.* *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. Emerg Infect Dis. 2008; 14: 1178–80.

39. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early Dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53: 2702.
40. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MCFG, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenemhydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumonia* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63: 265–68.
41. Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM *et al.* Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: impact of post-acute care facilities on dissemination. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65: 1807–18.
42. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2153–62.
43. Philippon A, Arlet G, Jacoby GA. Plasmid-determined AmpC-type β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 1-11.
44. Pitout JD, Le PG, Moore KL, Church DL, Gregson DB. Detection of AmpC β -lactamase in *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp., *Salmonella* and *Proteus mirabilis* in a region clinical microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect.* 2010; 18: 1469-71.
45. Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L *et al.* KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathogens.* 2012; 4:7.
46. Rodríguez-Avil C, Rodríguez-Avil I, Merino P, Picazo JJ. *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. *Clin Microbiol Infect.* 2012; 18: 61–66.
47. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. *JAMA.* 2008; 300: 2911-13.
48. Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Themeli-Digalaki K, Ikonomidis A, Petropoulou D *et al.* Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 2009; 47: 362–67.

49. Villegas MA, Lolans K, Correa A, Suarez CJ, Lopez JA, Vallejo M et al. First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006; 50: 2880–82.
50. Villegas MV, Correa A, Perez F, Miranda MC, Zuluaga T, Quinn JP et al. Prevalence and characterization of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* isolates from Colombian hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2004; 49: 217–22.
51. Winokur PL, Canton R, Casellas JM, Legakis N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin Infect Dis*. 2001; 32: S94–S103.
52. Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME et al. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29: 456–59.
53. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, Macdonald A et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother*. 2008; 62: 1261–64.
54. Yong D, Lee K, Yum JH, Shin HB, Rossolini M, Chong Y. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. *J Clin Microbiol*. 2002; 40: 3798-01.
55. Yum JH, Kim S, Lee H, Yong D, Lee K, Cho SN et al. Emergence and wide dissemination of CTX-M-type ESBLs, and CMY-2-and DHA-1-type AmpC β -lactamases in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Korean Med Sci*. 2005; 20: 961-65.
56. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill*. 2012; 17: pii=20088. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20088>
57. Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado ABMP, De Oliveira CRP, Superti SV, Pilger DA et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: A widespread threat in waiting? *Inter J Infect Dis*. 2010; 14: e539–e540.

Artigo 2

***In vitro* activity of polymyxin B and tigecycline against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* from hospitalized patients at a tertiary-care hospital**

**Cláudia Castelo Branco Artiaga Kobayashi^[1,2], Aysha Jussara Ivonilde Carrim^[3],
Geraldo Sadoyama Leal^[4], José Daniel Gonçalves Vieira^[3] & Fabiana Cristina
Pimenta^[3]**

^[1]Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil

^[2]Hospital de Urgências de Goiânia, Goiás, Brasil.

^[3]Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

^[4]Universidade Federal de Goiás-Campus Catalão, Goiânia, Goiás, Brasil

Address correspondence to:

Dr. José Daniel Gonçalves Vieira. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. Rua 235 s/n, Environmental Microbiology and Biotechnology Laboratory, Sala 418, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil.

Phone: 62-3209-6361; Fax: 62-3209-6363

E-mail:

jdgvieira62@yahoo.com.br

Abstract

Introduction: The recent emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* is becoming a challenging problem in infections, since this resistance limits therapeutic options for isolates expressing KPC-type serine carbapenemases. This study was conducted to evaluate the *in vitro* activity of tigecycline and polymyxin B against carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates obtained from clinical specimens of hospitalized patients. **Methods:** The *in vitro* activity of antimicrobials not commonly used as alternative therapy, along with tigecycline and polymyxin B, against carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolated from hospitalized patients at a public tertiary-care hospital in Goiânia, Brazil was evaluated, using the broth microdilution method. **Results:** Ninety-five (6.9%) carbapenemase-producing strains were detected among 1377 *K. pneumoniae* strains between 2006 and 2011, with high percentages of nonsusceptible isolates to fluoroquinolones (61.1% – 74.7%), aminoglycosides (52.1% – 54.3%), trimethoprim/sulfamethoxazole (47.3%), and polymyxin B (64.3%). Tigecycline was the only antimicrobial agent that inhibited 75.0% of these multidrug-resistant strains; this efficacy was, followed by that of tetracycline (62.1%). **Conclusions:** The high rates of polymyxin B-resistant, carbapenemases producers represents a true threat of the emergence of multi- or pan-drug-resistant bacteria, a particular concern in view of clinical and epidemiological considerations, as well as health care costs. The increasing prevalence of polymyxin resistance and the emergence of reduced susceptibility to tigecycline in nosocomial strains of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* underscores the importance of appropriate antimicrobial therapy guided by *in vitro*-based susceptibility in the interpretative criteria from the current guidelines.

Keywords: carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, tigecycline, polymyxin B

Introduction

The recent emergence of carbapenem-resistance *Klebsiella pneumoniae* strains^{1;2;3;4} is becoming a challenging problem in infectious diseases, especially for clinical therapies, which are limited for *K. pneumoniae* isolates expressing *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC)^{5;6}. This is due to a lack of active antimicrobial agents as a result of broad-spectrum antimicrobial resistance, including resistance to fluoroquinolones, aminoglycosides, and β -lactam classes^{5;7}.

Thus, antimicrobials, such as polymyxins and tigecycline, and/or various combinations of antibiotics that demonstrate *in vitro* activity, including a broad-spectrum β -lactams, at pharmacodynamically optimized doses have now become a mainstay of treatment for infections by KPC-producing *K. pneumoniae*⁵.

Polymyxin is a long-standing antibiotic that is still required now that the prevalence of multidrug-resistant (MDR) bacteria is increasing, and no new antimicrobial agents for MDR gram-negative bacteria are predicted to be developed for the next 10 years⁸. Likewise, the potential therapeutic use of tigecycline for the treatment of infections caused by carbapenemase-producing Enterobacteriaceae has been assessed⁹. However, elevated polymyxin minimum inhibitory concentrations (MICs) are being reported with increasing frequency for KPC-producing *K. pneumoniae* strains⁸, as are treatment-emergent increases in tigecycline MICs^{10;11}.

Given the increasing spread of plasmid-encoded *K. pneumoniae* carbapenemase in some states in Brazil¹², added to the challenge of treating infections by KPC-producing *K. pneumoniae*, the current study was conducted to evaluate the *in vitro* activity of tigecycline

and polymyxin B against this pathogen isolated from clinical specimens of hospitalized patients at a public tertiary-care hospital in Goiânia, Goiás, Brazil.

Methods

From January 2006 to December 2011, 95 non-repetitive carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates from different clinical specimens were obtained from patients admitted to various departments of a public hospital in Goiânia, Brazil, using the standard biochemical tests and MicroScan Walkaway systems (Siemens), when necessary. All isolates were categorized according to susceptibility to antimicrobial agents by disk diffusion, as suggested by the CLSI¹³.

MIC were determined by the broth microdilution method using tigecycline and polymyxin B to test and report 28 non-repeating carbapenem-resistant isolates that produced carbapenem-hydrolyzing β -lactamases (metallo- β -lactamases [M β Ls] and/or KPC-type serine carbapenemases)¹⁴. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) tigecycline breakpoints for Enterobacteriaceae were applied for this antimicrobial agent¹⁵. Due to absence of universally accepted breakpoints for polymyxins, forward susceptibility interpretations against Enterobacteriaceae, the breakpoints for *Acinetobacter* spp were used as comparator (≤ 2 mg/L for susceptibility), according to the CLSI¹³.

This study was approved by the Ethics in Research Committee of the Emergency Hospital of Goiânia, in view of Resolution 196/96¹⁶, under the protocol N^o.084/08.

Results

As expected, results obtained by disk-diffusion and broth microdilution methods demonstrated very low rates of susceptibility to most antimicrobial agents tested among carbapenemase-producing isolates of *K. pneumoniae*. All isolates were resistant to cephalosporins and monobactam but showed varying levels of susceptibility to aminoglycosides and trimethoprim/sulfamethoxazole. Percentages of nonsusceptible isolates to the non- β -lactam drugs were as follows: fluoroquinolones (61.1% – 74.7%), aminoglycosides (52.1% – 54.3%), trimethoprim/sulfamethoxazole (47.3%), and polymyxin B (64.3%). Tigecycline was the only antimicrobial agent that inhibited 75.0% of these MDR strains, followed by tetracycline (62.1%). The antimicrobial susceptibility profiles for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains are shown in figure 1 and table 1.

All strains were resistant to ertapenem, while imipenem and meropenem remained active against 3.2% and 2.1% of the isolates, respectively, at the current CLSI susceptibility breakpoints⁶.

Discussion

This study demonstrated that the rates of resistance to most antimicrobial agents were very high among isolates of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, and that susceptibilities to aminoglycosides, tetracycline, and tigecycline were greater than 45.7%. This data is similar to previous studies, which have demonstrated susceptibility to antimicrobials, such as aminoglycosides, tigecycline, and colistin, that are not commonly used as an effective alternative therapies for the treatment of serious nosocomial infections caused by MDR-gram-negative organisms^{9;17;18}.

High percentages of nonsusceptible isolates to non- β -lactam drugs (gentamicin, 75.0%; amikacin, 81.3%; ciprofloxacin, 81.5%; trimethoprim/sulfamethoxazole, 81.5%, and tetracycline, 87.5%) had been reported by Cuzon et al.¹⁹, from 5 countries (France, Sweden, Greece, Colombia and Brazil). These MDR features were also shown by Souli et al.²⁰, in Athens, Greece, who described the susceptibility of 50 *K. pneumoniae* clinical isolates to amikacin (14.0%), minocycline (55.2%), and gentamicin (70.0%), which was considered the most active agent.

In a retrospective study of carbapenem-resistant *Klebsiella* of bacteriuria, gentamicin performed better at eradicating bacteriuria than polymyxin B or tigecycline¹⁸. This is because gentamicin is consistently the most active aminoglycoside against both VIM- and KPC-producing Enterobacteriaceae due to the concomitant presence of the *aac(6')-I* gene, conferring amikacin, tobramycin, and netilmicin resistance, with carbapenemase genes, mostly *blaKPC*²¹.

This work supported previous studies that showed sufficient *in vitro* activity of tigecycline against KPC-producing *K. pneumoniae*^{2;9;22}. However, if the breakpoints of the EUCAST (2011)¹⁵ are applied, 7 isolates would be considered to have intermediate susceptibility to tigecycline. Intermediate susceptibility to tigecycline was also detected by Woodford et al.²³, who investigated the United Kingdom's first 2 KPC-producing *K. pneumoniae* isolates.

Resistance to tigecycline is, regrettably, increasing in some geographical areas, such as Greece, only 15.4% of 50 KPC-producing *K. pneumoniae* strains isolated from Greece during the period from 2007–2008, showed an MIC of 2 mg/L or less²⁰. Tigecycline was active

against 46.9 % of the isolates in a collection of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae from the UK, using EUCAST interpretative criteria²⁴. This differed from the current study conducted in Goiânia, wherein tigecycline was the only antimicrobial agent that inhibited most of the isolates of *K. pneumoniae*. There is a large discrepancy between the different breakpoints for resistance that have been issued by the EUCAST and the US Food and Drug Administration (FDA), the latter being higher, thus resulting in higher rates of susceptibility²⁵.

Although tigecycline has been shown to have potent *in vitro* activity against KPC-producing bacteria, it is not indicated for the treatment of bloodstream infections caused by organisms with MIC values of 1 mg/L or more given the low mean peak serum concentrations that are achievable at recommended doses²⁶. Its use in urinary tract infections (UTIs) is also questionable due to low concentrations found in the urine^{6;27}, one of the collection site for KPC- producing strains isolation in this study. However, report of successful treatment of UTIs caused by MDR isolates using off-label –‘high-dose’- tigecycline have been published²⁸.

Thus, caution should be exercised since subsequent selection of tigecycline-resistant isolates may be possible as a result of suboptimal drug concentrations or poor penetration into anatomic sites. Clinicians should be aware of the potential occurrence of this treatment-emergent tigecycline resistance, especially when the urine is the main source of bacteria in the blood²⁷.

The tigecycline MICs observed among KPC-producing isolates would be especially useful in patients with infections due to pathogens with reduced susceptibility or resistance to polymyxin, such as those presented in this study.

The Center for Disease Control (CDC) has tested colistin against KPC-producing isolates, whose MIC (≤ 2 mg/L) were maintained in 91% of isolates². *In vitro* susceptibility to polymyxin B of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clinical isolates was more than 90% in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* clinical isolates in New York City⁸ and 93.3% in a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program⁹. Although the polymyxins tested in other studies are considered effective therapeutic alternatives, taking into account their potential toxicity and the need for association with another antimicrobial agent, thereby restricting their clinical use⁹, this antimicrobial showed limited activity against the carbapenemase-producing *K. pneumoniae* isolates analyzed in the present study.

Lee et al.⁸ reported polymyxin-resistant *K. pneumoniae* after monotherapy with polymyxin B (MICs to polymyxin B increased ≥ 21 - fold) in patients with bacteremia infected with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and who received therapeutic doses of polymyxin B, in a hospital in New York. The high rates of resistance to non- β -lactam agents, particularly polymyxin B, among carbapenemases producers represents a true threat of the emergence and rapid spread of multi- or pandrug- resistant bacteria²⁰, a particular concern in view of clinical and, epidemiological considerations, as well as health care costs.

With respect to carbapenems susceptibility, clinical data indicate that these antimicrobials may have some utility against carbapenemase-producing *K. pneumoniae*, particularly in monotherapy for KPC infections when MIC outcomes are 4 mg/L or less, or, preferably in combination treatment with another active agent (aminoglycoside, colistin or tigecycline), using high-dose prolonged infusion regimens^{21;29}.

Pertinent literature for individual patient cases reporting both specific treatments and clinical outcomes on the treatment of KPC-producing *K. pneumoniae* infections have verified that therapy with polymyxin combinations and tigecycline appear to have higher success rates⁵. Despite this, the increasing frequency of polymyxin resistance and the emergence of reduced susceptibility to tigecycline in MDR nosocomial strains of carbapenem-resistant *K. pneumoniae* underscore the importance of appropriate antimicrobial therapy, guided by *in vitro*- based susceptibility in the interpretative criteria from the current guidelines.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Goiás and Medical File Services and Statistic - SAME of tertiary- care hospital investigated for all types of facilities, provided to us for this study.

Abstract in Portuguese

Atividade *in vitro* de polimixina B e tigeciclina contra *Klebsiella pneumoniae* produtora de carbapenemase de pacientes internados em um hospital de cuidados terciários

Introdução: A emergência de *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos, nos últimos anos, está se tornando um dos problemas mais desafiadores em infecções, cujas opções terapêuticas são limitadas para os isolados expressando serina carbapenemases do tipo KPC. Este estudo foi conduzido para avaliar a atividade *in vitro* da tigeciclina e polimixina B frente aos isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de carbapenemase obtidos de espécimes clínicos de pacientes hospitalizados. **Métodos:** A atividade *in vitro* de

antimicrobianos não comumente usados como terapia alternativa e da tigeciclina e polimixina B contra *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase obtida de pacientes internados em um hospital público brasileiro de cuidados terciários, em Goiânia, foi avaliada, utilizando-se o método de microdiluição em caldo. **Resultados:** Noventa e cinco isolados produtores de carbapenemase (6,9%) foram detectados entre 1377 *K. pneumoniae* nos anos de 2006 a 2011, com altos percentuais de isolados não sensíveis às fluoroquinolonas (61,1% - 74,7%); aminoglicosídeos (52,1% - 54,3%), trimetoprim / sulfametoxazol (47,3%), e polimixina B (64,3%). A tigeciclina foi o único agente antimicrobiano que inibiu 75,0% dessas cepas multirresistentes, seguido da tetraciclina (62,1%). **Conclusões:** As altas taxas de resistência à polimixina B entre produtores de carbapenemase salienta uma real ameaça do surgimento de bactérias multi ou panresistentes, uma preocupação particular do ponto de vista clínico, epidemiológico e custos com cuidados de saúde. O aumento da prevalência e a emergência de resistência à polimixina e suscetibilidade reduzida à tigeciclina em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos ressalta a importância da terapia antimicrobiana apropriada, guiada por testes de suscetibilidade *in vitro* baseados em critérios de interpretação atualizados.

Palavras-chaves: *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase. Tigeciclina. Polimixina B.

References

1. Cai JC, Zhou HW, Zhang R, Chen CX. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 2014–2018.
2. Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53: 60–67.
3. Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 2702.
4. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9: 228–236.
5. Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 1119–1125.
6. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440–58.
7. Chmelnitsky I, Hermesh O, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Detection of aac(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. *J Antimicrob Chemother* 2009; 64: 718–722.
8. Lee J, Patel G, Huprikar S, Calfee DP, Jenkins SG. Decreased susceptibility to polymyxin B during treatment for carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1611–1612.

9. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo- β -lactamase-producing enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 570–573.
10. Rodríguez-Avial C, Rodríguez-Avial I, Merino P, Picazo JJ. *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. *Clin Microbiol Infect.* v. 18, n.1, p. 61–66, 2012.
11. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Eurosurveillance.* v. 17, n. 7, p. pii=20088. 2012. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20088>. Acesso em: 11 de mai. 2012.
12. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of *Klebsiella pneumoniae* clonal complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 3579–3583.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement. CLSI document M100-S22, Wayne, PA: CLSI; 2012a.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - Ninth Edition. CLSI document M07-A9, Wayne, PA: CLSI; 2012b.

15. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. EUCAST, Basel, Switzerland. 2011.
http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf (31 October 2012, date last accessed).
16. Brasil Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde, MS/CNS. Resolução n. 196, de 10 de outubro de 1996. Disponível:
<http://conselho.saude.gov.br/comissao/conep/resolucao.html>.
17. Gaibani P, Ambretti S, Berlingeri A, Gelsomino F, Bielli A, Landini MP, et al. Rapid increase of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in a large Italian hospital: surveillance period 1 March – 30 September 2010. Euro Surveill 2011; 16: pii=19800. Available online:
<http://www.erosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19800>.
18. Satlin MJ, Kubin CJ, Blumenthal JS, Cohen AB, Furuya EY, Wilson SJ, et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. Antimicrob Agents Chemother 2011; 55: 5893–5899.
19. Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase blaKPC-2 gene. Emerg Infect Dis 2010; 16: 1349- 356.
20. Souli M, Galani I, Antoniadou A, Papadomichelakis E, Poulakou G, Panagea T, et al. An outbreak of infection due to beta-lactamase *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Clin Infect Dis 2010; 50: 364-373.

21. Kosmidis C, Poulakou G, Markogiannakis A, Daikos GL. Treatment options for infections caused by carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *Eur Infect Dis* 2012; 6: 28–34.
22. Manoharan A, Chatterjee S, Madhan S, Mathai D. Evaluation of tigecycline activity in clinical isolates among Indian medical centers. *Indian J Pathol Microbiol* 2010; 53: 734-737.
23. Woodford N, Zhang J, Warner M, Kaufmann ME, Matos J, MacDonald A, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62: 1261–1264.
24. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents* 2011; 37: 415–419.
25. Giamarellou HH, Poulakou GG. Multidrug-resistant Gram negative infections: what are the treatment options? *Drugs* 2009; 69: 1879–1881.
26. Daly MW, Riddle DJ, Ledebor NA, Dunne WM, Ritchie DJ. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Pharmacotherapy* 2007; 27: 1052–1057.
27. Anthony KB, Fishman NO, Linkin DR, Gasink LB, Edelstein PH, Lautenbach E. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 567–570.
28. Cunha BA. Pharmacokinetic considerations regarding tigecycline for multidrug-resistant (MDR) *Klebsiella pneumoniae* or MDR *Acinetobacter baumannii* urosepsis. *J Clin Microbiol* 2009; 47: 1613.
29. Daikos GL, Markogiannakis A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems?, *Clinical Microbiology and Infectious*. v. 17, n. 8, p. 1135–1141. 2011.

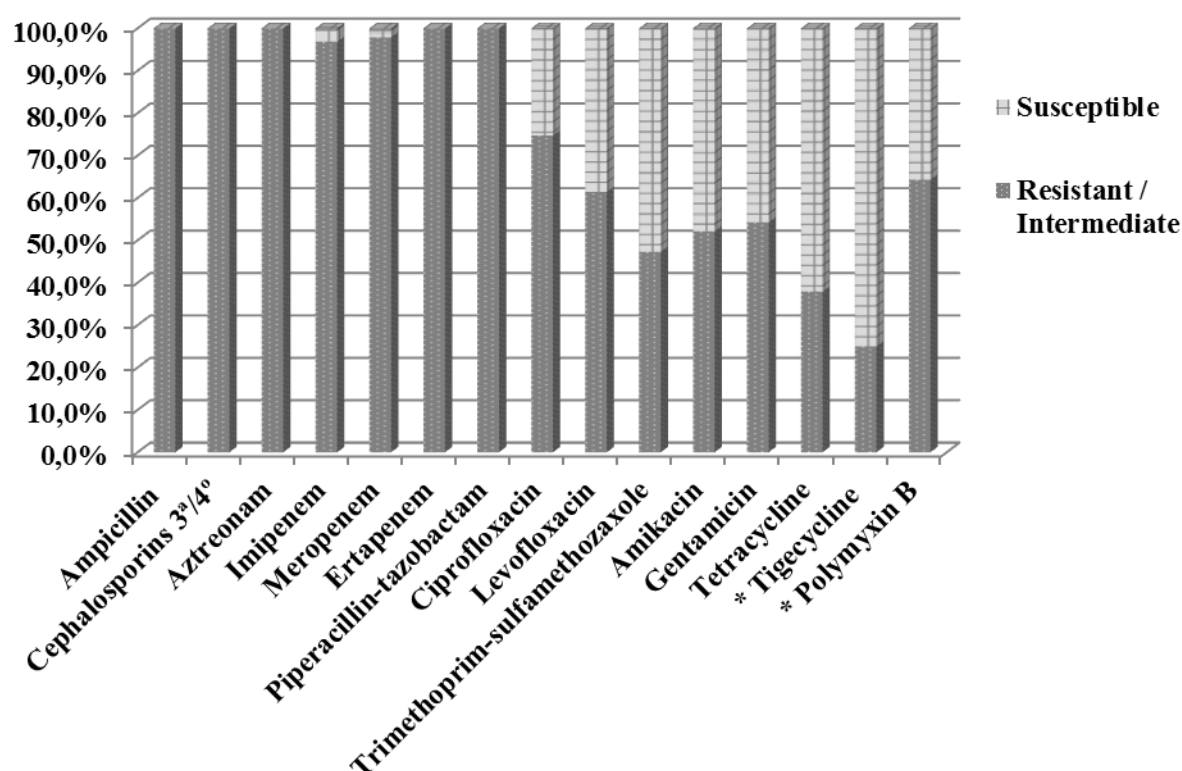


Figure 1. Susceptibility profile of the carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates at the current CLSI susceptibility breakpoint

*Minimum inhibitory concentrations for tigecycline and polymyxin B were determined by broth microdilution.

Table 1. Antimicrobial susceptibility profiles for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* strains against tigecycline and polymyxin B

Antimicrobial agents	MIC (mg/L)		
	MIC ₅₀	MIC ₉₀	Ranges
Tigecycline	1	2	0,5 - 2
Polymyxin B	4	32	2 - 64

Artigo 3

Risk factors associated with carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections or colonization in hospitalized patients

Cláudia C. B. Artiaga Kobayashi^{1,2}, Aysha J. I. Carrim³, Geraldo Sadoyama⁴, José Daniel G. Vieira³ & Fabiana C. Pimenta³

¹Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil,

²Hospital de Urgências de Goiânia-HUGO, Goiás, Brasil.

³Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás-IPTSP/UFG, Goiânia, Brasil.

⁴Universidade Federal de Goiás-Campus Catalão, Goiânia, Goiás, Brasil

Address correspondence to:

Dr. José Daniel Gonçalves Vieira. Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil. Rua 235 s/n, Environmental Microbiology and Biotechnology Laboratory, Sala 418, Setor Universitário, 74605-050 Goiânia, GO, Brazil.

Abstract

Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* is notorious because of their increasing prevalence and their ability to cause outbreaks, considered, therefore, one of the most dangerous pathogens since the widespread dissemination of this organism, as well as its resistance to most available antibiotics in particular to carbapenems. A retrospective case–control study was conducted to identify potential independent risk factors associated with colonization and/or infection by nosocomial carbapenemase *K. pneumoniae* strains isolated in Goiânia, Brazil. Case patients were defined like those with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* and control patient with carbapenem- susceptible *K. pneumoniae*. Independent risk factors for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* identified in multivariate analysis were found to be previous hospitalization ($p = 0.031$); previous use of carbapenems ($p = 0.041$) and use of ≥ 3 antimicrobial agents ($p = 0.034$). Specific attention should be given to infected patients, who are exposed to multiple antimicrobial classes and require long hospital stay, mainly unrecognized carbapenem-resistant *K. pneumoniae* colonized patients, considered a potential source for transmission.

Key words: carbapenemase- producing *Klebsiella pneumoniae*, risk factors

Introduction

Over the past decade, resistance to carbapenems has emerged and appears to be increasing among *Enterobacteriaceae* members particularly *Klebsiella pneumoniae* [1]. This pathogen, the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (carbapenem-hydrolysing β -lactamase and render them inactive) producer [2] have been considered a special concern of public health [3]. This problem is due to limited therapeutic options for treating infections due to KPC-

producing *K. pneumoniae* that harbour multiple resistance mechanisms associated with KPC-containing plasmids [4].

Carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CRKP) is notorious because of their increasing prevalence and their ability to cause outbreaks [5]. These KPC-producing bacteria are predominantly involved in nosocomial and systemic infections and have led to an increase in the number of publications concerning outbreaks caused by them [2,6-9]. Sporadic cases of *K. pneumoniae* KPC producers have been documented in Brazil [3,10-12].

KPC-carbapenemase-producing *K. pneumoniae* have been recovered from hospitalized patients with prolonged hospital stays (usually in intensive care units), transplantation, poor general health, travel to an endemic area, those given multiple antimicrobial drug courses and mechanically ventilated [13-15].

These infections with carbapenem-resistant organisms may require patients to receive additional treatment and impose extraordinary diagnostic, therapeutic and infection-control efforts that add significantly to the cost of healthcare [16-17]. Therefore, as KPC - *K. pneumoniae* has been considered one of the most dangerous pathogens since the widespread dissemination of this organism, as well as its resistance to most available antibiotics, in particular to carbapenems [18], the early identification of risk factors for hospital-acquired infection has to be considered the most important factor in controlling the spread of KPC- *K. pneumoniae* infections [19-20].

The aim of this study was to investigate the epidemiological characteristics of carbapenem-hydrolysing β -lactamase resistance phenotype in nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains

isolated in Goiânia, Brazil, comparing the features of case patients with those of control patients in order to identify potential independent risk factors associated with colonization and/or infection by carbapenemase-producing *K. pneumoniae*.

Methods

A retrospective case-control study was conducted at a 246 bed tertiary-care hospital in Goiânia, Go, Brazil, with approximately 59,949 annual admissions, 15,300 hospitalizations and 7,498 clinical microbiological cultures processed annually.

Patients with infections or colonization caused by carbapenemase-producing *K. pneumoniae* hospitalized during the period 1 January 2006 to 31 December 2011 were identified from the databases of the Microbiology Department of the Laboratory of Clinical Analysis of tertiary care hospital investigated. The study was approved by the local ethics review board under the protocol No.084/08.

For each patient with carbapenemase- producing *K. pneumoniae* (case patients), we selected a matched control patient from the pool of patients with carbapenem- susceptible *K. pneumoniae* to determine the factors associated with the isolation of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. We used a matching criterion to identify the appropriate control group to case patients, according to the site of infection or colonization (urine, blood, surgical site, skin and soft tissue, respiratory tract, body fluids and secretion in general) and temporal distribution of carbapenemase- producing *K. pneumoniae* by hospital service.

A case study patient was defined as a patient who was admitted to intensive care unit, medical and surgical clinics and emergency during the period from January 2006 to December 2011

and then became either clinically infected or colonized by carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. A control patient was defined as a patient admitted to the aforementioned units between the something periods, whose screening cultures were all negative for *K. pneumoniae* carbapenemase. These patients were retrospectively selected chosen at random from lists of patients meeting the criteria for each group.

Data regarding cases and controls were extracted from patients' medical charts. Parameters assessed included age and gender, underlying comorbid, ward and duration of hospitalization at isolation time and in ICU stay, site of first isolation, invasive procedures (central venous line and/ or urinary catheter), surgery, and mechanical ventilation, prior exposures to antimicrobial agent, and outcomes (in-hospital mortality).

K. pneumoniae strains identified by the clinical microbiology laboratory using standard biochemical tests and semi-automated systems MicroScan Walkaway (Siemens) and showing a reduced susceptibility to ertapenem, meropenem or imipenem by the disk diffusion method according to the Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI) guidelines [21-22] were included in this study. These isolates were tested for detection of carbapenemase production using the modified Hodge test (MHT) [21].

Positive isolates in the screening by the Hodge test, indicating the presence of a carbapenemase were collected and further evaluated in order to investigate the mechanism of resistance to carbapenems and were reviewed and analyzed as part of the carbapenem-resistant *K. pneumoniae* group. So, 68 patients who had an inpatient clinical culture positive for *K. pneumoniae* carbapenemase producer were eligible only once for inclusion.

Statistical analysis

Bivariate analysis was conducted to determine the unadjusted association between potential risk factors and the presence of carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. Categorical variables were compared using the Fisher's exact or the chi-squared test, as appropriate. Odds ratios (ORs) and 95% confidence intervals (CIs) were calculated to evaluate the strength of any association. Continuous variables were compared using the Student *t* test after checking normality (Shapiro-Wilk and Liliefors). Multivariable analysis was performed using forward stepwise multiple logistic regression. Variables for which the p -value ≤ 0.20 in the bivariate analysis were considered for inclusion in a multivariable model. In the statistical analysis, variables with $p \leq 0.05$ were considered significant. Stepwise multiple logistic regression analysis was used to determine which variables were independently associated with colonization or infection by KPC-*K. pneumoniae*. Goodness-of-fit was assessed by the Hosmer–Lemeshow test. Statistical analyses were carried out using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, Inc., Chicago, IL) for Windows, Version 20.0.

Results

Ninety-five (78.51%) *K. pneumoniae* strains showed a positive screening by the Hodge test, indicating the presence of significant carbapenem-hydrolyzing activity from a total of one hundred twenty-one isolates with a reduced susceptibility to ertapenem, meropenem or imipenem. Twenty-seven patients had repetitive clinical isolate, and therefore a total of 68 case patients with a single isolates who had an inpatient clinical culture positive for *K. pneumoniae* carbapenemase producer were included in this study, totaling 199 patients.

The bivariate analysis showed that potential risk factors under consideration as duration of previous hospitalization ($p = 0.04$); ICU stay ($p = 0.03$) and previous use of carbapenems ($p = 0.01$), β -lactams/ β -lactamase inhibitors ($p = 0.03$) and cumulative number of prior antimicrobial exposures of ≥ 3 antibiotics exposures were statistically significant. There were no differences in age, the presence of comorbidities (malignancy, liver disease, renal insufficiency, cardiopulmonary disease, infection by more than one multiresistant microorganisms, diabetes, and history of solid organ transplantation) and cephalosporin, aminoglycoside and fluoroquinolone use.

Independent risk factors for carbapenemase-producing *K. pneumoniae* identified by logistic regression analysis were found to be prolonged hospitalization (odds ratio [OR], 1.90; 95% confidence interval [CI]: 1.06-3.77; $p = 0.031$); previous use of carbapenems (OR, 1.91; 95% CI: 1.08–3.54; $p = 0.041$) and use of over three antimicrobial (OR, 2.01; 95% CI: 1.18-4.78; $p = 0.034$). The results of bivariate analysis of risk factors associated with carbapenemase-producing *K. pneumoniae* colonization or infection are shown in Table 1, while results from the multivariate analysis are given in Table 2.

Table 1. Bivariate analysis of risk factors for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection

Characteristic	Cases N = 68	Controls N = 131	p valor	³ OR ⁴ (95%IC)
Age, years (¹ x ± ² ds)	48.50 ± 19.99	47.66 ± 20.39	0.78	⁵ nc
Length of hospital stay (days) (x ± ds)	74.40 ± 118,39	51.47 ± 37,64	0.04	
Intensive care unit stay duration (days) (x ± ds)	46.03 ± 116.25	23.09 ± 22.98	0.03	nc
Gender (Male)	46	81	0.42	1.29 (0.67-2.51)
Comorbidities				
Cardiovascular	8	13	0.61	1.28 (0.45-3.54)
Diabetes mellitus	11	21	0.84	1.09 (0.45-2.59)
Renal	11	13	0.15	1.87 (0.72-4.81)
Presence of device				
Central venous catheter	57	93	0.06	2.01 (0.90-4.57)
Urinary catheter	63	114	0.23	1.88 (0.61-6.14)
Tracheotomy	57	98	0,17	1,69 (0,75-3,88)

Characteristic	Cases N = 68	Controls N = 131	p valor	³ OR ⁴ (95%IC)
Mechanical ventilation	56	94	0.12	1.79 (0.81-3.98)
Dialysis	15	10	0.00	3.42 (1.34-8.85)
Surgical procedure	48	92	0.96	1.02 (0.51-2.03)
Previous antibiotic exposure				
Cefepime	28	43	0.24	1.43 (0.75-2.74)
Third-generation cephalosporins	37	59	0.21	1.46 (0.78-2.74)
Fluoroquinolones	20	30	0.31	1.40 (0.69-2.86)
Aminoglycosides	16	18	0.08	1.93 (0.86-4.35)
Carbapenems	36	44	0.01	2.22 (1.17-4.23)
β -lactams/ β -lactamase inhibitors	38	52	0.03	1.92 (1.02-3.64)
Previous exposure to ≥ 3 antibiotic	49	61	0.00	2.96 (1.51-5.85)
Use of corticoids	38	56	0.08	1.70 (0.90-3.20)

Characteristic	Cases N = 68	Controls N = 131	p valor	³ OR ⁴ (95%IC)
Multidrug-resistant bacteria infections	39	70	0.07	0.42 (0.15-1.18)
Prognostic (death)	30	41	0.07	1.73 (0.91-3.32)

¹x = mean; ²ds = standard deviation; ³OR = odds ratio; ⁴IC = confidence interval; ⁵nc = no calculated

Table 2. Multivariate analysis for risk factors of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* colonization or infection

Characteristics	p; OR (95%IC)
Length of hospital stay	0.031; 1.90 (1.06-3.77)
Previous carbapenem exposure	0.041; 1.91 (1.08-3.54)
Previous exposure to ≥ 3 antibiotic	0.034; 2.01 (1.18-4.78)
Hosmer-Lemeshow test p=0.879	

Discussion

Carbapenem resistance among *K. pneumoniae* emerged five years ago, becoming a major challenge in antimicrobial resistance in institution analyzed. Infections due to this pathogen had been associated with numerous healthcare-related risk factors and with high mortality [13]. The study demonstrated that length of hospital stay; prior carbapenems use and previous administration of more than three antimicrobials were independent risk factors for isolation of carbapenemase- producing *Klebsiella pneumoniae* from colonized and/or infected patients.

Papadimitriou-Olivgeris et al., in multivariate analysis of the risk factors for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) enteric colonization at intensive care unit revealed that KPC colonization is associated with previous ICU stay, duration of previous hospitalization and previous use of carbapenems or β -lactams/ β -lactamase inhibitors [23], factors also demonstrated in bivariate analysis in the present study except by first. Differently, advanced age, mechanical ventilation, and previous exposure to ciprofloxacin were independently associated with increased risk for KPC in patients with *K. pneumoniae* bacteremia [1]. Like Papadimitriou-Olivgeris et al. [23] and unlike Tuon et al. [1], we found that exposure to a carbapenems was predictive of carbapenemse- producing *K. pneumoniae*.

Longer length of hospital stay has also been found to be an independent risk factor for multidrug-resistant organisms (MDROs) colonization or infections by relevant studies, including *K. pneumoniae* carbapenemase [13-14, 24-25]. *Klebsiella pneumoniae* is a microorganism whose major nosocomial reservoirs are contaminated medical equipment and surfaces, hands of health professionals and the patient's gastrointestinal tract [26-27]. This pathogen can survive or persist on inanimate surfaces even for months, and the surfaces can

thereby be a continuous source of cross transmission within an institution if no regular preventive disinfection is performed [26]. Thus, environment and surfaces colonization is an important risk factor for infection by multidrug-resistant KPC, since the prolonged stay increases the risk for colonization. Furthermore, the length of stay in the hospital may implicate in a longer exposure to potential risk factors since this environment is where antibiotic use is considerable and patients often remain or come from ICUs requiring mechanical ventilation and invasive devices [17].

In this work, some patients had a history of carbapenem use (40.2%) and 53.0% percent of the case patients have made previous use of the same. In one bivariate analysis 31.0% of the patients in carbapenem-resistant *K. pneumoniae* group received carbapenems prior to a positive culture, indicating that this class of antibiotic is associated with microorganism isolation [14]. The previous use of carbapenems can result an impact of resistance to this antimicrobial on the outcome of *K. pneumoniae* bloodstream infections, being considered strong prognostic factor for mortality among patients [28]. Breakthrough bacteraemias occurring during treatment with carbapenem had been associated in the bivariate analysis with preceeding use of more antibiotics (exposed to ≥ 3 drugs) ($p = 0.013$), especially carbapenems ($p < 0.001$), considered independent risk factor for KPC *K. pneumoniae* acquisition ($p = 0.008$) [29].

The association between carbapenem consumption and resistance has been previously documented [30]. The exposure to carbapenems highlights a serious clinical problem, since the carbapenems are recommended as the first-line antibiotics for severe infections by multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* (MDROs) [31]. High rates of MDROs, e.g. extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing bacteria, represent an indirect risk for the spread of

carbapenem resistance mechanisms because they are associated with an increased prescription of carbapenem to treat patients infected with these MDROs, resulting in an interminable cycle of antimicrobial use, antimicrobial pressure and high rates of antimicrobial resistance [32].

Despite risk factor study had demonstrated that prior exposure to fluoroquinolones was independent risk factor for CRKP infection [1,24], we did not obtain similar findings with this antibiotic classes tested. Our finding of no association of infection or colonization due to carbapenem-resistant *K. pneumoniae* with prior use of fluoroquinolones may be due to small sample size. In the carbapenemase- producing *K. pneumoniae* group, a trend of association among this antimicrobial use and infection/colonization was observed, but there was no significant difference.

The exposure to antimicrobials is among the most prominent risks [13-14,25,33-34]. The use of several classes of antimicrobials has been associated with carbapenem-resistant *K. pneumoniae* carriage or infection, including carbapenems [25], 3rd and 4th generation cephalosporins [13], fluoroquinolones [14,25], vancomycin [33], aminoglycosides and β -lactam/ β -lactamase inhibitors [35]. The previous therapy with over three antimicrobial was an independent risk factor associated with infection or colonization with KPC. The exposure to various antimicrobial agents can result in significant impact on the dynamics of patient's endogenous microbiota favoring infection or colonization by these multiresistant microorganisms. Furthermore, since the plasmids that confer carbapenem resistance frequently carry additional resistance determinants that confer cross-resistance to most other antibiotic classes, prior use of any antibiotic may select for a carbapenemase-producing bacteria [34]. Thus, the cumulative number of prior antibiotic exposures is also considered the most important factor determining risk for developing a CRE infection [36].

This study has some limitation. The kind of carbapenemase enzyme was not investigated by molecular epidemiology method using Polymerase Chain Reaction (PCR) for resistance genes. This fact could be pointed out as a limitation, considered the importance of identifying each specific carbapenemase, as the MICs vary with the type of this enzyme and may have an impact on treatment results. Moreover, the mechanisms of resistance differ among the CRKP isolates [24]. Distinct mechanisms of resistance to β -lactams, including KPC-type, ESBL, M β L and AmpC β -lactamases were detected in hospital investigated, including a combination of the production of an ESBL, metallo- β -lactamase and plasmidial AmpC β -lactamase (unpublished data). While resistant isolates may be phenotypically similar, risk factors and outcomes may differ according to the mechanism of resistance [14].

In this hospital in particular, KPC-producing *K. pneumoniae* strains spread fast and the isolation rate of these MDR bacteria is increasing. The recognition how common carbapenem-resistant *K. pneumoniae* is in our institution and their epidemiologically importance result in an opportunity to intervention, before these organisms are transmitted more widely. Thus, there is an urgent need to develop strategies for prevention and infection control. Specific attention should be given to infected patients, who are exposed to multiple antimicrobial classes and require long hospital stay, mainly unrecognized carbapenem-resistant *K. pneumoniae* colonized patients, considered a potential source for transmission [35]. In that respect, more intensive efforts should be applied to restrict the KPC-producing species. The appropriate management of antimicrobials as complementary to infection control measures might be most effective strategy to minimize the widespread presence of multidrug-resistant bacteria, principally if efforts are directed toward an overall decrease in antimicrobial use rather than targeting a specific antimicrobial class.

Acknowledgments

The authors would like to thank the Graduate Program in Health Sciences, Federal University of Goiás and Medical File Services and Statistic - SAME of tertiary care hospital investigated for all kind of facilities provided to us for this study.

References

1. Tuon FF, Rocha JL, Toledo P, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. *Braz J Infect Dis*. 2012; 16: 416–19.
2. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007; 20:440-58.
3. Leão RS, Carvalho-Assef APDA, Correal JCD, et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheterrelated infection *Clin Microbiol Infect* 2011; 17: 380–382.
4. Schwaber MJ, Carmeli Y. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: a potential threat. *JAMA* 2008a; 300: 2911–13.
5. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemaseproducing bacteria *Lancet Infect Dis*. 2009; 9: 228–36.
6. Richter SN, Frasson I, Franchin E, et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. *Gut Pathogens*. 2012; 4:7.

7. Robustillo Rodela A, Díaz-Agero Pérez C, Sanchez Sagrado T, et al. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. Euro Surveill. 2012;17: pii: 20086. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20086>.
8. Woodford N, Zhang J, Warner M, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom J Antimicrob Chemother. 2008; 62: 1261–64.
9. Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. Euro Surveill. 2012;17(7):pii: 20088. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20088>.
10. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, et al. Dissemination of *bla*KPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. Antimicrob Agents Chemother. 2011; 55: 3579–83.
11. Cuzon G, Naas T, Truong H, et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*KPC-2 gene. Emerg Infect. Dis. 2010; 16:1349–56.
12. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. Antimicrob. Agents Chemother. 2009; 53: 333–34.

13. Patel G, Huprikar S, Factor SH, et al. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:1099–106.
14. Schwaber MJ, Klarfeld-Lidji S, Navon-Venezia S, et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob Agents Chemother* 2008b; 52:1028–33.
15. Toye B, Krajden S, Fuxa M, et al. Carbapenem resistance in Canada. *CMAJ*. 2009; 180: 1225-26.
16. Giske CG, Monnet DL, Cars O, et al. Clinical and economic impact of common multidrug-resistant gram-negative bacilli. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 813–21.
17. Munoz-Price LS. Long-term acute care hospitals. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 438–43.
18. Carbonne A, Thiolet JM, Fournier S et al. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. *Euro Surveill*. 2010; 15: pii: 19734. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19734>
19. Lledo W, Hernandez M, Lopez E, et al. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. *MMWR*. 2009; 58: 256–60.
20. Schwaber MJ, Lev B, Israeli A, et al. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. *Clin Infect Dis* 2011; 52: 848–55.

21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - Ninth Edition: Approved Standard M07-A9. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012a.
22. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012b
23. Papadimitriou-Olivgeris M, Marangos M, Fligou F, et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. J Antimicrob Chemother. 2012; 67: 2976-81.
24. Falagas ME, Rafailidis PI, Kofteridis D, et al. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case control study. J. Antimicrob. Chemother. 2007; 60:1124–30.
25. Hussein K, Sprecher H, Mashiach T, et al. Carbapenem resistance among *Klebsiella pneumoniae* isolates: risk factors, molecular characteristics, and susceptibility patterns. Infect Control Hosp Epidemiol. 2009; 30: 666–71.
26. Kramer A, Schwebke I, Kampf G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. BMC Infectious Diseases. 2006; 6:130.
27. Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 53, n. 2, p. 818–820. 2009.
28. Ben-David D, Kordevani R, Keller N, et al. Outcome of carbapenem resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream Infections Clin Microbiol Infect. 2012; 18: 54–60.

29. Orsi GB, Bencardino A, Vena A, et al. Patient risk factors for outer membrane permeability and KPC-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolation: results of a double case-control study. 2012, 16. [Epub ahead of print. DOI 10.1007/s15010-012-0354-2].
30. Iosifidis E, Antachopoulos C, Tsivitanidou M, et al. Differential correlation between rates of antimicrobial drug consumption and prevalence of antimicrobial resistance in a tertiary care hospital in Greece. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2008; 29: 615-22.
31. Nadkarni AS, Schliep T, Khan L, et al. Cluster of bloodstream infections caused by KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* in Manhattan. *Am J Infect Control*. 2009; 37: 121-6.
32. European Centre for Disease Prevention and Control. Risk assessment on the spread of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae (CPE) through patient transfer between healthcare facilities, with special emphasis on cross-border transfer. Stockholm: ECDC; 2011.
33. Wiener-Well Y, Rudensky B, Yinnon AM, et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. *J Hosp Infect*. 2010; 74:344-49.
34. Brink A, Coetzee J, Clay C, et al. The spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in South Africa: Risk factors for acquisition and prevention. *S Afr Med J*. 2012; 102: 599-601.
35. Gupta N, Limbago BM, Patel JB et al. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. *Clin Infect Dis*. 2011; 53: 60-7.

36. Patel N, Harrington S, Dihmess A, et al. Clinical epidemiology of carbapenem-intermediate or -resistant *Enterobacteriaceae*. J Antimicrob Chemother. 2011;66: 1600-1608.

5 RESULTADOS E CONCLUSÕES

Em síntese, o estudo apresentou os seguintes resultados:

- ✚ A suscetibilidade reduzida ou resistência aos carbapenêmicos foi verificada em 8,01% do total de isolados de *K. pneumoniae* identificados entre 2006 e 2011;
A resistência aos carbapenêmicos foi verificada com frequência crescente, a partir de 2010, com concomitante aumento e ampla propagação da enzima carbapenemase entre os isolados de *K. pneumoniae*.
- ✚ A produção de carbapenemase foi verificada com crescente aumento em 2010 (19,71%) e 2011 (21,65%) em comparação com os períodos anteriores (0,65% em 2006 e 1,03% em 2009), com prevalência total de 6,90%. Entre os isolados produtores de carbapenemase, 77,78% foram considerados β -lactamase KPC, 37,04% demonstraram produção simultânea de AmpC plasmidial e KPC, 29,63% associação com M β L ou ESBL e KPC, 11,11% M β L/ESBL/KPC e 7,41% M β L/ESBL/KPC/AmpC plasmidial;
A alta frequência de isolados produtores de várias β -lactamases, assim como sua associação com distintos mecanismos de resistência no hospital investigado, pode resultar em infecção cruzada nosocomial, com consequente disseminação generalizada de isolados multi e panresistentes entre espécies distintas, um importante desafio do ponto de vista clínico e epidemiológico.
- ✚ Taxas de resistência muito elevadas aos antimicrobianos entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase foram demonstradas na instituição analisada. A tigeciclina foi o único antimicrobiano que apresentou atividade *in vitro* contra 75,00% dos isolados carbapenemase positivos, diferentemente da polimixina B, cuja resistência foi demonstrada em 64,30% destes isolados.
A boa atividade *in vitro* da tigeciclina frente *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase pode predizer uma terapêutica alternativa efetiva. A alta frequência de resistência à polimixina B e a suscetibilidade reduzida à tigeciclina em isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase ressalta a

importância da terapia antimicrobiana apropriada, guiada por testes de suscetibilidade *in vitro*, baseados em critérios de interpretação, segundo *breakpoints* atuais.

- ✚ Os fatores de risco independentes para infecção ou colonização por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase foram tempo de hospitalização prolongado (p : 0,031), uso prévio de carbapenêmicos (p : 0,041) e exposição a três ou mais antimicrobianos (p : 0,034).

Dada a importância epidemiológica para a instituição investigada, atenção especial referente às estratégias de controle de infecção e prevenção deve ser dada aos pacientes infectados, expostos a múltiplas classes de antimicrobianos e que necessitam de internação prolongada e, principalmente aos pacientes não reconhecidamente colonizados, considerados uma fonte potencial de transmissão.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Klebsiella pneumoniae carbapenemase consiste em um importante desafio para os estabelecimentos de saúde, devido à sua difícil detecção laboratorial. Esta dificuldade resulta em implicações relevantes quanto ao manejo terapêutico e controle de infecção. Identificar os principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos representa, portanto, um elemento essencial no controle da propagação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de carbapenemase.

A identificação de KPC no hospital de estudo, salienta a importância da realização de culturas clínicas e de uma vigilância contínua para detecção de pacientes de alto risco de colonização, uma vez que desempenham um importante papel epidemiológico na cadeia de transmissão deste micro-organismo multirresistente. Para tanto, a implantação de protocolos definidos, padronizados e atualizados para a adequada detecção laboratorial de carbapenemases, assume especial importância quanto à determinação da prevalência real de isolados produtores desta enzima e notificação às autoridades de saúde. Além disso, o laboratório deve assumir seu papel enquanto parceiro do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar, desempenhando com presteza e precisão sua função de colaborador com a vigilância de resistência e investigação de surtos.

Assim, prover recursos adicionais, como materiais, insumos diagnósticos e equipamentos deve ser uma ação contínua da gerência ou gestor das unidades assistenciais de saúde como apoio aos serviços laboratoriais, para a identificação e confirmação de isolados de *Enterobacteriaceae* produtores de KPC.

A divulgação ao corpo clínico acerca da prevalência de *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemases e de sua importância epidemiológica é de grande relevância para sensibilizar e alertar os profissionais de saúde quanto ao impacto e às recomendações necessárias para as intervenções, previamente a uma ampla propagação destes micro-organismos multi ou panresistentes. Desse modo, a adesão às medidas mínimas de prevenção e controle de infecção deve ser uma prática prioritária em estabelecimentos de saúde, onde estão presentes distintos mecanismos

de resistência, passíveis de transmissão cruzada. E a prática da higienização das mãos é se não a maior, a principal atitude através de um simples gesto.

O manejo de antimicrobianos também é uma estratégia muito efetiva para minimizar a propagação generalizada de bactérias multirresistentes, cuja presença encoraja o uso, resultando em um ciclo interminável de uso de antimicrobianos, pressão seletiva e resistência aos mesmos. O mesmo se aplica à desinfecção efetiva como prática rotineira das superfícies expostas aos pacientes. Isso também pode ajudar na prevenção de propagação de mecanismos de resistência, reduzindo o risco aumentado de resistência aos múltiplos antimicrobianos.

Portanto, administradores, profissionais de saúde, de limpeza/desinfecção do ambiente e o próprio paciente são todos atores principais que devem despertar para seus papéis determinantes, acerca de tomada de medidas, sejam administrativas ou técnicas, quanto à prevenção e controle das infecções relacionadas à assistência à saúde. Assim, somente esforços conjuntos e direcionados garantirão todos os passos para a minimização da propagação de micro-organismos multirresistentes, desde a detecção laboratorial precoce, limpeza do ambiente até a correta precaução padrão.

Este trabalho permitiu conhecer a situação de multirresistência, particularmente de um isolado de *Enterobacteriaceae* no hospital investigado, o que pode orientar quanto ao estabelecimento de estratégias de prevenção e controle, precocemente. No entanto, apresentou limitações, a saber:

- ✚ Ausência de identificação de carbapenemases específicas, por métodos de biologia molecular. A não confirmação do gene *blaKPC* pode interferir nos resultados terapêuticos, pois mecanismos de resistência distintos, como os detectados no hospital de estudo, implicam em variações nas CIMs segundo cada tipo de enzima e fatores de risco diferentes;
- ✚ Os dados de relação genética entre os isolados não foram determinados, o que impossibilita a verificação de possível disseminação clonal entre os pacientes.

Estudos para análise genética do gene *blaKPC* e demais determinantes de resistência aos carbapenêmicos (por exemplo: *blaGES*, *blaOXA*, *blaVIM*, *blaIMP*, *blaSPM*, *blaNDM*, etc), associados às informações epidemiológicas serão úteis para o

conhecimento futuro da dinâmica de transmissão de resistência aos antimicrobianos na instituição e propostas direcionadas de controle e terapêutica.

REFERÊNCIAS

1. AFZAL-SHAH, M.; WOODFORD, N.; LIVERMORE, D. M. Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D β -lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n. 2, p. 583–588. 2001.
2. AGGEN, J. B. et al. Synthesis and spectrum of the neoglycoside ACHN-490. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 11, p. 4636–4642. 2010.
3. AKTAS, Z. C. et al. Carbapenem-hydrolyzing oxacillinase OXA-48 persists in *Klebsiella pneumoniae* in Istanbul, Turkey. **Chemotherapy**. v. 54, n. 2, p.101–106. 2008.
4. AMBLER, R. P. et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. **Biochemical Journal**. v. 276, Pt. 1, p. 269–270.1991.
5. ANDERSON, K. F. et al: Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 8, p. 2723-2725. 2007.
6. ANDRADE, L. N. et al. Dissemination of *bla*KPC-2 by the Spread of *Klebsiella pneumoniae* Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* Species in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 7, p. 3579–3583. 2011.
7. ANTHONY, K. B. et al. Clinical and microbiological outcomes of serious infections with multidrug-resistant gram-negative organisms treated with tigecycline. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, n. 4, p. 567–570. 2008.

8. ARIAS, C. A.; MURRAY, B. M. Antibiotic-Resistant Bugs in the 21st Century — A Clinical Super-Challenge. **The New England Journal of Medicine**. v. 360, n. 5, p. 439-443. 2009.
9. ARNOLD, R. S. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-Producing Bacteria. **Southern Medical Journal**. v. 104, n. 1, p. 40–45. 2011.
10. BABOUEE, B. et al. Emergence of four cases of KPC-2 and KPC-3-carrying *Klebsiella pneumoniae* introduced to Switzerland, 2009–10. **Eurosurveillance**. v. 16, n. 11, p. pii=19817. 2011. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19817>>. Acesso em 02/09/2011.
11. BARANIAK, A. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 10, p. 4565–4567. 2009.
12. BARBIER, F. et al. Genesis of a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* after in vivo transfer from an imported Greek strain. **Eurosurveillance**. v. 15, n. 1, p. pii=19457. 2010. Available online: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19457>>. Acesso em 02/09/2011.
13. BEIRÃO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 15, n. 1, p. 69-73. 2011.
14. BOU, G.; OLIVER, A.; MARTÍNEZ-BELTRÁN, J. OXA-24, a novel class D β -lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 6, p. 1556–1561. 2000 a. Erratum in: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*: v. 50, n. 6, p. 2280. 2006.

15. BOU, G. et al. Characterization of a nosocomial outbreak caused by a multiresistant *Acinetobacter baumannii* strain with a carbapenem hydrolyzing enzyme: high-level carbapenem resistance in *A. baumannii* is not due solely to the presence of β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 9, p. 3299–3305, 2000b.
16. BRADFORD, P. A. et al., Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. *Clinical Infectious Diseases*. v. 39, n. 1, p.: 55-60. 2004.
17. BRATU, S. et al. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Archives of Internal Medicine**. v. 165, n. 12, p. 1430-1435. 2005a.
18. BRATU, S. et al. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 7, p 3018–3020. 2005b.
19. BRATU, S. et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, n. 1, p.128–132. 2005c.
20. BRATU, S., D. et al. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 2, p. 776–778. 2005d.
21. BRINK, A. et al. The spread of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in South Africa: Risk factors for acquisition and prevention. **South African Medical Journal**. v. 102, n. 7, p. 599-601. 2012.

22. CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v. 45, n. 5, p. 572-578. 2012.
23. CAGNACCI, S. et al. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo-beta-lactamase: first Italian outbreak. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, n. 2, p.296–300. 2008.
24. CAI, J. C. et al. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 6, p. 2014–2018. 2008.
25. CANTARELLI, V. V. et al. Utility of the Ceftazidime-Imipenem Antagonism Test (CIAT) to Detect and Confirm the Presence of Inducible AmpC Beta-Lactamases Among *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 11, n. 2, p. 237-239. 2007.
26. CARBONNE, A. et al. Control of a multi-hospital outbreak of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* type 2 in France, September to October 2009. **Eurosurveillance**. v. 15, n. 48, p. pii=19734. 2010. Available online: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19734>>. Acesso em: 19 de jan. 2012.
27. CARMELI, Y. et al. Controlling the spread of carbapenemase-producing gram-negatives: therapeutic approach and infection control. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 2, p 102-111. 2010.
28. CARTELLE, M. et al. Risk Factors for Colonization and Infection in a Hospital Outbreak Caused by a Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Expanded-Spectrum Cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 2, p.4242–4249. 2004.

29. CASTANHEIRA, M. et al. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*GIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 12, p. 4654–4661. 2004.
30. CASTANHEIRA, M. et al. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase-and metallo-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 570-573. 2008.
31. CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; JONES, R. N. Antimicrobial susceptibility patterns of KPC-producing or CTX-M-producing *Enterobacteriaceae*. **Microbial Drug Resistance**. v. 16, n. 1, p. 61–65. 2010.
32. CASTANHEIRA M. et al. Early dissemination of NDM-1– and OXA-181–producing *Enterobacteriaceae* in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006–2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 3, p. 1274–1278. 2011.
33. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Guidance for control of infections with carbapenem-resistant or carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in acute care facilities. **Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)**. v. 58, n. 10, p. 256–260. 2009.
34. CHEN, L. F.; ANDERSON, D. J.; PATERSON, D. L. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. **Infection and Drug Resistance**. v.5, p. 133–141, 2012.
35. CHMELNITSKY, I. et al. Detection of *aac*(6')-Ib-cr in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Tel Aviv, Israel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, n. 4, p. 718–722. 2009.

36. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Nineteenth Informational Supplement M100-S19*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009 a.
37. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Tenth Edition*. Approved Standard M02-A10. CLSI, Wayne, PA, USA, 2009 b.
38. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement M100-S20*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2010.
39. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-second Informational Supplement M100-S22*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012a.
40. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically - Ninth Edition: Approved Standard M07-A9*. CLSI, Wayne, PA, USA, 2012b.
41. COBO, J. et al. Use of tigecycline for the treatment of prolonged bacteremia due to a multiresistant VIM-1 and SHV-12 β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clone. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 60, n.3, p 319-322. 2008.
42. CONEJO, M. C.; HERNANDEZ, J. R.; PASCUAL, A. Effect of porin loss on the activity of tigecycline against *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases or plasmid-mediated AmpC-type β -lactamases. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 61, n. 3, p. 343–345. 2008.
43. CURIAO, T. et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n. 8, p. 1608–1614. 2010.

44. CUZON, G. et al. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *blaKPC-2* gene. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 9, p. 1349–1356. 2010.
45. CUZON, G. et al. Outbreak of OXA-48–positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 5, p. 2420–3. 2011.
46. DAIKOS GL, MARKOGIANNAKIS A, Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems?, **Clinical Microbiology and Infectious**. v. 17, n. 8, p. 1135–1141. 2011.
47. DALY, M. W. et al. Tigecycline for treatment of pneumonia and empyema caused by carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Pharmacotherapy**. v. 27, n. 7, p. 1052–1057. 2007.
48. DESHPANDE, L. M. et al. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States medical centers:report from the MYSTIC program (1999–2005). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 56, n. 4, p. 367–372. 2006.
49. DORTET, L. et al. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 61, n. 2, p. 455–457. 2008.
50. DOUMITH, M. et al. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63, n. 4, p. 659–667. 2009.
51. DUARTE, A., F. et al. Outbreak of GES-1 β -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 4, p. 1481–1482. 2003.

52. DUGAL, S.; FERNANDES, A. Carbapenem hydrolysing Metallo- β -lactamases: a review. **Journal of Current Pharmaceutical Research**. v. 3, n. 3, p. 9-16, 2011.
53. ELEMAM, A.; RAHIMIAN, J.; MANDELL, W. Infection with panresistant *Klebsiella pneumoniae*: A report of 2 cases and a brief review of the literature. **Clinical Infectious Diseases**. v. 49, n. 2, p. 271–274. 2009.
54. ENDIMIANI, A. et al. *In vitro* activity of fosfomycin against *blaKPC* containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those nonsusceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 1, p. 526–529. 2010.
55. EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS). EARSS annual report 2008. Available from: http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-Net/Documents/2008_EARSS_Annual_Report.pdf. Acesso em: 02/09/2011.
56. EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2009. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net). Stockholm: ECDC, 2010.
57. EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 1.3, January 2011. EUCAST, Basel, Switzerland. 2011. http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/EUCAST_breakpoints_v1.3_pdf.pdf. Acesso em: 31. Out. 2012.
58. FALAGAS, M. E. et al. A. Risk factors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infections: a matched case–control study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n. 5, p. 1124-1130. 2007.

59. FALAGAS, M. E. et al. Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant gram-negative bacteria to fosfomycin. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 27, n. 6, p. 439–443. 2008.
60. FALAGAS, M. E. et al. Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase-producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 10, n. 1, p. 43–50. 2010a.
61. FALAGAS, M. E. et al., Antimicrobial susceptibility of multidrug-resistant (MDR) and extensively drug-resistant (XDR) Enterobacteriaceae isolates to fosfomycin. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 35, n. 3, p. 240–3, 2010b.
62. FDA U. S. FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. Drug Safety Communication: Increased risk of death with Tygacil (tigecycline) compared to other antibiotics used to treat similar infections. FDA. 2010. Disponível em <<http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/ucm224370.htm>> Acesso em: 08/01/2013.
63. FEHLBERG, L. C. C. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 16, n. 16, p. 577–580. 2012.
64. FREIRE, A. T. et al. Comparison of tigecycline with imipenem/cilastatin for the treatment of hospitalacquired pneumonia. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 68, n. 2. p. 140–51. 2010.
65. GALES, A. C. et al. Carbapenem-resistant *Serratia marcescens* isolates producing Bush group 2f β -lactamase (SME-1) in the United States: results from the MYSTIC Programme. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 39, n. 2, p. 125–127. 2001.

66. GASINK, L. B. et al. Risk factors and clinical impact of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 30, n. 12, p. 1180-1185. 2009.
67. GIAKKOUP, P. et al. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 41, n. 8, p. 3893–3896. 2003.
68. GIAKKOUP, P. et al. Emerging *Klebsiella pneumoniae* isolates coproducing KPC-2 and VIM-1 carbapenemases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 9, p. 4048-4050. 2009a.
69. GIAKKOUP, P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Greek hospitals are mainly due to a hyperepidemic clone. **Eurosurveillance**. v. 14, n. 21, p. pii:19218. 2009b. Available from: http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId_19218.
- Acesso em 02/09/2011.
70. GIANI, T. et al. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 11, p. 3793-3794. 2009.
71. GOOTZ, T. D. et al. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 5, p. 1998 –2004. 2009.
72. GORDON, N. C., WAREHAM, D. W. Failure of the MicroScan WalkAway system to detect heteroresistance to carbapenems in a patient with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n.9, p. 3024–3025 . 2009.

73. GREGORY, C. J. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. **Infection Control and Hospital Epidemiology** v. 31, n. 5, p. 476-484. 2010.
74. GÜLMEZ, D. et al. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 31, n. 6, p. 523–526. 2008.
75. GUPTA, N. et al. Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*: Epidemiology and Prevention. **Clinical Infectious Diseases**. v. 53, n. 1, p. 60–67. 2011.
76. HARUTA, S. et al. Functional analysis of the active site of a metallo- β -lactamase proliferating in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 9, p. 2304–2309. 2000.
77. HAWKEY, P.; FINCH, R. Tigecycline: *in-vitro* performance as a predictor of clinical efficacy. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 13, n. 4, p. 354-362. 2007.
78. HIDRON, A. I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 29, n. 11, p. 996-1011. 2008.
79. HIRAKATA, Y. et al. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene *bla*IMP. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 42, n. 8, p. 2006–2011. 1998.
80. HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant

- infection. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 65, n. 6, p. 1119-1125. 2010.
81. IACONIS, J. P.; SANDERS, C. C. Purification and characterization of inducible β -lactamases in *Aeromonas* spp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 34, n. 1, p. 44–51. 1990.
82. JARLIER, V. et al. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of infectious diseases** v. 10, n. 4, p. 867-78, 1988.
83. JEONG, S. H. et al. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum β -lactamases in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy.** v. 49, n. 11, p.4809–4810. 2005.
84. JIANG, M. J.; ZHAO, P.; LI, J. M. Resistance of β -lactamase–producing *Klebsiella pneumoniae* to Imipenem with Ompk36 loss. **African Journal of Microbiology Research.** v. 6, n. 6, p. 1312-1317. 2012.
85. JONES, R. N. et al. Emerging epidemic of metallo- β -lactamase-mediated resistances. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.** v. 51, n. 2, p. 77–84. 2005.
86. KATTAN, J. N. et al. Widespread dissemination of KPC carbapenemases in multiple species from multiple cities within Colombia. In: **47th InterScience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; Chicago, IL, USA; Sept 17–20, 2007. C2-1932. 2007.
87. KELESIDIS, T. et al. Tigecycline for the treatment of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*: a systematic review of the evidence from microbiological and clinical studies. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy.** v. 62, n. 5, p. 895–904. 2008.

88. KITCHEL, B. et al. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in the United States: clonal expansion of MLST sequence type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 8, p. 3365–3370. 2009.
89. KO, K. S. et al. Predominance of an ST11 extended-spectrum betalactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. **Journal of Medical Microbiology**. v. 59, n. 7, p. 822–828. 2010.
90. KOBAYASHI, C. C. B. A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J. D. G. Avaliação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp. em um hospital público de Goiânia, Go-Brasil. *Revista de Patologia Tropical*. v. 38, n. 3: 165-178. 2009.
91. KOCHAR, S. et al. Success of an infection control program to reduce the spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 30, n. 5, p. 447–452. 2009.
92. KOSMIDIS, C. et al. Treatment Options for Infections Caused by Carbapenem-resistant gram-negative Bacteria. **European Infectious Disease**. v. 6, n. 1, p. 28–34. 2012.
93. KRAMER, A.; SCHWEBKE, I.; KAMPF, G. How long do nosocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review. **BMC Infectious Diseases**. v. 6, n. 1, p. 130-137. 2006.
94. KUMARASAMY, K. K. et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 10, n. 9, p. 597-602. 2010.

95. LANDMAN, D. et al. Evaluation of techniques for detection of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in stool surveillance cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 11, p. 5639–41. 2005.
96. LANDMAN, D. et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, n. 1, p. 78–82. 2007.
97. LAURETTI, L. et al. Cloning and characterization of *bla*VIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, n. 7, p. 1584–1590. 1999.
98. LEÃO, R. S. et al. KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter related infection. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n.3, p. 380–382. 2011.
99. LEAVITT, A., NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.v. 51, n. 8, p. 3026–3029. 2007.
100. LEE, K. et al. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*SIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 11, p. 4485-91. 2005.
101. LEE, J. et al. Decreased Susceptibility to Polymyxin B during Treatment for Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Infection. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n.5, p. 1611–1612. 2009.
102. LIVERMORE, D. M. Tigecycline: what is it, and where should it be used? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, n. 4, p. 611–614. 2005.

103. LIVERMORE, D. M, et al. NXL104 combinations versus Enterobacteriaceae with CTX-M extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, n. 5, p. 1053–1056. 2008.
104. LIVERMORE, D. M. Has the era of untreatable infections arrived? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 64, n. 1, p. i29-i36. 2009.
105. LOPEZ, J. A. et al. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 17, n. 1, p. 52–56. 2011.
106. MALTEZOU, H. C. et al. Outbreak of infections due to KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). **Journal of Infection**. v. 58, n. 3, p. 213–219. 2009.
107. MARRA, A. R. et al. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 1, p. 388–390. 2006.
108. MATHERS, A. M. et al. Molecular Dissection of an Outbreak of Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae* Reveals Intergenous KPC Carbapenemase Transmission through a Promiscuous Plasmid. **MBio**. v. 2, n. 6, p. e00204-11. 2011.
109. MENDES, R. E. et al. Carbapenem-resistant isolates of *Klebsiella pneumoniae* in China and detection of a conjugative plasmid (*bla*KPC-2 plus *qnrB4*) and a *bla*IMP-4 gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 2, p. 798–799. 2008.

110. MEYER, G.; PICOLI, S. U. Fenótipos de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 47, n.1, p. 25-31. 2011.

111. MICHALOPOULOS, A. et al. Intravenous fosfomycin for the treatment of nosocomial infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in critically ill patients: a prospective evaluation. **Clinical Microbiology and Infection**. v.16, n. 2, p. 184–186, 2010.

112. MIRIAGOU, V. et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 4, p. 1297–1300. 2003.

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

114. MOLAND, E. S. et al. *Klebsiella pneumonia* isolate producing at least eight different β -lactamases, including AmpC and KPC b-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p. 800–801, 2007.

115. MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing-*Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n.1, p. 333–334. 2009.

116. MOQUET, O. et al. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerging Infectious Diseases*. v. 17, n. 1, p. 143–144. 2011.

117. MUNOZ-PRICE LS. Long-term acute care hospitals. **Clinical Infectious Diseases**. v. 49, n. 3, p. 438–443. 2009.
118. MUNOZ-PRICE, L. S. et al. Successful eradication of a monoclonal strain of *Klebsiella pneumoniae* during a *K. pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* outbreak in a surgical intensive care unit in Miami, Florida. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 31, n. 10, p. 1074–1077. 2010.
119. NAAS, T. et al. Plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 10, p. 4423–4424. 2005.
120. NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla* KPC gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 4, p. 1257–1263. 2008.
121. NAVON-VENEZIA, S. et al. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 2, p. 818–820. 2009.
122. NICASIO, A. M.; CRANDON, J. L.; NICOLAU, D. P. *In vivo* Pharmacodynamic Profile of Tigecycline against Phenotypically Diverse *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 7, p. 2756-2761. 2009.
123. NORDMANN, P. et al. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase for *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 37, n. 5, p. 939–946. 1993.

124. NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram negatives aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 8, n. 6, p. 321–331. 2002.
125. NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 9, n. 4, p. 228–236. 2009.
126. NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase producing Enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases**. v. 17, n. 10, p. 1791-1798. 2011.
127. NORDMANN, P. et al. Does broad spectrum β -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by gram-negative bacteria? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 4, p. 689–692. 2011.
128. PAHO/OMS. Alerta epidemiológica: transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). [Online] 19 de Dez de 2012. Disponível em http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19619&Itemid=. Acesso em 30.de Jan. 2013.
129. PAPADIMITRIOU-OLIVGERIS M. et al. Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* enteric colonization upon ICU admission. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 67, n. 12, p. 2976-2981. 2012.
130. PASTERAN, F. G. et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. v. 14, n. 7, p. 1178–80. 2008.

131. PATEL, G. et al. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 29, n. 1, p. 1099–106. 2008.
132. PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 6, p. 2702. 2009.
133. PEIRANO, G. et al. Carbapenem hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 63, n. 2, p. 265–268. 2009.
134. PEREZ, F. et al. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* across a hospital system: Impact of post-acute care facilities on dissemination. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 65, n. 8, p. 1807–1818. 2010.
135. PFEIFER, Y.; CULLIK, A.; WITTE, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 30, n. 6, p. 371-379. 2010.
136. PITOUT, J. D. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacteriaceae*; an emerging public health concern. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 8, n. 3, p. 159–166. 2008.
137. PITOUT, J. et al. Detection of AmpC beta-lactamase in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* and *Proteus mirabilis* in a region clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 16, n. 2, p. 165-170. 2010.
138. POIREL, L. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo- β -lactamase and its plasmid- and integron-borne gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, n.4, p. 891–897. 2000.

139. POIREL, L.; NORDMANN, P. Acquired carbapenem-hydrolyzing β -lactamases and their genetic support. **Current Pharmaceutical Biotechnology**. v. 3, n., p. 117–127. 2002.
140. POIREL, L. et al. *In vivo* acquisition of high-level resistance to imipenem in *Escherichia coli*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 8, p. 3831–3833. 2004.
141. POIREL, L. et al. Integron encoded GES-type extended-spectrum β -lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 8, p. 3593–3597. 2005.
142. POIREL, L.; PITOUT, J. D.; NORDMANN, P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**. v. 2, n. 5, p. 501–512, 2007.
143. POIREL, L. et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing {beta}-lactamase KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Switzerland. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 3, p. 675-6. 2011a.
144. POIREL, L. et al. Cross-border transmission of OXA-48–producing *Enterobacter cloacae* from Morocco to France. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 5, p. 1181–1182. 2011b.
145. POTTUMARTHY, S. et al. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. **Emerging Infectious Diseases**. v. 9, n. 8, p. 999–1002. 2003.
146. POURNARAS, S. et al. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.64, n. 2, p. 348-352. 2009.

147. QI, Y. et al. Detection of a Common Plasmid Carrying *blaKPC-2* in *Enterobacteriaceae* Isolates from Distinct Cities in China. **Microbiol Drug Resistance**. v. 16, n. 4, p. 297-301, 2010.
148. QI, Y. et al. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 2, p. 307–312. 2011.
149. QUEENAN, A. M. et al. SME type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, n. 11, p. 3035–3039. 2000.
150. QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 20, n.3, p. 440–58. 2007.
151. QURESHI, Z. A. et al. Treatment Outcome of Bacteremia due to KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: Superiority of Combination Antimicrobial Regimens. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, n. 4, p. 2108–2113. 2012.
152. RADICE, M. et al. First class A carbapenemase isolated from *Enterobacteriaceae* in Argentina. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 3, p. 1068–1069. 2004.
153. RASMUSSEN, B. A. et al Characterization of IMI-1 b-lactamase, a novel class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, n. 9, p. 2080–2086. 1996.
154. RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Summary trends for the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection Program: a 10-year experience in the United States (1999–2008). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 65, n. 4, p. 414–426. 2009.

155. RICHTER, S. N. et al. KPC-mediated resistance in *Klebsiella pneumoniae* in two hospitals in Padua, Italy, June 2009-December 2011: massive spreading of a KPC-3-encoding plasmid and involvement of non-intensive care units. **Gut Pathogens**. v. 4, n. 1, p. 1-9. 2012.

156. ROBLEDO, I. E. et al. First report of a KPC-4 and CTX-M producing *K. pneumoniae* (KP) isolated from Puerto Rico. In: **47th InterScience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; Chicago, IL, USA; Sept 17–20, 2007. C2-1933. 2007.

157. ROBLEDO, I. E. et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 3, p. 1354–1357. 2010.

158. ROBUSTILLO RODELA, A. et al. Emergence and outbreak of carbapenemase-producing KPC-3 *Klebsiella pneumoniae* in Spain, September 2009 to February 2010: control measures. **Eurosurveillance**. v. 17, n. 7, p. pii=20086. 2012. Available online: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId>>. Acesso em: 14/05/2012.

159. RODRÍGUEZ-AVIAL, C. et al. *Klebsiella pneumoniae*: development of a mixed population of carbapenem and tigecycline resistance during antimicrobial therapy in a kidney transplant patient. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 18, n.1, p. 61–66, 2012.

160. SADER, H. S. et al. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 1, p. 25-79. 2004.

161. SADER, H. S. et al. IMPs, VIMs and SPMs: the diversity of metallo- β -lactamases produced by carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a

- Brazilian hospital. **Clinical Microbiology and Infection**. v. 11, n. 1, p. 73–76. 2005.
162. SAINO, Y. et al. Purification and properties of inducible penicillin β -lactamase isolated from *Pseudomonas maltophilia*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 22, n. 4, p. 564–570. 1982.
163. SAMRA, Z. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 30, n. 6, p. 525–529. 2007.
164. SAMRA, Z. et al. Evaluation of CHROMagar KPC for rapid detection of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology** v. 46, n. 9, p. 3110–3111. 2008.
165. SAMUELSEN, O. et al. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**. v. 63, n. 4, p. 654–658. 2009.
166. SATLIN, M. J. et al. Comparative effectiveness of aminoglycosides, polymyxin B, and tigecycline for clearance of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* from urine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 12, p. 5893–99. 2011.
167. SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*: a potential threat. **The Journal of the American Medical Association**. v 300, n. 24, p. 2911–2913. 2008.
168. SCHWABER, M. J. et al. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on

- mortality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 3, p. 1028–1033. 2008.
169. SCHECHNER, V. et al. Evaluation of PCR-Based Testing for Surveillance of KPC-Producing Carbapenem-Resistant Members of the *Enterobacteriaceae* Family. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 10, p. 3261–3265, 2009.
170. SEKI, L. M., et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**. v. 70, n. 2, p. 274–277. 2011.
171. SHEN, P. et al. Novel genetic environment of the carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 10, p. 4333–4338. 2009.
172. SIDJABAT, H. E et al. Interspecies spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene in a single patient. **Clinical Infectious Diseases**. v. 49, n. 11, p. 1736 –1738. 2009.
173. SIEGEL, J. D. et al. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. **American Journal of Infection Control**. v. 35, n. 10, p. S165–193. 2007.
174. SOULI, M. et al. Clinical experience of serious infections caused by *Enterobacteriaceae* producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek University Hospital. **Clinical Infectious Diseases**. v. 46, n. 6, p.847–854. 2008.
175. SOULI, M. et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Clinical Infectious Diseases**. v. 50, n.3, p: 364–373, 2010.

176. SOULI, M. et al. *In Vitro* Interactions of Antimicrobial Combinations with Fosfomycin against KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* and Protection of Resistance Development. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 55, n. 5, p. 2395–2397. 2011.
177. SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 29, n. 12, p. 1107–1109. 2008.
178. STACHYRA, T et al. *In vitro* activity of the {beta}-lactamase inhibitor NXL104 against KPC-2 carbapenemase and *Enterobacteriaceae* expressing KPC carbapenemases. **Journal of Antimicrob Chemotherapy**. v. 64, n. 2, p. 326–329. 2009.
179. TEGMARK-WISELL, K. T. et al. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. **Eurosurveillance**. v. 12, n.51, p: pii=3333. 2007. Available online:<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3333>. Acesso em: 21 de jan. 2013.
180. TENOVER, F. C. et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**. v.12, n. 8, p. 1209–1213. 2006.
181. THOMSON, K. S. Extended-spectrum β -lactamase, AmpC and carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 4, p. 1019–1025. 2010.
182. TIBBETTS, R. et al. Detection of KPC-2 in a clinical isolate of *Proteus mirabilis* and first reported description of carbapenemase resistance caused by a KPC beta-lactamase in *P. mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 9, p. 3080–83. 2008.

183. TOLEMAN, M. A. *et al.* Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 50, n. 5, p. 673-679. 2002.
184. TÓTH, A. *et al.* Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**. v. 29, n. 7, p. 765–769. 2010.
185. TOYE, B. *et al.* Carbapenem resistance in Canada. **Canadian Medical Association Journal**. v. 180, n. 12, p. 1225-26. 2009.
186. TSAKRIS, A. *et al.* Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumonia* isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 362-367. 2009.
187. VAARA, M. *et al.* Novel polymyxin derivatives carrying only three positive charges are effective antibacterial agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 52, n. 9, p. 3229–3232. 2008.
188. VILLEGAS, M. A. *et al.* First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 50, n. 8, p. 2880–2882. 2006.
189. VILLEGAS, M. V. *et al.* First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 51, n. 4, p. 1553–1555. 2007.

190. VOURLI, S. et al. Novel GES/IBC extended-spectrum β -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. **FEMS Microbiology Letters**. v. 234, n. 2, p. 209–213. 2004.
191. WACHINO, J. I. et al. Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A β -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 6, p.1960–1967. 2004.
192. WALLACE, K. M. P. et al. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamases, a preeminent property of this class A β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 54, n. 2, p. 890-897. 2010.
193. WALSH, T. R. et al. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 2, p. 306–325. 2005.
194. WARNER, S. L.; HIGHMORE, C. J.; KEEVIL, C. W. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes on abiotic touch surfaces implications for public health. **MBio**. v. 3, n. 6. p. e00489-512. 2012.
195. WEI, Z. Q. et al. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 2, p. 763-765. 2007.
196. WIENER-WELL, Y. et al. Carriage rate of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in hospitalised patients during a national outbreak. **Journal of Hospital Infection**. v. 74, n. 4, p. 344–349. 2010.
197. WOLTER, D. J. et al. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 2, p. 557–562. 2009.

198. WOODFORD, N. et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n.12, p. 4793–4799. 2004.
199. WOODFORD, N.; HILL, R. L.; LIVERMORE, D. M. *In vitro* activity of tigecycline against carbapenem-susceptible and -resistant isolates of *Klebsiella* spp. and *Enterobacter* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 59, n. 3, p. 582–583. 2007.
200. WOODFORD, N. et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, n. 6, p. 1261–1264. 2008.
201. 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.
202. YAN, J. J.; KO, W. C.; WU, J. J. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 8, p. 2368–2371. 2001.
203. YIGIT, H. et al. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-1 from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 45, n.4, p. 1151–1161. 2001. Erratum in: *Antimicrob Agents Chemother*. v. 52, n.2, p. 809. 2008.
204. YIGIT, H. et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 12, p. 3881–3889. 2003.

205. YONG, D. et al. Imipenem-EDTA disk method for differentiation of metallo- β -lactamase-producing clinical isolates of *Pseudomonas* spp. and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 10, p. 3798-3801. 2002.
206. YUAN, Z.; TAM, V. H. Polymyxin B: a new strategy for multi-drug resistant gram-negative organisms. **Expert Opinion on Investigational Drugs**. v. 17, n. 5, p. 661–668. 2008.
207. ZAGORIANOU, A. et al. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. **Eurosurveillance**. v. 17, n. 7, p. pii=20088. 2012. Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20088>. Acesso em: 11 de mai. 2012.
208. ZARKOTOU, O. et al. Risk Factors and Outcomes Associated with Acquisition of colistin-resistant KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae*: a Matched Case-Control Study. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 48, n. 6, p. 2271–2274. 2010.
209. ZAVASCKI, A. P. et al. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, n. 6, p. 1148–1151. 2005.
210. ZAVASCKI AP et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: A widespread threat in waiting? **International Journal of Infectious Diseases**. v. 14, n. 6. p. e539–e540. 2010.

GLOSSÁRIO

Antagonista: agente químico que pode reduzir ou anular o efeito de outro.

Pontos de corte ou *breakpoints*: são critérios de interpretação usados para definir a suscetibilidade e resistência aos agentes antibacterianos. Podem ser expressos como uma concentração (mg/L ou μ g/mL) ou diâmetro de halo (mm).

β -lactamases: classes de enzimas que hidrolisam os antibióticos β -lactâmicos, tornando-os inativos.

β -lactâmicos: grupo de antimicrobianos que tem em sua estrutura o anel β -lactâmico. Pertencem às classes: penicilinas, β -lactâmicos associados aos inibidores de β -lactamases, cefem (cefalosporinas), monobactâmicos e carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem).

Cefalosporinases: enzimas da classe C de Ambler, constitutivas ou induzíveis, que são encontradas nos cromossomos das bactérias gram-negativas.

***Enterobacteriaceae*:** Bacilos gram-negativos fermentadores de glicose, citocromo-oxidase negativa e redutores de nitrato a nitrito.

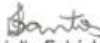
Extensivamente resistente: resistência *in vitro* a todos os antimicrobianos, exceto um ou dois entre os fármacos disponíveis e considerados como sendo eficazes contra o agente patogênico em questão.

Multirresistência: resistência *in vitro* a três ou mais classes de antimicrobianos disponíveis para o uso e considerados como sendo eficazes contra o agente patogênico em questão.

Panresistência: resistência *in vitro* a todas as classes de antimicrobianos disponíveis e considerados como sendo eficazes contra o agente patogênico em questão.

Anexos

ANEXO 1a – Parecer do Comitê de Ética

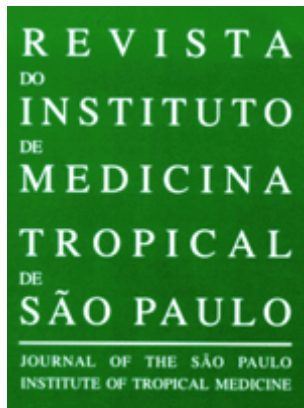
 SUS Sistema Único de Saúde	SECRETARIA DA SAÚDE DO ESTADO DE GOIÁS	 GOVERNO DO ESTADO DE GOIÁS Desenvolvimento com Responsabilidade
Hospital de Urgências de Goiânia		
PARECER FINAL/ CEP/HUGO/SES Nº 68/08		
Protocolo CEP/HUGO/SES Nº084/08		
Folha de Rosto: 236448		
 Título: BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES ISOLADAS EM UM HOSPITAL PÚBLICO DE GOIÂNIA.		
Pesquisadores responsáveis:		
○ JOSÉ DANIEL GONÇALVES VIEIRA. ○ CLÁUDIA CASTELO B. ARTIAGA KOBAYASHI.		
 Área Temática: Grupo III		
Local de realização: HUGO.		
PROJETO APROVADO		
Recomendações: O Pesquisador deve apresentar relatórios quinzenais para projetos com duração de 30 dias, mensais para projetos de 31 a 90 dias e trimestral para projetos com duração superior a 90 dias. Comunicar primeiramente ao CEP qualquer intercorrência ou mudança durante o projeto. O relatório final deve ser entregue juntamente com o trabalho para arquivo no Cep.		
Goiânia, 12 de dezembro de 2008.		
 Elisângela Cristiane Fontoura da Silva Coordenadora do CEP/HUGO/SES	 Daniella Fabíola dos Santos Chefe da Divisão de Ensino e Pesquisa	
Av. 31 de março, esq. C/5ª Radial, s/n Setor Pedro Ludovico, CEP: 74810-200 Goiânia/Goiás Fone/Fax: (62) 201-4436 cepmh_hugo_ses@yahoo.com.br		

ANEXO 1b - Informações quanto à formulação do termo de consentimento livre e esclarecido

O presente trabalho, intitulado “Bactérias multirresistentes isoladas em um hospital público de Goiânia” consistirá em um estudo observacional dos dados demográficos e clínicos de pacientes internados no Hospital de Urgências de Goiânia. Tais dados somente serão analisados mediante a conclusão dos resultados dos exames bacteriológicos realizados no laboratório desta instituição a partir de espécimes clínicos suspeitos de infecção e solicitados para cultura microbiológica pelo clínico responsável. Além disso, consistirá na formação de um banco de micro-organismos para análise posterior de cepas bacterianas multirresistentes pré-selecionadas. Dessa forma, a utilização de isolados bacterianos só ocorrerá posteriormente ao período de liberação dos resultados dos exames bacteriológicos, não havendo nenhum tipo de intervenção nos pacientes, direta ou indiretamente, relacionada à obtenção de seus espécimes clínicos, pois os mesmos já serão processados laboratorialmente de acordo com a demanda espontânea do hospital. Assim, não haverá necessidade de obtenção de termo de consentimento livre e esclarecido, uma vez que será um estudo relacionado à revisão de prontuários dos pacientes que apresentaram diagnóstico clínico de infecção ou colonização por bactérias multirresistentes.

ANEXO 2 – Normas de publicação dos respectivos periódicos

Artigo 1 – Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo



ISSN 0036-4665 *printed version*
ISSN 1678-9946 *online version*

INSTRUCTIONS TO AUTHORS

- [Scope and policy](#)
- [Form and preparation of manuscripts](#)
- [Submission of manuscripts](#)

Scope and policy

The "**Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**/Journal of the São Paulo Institute of Tropical Medicine" (Revista do IMTSP) is a journal devoted to research on the different aspects of transmissible diseases. The Journal welcomes original works on all transmissible diseases. Each issue may contain, besides original papers, brief communications, preliminary reports, technical reports, reviews and correspondence. Reports on meetings are also accepted. **The journal publishes papers only in English.**

Papers written in English (**we advise authors with English as a foreign language to have their manuscripts checked by someone with English as a first language, preferably a scientist**), should be sent to the Editor, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. **Manuscripts will be peer-reviewed by two or three referees of the Editorial Board and/or ad hoc reviewers. The decision of acceptance for publication lies with the Editors and is based on the recommendations of these referees. A form stating the following items should be sent to the Editorial Office signed by all Authors of the article:** 1) The manuscript and all parts of it have not been submitted elsewhere; 2) There are no financial or other relationships from any of the authors of the manuscript that might lead to any conflict of interest; 3) The submitted manuscript has been read by all authors carefully. All authors agree that the manuscript represents their work. 4) Describe sources of funding that have supported the work. Please also describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; collection, analysis, and interpretation of data; writing of the paper; and decision to submit it for publication; 5) The corresponding author is indicated below and will be responsible for communicating with the other authors about revisions and final approval of the paper. The manuscripts will be received only by on-line submission at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>, where the authors can check the status of the submission any time. The electronic file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decisions

on the manuscript will be communicated to the authors.

Authors may suggest up to four potential reviewers for their work, giving a full address (with fax, phone and e-mail) for each person they propose.

Form and preparation of manuscripts

Original papers - The text should be preceded by a short summary not exceeding 200 words, and should then proceed to sections of Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements and References. All papers should contain a summary in English and Portuguese or Spanish, with title in Portuguese or Spanish. Pages should be numbered consecutively in Arabic numerals. Tables and figures should be referred to in the text together with an indication of their approximate position recorded in the text margin. Tables should be numbered and contain a brief specific title. Drawings as well as halftones (photographs, photomicrographs, electron micrographs, or roentgenograms) should be planned to suit the size of a single or double page column. Images should be submitted preferably in TIF format.

If there are color images the author will be asked to contribute towards the cost of reproduction.

Acknowledgments should be brief, and should not include thanks to anonymous referees and editors, or effusive comments. Grant or contribution numbers may be acknowledged.

Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo encourages authors to include a statement to specify the individual contributions of each co-author, which will be published under a separate subheading "Author contributions" following the Acknowledgments.

Brief communications, preliminary and technical reports and letters to the editor are reserved for reporting new observations of critical importance. They should not exceed two or three printed pages, including the illustrations and references. Preliminary reports will be published in the next issue going to press, after acceptance by referees.

Review articles by investigators who have made substantial contributions to a specific area of transmissible diseases will be published by invitation of the editorial board.

However, a review article may be submitted to the editor and if it is judged appropriate after peer revision it will be published. A review article should be presented in the same format as a full paper, except that it would not have to be divided into sections such as introduction, material and methods, results and discussion. It should, however, contain abstracts both in English and Portuguese or Spanish.

Review articles, brief communications, preliminary and technical reports, and correspondence published in a recent number of the journal should be used as models for formatting.

The list of **REFERENCES**, including only those actually mentioned in the text or tables, should be in alphabetical order in the Vancouver format and numbered consecutively in Arabic numerals. Citation in the text is by these numbers, and only exceptionally by name and year. Listing should be as follows:

a) **Articles from journals:** Last names and initials of all authors (unless there are more than six, when only the first six should be given followed by et al.), full title of the article, title of the journal (title abbreviation by NLM - <http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/lji.html>), the year of publication, the volume number, the first and last page numbers.

Ex.: Velho, PENF, Faria, AV, Cintra, ML, Souza, EM, Moraes, AM. *Larva migrans*: a case report and review. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:167-71.

Ex.: Costa E, Lopes AA, Sacramento E, Costa YA, Matos ED, Lopes MB *et al.* Penicillin at the late stage of leptospirosis: a randomized controlled trial. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2003;45:141-5.

b) **Books**: last names and initials of all authors, full title of the book, edition, place of publication, the publisher, and the year.

Ex.: Lewin B. Genes IX. Boston: Jones and Bartlett; 2008.

c) **Chapter of book**:

Ex.: Ferreira HO. Doença de Chagas. In: Farhat CF, Carvalho ES, Carvalho LHFR, Succi RC, editores. Infectologia pediátrica. São Paulo: Atheneu; 1998. p. 531-7.

d) **Thesis**

Ex.: Vidal MSM. Estudo imunoquímico de antígenos de *Fonsecaea pedrosoi* e padronização de técnicas sorológicas para cromoblastomicose causada por este fungo [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2002.

Ethical Guidelines - Papers must state in the Material and Methods section that: 1) inform consent was obtained from all human adult participants and from parents or legal guardians of minors together with the approved consent of the Ethical Commission and 2) the maintenance of experimental animals complies with the guidelines of the human use of laboratory animals.

Randomized Controlled Trials and Clinical Trials - The **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo** supports the policy of Clinical Trials registration delivered by WHO and the International Committee of Medical Journals Editors (ICMJE) recognizing the importance, in open access, of these initiatives for the registration and international knowledge of the information on clinical studies. Therefore, there will be accepted from 2007 on, only papers of clinical research dealing with these issues having an identification number provided by one of the clinical assays validated by established criteria from WHO and ICMJE. The addresses can be found in the ICMJE site (<http://www.icmje.org>). **The trial registration number should be written at the end of the summary.**

Submission of manuscripts

The manuscripts will be received only by on-line submission at: <http://mc04.manuscriptcentral.com/rimtsp-scielo>, where the authors can check the status of the submission any time. The electronic file will be used for editorial assessment and online refereeing, and the editorial decisions on the manuscript will be communicated to the authors.

[[Home](#)] [[About this journal](#)] [[Editorial board](#)] [[Subscription](#)]



All the content of the journal, except where otherwise noted, is licensed under a [Creative Commons License](#)

Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
05403-000 São Paulo SP - Brazil
Tel. / Fax: +55 11 3062-2174



revimtsp@edu.usp.br

Artigo 2 – Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical



ISSN 0037-8682 versão impressa
ISSN 1678-9849 versão on-line

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo](#)
- [Política de avaliação](#)
- [Tipos de manuscrito](#)
- [Preparação do manuscrito](#)
- [Workflow](#)

Escopo

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, multidisciplinar, com acesso aberto, que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A preferência para publicação será dada a artigos que relatem pesquisas e observações originais. A revista possui um sistema de revisão por pares, para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical é publicada em Inglês.

Política de avaliação

Os manuscritos submetidos com vistas à publicação na **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** são avaliados inicialmente pelos profissionais da secretaria quanto à adequação às normas. Em seguida, serão encaminhados para, no mínimo, dois revisores para avaliação e emissão de parecer fundamentado (revisão por pares), os quais serão utilizados pelos editores para decidir sobre a aceitação, ou não, do mesmo. Em caso de divergência de opinião entre os revisores, o manuscrito será enviado para um terceiro relator para fundamentar a decisão editorial final, de acordo com o [workflow](#) do processo de submissão da Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical (disponível online em <http://www.scielo.br/revistas/rsbmt/iinstruc.htm#005>).

O contato com o escritório editorial pode ser estabelecido para:
Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.
Praça Thomaz Ulhôa, 706.
Caixa Postal: 118. 38001-970. Uberaba, MG.
Telefone: 55-34-3318-5287. Fax: 55-34-3318-5279.
E-mail: rsbmt@rsbmt.ufmt.edu.br;

<http://www.scielo.br/rsbmt>

Tipos de manuscrito

A revista convida à publicação Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Cartas, Suplementos, Obituários.

Artigos Originais: devem relatar pesquisas originais que não tenham sido publicadas ou consideradas para publicação em outros periódicos. No caso de Ensaio Clínico, o manuscrito deve ser acompanhado pelo número e órgão de registro do ensaio clínico. Estes

requisitos estão de acordo com BIREME/OPAS/OMS e o Comitê Internacional dos Editores de Revistas Médicas (www.icmje.org) e do Workshop ICTPR. O limite de palavras é de 3.500 (excluindo resumo e referências); resumo com até 250 palavras, estruturado com os tópicos Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões. Um total de cinco ilustrações (tabelas e figuras) é permitido.

Artigos de Revisão: devem ser uma análise crítica de avanços recentes e não apenas revisão da literatura, geralmente a convite do editor. Devem ter resumo com até 250 palavras, máximo de 3.500 palavras, cinco ilustrações (tabelas e figuras), com a mesma formatação do artigo original. São publicados também mini-revisões com resumo com até 250 palavras, três ilustrações (tabelas e figuras) e máximo de 3.000 palavras.

Cartas: leitores são encorajados a escrever sobre qualquer tópico relacionado a doenças infecciosas e medicina tropical de acordo com o escopo da revista. Não devem exceder 1.200 palavras, sem resumo e palavras-chaves, com apenas uma inserção (figura ou tabela) e pode tratar de material anteriormente publicado na revista, com até 12 referências.

Editoriais: usualmente, escritos a convite, considerando os tópicos da área de enfoque da revista, não excedendo a 1.500 palavras, sem resumo e palavras-chaves e no máximo uma figura ou tabela e dez referências.

Comunicações Breves: devem ser relatos sobre novos resultados interessantes dentro da área de abrangência da revista. Não deve exceder quatro páginas impressas, com no máximo 2.000 palavras, mesma formatação do artigo original, incluindo o resumo e abstract estruturados com os subitens introdução, métodos, resultados e conclusões, e com até 15 referências. Um máximo de três ilustrações (tabelas e figuras) é permitido. Um resumo com não mais que 100 palavras e até três palavras-chaves devem ser fornecidos. Não colocar no corpo do manuscrito os tópicos introdução, métodos, resultados, discussão e conclusões.

Relatos de Casos: devem ser relatos breves com extensão máxima de 1.500 palavras, com máximo de três ilustrações (tabelas e figuras), até 12 referências, resumo e abstract não estruturados e com no máximo 100 palavras, e de três palavras-chaves, contendo também título resumo e palavras-chaves em Português. Colocar no corpo do manuscrito os tópicos Introdução, Relato do Caso, Discussão e Referências.

Relatórios Técnicos: devem ser precisos e relatar os resultados e recomendações de uma reunião de *experts*. Será considerado, se formatado como um editorial.

Imagens em Doenças Infecciosas: até três figuras com a melhor qualidade possível. Apenas três autores e três referências (não citadas no texto) sem agradecimentos são permitidos. O tamanho máximo é de 250 palavras com ênfase na descrição da figura. Os temas devem envolver alguma lição clínica, contendo título e a descrição das figuras.

Suplementos: podem ser anais de um simpósio ou um congresso. Propostas relacionadas com a adequação do tema, organização do programa e a produção devem ser feitas por escrito para o Editor e / ou Editor Convidado.

Obituários: devem ser escritos por um colega de profissão, e destacar o perfil científico e a contribuição do profissional falecido.

Preparação do manuscrito

Autores são aconselhados a ler atentamente estas instruções e segui-las para garantir que o processo de revisão e publicação de seu manuscrito seja tão eficiente e rápido quanto

possível. Os editores se reservam o direito de devolver manuscritos que não estejam em conformidade com estas instruções. Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão on-line nos endereços <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo> ou <http://www.scielo.br/rsbmt>. A carta de apresentação deve conter uma declaração assegurando que o material não foi publicado ou está sob consideração por outro periódico científico. O autor deve escolher dentro do item "Tipos de Manuscrito" uma categoria para o manuscrito (Artigos Originais, Editoriais, Artigos de Revisão, Comunicações Breves, Relatos de Casos, Relatórios Técnicos, Imagens em Doenças Infecciosas, Obituários e Cartas ao Editor, ou outros quando não se encaixar em nenhuma das categorias listadas). A responsabilidade pelo conteúdo do manuscrito é inteiramente do autor e seus co-autores.

Edição da Pré-Submissão: se a sua primeira língua não é o Inglês, para garantir que o conteúdo científico de seu manuscrito será compreendido pelos editores da revista e revisores, todos os manuscritos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deve ser em Inglês. A escrita e os custos de edição de texto será de responsabilidade dos autores. Para tornar o processo mais fácil e rápido, é altamente recomendável que os autores utilizam os serviços de uma empresa de edição semelhante ao American Journal Experts (AJE - www.journalexperts.com), Oxford Journals Language (www.prof-edicao.com) ou Editage (www.editage.com.br) para a tradução para o idioma Inglês e / ou edição de texto. É solicitado que os autores enviem, juntamente com sua submissão on-line, o certificado emitido pela empresa ou por um revisor nativo da língua inglesa com proficiência reconhecida como tradutor. É de escolha dos autores utilizar esses ou outros serviços, desde que quando da apresentação do manuscrito, enviem um certificado indicando que eles usaram os serviços de um tradutor oficial e / ou empresa de edição de texto da língua inglesa.

A revisão / edição da Língua Inglesa, não garante que o manuscrito será aceito para publicação.

A partir de 30 de setembro de 2011 a Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical aceitará apenas manuscritos acompanhados pelo certificado de revisão / edição da língua inglesa.

Formatação de Artigo Original

O manuscrito deve ser preparado usando *software* padrão de processamento de textos e deve ser impresso (fonte *times new Roman* tamanho 12) com espaço duplo em todo o texto, legendas para as figuras e referências, margens com pelos menos 3cm. O limite de palavras é de 3.500 com até cinco inserções (figuras e tabelas). O manuscrito deve ser dividido nas seguintes seções: Carta de envio, endereçada ao editor chefe, resumo estruturado, palavras-chaves, introdução, métodos, resultados, discussão, conclusões, agradecimentos e referências. Abreviações devem ser usadas com moderação.

Página de Título: deve incluir o nome dos autores na ordem direta e sem abreviações, graduações mais elevadas possuídas, afiliações com informação de contato (telefone, endereço e números de fax e e-mail para o autor correspondente e todos os co-autores e apoio financeiro. A quantidade de autores por manuscrito é limitada a seis, exceto para estudos multicêntricos. Os autores são convidados a fornecer os nomes e informações de contato (e-mail e telefone) por três potenciais revisores imparciais. Favor informar revisores de região diferente da dos autores.

Título: deve ser conciso, claro e o mais informativo possível, não deve conter abreviações e não deve exceder a 200 caracteres, incluindo espaços.

Título Corrente: com no máximo 70 caracteres.

Resumo Estruturado: deve condensar os resultados obtidos e as principais conclusões de tal forma que um leitor, não familiarizado com o assunto tratado no texto, consiga entender as implicações do artigo. O resumo não deve exceder 250 palavras (100 palavras no caso de comunicações breves) e abreviações devem ser evitadas. Deve ser subdividido em: Introdução, Métodos, Resultados e Conclusões.

Palavras-chaves: 3 a 6 itens devem ser listados em Inglês, imediatamente abaixo do resumo estruturado.

Introdução: deve ser curta e destacar os propósitos para o qual o estudo foi realizado. Apenas quando necessário citar estudos anteriores de relevância.

Métodos: devem ser suficientemente detalhados para que os leitores e revisores possam compreender precisamente o que foi feito e permitir que seja repetido por outros. Técnicas-padrões precisam apenas ser citadas.

Ética: em caso de experimentos em seres humanos, indicar se os procedimentos realizados estão em acordo com os padrões éticos do comitê de experimentação humana responsável (institucional, regional ou nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1964, revisada em 1975, 1983, 1989, 1996 e 2000. Quando do relato de experimentos em animais, indicar se seguiu um guia do conselho nacional de pesquisa, ou qualquer lei sobre o cuidado e uso de animais em laboratório foram seguidas.

Resultados: devem ser um relato conciso e impessoal da nova informação. Evitar repetir no texto os dados apresentados em tabelas e ilustrações.

Discussão: deve relacionar-se diretamente com o estudo que está sendo relatado. Não incluir uma revisão geral sobre o assunto, evitando que se torne excessivamente longa.

Agradecimentos: devem ser curtos, concisos e restritos aqueles realmente necessários, e, no caso de órgãos de fomento não usar siglas.

Conflito de Interesse: todos os autores devem revelar qualquer tipo de conflito de interesse existente durante o desenvolvimento do estudo.

Suporte Financeiro: informar todos os tipos de fomento recebidos de agências de fomento ou demais órgãos ou instituições financiadoras da pesquisa.

Referências: devem ser numeradas consecutivamente, na medida em que aparecem no texto. Listar todos os autores quando houver até seis. Para sete ou mais, listar os seis primeiros, seguido por "et al". Digitar a lista de referências com espaçamento duplo em folha separada e no final do manuscrito. Referências de comunicações pessoais, dados não publicados ou manuscritos "em preparação" ou "submetidos para publicação" não devem constar da lista de referência. Se essenciais, podem ser incorporados em local apropriado no texto, entre parênteses da seguinte forma: (AB Figueiredo: Comunicação Pessoal, 1980); (CD Dias, EF Oliveira: dados não publicados). Citações no texto devem ser feitas pelo respectivo número das referências, acima da palavra correspondente, separado por vírgula (Ex.: Mundo^{1,2,3}; Vida^{30,42,44-50}). As referências no fim do manuscrito devem estar de acordo com o sistema de requisitos uniformes utilizado para manuscritos enviados para periódicos

biomédicos (Consulte: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>). Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado no "Index Medicus" (Consulte: <http://ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=journals&TabCmd=limits>).

Alguns exemplos de referências:

1. Russell FD, Coppel AL, Davenport AP. *In vitro* enzymatic processing of radiolabelled big ET-1 in human kidney as a food ingredient. *Biochem Pharmacol* 1998;55:697-701.
2. Porter RJ, Meldrum BS. Antiepileptic drugs. *In*: Katzung BG, editor. *Basic and clinical pharmacology*. 6th ed. Norwalk (CN): Appleton and Lange; 1995. p. 361-80.
3. Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Figuras: devem preferencialmente ser submetidas em alta resolução no formato **TIFF**. As figuras devem ser colocadas em arquivos separados, nomeados apenas com o número das figuras (ex.: Figura 1; Figura 2). Certifique-se que as mesmas têm uma resolução mínima de 300dpi.

• **Fotografias:** devem ser enviadas com boa resolução (mínimo de 300dpi) no formato **TIFF**, preferencialmente, preparadas utilizando o *Adobe Photoshop*.

• **Gráficos:** criados usando *Microsoft Word* ou *Excel*, devem ser salvos com a extensão original (.doc ou .xls). **Eles não devem ser copiados ou colados** de um programa para o outro.

• **Mapas e Ilustrações:** devem ser vetorizadas (desenhados) profissionalmente utilizando os *softwares CorelDraw* ou *Illustrator* em alta resolução, e suas dimensões não devem ter mais que 21,5 x 28,0cm.

• **Imagens:** produzidas em *software* estatístico devem ser convertidas para o formato *Excel* ou *PowerPoint*. Caso não seja possível, converter o arquivo para o formato **TIFF** com resolução de 300dpi, e enviar juntamente com o arquivo no formato original.

Legendas: nas figuras, as legendas devem ser digitadas juntas com espaçamento duplo em uma folha separada e no final do manuscrito.

Ilustrações Coloridas: devem ser aprovadas pelos editores e as despesas extras para confecção de fotolitos coloridos serão de responsabilidade dos autores.

Tabelas: devem ser digitadas com espaçamento duplo, com um título curto e descritivo e submetido *online* em um arquivo separado. Legendas para cada tabela devem aparecer no rodapé da mesma página que a tabela. Todas as tabelas devem ter numeração arábica, citadas no texto, consecutivamente. Tabelas não devem ter linhas verticais, e linhas horizontais devem ser limitadas ao mínimo, com notas de rodapé logo abaixo. Tabelas devem ter no máximo 17cm de largura.

Processo de Envio: a partir de 21 de Outubro de 2009, os artigos submetidos à Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical deverão utilizar apenas a via eletrônica. Todos os manuscritos deverão ser enviados via internet para <http://submission.scielo.br/index.php/rsbmt/login>, seguindo as instruções no topo de cada tela. A partir desta data o processo de revisão pelos pares também será totalmente pela via eletrônica.

Sobre Reenvio e revisões: a revista diferencia entre: a) manuscritos que foram rejeitados e b) manuscritos que serão re-avaliados após a realização das correções que foram solicitadas aos autores.

Reenvio: caso o autor receba uma carta informando que seu trabalho foi rejeitado e queira que os editores reconsiderem tal decisão, o autor poderá re-enviá-lo. Neste caso será gerado um novo número para o manuscrito.

Revisão: caso seja necessário refazer seu manuscrito com base nas recomendações e sugestões dos revisores, ao devolvê-lo, para uma segunda análise, por favor, encaminhe o manuscrito revisado e informe o mesmo número do manuscrito.

Após a aceitação: quando o trabalho for aceito para publicação, os autores devem fornecer:

- a) Formulário de concessão de direitos autorais, fornecido pela secretaria da revista, assinado pelo autor correspondente.
- b) Provas: serão enviadas ao autor correspondente para que o texto seja cuidadosamente conferido. Mudanças ou edições ao manuscrito editado não serão permitidas nesta etapa do processo de edição. Os autores deverão devolver as provas corrigidas dentro de quatro dias após serem recebidas.
- c) Os artigos aceitos comporão os números impressos obedecendo o cronograma em que foram submetidos, revisados e aceitos.
- d) Os artigos aceitos remanescentes a cada número da revista serão disponibilizados *online* enquanto aguardam a prioridade para publicação na versão impressa.

Re-impressões: a revista fornece ao autor, gratuitamente, excertos do artigo em formato PDF, via e-mail.

Custos de Publicação: Não haverá custos de publicação.

A tradução de todo manuscrito deve ser realizada antes da submissão do mesmo. A contratação e o pagamento dos serviços de tradução, são de responsabilidade dos autores. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical não fornece qualquer tipo de serviço de tradução. Custos de publicação de imagens coloridas, são de responsabilidade dos autores.

Workflow

WORKFLOW DO PROCESSO DE SUBMISSÃO DA REVISTA DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL

A **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** é um periódico oficial da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical com acesso aberto. É uma revista multidisciplinar que publica pesquisas originais relacionadas a doenças tropicais, medicina preventiva, saúde pública, doenças infecciosas e assuntos relacionados. A revista possui um sistema de revisão por pares para a aceitação de artigos, e sua periodicidade é bimestral. Todos os manuscritos a serem considerados para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical devem ser submetidos por via eletrônica através do sistema de submissão *online* no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/rsbmt-scielo>

Política de revisão do periódico (*workflow*):

- 1 – Os manuscritos submetidos para publicação na Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical são inicialmente avaliados pela Secretaria quanto à adequação do texto às normas do periódico.
- 2 – Após esta etapa, os manuscritos adequados às normas da revista serão avaliados pelo Editor ou Editores Associados quanto ao escopo e a política editorial do periódico. A Secretaria envia o manuscrito para o Editor-Chefe.
- 3 – O Editor Chefe designa um Editor Associado ou designa revisores.
- 4 – O *paper* será enviado a pelo menos dois revisores num sistema duplo-cego para avaliação e emissão de um relatório fundamentado (*peer review*), que será usado pelos Editores para decidir se o manuscrito será aceito ou não. No caso de conflito de pareceres dos revisores, o manuscrito será enviado a um terceiro parecerista para validar uma decisão final.
- 5 – Comentários dos Revisores (*Free Form Review*) serão encaminhados ao autor correspondente (autor principal para correspondência editorial) para responder aos questionamentos feitos.
- 6 – Os autores enviam suas respostas aos questionamentos e reenviam a versão revisada do manuscrito. A versão revisada será enviada aos revisores que emitirão um relatório final fundamentado.
- 7 – Depois da análise final dos revisores, a versão corrigida do manuscrito será enviada aos Revisores de Métodos Quantitativos para análise. Sugestões serão enviadas aos autores para correções e resubmetida aos Revisores de Métodos Quantitativos para reavaliação.
- 8 – Os apontamentos dos Revisores e as respostas dos autores serão analisadas pelos Editores Associados e/ou Editor Chefe.
- 9 – O Editor Chefe emite uma decisão final.
- 10 – A decisão editorial final (aceitação ou rejeição) é enviada aos autores.
- 11 – Após esta etapa inicia-se o processo de edição. O manuscrito aceito é enviado à edição quanto à qualidade linguística do inglês.
- 12 – A revisão de inglês é enviada aos autores para análise e declaração de aceitação da revisão.
- 13 – Após esta etapa, inicia-se o processo de diagramação, com contato com o autor correspondente no que diz respeito às figuras, tabelas, fotografias, mapas, ilustrações e formatação em geral.
- 14 – Após esta etapa, é requerido aos autores declarar formalmente qualquer conflito de interesse, suporte financeiro e cessão de direitos autorais.
- 15 – Provas são enviadas ao autor correspondente para cuidadosa correção e acuidade tipográfica.
- 16 – A versão final de cada manuscrito é selecionada para compor o próximo número e será

enviada ao *Ahead of Print* na plataforma SciELO.

17 - A versão impressa é publicada e será disponibilizada em acesso aberto em <http://www.scielo.br/rsbmt>

[[Home](#)] [[Sobre a revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

Praça Thomaz Ulhôa, 706
Caixa Postal 118
38001-970 Uberaba MG Brasil
Tel.: +55 34 3318-5287
Fax: +55 34 3318-5279



rsbmt@rsbmt.ufbm.edu.br

Instructions for Authors

SUBMISSION INSTRUCTIONS

The authors should submit their articles via website (<http://ees.elsevier.com/bjid>). All papers must be submitted in English. Instructions for submission can be found on www.bjid.org.br/instructions.

JOURNAL SECTIONS

Manuscripts may be submitted within designated categories of communication, including:

- Original basic or clinical investigation (original papers);
- Brief reports of new methods or observations (brief communications);
- State-of-the-art presentations or reviews (review or mini review papers);
- Case presentation and discussion (case reports);
- Clinical infectious diseases images;
- Letters to the editor concerning previous publications;
- Editor's corner, containing ideas, hypotheses and comments (Editorial).

Original articles It is the most important section of the Journal. Original articles present new data about researches, issues and matters in the field of infectious diseases. These articles should conform strictly to the rules of publication, containing the following sections: abstract, objective or hypothesis, experimental design and methods used (statistical data), essential features of any interventions, main outcome measures, main results of the study, discussion and conclusion. An Original Paper should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- The text should be divided into separate sections (Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, References);
- No more than 50 references;
- Number of authors should not exceed 10;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be an original paper.

Brief communications A brief communication is focused in a single subject, which should be concise and a new point of view presentation of the subject. The scope of this section is intended to be wide and methods, results and discussion should be in the same text. A brief communication should contain:

- An abstract of no more than 200 words;

- No more than 4 keywords;
- Text should not exceed 12 double-spaced typed pages of 23 lines each;
- A maximum of 2 figures or tables (or one of each);
- No more than 20 references;
- The text should not be divided into separate sections;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a brief communication;
- Number of authors should not exceed 5.

Review article This section is for an updated presentation on a specific topic. This section should contain critical analysis and a new point of view of a relevant area and not a chronological description of the literature. This section aims to raise discussion among readers about controversial issues and the development of concepts in Infectious Diseases. A review article has to bring the new point of view of the focus of the subject. A minireview is focused on a restricted part of a subject. A minireview and review article should contain:

- An abstract of no more than 300 words;
- No more than 7 keywords;
- No more than 80 references;
- The text may be divided into sections with appropriate titles and subtitles;
- Number of authors should not exceed 5;
- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a review or mini review article.

Case reports Reports of clinical cases must contain a brief introduction about the nature of the case diagnosis, whose focus is the importance of the subject. The case has to be described with data and reports of examinations, treatment and prognosis of the case, discussion about the importance of the findings and presentation of the case in relation to literature. A case report should have a special interest to the clinical research community or it has to be a rare case; or to present a new diagnostic method; or new or modified treatment. A case report article should contain:

- An abstract of no more than 150 words;
- No more than 4 keywords;
- No more than 20 references;
- The text may be divided into sections: brief introduction with a review of literature, case reports, and conclusion;
- Number of authors should not exceed 5;

- Authors should state in the cover letter that the manuscript is intended to be a case report article.

Clinical infectious diseases images For submission to Clinical Infectious Diseases Images, which is not intended as a vehicle for case reports, all text should contain:

- A minimum of references (no more than 4);
- No abstract;
- The text should be uniform and contain no more than 300 words;
- Number of authors should not exceed 5.

Letters to the editor Letters may be written in response to previous content published in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID) or on any topic of general interest or concern. In the first case, the letter must emphasize the main message of the author of the article, focusing the contribution of that scientific article in the medical practice, drawing attention to the reference and impact it had on the community. The Letter to the Editor should contain:

- Title and the text with no more than 23 line pages;
- No more than 5 references;
- Number of authors should not exceed 5.

MANUSCRIPT FORMATS

Cover letter For all manuscripts, authors must indicate in a cover letter:

- Title of article;
- Name(s) of all author(s);
- Address, telephone number, fax, and e-mail of the corresponding author;
- A statement signed by the corresponding author confirming that the manuscript content represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person;
- The registration number of all randomized controlled trials and clinical trials, in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors;
- In the same case, the corresponding author has to send a statement indicating that written informed consent was obtained from all participants;
- All original articles should indicate the number of the Ethics Committee approval. If the article does not require an approval from the Ethics Committee, the author should write it separately in the article;

- Animal experimentation should be carried out according to institutional guidelines for experimental use of animals;
- The authors should obtain written permission to reproduce figures and tables from other sources;
- If the study was supported by any institution, it has to be indicated in the cover letter.

The cover letter should be in one double-spaced electronic document, title (no more than eight words in the title); no more than five (or ten, when an original article) authors may be listed, including name, institution, address, email address, telephone and fax number of each author; the text should contain no more than 300 words.

Supplements to the BJID include articles under a unifying theme, such as those summarizing presentations of symposia or focusing on a specific pathogenic process or antimicrobial agent. These will be added to the regular bimonthly publication as appropriate, and will be peer reviewed in the same manner as submitted manuscripts.

For each manuscript a registration number will be assigned and the author will be notified that the manuscript is complete and adequate to start the review process.

Format of articles and letters Contributions should be double-spaced and written in English. All manuscripts are to be typed double-spaced, including text, tables, references and legends; the character should be Time New Roman for all text, including figures, graphics and tables, and the tool "insert > symbol" for Greek character; size 12 should be used in all manuscript. The manuscripts have to be saved in Word document and the figures should be saved in CorelDraw, JPG or TIF document with high resolution - minimum of 300 dpi.

Use of digital resources Manuscript, Title Page, Cover Letter, and Author Agreement files in DOC format (Winword); bars or lines figures in XLS (Excell standard); photos and figures, with minimum resolution of 300 dpi, in JPG format. Please do not attach titles and letterings to illustrations. Please do not insert illustrations on text. Each illustration shall have an individual file. File name shall express illustration type and numbering (Figure 1, Table 2, for example). Illustration titles and letterings duly numbered shall be in separate text file. Copies or reproductions of other publications will be allowed only with the attachment of express authorization of the Editing company or the author of the original article.

Titles and subtitles

- Titles should be in bold;
- Subtitles should be in underscore;
- Titles should not have abbreviations or acronyms;
- Titles should not exceed two printed lines;
- Do not exceed 80 characters (inc. spaces).

Author affiliations

- Complete name of the authors (do not abbreviate);
- Affiliations of all authors;

- Name, mailing addresses, phone and fax number, e-mail, state, city and country of the corresponding author;
- Acknowledgement of research grants and fellowships (agency and grant number).

Keywords

- Consider the manuscript formats to verify the number of keywords;
- Use capital letter for the first word, the other should be in regular form.

Abstract

- The abstract should briefly contain the objective, data, methods, results and discussion of the study or presentation to ensure the reader's understanding of the manuscript;
- Do not use abbreviations in abstract;
- Do not use references in abstract;
- Consider the manuscript formats to verify the number of words.

Introduction

- In the text of Introduction the authors have to reveal the aim of the study, the purpose of the research, and the basic literature about the subject.

Material and methods

- This section should be subdivided by short underscore headings referring to methods used;
- This section cannot contain figures or tables;
- The material and methods used must be carefully described to allow the study repetition and to determine if the results were possible and correct;
- Papers with statistical testing should state the name of the test, the name for each analysis, the comparisons of interest, a justification of that test, the alpha level for all tests, whether the tests were over two-tailed, and the actual p-value for each test;
- Data sets should be summarized with descriptive statistics, which should include then for each data set, a clearly labeled measure of centre (such as the mean or median), and a clearly labeled measure of variability (such as the standard deviation or range).

Results

- The data of the results should be described concisely;
- Tables, graphics and figures have to be inserted in this section;
- The data presented in this section have to be oriented by universal units;

- Tables should be clear enough to the readers do not need the text to understand them;
- Tables should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Tables should present a short one-line title in bold;
- Tables have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the table;
- More information about the table should be below the symbols and abbreviations;
- If the table is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the Journal.

Figures/Graphics

- Figure legend should be listed one after the other, as a part of the text document, separate from the figure files, with a short one-line title in bold.
- Figures should be submitted in CDR, TIF, JPG file (300 dpi);
- Figures should be clear enough that the readers do not need the text to understand them;
- Figures should be presented on separate pages, portrait orientation, and upright on the page;
- Figures have to be numbered consecutively with Arabic numerals in the text;
- Symbols and abbreviations are defined immediately below the figure, as well as any other informations about the figures;
- If the figure is from another source, the authors must indicate the source and send the permission to the Journal.

Discussion

- The discussion presents the results comparing and evaluating them to literature and the existing knowledge. References to other studies should appear in the Discussion to compare the data obtained in the methods and results of the paper.

Acknowledgements

- Authors can thank anyone who helped them do the work or study.

Financial support

- The authors must indicate in the cover letter if the study was supported by institutions.

Abbreviations and symbols

- All abbreviations have to be explained in the text, figure and table legends when they first appear;
- Include the abbreviation in parenthesis after they first appearance.
- Abbreviate units [(5 mL, not 5 milliliters (mL))];
- Do not abbreviate institutions;
- Abbreviations must follow the format of the National Library of Medicine (USA) as in Index Medicus.

Units

- Follow the use of the The International System of Units (SI) (<http://physics.nist.gov/cuu/Units>).

References

- They should go in the final part of the article, according to the quotation order in the text, in which should appear the Arabic numerals superscripted. Please quote all the authors in works with until six authors; after six authors, quote the first three followed by the expression et al. Reference Manager or Endnote programs are strongly recommended for use adopting the "Vancouver" style.

Examples for reference citation are presented below. Authors should consult NLM's Citing Medicine for additional information on the reference formats.

Article

Turner SW, Young S, Goldblatt J, Landau LI, Le Souëf PN. Child hood asthma and increased airway responsiveness a relationship that begins in infancy. *Am J Respir Crit Care Med*. 2009;179:98-104.

Chang ML, Yang CW, Chen JC, et al. Disproportional exaggerated aspartate transaminase is a useful prognostic parameter in late leptospirosis. *World J Gastroenterol*. 2005;11:5553-6.

Book chapter Taylor DM, Personnet J. Epidemiology and natural history of *Helicobacter pylori* infection. In: Blaser MJ, Smith PD, Ravdin J eds. *Infections of the gastrointestinal tract*. New York: Raven Press, 1994.

Book

Polak JM, Van Noordan S. *An introduction to immunochemistry: current techniques and problems*. Oxford, UK: Oxford University Press, 1987.

Abstract Blatt SP, Butzin CA, Lucey DR, Melcher GP, Hendrix CR. Anergy status and CD4 CD29 memory T-cells predict progression to AIDS (abstract PoB 3480). In: *Program and abstracts: VIII International Conference on AIDS (Amsterdam)*. Amsterdam: CONGREX Holland, 1992.

SCOPE AND POLICY

The aim of BJID is to be relevant in the broadest sense to all aspects of Infectious Diseases and its fields. The manuscripts submitted to BJID should develop new concepts or experimental approaches; they have to describe new principles or improvement of an existing method and their results; they have to bring new data about a subject which will be important to physicians; so they could not be a single presentation of known data.

PUBLICATION ETHICS

- All the listed authors have to agree on all contents (authors must approve the article galley proof) and they are responsible for all informations included in the text.
- The corresponding author is responsible for all communications between the Journal and all coauthors, before and after publication.
- The corresponding author has to make a statement confirming that the content of the manuscript represents the views of the coauthors, that neither the corresponding author nor the coauthors have submitted duplicate or overlapping manuscripts elsewhere, and that the items indicated as personal communications in the text are supported by the referenced person.
- Any changes to the author list after submission, such as a change in the order of the authors, or the deletion or addition of authors, need to be approved by every author.
- The editors of BJID may seek advice about submitted papers not only from technical reviewers but also on any aspect of a paper that raises concerns. These may include, for example, ethical issues or issues of data or materials access.
- The authors warrant that the manuscript is original and contains no matter which is defamatory or is otherwise unlawful or which invades individual privacy or infringes any proprietary right or any statutory copyright.

Duplicate publication All manuscripts submitted to BJID must be original and not published or submitted for publication elsewhere.

Plagiarism and fabrication If a case of plagiarism occurs in BJID, a determination of misconduct will lead the BJID to exclude the article from the submission process or, if the article was already published, to exclude from the publication, and the authors will be accountable for the plagiarism.

Confidentiality The Journal editors treat the submitted manuscript and all communication with the authors as confidential between themselves and the peer-reviewers. Similarly, authors must treat communication with the Journal as confidential.

Page charges There is no charge to publish in The Brazilian Journal of Infectious Diseases (BJID).

PERMISSIONS

Copyright 2012 by the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. All rights reserved. Except as authorized in the accompanying statement, no part of the BJID may be reproduced in any form or by any electronic or mechanical means, including information storage and retrieval systems, without the publisher's written permission. Authorization to photocopy items for internal or personal use, or the internal or personal use by specific clients is granted by the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. for libraries and other users. This authorization does not extend to other kinds of copying such as copying for general distribution, for advertising or promotional purposes, for creating new collective works, or for resale.

Copyright The authors grant and assign the entire copyright to the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. for its exclusive use. The copyright consists of any

and all rights of whatever kind or nature protected by the copyright laws of Brazil and of all foreign countries, in all languages and forms of communication, and the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. shall be the sole proprietors thereof. The author(s) agree(s) to indemnify and hold the Brazilian Society of Infectious Diseases and Elsevier Editora Ltda. harmless against any claim to the contrary.

PEER REVIEW

BJID is a peer-review Journal, so all papers (except Letters to the Editor) are evaluated by this system. If the paper follows the scope of the Journal, it will be sent to two or three independent reviewers, selected by the editors (two from the editorial board and one any other expertise).

Authors may suggest appropriate consultants for review of the manuscript, but these suggestions may not be followed.

Timing The review process will ordinarily require two months.

Peer review policy *General information* The reviewers will be invited by the editor of BJID to do the comments about an article, in accordance with the specialty of each referee. Questions about a specific manuscript should be directed to the editor who is handling the manuscript.

Online manuscript review We ask peer-reviewers to submit their reports via our secure online system. The reviewer will receive a username and a login that provide him/her to download the article and in a specific form write their comments.

The review process All submitted manuscripts are read by the editorial staff. To save time for authors and peer-reviewers, only those papers that seem most likely to meet our editorial criteria are sent for formal review. Those papers judged by the editors to be of insufficient general interest or otherwise inappropriate are rejected promptly without external review (although these decisions may be based on informal advice from specialists in the field).

Manuscripts judged to be of potential interest to our readership are sent for formal review, typically to two or three reviewers, but sometimes more if special advice is needed (for example on statistics or a particular technique). The editors then make a decision based on the reviewers' advice, from among several possibilities:

- Accept, with minor corrections;
- Invite the authors to revise their manuscript to address specific concerns before a final decision is reached;
- Reject, but indicate to the authors that further work might justify a resubmission;
- Reject outright, typically on grounds of specialist interest, lack of novelty, insufficient conceptual advance or major technical and/or interpretational problems.

LEGAL AND ETHICAL CONSIDERATIONS

According to the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (International Committee of Medical Journal Editors - February 2006).

Conflict of interest Public trust in the peer review process and the credibility of published articles depend in part on how well conflict of interest is handled during writing, peer review, and editorial decision making. Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationships that inappropriately influence (bias) his or her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or

competing loyalties). These relationships vary from those with negligible potential to those with great potential to influence judgment, and not all relationships represent true conflict of interest. The potential for conflict of interest can exist whether or not an individual believes that the relationship affects his or her scientific judgment. Financial relationships (such as employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony) are the most easily identifiable conflicts of interest and the most likely to undermine the credibility of the journal, the authors, and of science itself. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships, academic competition, and intellectual passion.

Informed consent Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published. Authors should identify individuals who provide writing assistance and disclose the funding source for this assistance. Identifying details should be omitted if they are not essential.

Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

Ethical treatment When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach, and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should be asked to indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

Clinical trials registry Clinical trials must be registered according to WHO recommendation at www.who.int/ictrp/en/. The definition of clinical trial include preliminary trials (phase I): any study with prospective recruiting of subjects to undergo any health-related intervention (drugs, surgical procedures, equipment, behavioral therapies, food regimen, changes in health care) to evaluate the effects on clinical outcomes (any biomedical or health-related parameter, including pharmacokinetics measurements and adverse reactions).

The Journal has the right not to publish trials not complying with these and other legal and ethical standards determined by international guidelines.

ANEXO 3 – Levantamento de características associadas aos pacientes dos grupos caso e controle

ESTUDO DE *Klebsiella pneumoniae*

Ficha nº: _____ Prontuário: _____ Unidade:

_____ Leito: _____

Transferência inter-hospitalar: ☐ sim ☐ não Local de origem:

Data de Internação: _____ Data da Alta: _____ Sexo: _____ Idade: _____

Doença de Base:

Diagnóstico Clínico:

Co-morbidades:

Diabetes	Cardiopata	Neoplasia	Vascular	Nefropata	Hepático	
----------	------------	-----------	----------	-----------	----------	--

Infecção : ☐ comunitária

Sítio de infecção:

Pulmão	Sangue	Cirúrgico	Trato Urinário	Outro:
--------	--------	-----------	----------------	--------

Data de Diagnóstico da Infecção: _____

Infecção : ☐ hospitalar ☐ desconhecida

Sítio de infecção primário:

Pulmão	Sangue	Cirúrgico	Trato Urinário	Outro:
--------	--------	-----------	----------------	--------

Data de Diagnóstico da Infecção: _____

Sítio de infecção secundário:

Pulmão	Sangue	Cirúrgico	Trato Urinário	Outro:
--------	--------	-----------	----------------	--------

Data de Diagnóstico da Infecção:

Uso de Antimicrobianos: ☐ sim ☐ não

Quais: _____ Início _____ Término _____

1) _____

- 2) _____
- 3) _____
- 4) _____
- 5) _____
- 6) _____

Fatores de Risco:

- Intrínsecos: - ASIS:

- Imunossupressor: ☐ sim ☐ não

Quais:

- 1) _____
- 2) _____

- Extrínsecos:

- Cirurgia: ☐ sim ☐ não qual: _____ data: _____
- Respirador: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____
- Sonda Vesical: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____
- Sonda nasogástrica: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____
- Dreno: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____
- Tubo endotraqueal: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____
- Uso do CVC: ☐ sim ☐ não início: _____ término: _____

Localização do CVC: ☐ subclávia ☐ jugular ☐ artéria pulmonar

- Outros: _____ início: _____ término: _____

Evolução Clínica: ☐ alta ☐ óbito causa: _____

ANEXO 4 - Metodologias de preparo das soluções reagentes

Meio de ágar Müeller Hinton

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;

Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente;

Esterilizar em autoclave;

Distribuir 60 a 70 mL / placa de 150 mm de meio de ágar Müeller Hinton, de tal forma que a espessura do meio seja de 4 mm uniformemente distribuída;

Meio de Ágar MacConkey.

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;

Aquecer sob agitação até fundir o ágar completamente;

Esterilizar em autoclave;

Resfriar até 50°C e distribuir 20 a 25 mL em placas de Petri 90 mm estéreis;

Deixar em temperatura ambiente até resfriar;

Embalar as placas com plástico PVC transparente e guardar em geladeira de 4 a 8°C.

Caldo Müeller Hinton (suplementado com os sais apropriados para fornecer 20-25mg/L de cálcio e 10-12.5 mg/L de magnésio)

Dissolva 22 gramas em 1000 mL de água destilada;

Aqueça até ferver para dissolver o meio completamente;

Esterilizar autoclavando a 15 lbs de pressão a 116-121°C por 10 minutos.

Deixar em temperatura ambiente até resfriar;

Distribuir 4 a 5 ml em tubos de vidro esterilizados;

Armazenar o meio preparado a temperatura entre 2 e 8°C.

Caldo BHI – Brain Heart Infusion

Pesar e hidratar o meio conforme instruções do fabricante;

Distribuir 3,0 mL em tubos com tampa de rosca;

Esterilizar em autoclave;

Retirar os tubos da autoclave e deixar esfriar em temperatura ambiente.

Solução estoque de ácido clavulânico a 10 µg/mL

Dissolver 100 mg (1 comprimido) de ácido clavulânico em 10 ml de água destilada esterilizada. Esterilizar a solução por filtração e acrescentar 1 µL nos discos de ceftazidima e cefotaxima ou ceftriaxona. Aguardar 30 minutos para a secagem dos discos antes de utilizá-los.

Solução de ácido borônico a 50 mg/mL

Pesar 50 mg de ácido borônico e diluir em 1 mL de DMSO.

Solução de ácido borônico a 20 mg/mL

Pesar 20 mg de ácido borônico e dissolver em 1 mL de DMSO

Solução de EDTA 0,5 M

Pesar 186,1 g de EDTA dissodium 2 H₂O e dissolver em 1000 mL de água destilada . Ajustar o pH para 8,0 com NaOH 0,5 N e esterilizar a solução em autoclave 121°C por 15 minutos.

Preparo dos antimicrobianos para microdiluição

Tigeciclina (Concentração 50 mg; peso líquido 154 mg)

{Concentração desejada: 64 µg/mL (10x: 640 µg/mL)}

50 mg _____ 154 mg

0,640 mg _____ 1,9712 mg

Pesar 19,712 mg da droga e acrescentar 10 mL de H₂O destilada. Filtrar e diluir a solução 640 µg/mL 1/10 em caldo Müeller Hinton, a fim de obter uma concentração desejada inicial de 64 µg/mL.

Polimixina B (Concentração 500000 U)

{Concentração desejada: 1024 µg/mL (10x: 10240 µg/mL)}

10,24 mg _____ 1 mL

50 mg _____ 4,88 mL

Pesar 50 mg de polimixina B e acrescentar 4,88 mL de H₂O. Filtrar e diluir a solução 10240 µg/mL 1/10 em caldo Müller Hinton, a fim de obter uma concentração desejada inicial de 1024 µg/mL.