

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Deteccão de resistência aos carbapenêmicos e avaliação da produção de  
*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em isolados clínicos da  
família Enterobacteriaceae**

VANESSA BLEY RIBEIRO

PORTO ALEGRE, 2013



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**Detecção de resistência aos carbapenêmicos e avaliação da produção de  
*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) em isolados clínicos da  
família Enterobacteriaceae**

Tese apresentada por **Vanessa Bley Ribeiro** para  
obtenção do título de Doutor em Ciências  
Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Afonso Luis Barth  
Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Prehn Zavascki

PORTO ALEGRE, 2013

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Doutorado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28.03.2013, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Ana Lúcia da Costa Darini  
Universidade de São Paulo (USP)

Profa. Dra. Ana Lúcia Peixoto de Freitas  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

Prof. Dr. Cícero Armídio Gomes Dias  
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA)

#### CIP - Catalogação na Publicação

Bley Ribeiro, Vanessa  
Detecção de resistência aos carbapenêmicos e  
avaliação da produção de *Klebsiella pneumoniae*  
Carbapenemase (KPC) em isolados clínicos da família  
Enterobacteriaceae / Vanessa Bley Ribeiro. -- 2013.  
134 f.

Orientador: Afonso Luis Barth.  
Coorientador: Alexandre Prehn Zavaski.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-  
RS, 2013.

1. Enterobacteriaceae. 2. Carbapenêmicos. 3. KPC.  
I. Barth, Afonso Luis, orient. II. Prehn Zavaski,  
Alexandre, coorient. III. Título.

## **INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS**

O presente estudo foi desenvolvido no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). O projeto recebeu financiamento do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Ensino (FIPE) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (09-270) e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (10/0026-1). O autor recebeu bolsa de estudo patrocinada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).



À minha família

**“Enquanto houver você do outro lado, aqui do outro eu consigo  
me orientar”**

Teatro Mágico





## AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente ao meu mestre e amigo Prof. Afonso Luis Barth pela oportunidade concedida, pelo carinho e amizade de sempre. Obrigada pelos ensinamentos, pelos conselhos e pela convivência diária e tão agradável durante esses anos. Tu és o meu maior exemplo! Obrigada, professor!

Ao meu co-orientador, Prof. Alexandre Prehn Zavascki, pela imensa contribuição neste trabalho. Admiro o teu profissionalismo, a tua clareza e objetividade. Obrigada pelo carinho, orientação e por todo o aprendizado!

Aos práticos e bioquímicos da Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular pelo apoio durante esses anos de caminhada, pelos ensinamentos e pela amizade.

Aos meus bolsistas Adriano Rostirolla Linhares e Carolina Nodari por toda a responsabilidade e dedicação. Foram alguns anos de ótima companhia, muitos experimentos e um enorme aprendizado! Um obrigada bem especial a cada um de vocês.

A todo pessoal do nosso grupo de pesquisa, pelo apoio, pelos momentos de diversão e por trazerem alegria e descontração ao meu dia a dia. Um agradecimento especial às minhas queridas Luciana Nunes e Juliana Barin, pela participação e dedicação neste trabalho.

À Prof. Ana Lúcia Darini e, em especial, ao Leonardo Andrade, pelo grande empenho e pela oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao Dr. Jorge Sampaio pelo acolhimento e carinho. Gostaria de expressar minha enorme gratidão pelo imenso aprendizado em tão poucos dias! Obrigada por fazer parte deste trabalho!

Ao Marlos, pelo amor, pelo apoio, pelos bons conselhos e pela serenidade. Obrigada pela paciência, mesmo nos momentos mais difíceis e por deixar a minha vida muito mais cor-de-rosa! Tua participação na minha vida é fundamental, obrigada amor!

À minha família amada que é o meu alicerce. Agradeço a cada momento precioso que passamos juntos e ao amor incondicional.

Por fim, agradeço a Deus pela vida abençoada que tenho, pelas oportunidades concedidas e por colocar no meu caminho pessoas tão especiais, com as quais aprendi, aprendo e aprenderei muito nesta trajetória da vida! Obrigada por segurar a minha mão todos os dias!

## RESUMO

As enterobactérias são importantes patógenos comunitários e hospitalares e o aparecimento cada vez mais frequente de cepas multirresistentes tem sido motivo de preocupação em hospitais e instituições de saúde por todo o mundo, devido às opções terapêuticas restritas. Nas últimas décadas, o aumento global de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases plasmidiais induzíveis e  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), fizeram com que os carbapenêmicos fossem considerados a primeira opção para o tratamento de infecções graves. No entanto, a resistência aos carbapenêmicos já é considerada um problema de saúde pública em diversos países e a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência a esta classe de antibióticos na família Enterobacteriaceae. Considerando que apenas relatos esporádicos de cepas produtoras de KPC têm sido reportados no Rio Grande do Sul (RS), em contraste à situação de muitos estados brasileiros, este estudo teve por objetivo estabelecer a prevalência de KPC entre isolados com reduzida sensibilidade aos carbapenêmicos provenientes de 11 hospitais do RS, promover a caracterização molecular destes isolados, bem como avaliar as principais metodologias fenotípicas utilizadas na sua detecção. Diferenças significativas foram observadas entre os perfis de sensibilidade a imipenem (IPM) e meropenem (MEM), quando comparados ao de ertapenem (ERT), sendo que para este último menos de 10% dos isolados foram considerados sensíveis em comparação a mais de 73% para os dois primeiros. Nossos resultados também demonstraram que a redução de sensibilidade aos carbapenêmicos esteve associada à produção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC e ESBL, em detrimento de carbapenemases. Dentre as principais carbapenemases encontradas em enterobactérias, apenas cepas produtoras de KPC foram detectadas entre os isolados estudados, cuja prevalência foi de 4%. Entre os produtores de KPC, foram identificadas espécies de *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *K. georgiana*, provenientes de quatro hospitais distintos. A análise por sequenciamento revelou que todos foram produtores da enzima KPC-2. Quanto ao perfil de sensibilidade, a maioria foi altamente resistente aos  $\beta$ -lactâmicos e às quinolonas, enquanto que, amicacina e polimixina foram os antibióticos mais efetivos contra os isolados *in vitro*. Dois grupos clonais foram evidenciados entre os isolados de *E. cloacae* e *S. marcescens* e quatro entre os isolados de *K. pneumoniae*, na análise por PFGE. Com relação ao contexto genético que envolve o *bla*<sub>KPC-2</sub>, apenas uma caracterização parcial foi possível, evidenciando uma plataforma alterada em relação ao ambiente genético clássico (Tn4401). A análise

plasmidial dos produtores de KPC resultou em plasmídeos de tamanhos variáveis, evidenciando a maior prevalência de plasmídeos de ~20Kb no carreamento do gene. A análise também revelou que todos foram não- tipáveis pela técnica de PBRT. Com relação às metodologias fenotípicas utilizadas na detecção de KPC, o IPM apresentou melhor desempenho que o MEM na realização do teste de discos combinados com ácido borônico (AB), resultando em 100% de sensibilidade (SN) e 96.1% de especificidade (SP). A quantificação do Teste Modificado de Hodge (MHT), proposta neste trabalho, eliminou a subjetividade na sua interpretação e evidenciou um aumento considerável na SP do teste em relação à metodologia convencional. Em conclusão, nossos resultados confirmaram a elevada plasticidade genética e os diversos fenótipos observados na família Enterobacteriaceae; contribuíram para o conhecimento da epidemiologia local de resistência aos carbapenêmicos e dos isolados produtores de KPC; bem como reforçaram o valor das metodologias fenotípicas como ferramenta capaz de discriminar os mecanismos envolvidos na resistência aos carbapenêmicos.

Palavras-chave: Enterobacteriaceae, carbapenêmicos, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Teste de Hodge Modificado, Tn4401.

## ABSTRACT

### **Detection of carbapenem resistance and evaluation of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) production in clinical isolates from Enterobacteriaceae family**

The Enterobacteriaceae family includes important community and nosocomial pathogens frequently associated to multiresistance. Multidrug-resistant strains represent an important concern among hospitals and healthcare institutions around the world, due to the limited therapeutic options. In recent decades, the overall increase of strains producing inducible  $\beta$ -lactamases and extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) has led to the use of carbapenems as the first option for the treatment of serious infections. However, the carbapenem resistance has been considered a public health problem in many countries and the production of the enzyme *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) has been described as the major resistance mechanism to carbapenems in this family. Whereas only sporadic reports of KPC-producing strains have been reported in Rio Grande do Sul (RS), in contrast to the situation in many Brazilian states, this study aimed to establish the prevalence of KPC among isolates with reduced susceptibility to carbapenems from 11 distinct hospitals of RS, promote the molecular characterization of these isolates, as well as evaluate the main phenotypic methods used for KPC detection. Significant differences were observed among the susceptibility profiles of imipenem (IPM) and meropenem (MEM), when compared to ertapenem (ERT): less than 10% of the isolates were classified as susceptible to ERT compared to over 73% to IPM and MEM. Our results demonstrated that the reduced susceptibility to carbapenems, was mainly due to the production of AmpC  $\beta$ -lactamases and ESBL, instead of true carbapenemases. Regarding the major carbapenemases found in Enterobacteriaceae, only KPC was detected among the isolates studied, at a prevalence of 4%. KPC producers included the species *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* and *K. georgiana*, from four different hospitals. The sequencing analysis demonstrated that all of them were KPC-2 producers. According to the susceptibility profile, most were highly resistant to  $\beta$ -lactams and quinolones, whereas polymyxin and amikacin were the most effective drugs in vitro. Two clonal groups were detected among isolates of *E. cloacae* and *S. marcescens* and four among isolates of *K. pneumoniae*, by PFGE analysis. Only a partial characterization of the genetic context that involves the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was possible for these isolates, indicating an altered platform compared to the classic genetic environment (Tn4401). The plasmid analysis

indicated plasmids of variable sizes, with a higher prevalence of those of ~ 20Kb involved with the *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. The analysis also showed that all of them were non-typable by PBRT technique. With respect to the phenotypic methods used for KPC detection, IPM proved to present a better performance than MEM in the combined-disc test with boronic acid (AB), resulting in 100% of sensitivity (SN) and 96.1% of specificity (SP). The quantification of Modified Hodge Test (MHT), proposed in this study, eliminated the subjectivity of this test leading to a considerable increase in the SP of the test compared to the conventional methodology. In conclusion, our results confirmed the high genetic plasticity and the distinct phenotypes observed in the Enterobacteriaceae family; contributed to the knowledge of the local epidemiology of carbapenem resistance and for KPC-producing isolates; as well as reinforced the use of phenotypic methods as an useful tool able to discriminate the mechanisms involved in carbapenem resistance.

Keywords: Enterobacteriaceae, carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase, Modified Hodge Test, Tn4401.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – ácido borônico

CDC – Centers for Disease Control and Prevention

CIM – concentração inibitória mínima

CLSI – Clinical and Laboratory Standard Institute

DHP – deidropeptidase-1

EDTA – ácido etileno diamino tetracético

ERT – ertapenem

ESBL –  $\beta$ -lactamases de espectro estendido

EUA – Estados Unidos da América

FDA – Food and Drug Administration

Inc – grupo de incompatibilidade de plasmídeo

IPM – imipenem

KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LACEN – Laboratório Central de Saúde Pública

MALDI-TOF - Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time Of Flight

MBL – metalo  $\beta$ -lactamase

MER – meropenem

MHT – teste de Hodge modificado

MLST – multilocus sequence typing

OMP – proteína de membrana externa

OXA – oxacilinas

PBP – protein ligante de penicilina

PFGE – eletrofore em campo pulsado

SI – sequência de inserção

SN – sensibilidade

SP – especificidade

ST – sequence type

UTI – unidade de terapia intensiva





## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1. Objetivo geral.....	19
2.2. Objetivos específicos.....	19
3. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
3.1. Família Enterobacteriaceae.....	21
3.2. Evolução da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos na família Enterobacteriaceae ...	22
3.3. Produção $\beta$ -lactamases associada à impermeabilidade de membrana.....	26
3.4. Carbapenemases.....	27
3.4.1. Carbapenemases de classe A.....	28
3.4.2. Carbapenemases de classe B ou metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs).....	30
3.4.3. Carbapenemases de classe D ou oxacilinases (OXAs).....	31
3.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemases (KPC).....	32
3.5.1 KPC no Brasil e no Rio Grande do Sul.....	35
3.5.2 Contexto genético do gene <i>bla</i> <sub>KPC</sub> .....	36
3.5.3 Epidemiologia molecular dos isolados produtores de KPC.....	37
3.6. Identificação de isolados produtores de KPC no laboratório clínico.....	38
4. ARTIGOS CIENTÍFICOS.....	41
4.1. MANUSCRITO I - Detection of <i>bla</i> <sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant <i>Kluyvera georgiana</i> .....	41
4.2. MANUSCRITO II - Performance of quantification of Modified Hodge Test: an evaluation with <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates.....	51
4.3. MANUSCRITO III – Evaluation of <i>Enterobacteriaceae</i> with reduced susceptibility to carbapenems and molecular characterization of <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC)-producing isolates in Southernmost Brazilian region.....	73
5. DISCUSSÃO GERAL.....	97
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	103
7. REFERÊNCIAS.....	105
ANEXO – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	131



## 1. INTRODUÇÃO

As enterobactérias são importantes patógenos comunitários e hospitalares, podendo ser isoladas de diversos sítios anatômicos. Podem causar uma grande variedade de infecções, que variam desde infecções urinárias, gastroenterites e pneumonias até meningites e bacteremias (Abbott et al., 2011). Dados do início da década passada revelaram que sete dos dez principais patógenos gram-negativos associados a infecções de pacientes em unidades de terapia intensiva (UTI) compreendiam espécies de enterobactérias (Abbott et al., 2011). Mais recentemente, dados publicados pela National Healthcare Safety Network confirmaram que as espécies de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. estão entre os principais patógenos causadores de infecções nosocomiais (Hidron et al., 2008).

O aumento da resistência entre os membros da família Enterobacteriaceae tem culminado com o aparecimento cada vez mais frequente de espécies multirresistentes, para as quais as opções terapêuticas são muito limitadas (Kallen et al., 2010; Patel et al., 2009). Embora os gêneros *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. constituam a principal ameaça, a presença de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), AmpC  $\beta$ -lactamases e carbapenemases também tem sido bastante freqüente em outras espécies como *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Citrobacter* spp. e *Proteus* spp., entre outras (Andrade et al., 2011; Jones et al., 2009). A resistência aos carbapenêmicos já é considerada um problema de saúde pública em diversos países e a produção da enzima *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) tem sido descrita como o principal mecanismo de resistência a esta classe de antibióticos na família Enterobacteriaceae (Chen et al., 2012; Giakkoupi et al., 2011). A KPC é uma carbapenemase da Classe A de Ambler e se caracteriza por conferir resistência a todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Queenan e Bush, 2007). Esta característica, juntamente ao fato de ser uma enzima codificada por plasmídeos móveis, facilita a transferência do gene inter-espécies e agrava de forma significativa as conseqüências de sua disseminação.

Embora a identificação destes isolados seja o primeiro passo para guiar a escolha do tratamento antimicrobiano e a tomada de medidas efetivas de controle de infecção, a identificação clínica de cepas produtoras de KPC e de outras carbapenemases ainda permanece como um desafio aos laboratórios clínicos, devido à complexidade apresentada por essas enzimas. As metodologias fenotípicas têm basicamente como princípio a detecção de atividade carbapenemase, como o teste de Hodge Modificado (MHT), e a inibição enzimática, a partir da utilização combinada de inibidores específicos de  $\beta$ -lactamases, como o ácido

borônico (AB), a cloxacillina e o ácido etileno diamino tetracético (EDTA), entre outros (Giske et al; 2011; Pasteran et al., 2009; Anderson et al., 2007). Apesar disso, as metodologias moleculares continuam sendo fundamentais na confirmação do mecanismo de resistência, já que os métodos fenotípicos muitas vezes não são sensíveis o suficiente ou ainda são pouco específicos para garantir um diagnóstico confiável.

O surgimento de KPC no Brasil foi descrito em 2009 e, a partir de então, se intensificaram os relatos desta enzima na família Enterobacteriaceae (Pavez et al., 2009; Andrade et al., 2011; Pereira et al., 2012). Por outro lado, ainda permanecem escassos os dados referentes a isolados produtores de KPC no Rio Grande do Sul, justificando a implementação de um estudo direcionado que permita o conhecimento da epidemiologia local, bem como, a investigação dos métodos utilizados na detecção de estas enzimas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo geral

Estabelecer a prevalência de KPC nos isolados clínicos estudados da família Enterobacteriaceae com diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos e avaliar as metodologias fenotípicas utilizadas na detecção dessas carbapenemases.

### 2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Estabelecer a prevalência de KPC nos isolados clínicos estudados com resistência ou diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos;

2.2.2. Avaliar a diversidade genética dos isolados produtores de KPC, através da técnica de tipagem molecular (PFGE);

2.2.3. Realizar o sequenciamento do gene *bla*<sub>KPC</sub>, a fim de estabelecer a epidemiologia molecular dos isolados;

2.2.4. Avaliar os plasmídeos e o ambiente genético no qual o gene *bla*<sub>KPC</sub> está inserido;

2.2.5. Avaliar os métodos fenotípicos utilizados para a triagem de KPC (MTH e teste baseado na utilização do AB);

2.2.6. Propor uma avaliação quantitativa do MHT como método de triagem para detecção de isolados produtores de KPC;

2.2.7. Caracterizar fenotipicamente os demais mecanismos associados à resistência aos carbapenêmicos nas amostras selecionadas.



### 3. REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1. Família Enterobacteriaceae

As enterobactérias são bacilos gram-negativos que, bioquimicamente, caracterizam-se por serem anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa, e por não possuírem exigências nutricionais complexas, podendo ser cultivadas em uma variedade de meios de cultura. Apresentam a capacidade de fermentar a glicose com a produção de ácido e são amplamente distribuídas na natureza, algumas sendo encontradas no solo e na água, outras como habitantes da microbiota intestinal de humanos e animais, e algumas ainda estão implicadas exclusivamente em processos patogênicos. Ainda que apresentem algumas características em comum, a família Enterobacteriaceae é extremamente diversa, abrangendo gêneros e espécies que se diferenciam pela capacidade de fermentação de uma série de outros carboidratos, pela produção de toxinas ou por suas características antigênicas (Abbott et al., 2011). Devido à sua heterogeneidade, frequentemente são descritos novos gêneros e espécies, como é o caso da *Morganella psychrotolerans* e do gênero *Cronobacter* (Iversen et al., 2008; Emborg et al., 2006). Este último é composto por cinco espécies, uma das quais ainda é usualmente denominada *Enterobacter sakazakii*. A espécie é reconhecida por causar doenças infecciosas graves, com altas taxas de mortalidade em neonatos e a sua transferência ao gênero *Cronobacter* deveu-se às diferenças genéticas em relação às demais espécies de *Enterobacter* (Iversen et al., 2008).

Muitas espécies bacterianas pertencentes a essa família são importantes patógenos causadores de infecções comunitárias e hospitalares, podendo ser isoladas de uma grande variedade de sítios anatômicos, como o trato urinário e intestinal, o trato respiratório, abscessos, corrente circulatória e até o sistema nervoso central (Konemam et al., 2008). As espécies de maior importância clínica compreendem *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp., dos quais alguns estão entre os dez no ranking dos principais microrganismos associados a infecções hospitalares. Entre os anos de 2002 e 2004, nos Estados Unidos (EUA), sete dos 10 principais bacilos gram-negativos isolados de pacientes internados em unidades de terapia intensiva (UTI) eram enterobactérias (Abbott et al., 2011). Dados divulgados pelo Centers for Disease Control and Prevention (CDC) em 2008, também confirmaram a presença das espécies de *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp. e *E. coli* entre os 10 patógenos mais comuns entre as infecções de origem hospitalar (Hidron et al., 2008).

Recentemente, dados publicados pelo SENTRY Antimicrobial Surveillance Program revelaram uma maior prevalência de infecções causadas por bacilos gram-negativos na América Latina em comparação aos EUA e ao Canadá. Este mesmo estudo mostrou que a *E. coli* e o gênero *Klebsiella* são os principais agentes etiológicos em infecções de corrente circulatória e infecções de pele e tecidos moles (Gales et al., 2012). Embora menos prevalentes, algumas espécies como *S. marcescens*, *Proteus* spp. e *Morganella* spp. também são frequentemente isoladas e podem estar relacionadas a quadros infecciosos graves (Zalas-Więcek et al., 2012; Garcia et al., 2011; Chang et al., 2010). Ainda, os gêneros *Salmonella* e *Shigella* estão relacionados a infecções alimentares podendo causar desde gastroenterites até febre tifóide (Velge et al., 2012).

O aparecimento cada vez mais comum de enterobactérias resistentes aos antibióticos constitui um dos principais desafios aos laboratórios clínicos e às equipes médicas. A emergência de cepas pan-resistentes de *Klebsiella* spp. tem sido relatada mundialmente e a presença de ESBL e carbapenemases já foi descrita em praticamente todos os membros da Família Enterobacteriaceae (Abbott et al., 2011).

### **3.2. Evolução da resistência aos antibióticos $\beta$ -lactâmicos na família Enterobacteriaceae**

Uma das principais classes de antimicrobianos utilizadas no tratamento das infecções causadas por enterobactérias são as cefalosporinas (Abbott, 2011). Elas diferenciam-se entre si pelo seu espectro de ação e, por isso, são classificadas como cefalosporinas de primeira, segunda, terceira ou quarta geração, sendo as três últimas as mais ativas contra os bacilos gram-negativos. Entretanto, nas últimas décadas, o aumento global de cepas produtoras de ESBL e AmpCs plasmidiais tem restringido o uso das cefalosporinas e cefamicinas no tratamento de infecções causadas por enterobactérias (Turner, 2009; Deshpande, 2006). A produção dessas enzimas está principalmente relacionada às espécies bacterianas mais frequentemente isoladas nas infecções de origem hospitalar e, conseqüentemente, mais associadas ao desenvolvimento de multirresistência (Gales et al., 2012).

As AmpC  $\beta$ -lactamases são classificadas como enzimas de classe C e podem ser encontradas tanto no cromossomo bacteriano quanto inseridas em plasmídeos móveis. Quanto às suas propriedades enzimáticas, são ativas contra penicilinas, cefalosporinas e cefamicinas, como a cefoxitina e o cefotetan. Ainda, podem hidrolisar o aztreonam, porém a uma taxa muito inferior se comparadas às enzimas das classes A e D (Jacoby, 2009). Muitos bacilos gram-negativos, tais como *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp. e *Providencia*



spp., possuem um gene de AmpC cromossomal e expressam a enzima de forma constitutiva. Uma hiperexpressão do gene pode ocorrer por indução pela exposição a agentes  $\beta$ -lactâmicos, ou ainda, em casos de hiperprodução constitutiva da enzima. A disseminação clonal de cepas hiperprodutoras de AmpC não é um problema mundial, porém uma vez selecionada, a hiperprodução pode ser estável de modo a atingir taxas de que variam de 25 à 40% em isolados de *E. cloacae* provenientes de pacientes internados (Jones et al; 2008; Livermore e Woodford, 2006). Embora sejam menos frequentes em espécies como *E. coli*, *Klebsiella* spp. e na família *Proteus*, a presença dessas enzimas pode ser encontrada em praticamente qualquer espécie da família Enterobacteriaceae, uma vez que as AmpC também podem ocorrer em plasmídeos transferíveis (Jacoby, 2009). As AmpC plasmidiais começaram a surgir em meados dos anos 90 e, desde então, têm sido altamente frequentes por todo o mundo, sendo as enzimas mais encontradas as que pertencem às famílias CMY, FOX e DHA (Thomson, 2010). Assim como as de origem cromossomal, elas também conferem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de amplo espectro e praticamente não afetam a sensibilidade às cefalosporinas de 4º geração e aos carbapanêmicos. As AmpC plasmidiais são frequentemente encontradas em isolados de *Klebsiella* spp., *E. coli*, *Salmonella* spp, *E. aerogenes*, *C. freundii* e *P. mirabilis* e estão associadas à multirresistência. Como principais fatores de risco para infecções graves causadas por cepas produtoras de AmpC plasmidiais estão o tempo de hospitalização, a permanência em UTIs e a administração prévia de antibióticos, especialmente cefalosporinas de amplo-espectro e combinações de inibidores de  $\beta$ -lactamases (Jacoby, 2009).

Deshpande e colaboradores (2006) ao pesquisarem a presença de AmpC em isolados de *E. coli* com teste fenotípico positivo, porém com teste confirmatório negativo para ESBL, encontraram um percentual de 100% de positividade para genes de AmpC, como CMY, FOX e DHA. Resultados semelhantes foram observados por diversos autores, mostrando que os testes fenotípicos não são definitivos para distinguir AmpCs de outras  $\beta$ -lactamases (Pasteran et al., 2008; Tsakris et al., 2008; Alvarez et al., 2004). Assim, devido às dificuldades de detecção laboratorial, ausência de critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) e necessidade de implantação de testes confirmatórios confiáveis, dados de prevalência referentes às AmpCs ainda são escassos, embora, elas pareçam ser menos frequentes que as ESBL (Jacoby, 2009).

As ESBL são enzimas plasmidiais, pertencentes à classe A de Ambler, capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas e o aztreonam e seu impacto clínico imergiu nos anos

80, a partir do aparecimento dos primeiros surtos relacionados à sua produção (Paterson e Bonomo, 2005; Brun-Buisson et al., 1987). As ESBL mais comumente encontradas pertencem às famílias TEM, SHV e CTX-M e são mais freqüentes nas espécies *E. coli* e *K. pneumoniae*, embora também sejam detectadas entre as demais enterobactérias (Chong et al., 2011; Thomson, 2010). Na década de 90, um estudo europeu que avaliou pacientes internados em UTIs evidenciou que 25% das cepas de *Klebsiella* spp. já eram produtoras de ESBL (Babini e Livermore, 2000). Na América do Norte, foram descritos diversos surtos associados às enzimas TEM. Moland e colaboradores encontraram a presença de ESBL em isolados de *K. pneumoniae* em 75% dos 24 centros médicos que integraram o estudo nos EUA (Moland et al., 2002). Neste mesmo período, foram detectadas as primeiras ESBL na América do Sul, em cepas de *K. pneumoniae* produtoras de SHV (Casellas e Goldberg, 1989), seguidas pelo aparecimento e disseminação das enzimas do tipo CTX-M (Radice et al., 2002). Foi também na América do Sul que as enzimas GES-1 e BES-1 foram primeiramente descritas, sendo a primeira em um isolado de *K. pneumoniae* proveniente da Guiana Francesa e a última em uma *S. marcescens* isolada na cidade do Rio de Janeiro, no Brasil (Bonnet et al., 2000; Poirel et al., 2000). No início dos anos 2000, a presença de ESBL em isolados clínicos de *Klebsiellae* provenientes de UTIs variava de 30 à 60% em países como Brasil, Colômbia e Venezuela. As ESBL também foram detectadas na América Central, bem como nos continentes africano e asiático. Na China, de 25 à 30% das cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* carregavam genes de ESBL, ao passo que, em outros países como Japão e Tailândia esse percentual era inferior a 10% (Paterson e Bonomo, 2005). Em 2006, um estudo que englobou amostras da América do Norte, América Latina e Europa apontou uma prevalência de ESBL de 77% nas enterobactérias avaliadas (Bhavnani et al., 2006). Mais recentemente, dados do SENTRY referentes à América do Sul apontaram que aproximadamente 25 e 50% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente, apresentaram um fenótipo ESBL (Gales et al., 2012). Há indícios de que a presença mais freqüente de ESBL no gênero *Klebsiella* deve-se à sua facilidade de adaptação no ambiente hospitalar, fazendo com que a sua sobrevivência nas mãos e nas superfícies seja maior do que a de outras bactérias, facilitando assim a ocorrência de infecções cruzadas e a disseminação de determinantes de resistência (Casewell e Phillips, 1981).

A detecção de resistência às cefalosporinas tem sido cada vez mais comum em isolados de enterobactérias, muitos dos quais acabam também desenvolvendo resistência a outras classes de antibióticos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas (Livermore et al.,

2008). Devido às reduzidas opções terapêuticas disponíveis, os carbapenêmicos constituem os agentes de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por cepas produtoras de ESBL ou AmpC, muitas vezes, sendo os únicos antibióticos que permanecem ativos.

Os carbapenêmicos são antibióticos caracterizados pelo seu amplo espectro de ação contra bactérias gram-negativas e gram-positivas e são estáveis à degradação pela maioria das  $\beta$ -lactamases, incluindo ESBL e AmpC (Zhanel et al., 2007). Como todos os agentes  $\beta$ -lactâmicos, os carbapenêmicos atuam inibindo a síntese da parede celular através da ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). A sua utilização clínica iniciou em meados dos anos 80 (Lyon, 1985) e, atualmente, quatro são os carbapenêmicos que têm o seu uso aprovado pelo Food and Drug Administration (FDA), sendo eles, o imipenem, o meropenem, o ertapenem e o doripenem. O imipenem é suscetível à degradação pela enzima deidropeptidase-1 (DHP), encontrada nos túbulos renais e, por este motivo, sua utilização requer co-administração com um inibidor da DHP, como a cilastatina. Os demais carbapenêmicos foram, então, desenvolvidos para minimizar esta falha, sendo o meropenem e o ertapenem estáveis à degradação pela DHP. O último, porém, difere dos demais por apresentar atividade limitada contra *Enterococcus* spp., *Pseudomonas* spp. e outros bacilos gram-negativos não-fermentadores, comumente associados a infecções nosocomiais (Zhanel et al., 2007; Zhanel et al., 2005). O doripenem foi o carbapenêmico mais recentemente desenvolvido, aprovado pelo FDA em 2007, e combina amplo espectro de ação com maior atividade contra *P. aeruginosa* (Matthews e Lancaster, 2009; Nicolau, 2008).

Embora fossem esporádicos os casos de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias nos anos 90, nas últimas duas décadas, como resultado da pressão seletiva, a resistência a estes antibióticos tem aumentado de maneira considerável por todo mundo (Gales et al., 2012; Gupta et al, 2011; Nordmann e Poirel, 2002). Devido à sua ubiquidade e frequente aquisição de elementos genéticos móveis, aliadas à utilização não criteriosa dos carbapenêmicos, a disseminação de enterobactérias resistentes a estes antibióticos representa uma ameaça emergente (Grundmann et al., 2010; Livermore, 2009). Dados recentes do SENTRY mostraram que no Brasil o gênero *Klebsiella* spp. foi o que apresentou menor taxa de sensibilidade aos antibióticos imipenem e meropenem (89%) comparado aos demais países latino-americanos avaliados, cujos percentuais variaram entre 92 e 99%. No gênero *Enterobacter* spp., para o meropenem o percentual de sensibilidade foi equivalente a 98%, enquanto que, para o imipenem apenas de 92% (Gales et al., 2012). Além disso, evidenciou-se que a colistina e a amicacina, juntamente com os carbapenêmicos, consistem em uma das

poucas opções terapêuticas que ainda apresentam um elevado percentual de sensibilidade frente às infecções hospitalares causadas por enterobactérias. Estes resultados confirmam as importantes mudanças nos padrões de resistência a estes antibióticos, considerando que, até metade dos anos 2000 as taxas de resistência aos carbapenêmicos eram inferiores a 1%.

Uma variedade de mecanismos pode estar envolvida na resistência aos carbapenêmicos, compreendendo desde alterações dos alvos de ligação por alteração das proteínas ligantes de penicilina (PBP), hiperexpressão de bombas de efluxo, diminuição da permeabilidade da membrana externa, até a produção de enzimas altamente capazes de promover a hidrólise dos carbapenêmicos (Nordmann et al., 2009; Szabó et al., 2006; Yigit et al., 2001; Villar et al., 1997). Dentre estes mecanismos, as alterações de permeabilidade da membrana associadas à produção de  $\beta$ -lactamases de baixa afinidade aos carbapenêmicos, bem como a produção de carbapenemases constituem os dois principais e mais freqüentes mecanismos de resistência aos carbapenêmicos na família Enterobacteriaceae (Grundmann et al., 2010; Nordmann, 2010; Jacoby et al., 2004; Nordmann e Poirel, 2002; Cao et al., 2000; Martinez-Martinez et al., 1999).

### **3.3. Produção $\beta$ -lactamases associada à impermeabilidade de membrana**

A membrana externa é a primeira linha de defesa da célula e o ingresso de substâncias é controlado pelas proteínas da membrana externa, denominadas de OMPs (“outer membrane proteins”). As porinas são um grupo particular dessas proteínas e receberam essa denominação por formarem canais (poros) de difusão não específicos na membrana (Nikaido, 2003). As primeiras porinas foram caracterizadas em *E. coli* e hoje servem como padrão de comparação àquelas encontradas em diferentes espécies de enterobactérias. As principais porinas caracterizadas nestes microrganismos são a OmpC e a OmpF em isolados de *E. coli* e *Serratia* spp. e seus respectivos homólogos OmpK36 e OmpK35 em espécies de *Klebsiella* spp. e Omp36 e Omp35 em *Enterobacter* spp. (Pàges et al., 2008, Nikaido 2003).

Estas proteínas foram descobertas em 1976 e, desde então, têm sido altamente relacionadas ao perfil de sensibilidade das bactérias gram-negativas a muitos antibióticos (Nakaido, 2003). Porinas alteradas podem resultar de vários fatores, dentre os quais, alterações de tamanho, redução dos seus níveis de expressão ou mutações. Essas mudanças podem ocasionar polimorfismos, mudanças conformacionais ou ainda proteínas com atividade funcional reduzida. As ESBL e as AmpCs por si só não são capazes de promover a hidrólise dos carbapenêmicos, pois apresentam valores elevados de  $K_m$  para estes antibióticos,

resultando em uma baixa afinidade enzima-substrato. Por outro lado, quando há perda ou redução das porinas de membrana há também uma restrição da entrada do antibiótico e, consequentemente, uma diminuição da sua concentração no interior da célula, fazendo com que as  $\beta$ -lactamases de baixa afinidade consigam promover sua hidrólise e, consequentemente, conferir resistência ao tratamento (Pagès et al., 2008).

Diversos estudos têm mostrado que alterações nos padrões de expressão de porinas, em combinação com produção de ESBLs ou AmpCs, têm sido implicadas na resistência aos carbapenêmicos (Adler et al., 2013; Woodford et al., 2007). Doumith e colaboradores (2009) mostraram que a resistência ao ertapenem encontrada em isolados de *Klebsiella* spp. e *Enterobacter* spp. foi devida exclusivamente à combinação destes mecanismos, enquanto Suh e colaboradores (2010) demonstraram que a combinação de hiperprodução de AmpC cromossomal com perda da OmpF foi responsável pela aquisição de resistência ao meropenem em isolados de *S. marcescens*. Adler e colaboradores (2013) avaliaram a influência das  $\beta$ -lactamases adquiridas na resistência espontânea aos carbapenêmicos em *E. coli* e encontraram que o principal mecanismo de resistência ao ertapenem e ao meropenem foi a perda das porinas OmpC e OmpF em combinação com a expressão de  $\beta$ -lactamases como TEM, OXA ou CTX-M. A importância destas porinas na penetração do imipenem e meropenem já havia sido anteriormente demonstrada por Cornaglia e colaboradores (1992) que evidenciaram uma redução de 90% nos coeficientes de permeabilidade destes antibióticos em mutantes deficientes de OmpC e OmpF. Ainda mais importante, foi a constatação de que a redução na expressão das porinas, na ausência de uma enzima capaz de hidrolisar o antibiótico, não é capaz de aumentar as MICs para os carbapenêmicos, mesmo que a permeabilidade atinja níveis altamente reduzidos, demonstrando que alterações no influxo do antibiótico afetam o padrão de sensibilidade da bactéria apenas na existência de uma barreira de inativação enzimática efetiva. Outro estudo recentemente publicado constatou que a presença de ESBL e/ou AmpC em associação com alterações das porinas de membrana foi o mecanismo responsável por conferir diminuição na sensibilidade aos carbapenêmicos nos 61 isolados clínicos investigados, compreendendo *Enterobacter* spp., *S. marcescens*, *M. morgani*, *E. coli* e *Klebsiella* spp. (Wosniak et al., 2012).

### 3.4. Carbapenemases

As carbapenemases representam a mais versátil família de  $\beta$ -lactamases, com um espectro de ação muito mais abrangente em relação às demais enzimas que hidrolisam os  $\beta$ -

lactâmicos. Isto por que apresentam a propriedade de hidrolisar os antibióticos carbapenêmicos, além de penicilinas e cefalosporinas (Queenan e Bush, 2007; Nordmann e Poirel, 2002). Essas enzimas pertencem a duas principais famílias, diferenciadas pelo seu mecanismo hidrolítico, devido à presença de zinco ou serina no sítio de ação. As primeiras carbapenemases foram descritas em bacilos gram-positivos e foram denominadas de metalo  $\beta$ -lactamases, devido à sua inibição pelo EDTA. Posteriormente, verificou-se que essas enzimas apresentavam, ao menos, um átomo de zinco no seu sítio ativo, responsável por facilitar a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico (Frere et al., 2005). No final dos anos 80, surgiu outro grupo de carbapenemases na família Enterobacteriaceae, porém, que não era inibido pelo EDTA (Medeiros e Hare, 1986). Estudos subsequentes demonstraram que essas enzimas, ao invés do zinco, utilizavam a serina no seu sítio ativo e eram inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (Rasmussem et al., 1996; Yang et al., 1990). Também, de acordo com suas propriedades moleculares, as carbapenemases podem ser agrupadas em enzimas de classes A (penicilinases), B (metaloenzimas) e D (oxacilinases), segundo a classificação de Ambler. Aquelas pertencentes às classes A e D são serino-carbapenemases, enquanto que, as pertencentes à classe B são metalo  $\beta$ -lactamases (Queenan e Bush, 2007; Nordmann e Poirel, 2002).

Até o início dos anos 90, as carbapenemases eram descritas como  $\beta$ -lactamases cromossomais, espécie-específicas e cada uma com suas características bem definidas. Porém, o aparecimento de carbapenemases plasmidiais mudou completamente os padrões de disseminação dessas enzimas, tornando-se um problema global de disseminação inter-espécies (Yigit et al., 2001; Scaife et al., 1995; Watanabe et al., 1991).

### **3.4.1. Carbapenemases de classe A**

Atualmente, existem quatro principais famílias de carbapenemases de classe A, cujas representantes são a SME, a NMC/IMI, a GES e a KPC, sendo as duas últimas consideradas as de maior importância clínica devido ao fato de serem enzimas plasmidiais (Queenan e Bush, 2007).

O aparecimento destas carbapenemases se deu no início da década de 80 com a família SME, mesmo antes do início da ampla comercialização dos carbapenêmicos (Yang et al., 1990). Esta família consiste de três variantes enzimáticas, a SME-1, a SME-2 e a SME-3, que diferem entre si por um único aminoácido (Queenan et al., 2006; Queenan et al., 2000). São enzimas cromossomais encontradas exclusivamente em *S. marcescens*, que tiveram seu

surgimento na Inglaterra e, posteriormente, foram detectadas na Argentina e em diversas regiões dos EUA, onde foram responsáveis por surtos na década de 90 (Pasteran et al., 2009; Queenan et al., 2000). Embora relativamente esporádicos, relatos recentes têm sido publicados demonstrando a capacidade destas enzimas de conferir resistência ao imipenem e resultar em perfis variáveis de sensibilidade aos demais  $\beta$ -lactâmicos (Fairfax et al., 2011; Carrer et al., 2008). As enzimas da família NMC/IMI também foram descritas há mais de 20 anos e tem sido raramente detectadas em isolados de *Enterobacter* spp. (Radice et al., 2004; Pottumarthy et al., 2003). Ambas apresentam um perfil hidrolítico semelhante e uma sequência de aminoácidos com 97% de identidade (Rasmussen et al., 1996). Seu espectro de ação inclui aminocarboxipenicilinas, cefalotina, imipenem e aztreonam e sua atividade é parcialmente inibida por ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Nordmann e Poirel, 2002). Os genes codificantes para essas  $\beta$ -lactamases estão comumente localizados no cromossomo bacteriano, o que provavelmente tem contribuído para a sua raridade (Queenan e Bush, 2007). Apesar disto, a detecção plasmidial do gene que codifica a enzima IMI-2 foi caracterizada em um *E. asburiae* de origem ambiental e, mais recentemente, em um isolado clínico de *E. cloacae* na China (Yu et al., 2006; Aubron et al., 2005).

Outra família é representada pela GES, que atualmente possui 22 variantes enzimáticas (Delbruck et al., 2012). Essas enzimas foram originalmente classificadas como ESBLs, devido ao seu espectro de hidrólise que incluía apenas penicilinas e cefalosporinas. Porém, a substituição de um único aminoácido na posição 170 do sítio catalítico modificou o seu perfil de hidrólise (Queenan e Bush, 2007). A primeira enzima com atividade carbapenemase foi a GES-2, isolada de uma *Pseudomonas aeruginosa* e a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos foi, então, responsável pela re-classificação da família (Queenan e Bush, 2007; Poirel et al., 2001). Análises cinéticas mostraram que a eficiência catalítica da GES-2 contra o imipenem foi 100 vezes maior comparada à GES-1, porém 1.000 vezes menor quando comparada às demais carbapenemases de classe A. Diversas enzimas com atividade carbapenemase tem sido descritas em todo o mundo, incluindo GES-4,-5,-6,-8,-11,-14,-18,-20, (Barrios et al., 2012; Bebrone et al., 2012; Girlich et al., 2012a). No Brasil, existe apenas um relato referente à identificação de uma *K. pneumoniae* produtora de GES-5, resistente a todos os  $\beta$ -lactâmicos (Picão et al., 2010). Embora estejam mais associadas com ocorrências singulares, pequenos surtos já foram descritos em *P. aeruginosa* produtoras de GES-2 na África do Sul e em *K. pneumoniae* produtora de GES-5 na Coreia (Jeong et al., 2005; Poirel et al., 2002).

As KPCs constituem a família de maior importância clínica entre as carbapenemases de classe A, porém, como constituem o principal objeto de investigação deste trabalho, serão discutidas separadamente mais adiante.

### 3.4.2. Carbapenemases de classe B ou metalo- $\beta$ -lactamases (MBLs)

As MBLs apresentam um espectro amplo de ação, que inclui além dos carbapenêmicos, cefalosporinas e penicilinas, não hidrolisando apenas os monobactams (Queenan e Bush, 2007). Caracterizam-se por não serem afetadas pelos inibidores clássicos de  $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico e tazobactam, e são sensíveis à inibição pelos quelantes de metais, como o EDTA, o ácido mercaptopropiônico e o ácido dipicolínico (Giske et al., 2011; Thomson, 2010). Em contraste à situação atual, onde as MBL frequentemente são enzimas plasmidiais, as primeiras MBL estudadas eram enzimas cromossomais presentes no ambiente e em bactérias, como o *Bacillus cereus* e a *Aeromonas* spp. (Queenan e Bush, 2007). Embora sua ocorrência seja mais freqüente em bacilos gram-negativos não-fermentadores, algumas famílias são altamente prevalentes entre as enterobactérias (Pollini et al., 2012; Poirel et al., 2010; Yong et al., 2009). Muitas enzimas têm sido detectadas nos últimos anos e, até o momento, 12 famílias já foram descritas: IMP, VIM, SPM, SIM, GIM, DIM, AIM, NDM, KHM, SMB, TMB e FIM.

IMP e VIM constituem as famílias mais antigas e estão amplamente distribuídas entre os gêneros *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. e também entre as enterobactérias (Tzouvelekis et al., 2012; Walsh, 2010). Já foram descritas em torno de 28 variantes de IMP e 25 variantes de VIM ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). Constantemente, estas enzimas são detectadas em isolados multirresistentes, associadas a surtos hospitalares (Breathnach et al., 2012; Miró et al., 2012; Rodriguez-Martinez et al., 2010). Por outro lado, as enzimas SPM-1, GIM-1 e AIM-1 são variantes únicas identificadas apenas em *P. aeruginosa*, isoladas no Brasil, na Alemanha e na Austrália, respectivamente, apresentando uma prevalência local (Yong et al., 2007; Castanheira et al., 2004; Gales et al., 2003). A enzima SIM-1 foi descoberta na Coreia em uma triagem em larga escala de cepas de *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. resistentes ao imipenem e apresenta aproximadamente 70% de identidade com a família IMP (Lee et al., 2005). A KHM foi identificada em um isolado de *C. freundii* no Japão e não se difundiu para outros países (Sekiguchi et al., 2008). Em 2009, Yong e colaboradores descreveram a presença de uma nova MBL em um isolado de *K. pneumoniae*, denominada de NDM-1. Após a sua identificação, a enzima se espalhou rapidamente para o Reino Unido,



Índia, Paquistão e Bangladesh, principalmente entre isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* e, onde chegou a atingir uma prevalência de até 18,5% em algumas instituições de saúde (Perry et al., 2011; Kumarasamy et al., 2010). Atualmente, a NDM já foi detectada em outras espécies da família Enterobacteriaceae, bem como em *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. e (Yang et al., 2012; Nordmann et al., 2011; Kumarasamy et al., 2010). Relatos de isolados produtores de NDM têm sido altamente frequentes em todos os continentes e constituem uma ameaça emergente (Lowe et al., 2013; Bonnin et al., 2012; Lowman et al., 2011). Até o momento, 6 variantes da enzima já foram descritas (Williamson et al., 2012). Em 2010, outra família de MBL surgiu com a DIM-1, caracterizada a partir de um isolado de *Pseudomonas stutzeri* na Holanda. O gene *bla*<sub>DIM-1</sub> estava presente em um integron de classe I que continha outros dois cassetes gênicos, codificantes de resistência aos aminoglicosídeos e a desinfetantes (Poirel et al., 2010). As três últimas enzimas descritas são a SBM, a TBM e a FIM que foram isoladas de *S. marcescens*, *Achromobacter xylosoxidans* e *P. aeruginosa*, respectivamente entre 2011 e 2012 e até o momento permanecem restritas aos seus locais de origem (El Salabi et al., 2012; Pollini et al., 2012; Wachino et al., 2011).

### 3.4.3. Carbapenemases de classe D ou oxacilinases (OXAs)

As carbapenemases de classe D foram originalmente denominadas de oxacilinases devido à sua elevada capacidade hidrolítica contra cloxacilina, oxacilina e meticilina (Naas e Nordmann, 1999). São enzimas fracamente inibidas pelo ácido clavulânico e o EDTA e caracterizam-se por apresentar baixa atividade hidrolítica contra imipenem e meropenem (Queenan e Bush 2007). Isolados produtores de OXA que apresentam MIC elevados para os carbapenêmicos, frequentemente, possuem outros mecanismos adicionais de resistência, como efluxo, diminuição de permeabilidade e alteração de PBPs (Nordmann e Poirel, 2002). As OXA carbapenemases são frequentemente encontradas em *Acinetobacter* spp., mas têm aumentado de forma significativa os relatos de sua presença também em enterobactérias (Poirel et al., 2010b).

No gênero *Acinetobacter* spp. as OXA podem ser codificadas tanto no cromossomo quanto em plasmídeos transferíveis, sendo a principal representante a OXA-23 (Poirel et al., 2010b). Essa enzima tem sido mundialmente detectada e tem sido responsável por surtos em inúmeros países, inclusive no Brasil (Mugnier et al., 2010; Martins et al., 2009). Outras, como a OXA-51, a OXA-24, a OXA-58 e, mais recentemente, a OXA-143 também estão associadas à resistência aos carbapenêmicos nesta espécie (Zavascki et al., 2010). Embora em menor

extensão, algumas enzimas como a OXA-40 e a OXA-198 também são encontradas em *P. aeruginosa* (El Garch et al., 2011; Sevillano et al., 2009). Na família Enterobacteriaceae, a OXA-48 é a principal representante e tem se tornado clinicamente relevante devido à sua rápida disseminação. Trata-se de uma enzima de origem plasmidial, principalmente detectada em *K. pneumoniae* e *E. coli*, embora já tenha sido relatada em outras espécies, como *C. freundii* e *E. cloacae* (Dimou et al., 2012; Nazic et al., 2005). A OXA-48 foi primeiramente identificada na Turquia, onde atualmente é considerada a carbapenemase de maior importância clínica (Kilic et al., 2011; Gulmez et al., 2008; Poirel et al., 2004). Já foi identificada na Ásia, na África e, recentemente, foram descritos os primeiros casos no Canadá e nos EUA (Lascols et al., 2012; Mathers et al., 2012; Goren et al., 2011; Moquet et al., 2011). Na Europa, os relatos têm sido cada vez mais frequentes e diversos surtos já foram publicados (Glupczynski et al., 2012; Cuzon et al., 2011a; Pitart et al., 2011; Poirel et al., 2011). Outra OXA carbapenemase tem sido relatada na família Enterobacteriaceae, denominada de OXA-181. A enzima é uma variante da OXA-48, foi recentemente descrita e já tem sido reportada em diversos países, como Índia, Singapura, África do Sul e Canadá (Brink et al., 2013; Mataseje et al., 2013, Koh et al., 2012; Castanheira et al., 2011; Potron et al., 2011).

### **3.5. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC)**

Embora o termo KPC esteja associado à espécie bacteriana onde a enzima foi encontrada pela primeira vez, representa uma denominação comum utilizada para descrever a presença da enzima independentemente da espécie. As KPCs já foram identificadas em praticamente todos os membros de importância clínica da família Enterobacteriaceae e, inclusive, em espécies de não-fermentadores, como a *P. aeruginosa* e o *A. baumannii* (Robledo et al., 2011; Tsakris et al., 2010; Rasheed et al., 2008; Tibbetts et al., 2008; Miriagov et al., 2003; Bratu et al., 2005a). Atualmente, as KPCs constituem as  $\beta$ -lactamases de classe A de maior importância clínica e epidemiológica e as principais enzimas associadas à resistência aos carbapenêmicos na família Enterobacteriaceae. Conferem resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, considerando que seu espectro hidrolítico inclui penicilinas, cefalosporinas, monobactams e carbapenêmicos (Patel et al., 2009; Queenan e Bush, 2007). Na sua grande maioria, são enzimas codificadas por plasmídeos móveis, o que facilita a transferência do gene inter-espécies e, conseqüentemente, acentua o seu potencial de disseminação (Patel et al., 2009; Queenan e Bush, 2007). Este fato, aliado à capacidade de conferirem resistência aos carbapenêmicos, fez com que as KPC se disseminassem mundialmente e se tornassem um

problema de saúde pública em diversos países, devido às restrições terapêuticas limitadas disponíveis para o tratamento de infecções graves (Chen et al., 2012; Giakkoupi et al., 2011; Navon-Venezia et al., 2009, Nordmann et al., 2009).

Até o momento, já foram descritas 12 variantes desta enzima (KPC-2 a KPC-13) ([www.lahey.org/studies](http://www.lahey.org/studies)). O primeiro membro da família, denominado de KPC-1, foi isolado em 1996 na Carolina do Norte, em uma *K. pneumoniae* multirresistente (Yigit et al., 2001). Logo após a descoberta da KPC-1, novos relatos já apontavam o surgimento de uma nova enzima na costa leste dos EUA, a KPC-2 (Miriagou et al., 2003; Moland et al., 2003). A identificação de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 tornou-se alarmante devido aos elevados índices de *Klebsiellae* produtoras de ESBL no EUA, para as quais os carbapenêmicos eram considerados uma das poucas opções terapêuticas (Paterson e Bonomo, 2005). Muitas destas espécies foram inconsistentemente reconhecidas, pois as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para os carbapenêmicos eram inferiores aos pontos de corte de resistência estabelecidos (Lomaestro et al., 2006). Além disso, as falhas dos métodos laboratoriais na identificação de isolados produtores de KPC quando estavam associados também à produção de outras  $\beta$ -lactamases foi outro fator que contribuiu para as dificuldades de detecção destas enzimas, principalmente quando não conferiam resistência *in vitro* aos carbapenêmicos (Moland et al., 2003). Em 2008, uma correção da sequência do gene da KPC-1 revelou uma sequência idêntica ao gene da KPC-2, evidenciando o mesmo subtipo enzimático (Yigit et al., 2001. Errata publicada em 2008). A partir de então, a designação KPC-1 não foi mais utilizada.

Desde o seu surgimento, a KPC-2 tem sido altamente prevalente nos EUA. Dados do CDC, em 2009, mostravam que a enzima era regularmente detectada em diversas instituições de saúde na cidade de Nova York (Patel et al., 2009). Dados mais recentes revelaram que a mesma já foi identificada em 38 dos 50 estados americanos (<http://www.cdc.gov/HAI/organisms/cre.html>). O primeiro isolado produtor de KPC fora dos EUA ocorreu na França, a partir de um paciente que havia sido internado em Nova York, sugerindo a “importação” da enzima (Naas et al., 2005). Apesar disto, foi na Grécia que a KPC-2 tornou-se endêmica (Zagorianou et al., 2012; Giakkoupi et al., 2011). O CDC europeu estimou que em torno de 49% dos isolados de *K. pneumoniae* são resistentes aos carbapenêmicos e, que 53% desta resistência deve-se especialmente à produção de KPC-2 ([http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111\\_SUR\\_AMR\\_data.pdf](http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/1111_SUR_AMR_data.pdf)).

Atualmente, é a enzima de maior prevalência mundial, presente em praticamente todos os

continentes e, responsável por surtos hospitalares em diversos países (Brink et al., 2012; Andrade et al., 2011; Giakkoupi et al., 2011; Zhang et al., 2011; Kitchel et al., 2009).

A KPC-3 foi identificada a partir da variação de um único aminoácido em relação à sequência da KPC-2, durante um surto de *K. pneumoniae* em Nova York (Woodford et al., 2004). Logo após a sua descoberta, a enzima também foi detectada em um isolado de *E. cloacae*, que foi reportado como sensível aos carbapenêmicos pelos sistemas automatizados (Bratu et al., 2005a). Estudos cinéticos revelaram um perfil similar à KPC-2, porém, com um aumento significativo na hidrólise da ceftazidima e uma diminuição discreta na hidrólise da cefoxitina (Alba et al., 2005). Embora menos frequente que a KPC-2, esta variante enzimática também está difundida mundialmente e, inclusive, já foi identificada em espécies de não-fermentadores (Walsh, 2010). Em 2009, foi detectada em sete de dez isolados produtores de KPC pertencentes ao complexo *A. calcoaceticus-baumannii* em Porto Rico (Robledo et al., 2010). Em Israel os surtos começaram em 2006 e, atualmente, o país encontra-se em uma situação de epidemia causada por um clone produtor de KPC-3, geneticamente relacionado a um clone causador de surtos também nos EUA (Navon-Venezia et al., 2009). Na Itália, um levantamento realizado entre os anos de 2009 e 2011 revelou a disseminação massiva do gene *bla*<sub>KPC-3</sub> entre cepas de *K. pneumoniae* em dois hospitais, evidenciando também o envolvimento de outros setores hospitalares, além das UTIs, no isolamento destes germes (Richter et al., 2012).

Em 2004, na Escócia, a KPC-4 foi identificada em um isolado do gênero *Enterobacter* spp. (Palepou et al., 2005). Embora também tenha sido relatada em mais um isolado de *K. pneumoniae* em Porto Rico, parece não ter havido uma disseminação para outras partes do mundo (Robledo et al., 2007). Em 2007, em um isolado de *P.aeruginosa*, surgiu um novo subtipo enzimático, a KPC-5 (Villegas et al., 2007). Até o momento, apenas as enzimas KPC-2 e KPC-3 haviam sido descritas neste gênero (Wolter et al., 2007). A enzima demonstrou ser intermediária às enzimas KPC-2 e KPC-4 quanto à sequência de aminoácidos e mais sensível à inibição pelo ácido clavulânico (Wolter et al., 2009).

As variantes mais recentemente identificadas apresentam poucos relatos na literatura e parecem permanecer restritas ao seu local de origem. As enzimas KPC-6, KPC-7 e KPC-8 foram identificadas em isolados de *K. pneumoniae*, em Porto Rico e nos EUA (Gregory et al., 2010; Perez et al., 2010; Robledo et al., 2008). Já a KPC-9 foi detectada em Israel, a partir de uma *K. pneumoniae* multirresistente isolada de uma infecção urinária. Após algumas semanas de internação, foi coletada uma cultura de escarro do mesmo paciente que revelou a presença

de uma *E. coli* resistente a todos os  $\beta$ -lactâmicos, também produtora da enzima (Hidalgo-Grass et al., 2012). A KPC-10 teve sua origem em Porto Rico e foi isolada durante uma triagem de aproximadamente 300 isolados de *Acinetobacter* spp. multirresistentes (Robledo et al., 2010). As enzimas KPC-11, KPC-12 e KPC-13 têm suas sequências depositadas no GenBank, porém informações adicionais ainda não estão disponíveis (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/GenBank>).

### 3.5.1 KPC no Brasil e no Rio Grande do Sul

O primeiro relato de isolados produtores de KPC no Brasil ocorreu em 2009, referente a quatro cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, isoladas na cidade de Recife em 2006 (Monteiro et al., 2009). Logo após, Peirano e colaboradores (2009) caracterizaram 6 cepas produtoras de KPC-2 no Rio de Janeiro, isoladas entre os anos de 2007 e 2008. Em uma pesquisa regional de vigilância de cepas resistentes aos carbapenêmicos realizada em São Paulo, entre os anos de 2003 à 2008, foram detectadas duas cepas de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, sendo uma delas com data de isolamento de 2005, trazendo evidências de que o surgimento de  $\beta$ -lactamases do tipo KPC no Brasil foi anterior a 2006 (Pavez et al., 2009). Esta evidência foi corroborada por Zavascki e colaboradores (2010) que descreveram o caso de uma *K. pneumoniae* produtora de KPC isolada em outubro de 2005, em Florianópolis, Santa Catarina. Durante o período de 2006 à 2009, 57 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 provenientes de cinco estados brasileiros tiveram seu perfil clonal avaliado no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar da FIOCRUZ. Dez diferentes clones foram identificados, com um clone predominante encontrado nos estados do Rio de Janeiro e do Espírito Santo (Seki et al., 2011). Entretanto, foi no ano de 2010, que houve uma grande dispersão de isolados produtores de KPC no país, alarmando as instituições de saúde e as autoridades públicas. Foi neste contexto, que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária publicou a primeira nota técnica brasileira (Nota Técnica N° 1/2010) instituindo diretrizes para a detecção de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos. Além disso, a nota recomenda que uma cultura das cepas resistentes seja enviada aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) para que, em conjunto com a FIOCRUZ, seja realizada a confirmação do mecanismo de resistência. A partir da publicação da nota técnica, a FIOCRUZ recebeu mais de 500 isolados produtores de KPC, provenientes de 11 estados brasileiros, incluindo Santa Catarina, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo, Alagoas, Pernambuco, Ceará, Piauí, Maranhão, Amazonas e o Distrito Federal. De um total de 130 cepas de *K.*

*pneumoniae* selecionadas para avaliação da relação genética entre os isolados, vinte e dois perfis clonais foram observados (Pereira et al., 2012). Ainda, dados recentemente publicados apontam para o surgimento do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> também entre isolados de *K. pneumoniae* na Paraíba, no norte do Brasil, evidenciando sua ampla disseminação por todas as regiões do país (Fehlberg et al., 2012). Embora a grande maioria dos isolados produtores de KPC seja de *K. pneumoniae*, a presença do gene já foi evidenciada nas espécies *E. coli*, *S. marcescens*, *C. freundii*, *P. aeruginosa* e *P. putida* e, até o presente momento, apenas o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> foi detectado entre os isolados brasileiros (Almeida et al., 2012; Jácome et al., 2012; Andrade et al., 2011; D'Alincourt Carvalho-Assef et al., 2010).

No Rio Grande do Sul, os relatos ainda são escassos. Em 2009, Zavascki e colaboradores descreveram a presença do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em dois isolados de *E. cloacae*. O primeiro, proveniente da cidade de Porto Alegre e o segundo, de Lageado e apesar de não ter sido encontrada nenhuma relação epidemiológica entre os pacientes, os isolados apresentaram um perfil clonal. Outros três isolados de *E. cloacae* produtores de KPC provenientes do sul do estado são mencionados por Andrade e colaboradores (2011) que investigaram os plasmídeos e o ambiente genético envolvidos na disseminação do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> em isolados brasileiros.

### 3.5.2 Contexto genético do gene *bla*<sub>KPC</sub>

Diversos estudos têm mostrado uma variedade de plasmídeos nos quais o gene *bla*<sub>KPC</sub> tem sido detectado. Eles podem apresentar tamanhos variados, carregar diferentes determinantes de resistência aos antibióticos e pertencer a diferentes grupos de incompatibilidade (Inc), incluindo IncFII, IncL/M, IncN, IncA/C, IncX (Chen et al., 2012a; Chen et al., 2012b, Andrade et al., 2011, Gomes et al., 2011; Curiao et al., 2010). A capacidade de transposição do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi inicialmente sugerida a partir da observação de que porções de genes codificantes de transposases e genes auxiliares à transposição estavam ligadas à sua estrutura (Navon-Venezia et al., 2006; Naas et al., 2005). Mas foi em 2008, que o ambiente genético do gene *bla*<sub>KPC</sub> foi primeiramente caracterizado, evidenciando a sua localização em um transposon derivado do Tn3, denominado Tn4401. O transposon apresenta uma tamanho de aproximadamente 10 Kb e sua estrutura compreende, além do gene *bla*<sub>KPC</sub>, duas sequências imperfeitas inversamente repetidas, um gene de transposase, um gene de resolvase e duas sequências de inserção (SI), a *ISKpn6* e *ISKpn7*. Atribui-se ao fato de o gene estar inserido em um elemento transponível, como o Tn4401, a sua ampla mobilidade e disseminação entre diferentes plasmídeos e diferentes espécies bacterianas por todo o mundo

(Cuzon et al., 2011b; Kitchel et al., 2009). Embora exista uma grande similaridade entre as estruturas que circundam o gene *bla<sub>KPC</sub>* provenientes de isolados bacterianos de diversas regiões geográficas, variações em uma região não conservada do transposon, localizada *upstream* ao gene *bla<sub>KPC</sub>*, deram origem a diferentes isoformas. Enquanto as isoformas *a*, *b* e *c* diferenciam-se por uma deleção de 100 à 200 pb, a isoforma *d*, apesar de apresentar homologia com algumas regiões da isoforma *b*, consiste em uma estrutura de apenas 4,7 Kb (Chen et al., 2012b; Cuzon et al., 2010; Naas et al., 2008). O Tn4401d foi detectado em um isolado de Nova York resistente aos demais carbapenêmicos, porém sensível ao imipenem, sugerindo que a estrutura do transposon possa estar relacionada à eficiência da atividade carbapenemase (Chen et al., 2012b). Gootz e colaboradores (2009) demonstraram que deleções *upstream* ao gene podem modificar sua região promotora, influenciando o seu nível de expressão. Um baixo nível de resistência aos carbapenêmicos foi evidenciado em isolados que apresentaram um baixo número de cópias do gene e também a presença da isoforma *b*, contribuindo para a hipótese de que tanto o número de cópias quanto as deleções *upstream* ao gene são importantes para o aumento da produção da enzima (Kitchel et al., 2010). Variações do Tn4401 ou mesmo ambientes genéticos distintos têm sido descritos e, embora sejam menos prevalentes, demonstram a diversidade genética e as frequentes recombinações que ocorrem na região que circunda o gene *bla<sub>KPC</sub>* (Chen et al., 2012; Gomes et al., 2011; Shen et al., 2009). No Brasil, a presença do gene tem sido associada às isoformas *a* e *b* do Tn4401 e a uma diversidade de plasmídeos, dentre os quais, os mais prevalentes pertencem ao grupo IncN (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011).

### 3.5.3 Epidemiologia molecular dos isolados produtores de KPC

Quanto à epidemiologia molecular, análises por Multilocus Sequence Typing (MLST) têm revelado o envolvimento de diversos tipos clonais (ST) entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC. O complexo clonal (CC) 258, que compreende o ST258, ST11 e ST437, está mundialmente disseminado e a detecção de isolados multirresistentes está principalmente associada ao ST258. Nos EUA, em alguns países europeus, como a Polônia, a Grécia e a Bélgica, bem como em alguns países da América do Sul, o ST258 está associado à emergência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC-2 (Chen et al., 2012; Giakkoupi et al., 2011; Gomes et al., 2011; Bogaerts et al., 2010; Baraniak et al., 2009). O mesmo ST é predominante em isolados produtores de KPC-3 de um clone hiperepidêmico identificado em Israel e, posteriormente, na Colômbia (Lopes et al., 2011; Navon-Venezia et al., 2009). Na

Itália também foi verificada a disseminação massiva de um clone produtor de KPC-3 pertencente ao ST258 (Richter et al., 2012). O ST11 foi reportado pela primeira vez na França e, atualmente tem sido identificado na Ásia e na Europa (Qi et al., 2011; Ko et al., 2010; Baraniak et al., 2009). Outros ST menos comuns também são frequentemente detectados em regiões geográficas distintas. É o caso do ST384, relacionado a cepas produtoras de KPC-2 na Espanha e, recentemente, detectado um isolado produtor da enzima KPC-4 nos EUA (Chen et al., 2012; Curiao et al., 2010). Ainda, o ST340, primeiramente detectado em isolados produtores de KPC na Grécia, também já foi identificado em diversos isolados produtores de KPC no Brasil (Pereira et al., 2012; Giakkoupi et al., 2011). Quanto aos isolados brasileiros, Andrade e colaboradores (2011) encontraram o ST258 como clone mais frequente quando avaliaram cepas coletados nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro. No entanto, um estudo mais abrangente, que incluiu isolados de diversas regiões do país, revelou a predominância do ST437 e do ST11, corroborando com achados anteriores que já haviam evidenciado estes dois ST como os mais prevalentes (Nicoletti et al., 2012; Pereira et al., 2012; Seki et al., 2011). Além de alguns ST menos frequentes, outros 14 novos ST foram identificados entre os isolados brasileiros (Nicoletti et al., 2012; Pereira et al., 2012).

### **3.6. Identificação de isolados produtores de KPC no laboratório clínico**

Considerando o impacto clínico causado pelo aumento cada vez mais freqüente de cepas resistentes aos carbapenêmicos por produção de KPC, a identificação laboratorial destes isolados é fundamental para a tomada de medidas de controle de infecção, bem como para a escolha apropriada da terapia antimicrobiana. Por outro lado, a identificação destes microrganismos no laboratório clínico de rotina ainda é considerada um desafio, devido à complexidade apresentada por essas enzimas e aos métodos pouco específicos utilizados na sua detecção.

Diversos estudos relataram falhas na identificação de isolados produtores destas carbapenemases, a partir de metodologias automatizadas utilizadas rotineiramente para avaliação do perfil de sensibilidade dos isolados aos carbapenêmicos. Resultados discrepantes foram apontados em uma variedade de espécies entéricas incluindo produtores e não-produtores de KPC, quando testadas frente a imipenem e meropenem por uma variedade de sistemas automatizados (Lat et al., 2011; Tenover et al., 2006; Bratu et al., 2005b; Steward et al., 2003). Falsa sensibilidade em isolados produtores de KPC reportada em alguns estudos também foi atribuída a variações na densidade do inóculo bacteriano (Bratu et al., 2005).



Recentemente, Woodford e colaboradores (2010), comprovaram a baixa habilidade dos sistemas comerciais (VITEK 2, MicroScan e BD Phoenix) em distinguir produtores de carbapenemases de isolados produtores de outras  $\beta$ -lactamases, com uma especificidade que não ultrapassou 38%. A utilização de metodologias, como fitas de Etest, também pode revelar resultados inconsistentes devido ao crescimento de colônias dentro das zonas de inibição, dificultando a interpretação dos resultados (Anderson et al., 2007; Tenover et al., 2006). A microdiluição em caldo é o método considerado padrão-ouro para avaliação do perfil de sensibilidade em isolados da família Enterobacteriaceae, mas apesar disso, isolados produtores de KPC, muitas vezes, podem conferir um baixo nível de resistência *in vitro* aos carbapenêmicos, resultando em CIM que se encontram fora da faixa de resistência, dificultando ainda mais a sua identificação (Nordmann et al., 2011; Pasteran et al., 2009, Patel et al., 2009). Em relação ao substrato utilizado, o ertapenem é o carbapenêmico mais sensível na detecção de KPC e tem sido empregado em diversos testes diagnósticos (Nordmann et al., 2012b; Landman et al., 2010). Em 2007, Anderson e colaboradores já haviam demonstrado que um percentual de sensibilidade superior a 90% para os métodos de disco-difusão, Etest, VITEK 2 e MicroScan foi encontrado somente quando o antibiótico ertapenem foi utilizado (Anderson et al., 2007). Por outro lado, é claramente reconhecida que a resistência a esse antibiótico não está relacionada necessariamente à produção de carbapenemases. A resistência ao ertapenem pode desenvolver-se a partir de outros mecanismos, como por exemplo, a alteração das porinas de membrana associada à produção de ESBL ou AmpC, o que reflete uma baixa especificidade desse substrato, independentemente do método utilizado (Quale et al., 2008).

O MHT foi proposto pelo CLSI em 2009, como metodologia fenotípica confirmatória para detecção de carbapenemases, por apresentar uma sensibilidade elevada na detecção de KPC (CLSI, 2009). Por outro lado, confere resultados positivos também na presença de outras carbapenemases e outras  $\beta$ -lactamases como, ESBL e AmpC (Doyle et al., 2012; Girlich et al., 2012b; Carvalhaes et al., 2010; Pasteran et al., 2010; Pasteran et al., 2009). A subjetividade e as dificuldades de interpretação do teste, aliadas à sua baixa especificidade, fizeram com que o CLSI, em 2011, recomendasse a sua realização apenas de forma facultativa, condicionada à utilização dos pontos de corte anteriores aos estabelecidos no documento publicado (CLSI, 2011). Paralelamente, metodologias alternativas têm sido utilizadas em ensaios fenotípicos para a detecção de KPC, na tentativa de se padronizar um teste capaz de unir sensibilidade e especificidade satisfatórias. O ácido borônico (AB), primeiramente

utilizado para a detecção de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC, tem sido o composto mais testado, uma vez que estudos recentes demonstraram também a sua atividade inibitória contra algumas carbapenemases. Tsakris e colaboradores (2009) encontraram 100% de sensibilidade e especificidade na detecção de KPC, quando testaram o AB com os substratos imipenem e meropenem em isolados produtores e não-produtores de KPC, incluindo produtores de ESBL, AmpC e carbapenemases de Classe B. No mesmo ano, um estudo mais abrangente, confirmou a sensibilidade elevada do teste, porém, demonstrou que o AB é capaz de inibir carbapenemases de Classe A em geral, não sendo específico para KPC (Pasteran et al., 2009). Considerando a maior prevalência de KPC em Enterobacteriaceae, em detrimento de outras carbapenemases de Classe A, diversos estudos têm proposto a utilização combinada de inibidores de  $\beta$ -lactamases, como o AB, o ácido dipicolínico e a cloxacilina, com a finalidade de aumentar a especificidade dos testes para a detecção de KPC, reduzindo os resultados falsos positivos por produção de outras enzimas, como AmpC e MBL (Birgy et al., 2012; Giske et al., 2011; Pournaras et al., 2010). Meios de cultura específicos também têm sido desenvolvidos para detecção de isolados produtores de carbapenemases, como a exemplo do CHROMagar® KPC e do SUPERCARBA®. Ambos, quando testado frente a isolados produtores de KPC, apresentam uma boa sensibilidade, porém também permitem o crescimento de isolados produtores de outras carbapenemases e, ainda, de isolados resistentes ao ertapenem não produtores de carbapenemases, fazendo com que apresentem uma baixa especificidade (Girlich et al., 2012c; Moran et al., 2011). A técnica mais recentemente desenvolvida é a aplicação da espectroscopia de massa por MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Flight) para detecção de carbapenemases, a partir dos produtos de degradação dos substratos carbapenêmicos. Embora apresente uma excelente sensibilidade, a técnica também não é específica para a detecção de KPC (Hrabák et al., 2012; Burckhardt e Zimmermann, 2011). Desta forma, confirmação do mecanismo de resistência permanece restrita às técnicas de biologia molecular, o que ainda não representa uma realidade para a maioria dos laboratórios clínicos, considerando o alto custo de implementação e manutenção dessas metodologias.

#### **4. ARTIGOS CIENTÍFICOS**

##### **4.1. MANUSCRITO I - Detection of *bla*<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*.**

Manuscrito publicado no *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*.



## Detection of *bla*<sub>KPC-2</sub> in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*

Vanessa Bley Ribeiro<sup>1,2†</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>3†\*</sup>, Carolina Silva Nodari<sup>1</sup>, Ana Maria Sandri<sup>4</sup>, Marilaine Peres Silva<sup>4</sup>, Juliana Coutinho Campos<sup>5</sup>, Jorge Luiz Mello Sampaio<sup>6</sup>,  
Afonso Luís Barth<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>2</sup> Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de

Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>3</sup> Infectious Diseases Service, Hospital de

Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil; <sup>4</sup> Infection Control Service, Hospital São

Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil;

<sup>5</sup> Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Brazil; <sup>6</sup> Microbiologia -

Fleury Medicina e Saúde, São Paulo, Brazil.

Running title: KPC-2 producing *K. georgiana*

**Keywords:** resistance, KPC-2, *Klebsiela pneumoniae* carbapenemase

\* Corresponding Author: Alexandre P. Zavascki. Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, 2350 Ramiro Barcelos St, Porto Alegre, 90.035-903, Brazil.

Phone/fax: +55 (51) 33598152, e-mail: azavascki@hcpa.ufrgs.br

†Both authors contributed equally to the article.



Since the redefinition of the Enteric Group 8 as a new genus of the family Enterobacteriaceae designated *Kluyvera*, there have been some reports describing its role as a human pathogen, mostly recovered from respiratory samples.<sup>1</sup> Antimicrobial agents active against *Kluyvera* include third-generation cephalosporins, carbapenems, fluoroquinolones and aminoglycosides.<sup>1</sup> Although *Kluyvera* genus is believed to be the source of genes encoding CTX-M-type extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs), reports of multidrug-resistant isolates of this genus are still rare.

*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)-producing Enterobacteriaceae have been increasingly reported worldwide and currently represents the major mechanism of carbapenem resistance in this family.<sup>2</sup> Regardless the fact that these enzymes are more frequently found in *K. pneumoniae* and *Enterobacter* spp., they have already been reported in virtually all members of the Enterobacteriaceae.<sup>2</sup> In this report, we describe the presence of KPC-2 in *K. georgiana*.

A patient admitted in a hospital from Porto Alegre, Brazil, in 2011 required mechanical ventilation and a ventilator-associated pneumonia (VAP) was diagnosed. A carbapenem-resistant *Kluyvera*, initially identified as *K. cryocrescens* by VITEK2 (bioMérieux, France) and a carbapenem and cephalosporins-susceptible *K. pneumoniae* were recovered from a quantitative tracheal aspirate (QTA), both at  $>10^6$  cfu/mL. Only piperacillin-tazobactam had been previously administered to the patient. Meropenem was initiated, but no improvement had been observed, and a new QTA was performed 4 days after starting meropenem. A pure growth of *K. cryocrescens*, at  $>10^6$  cfu/mL, was obtained. The patient was then treated with polymyxin B and recovered from VAP.

The isolate identified as *K. cryocrescens* was submitted to further analysis by 16S rRNA gene sequencing using primers 27f and 1492r for amplification and primers 27f, 38r, 533f, 1175r, 1194f, 1492r for sequencing.<sup>3</sup> Susceptibility tests were performed by broth

microdilution and interpreted according Clinical and Laboratory Standards Institute criteria (CLSI).<sup>4</sup> The modified confirmatory test for ESBL with antibiotic disks containing boronic acid (BA) was performed as described elsewhere.<sup>5</sup> The Modified Hodge Test (MHT) and combined-disks tests with BA were performed to screen for carbapenemase production.<sup>4,6</sup> Specific primers were used to detect the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> ESBL-coding genes.<sup>7</sup> PCR and sequencing of *bla*<sub>KPC</sub> gene were performed as previously described.<sup>8</sup> PCR products were purified using GFX kit (GE Healthcare) and sequenced using BigDye Terminator version 3.1 and a 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions. GenBank was used to access the KPC sequences deposited to date and BioEdit program was used to compare the similarity between sequences. Plasmidial DNA was obtained from alkaline lysis and it was electroporated into an *Escherichia coli* Top10 (Invitrogen).<sup>9</sup> Transformants were selected on Luria-Bertani agar containing 1.0 µg/ml of ceftazidime or 0.05 µg/ml of meropenem and an *E. coli* 39R861 was used as a standard for transformant plasmidial analysis. Genomic DNA from *K. georgiana* was submitted to amplification and sequencing using specific primers for evaluation of genetic environment of *bla*<sub>KPC-2</sub> gene.<sup>10</sup>

The 16S rRNA gene sequencing revealed that the isolate was in fact a *K. georgiana*, with 99.85% similarity with the sole available sequence from *K. georgiana* ATCC 51603 (GenBank accession AF047186.1), while the similarity index was 98.91% when compared to the *K. cryocrescens* ATCC 33435 (GenBank accession AF310218.1). The isolate was resistant to all β-lactams (ceftazidime MIC =16mg/L; cefepime MIC =32mg/L; ampicillin-sulbactam MIC ≥256mg/L; imipenem MIC =256mg/L; meropenem MIC =128mg/L and ertapenem MIC =128mg/L) but susceptible to other drugs such as amikacin (MIC =2.0mg/L), ciprofloxacin (MIC ≤0.125mg/L), tigecycline (MIC =0.5mg/L) and polymyxin B (MIC =0.25mg/L). ESBL phenotypic and genotypic tests were negative. Both MHT and BA-based



assay for carbapenemase detection were positive. The presence of *bla*<sub>KPC</sub> gene was confirmed by PCR and the gene sequencing revealed 100% identity with *bla*<sub>KPC-2</sub>. The plasmid electroporation into *E. coli* Top10 resulted in transformants which presented positive results in MTH and BA-based method, and the presence of the KPC gene was confirmed by PCR. The transformants demonstrated the acquisition of a ~36-Kb plasmid and the genetic environment analysis of *bla*<sub>KPC-2</sub> suggested that the gene was inserted into a Tn801-like transposon. We obtained a partial sequence of 1,461 pb of this transposon (130 pb *upstream* to 459 pb *downstream* of KPC gene) demonstrating 99.8% of identity with the sequence of a KPC-2- producing *Enterobacter cloacae*, in which the KPC gene is inserted in a Tn801-like transposon (GenBank accession JN048640.1).

High level resistance to carbapenems was observed in *K. georgiana*, suggesting the involvement of additional resistance mechanisms. Since porin expression was not investigated, we cannot exclude the possibility that *K. georgiana* phenotype results from the interplay between permeability alteration and KPC-2 production.

KPC-producing isolates have been associated with serious infection and high mortality probably due to the difficulty to treat these infections. This work presents a description of a KPC-2 enzyme in the rare pathogen *K. georgiana* highlighting the ability of KPC to spread to unusual pathogens

## **Funding**

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (09-270), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (10/0026-1), Brazil. A. P. Z. and A.L.B. are research fellows from the National Council for Scientific and Technological

Development, Ministry of Science and Technology, Brazil.

### Transparency declarations

All authors: none to declare.

### References

1. Sarria JC, Vidal AM, Kimbrough III RC. Infections caused by *Kluyvera* species in humans. *Clin Infect Dis* 2001; **33**: 69-74.
2. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 228-36.
3. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 1991; **173**: 697-703.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-First Informational Supplement M100-S21*; CLSI, Wayne, PA, USA, 2011.
5. Tsakris A, Poulou A, Themeli-Digalaki K *et al.* Use of boronic acid disk tests to detect extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of KPC carbapenemase possessing enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 3420-6.
6. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L *et al.* Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1631-9.
7. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM *et al.* Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella*

*pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3554-60.

8. Bradford PA, Bratu S, Urban C *et al.* Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin Infect Dis* 2004; **39**: 55-60.

9. Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 1979; **7**: 1513-23.

10. Naas T, Cuzon G, Villegas MV *et al.* Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the  $\beta$ -Lactamase *blaKPC* Gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1257-63.



**4.2. MANUSCRITO II** - Performance of quantification of Modified Hodge Test: an evaluation with *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates.

Manuscrito enviado para publicação no *BMC Microbiology*.



**Performance of quantification of Modified Hodge Test: an evaluation with *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae isolates**

Vanessa Bley Ribeiro<sup>1,2</sup>, Adriano Rostirolla Linhares<sup>1</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>3</sup> †, Afonso Luis Barth<sup>1,2,†\*</sup>

<sup>1</sup> *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;* <sup>2</sup> *Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil;* <sup>3</sup> *Infectious Diseases Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil.*

\* Corresponding Author: Afonso Luis Barth

Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica. 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-903. Porto Alegre, Brasil.

Phone/fax: +55 (51) 33598607. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br

† Both senior authors contributed equally to the work.





**Abstract**

**Background:** The global spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) in Enterobacteriaceae in the last decade poses a serious public health threat. Modified Hodge Test (MHT) has been suggested as screening tests for Ambler Class A carbapenemases, but concerns regarding its difficult interpretation and common false-positive results obtained in the presence of other  $\beta$ -lactamases have been noted. This study aimed to evaluate the performance of a quantitative reading of MHT for KPC screening in order to better standardize its interpretation and improve its accuracy, by a ratio calculated from the enhanced growth generated by the isolates tested and the positive control.

**Results:** MHT was performed in 50 KPC-producing isolates and 334 non-carbapenemase-producing isolates, using ertapenem (ERT) and meropenem (MER) as substrates. Our results revealed 17 different ETP ratios (ER) and 17 MEM ratios (MR), with distinct sensitivity (SN) and specificity (SP) values. Higher SN combined to higher SP was achieved when ER and MR was 0.45, with a SN value of 96% for both substrates and SP values of 99.4% and 100% for ER and MR, respectively. Using this cut-off, only 2 KPC producers were not detected. False-positive results were found in 2 isolates only for ER.

**Conclusions:** Our study showed that quantification of MHT with either ETP or MEM increases SP of the test for the detection of KPC enzyme in Enterobacteriaceae with no impairment in the SN and could be used as an easy, inexpensive and accurate alternative for KPC screening in clinical laboratories.

**Keywords:** Enterobacteriaceae; KPC; carbapenemases; screening; carbapenems.

## Background

The global spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) in Enterobacteriaceae in the last decade poses as a serious public health threat, since it leads to variable levels of carbapenem resistance and few therapeutic options remain available for treating such infections [1,2]. Moreover, KPC codifying genes are harbored in genetically mobile elements allowing their rapid spread among gram-negative rods [3].

Molecular methods are the gold standard to detect the KPC genes; however, screening tests are necessary to discriminate which isolates with reduced susceptibility to carbapenems are more likely to produce KPC. Many screening tests for Ambler Class A carbapenemases have been presented in recent years, including the Modified Hodge Test (MHT), tests based on boronic acid (BA) [4-6], as well as, the combined use of  $\beta$ -lactamase inhibitors, including BA, EDTA, dipicolinic acid and cloxacillin in order to differentiate Class A from other carbapenemases, such as metallo  $\beta$ -lactamases, and AmpC  $\beta$ -lactamases [7,8].

Although MHT often presents high sensitivity (>90%) [4,5,9] its interpretation is usually difficult and also subjective [10,11]. Moreover, many studies have demonstrated positive results in MHT in the presence of other  $\beta$ -lactamases, such as ESBL and AmpC coupled with porin loss [5,10,12,13]. Since MHT positivity depends on the enzymatic activity, it should be expected that the enhanced growth intensity would be bigger as the stronger the hydrolytic activity of the enzyme. Considering that MHT is inexpensive, easy to perform, presents high sensitivity for KPC detection and taking into account the fact that KPC are the most frequent carbapenemases worldwide, in this study we evaluated the performance of the quantification of MHT for detection of these enzymes in order to improve the accuracy of the test.

## Results

All isolates were submitted to MHT quantification and revealed 17 different ertapenem ratio (ER) and meropenem ratio (MR) by the receiver operating characteristic (ROC) curves. According to the enhanced growth ratio used as breakpoint for positive or negative MHT result, the sensitivity (SN) and specificity (SP) of ER for KPC detection ranged from 58% to 100% and from 28.4% to 99.7%, respectively (Table 1); and from 54% to 100% and 28.4% to 100% for MR, respectively (Table 2). When the enhanced growth ratio was 0.45, the highest SN and SP values were obtained for both substrates (Tables 1 and 2). Considering this cut-off, two KPC-producing isolates would not be detected: an *E. cloacae* (ER = 0.2 and MR = 0.3) with imipenem (IPM) and meropenem (MEM) MICs of 1.0 mg/L and ertapenem (ETP) MIC of 4.0 mg/L; and a *S. marcescens* (ER and MR = 0.2) with IPM and ETP MICs of 16 mg/L and MEM MIC of 8.0 mg/L. Among non-carbapenemase-producing isolates, two *E. cloacae* showed a ratio  $\geq 0.45$  only when ETP was used as substrate. One isolate presented ER = 1.0, with IPM and MEM MICs of 2.0 mg/L and ETP MIC of 16 mg/L and the other presented ER = 0.5, with IPM and MEM MICs of  $\leq 0.5$  mg/L and ETP MIC of 4.0 mg/L. For these two isolates, ESBL and AmpC production was performed by phenotypic tests using combination-disk assay with clavulanic acid and cloxacillin, respectively, as inhibitors and the presence of *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was also investigated [14,15]. Whereas both isolates presented positive results with cloxacillin assay, indicating the presence of a AmpC, the first one also showed the presence of a CTX-M.

The area under the curve (AUC) calculated for ER was 0.990 (95% confidence interval [CI] 0.977-1.0) (Figure 1A) and for MR 0.997 (95% [CI] 0.992-1.0) (Figure 1B). The Bland-Altman analysis indicated that there was intra and inter-observer agreement in the readings. The comparisons included intra-observer agreement of ER for two different investigators

( $P=0.081$  and  $P=0.073$ ), intra-observer agreement of MR also for both investigators ( $P=0.962$  and  $P=0.078$ ), and inter-observer agreement for both substrates ( $P=0.894$  and  $P=0.136$ ). Most reading disagreements were  $\leq 1$  mm.

## Discussion

KPC dissemination among Enterobacteriaceae isolates in the recent years has challenged clinical laboratories to provide a rapid, inexpensive and accurate result of which isolate with reduced susceptibility to carbapenems would more likely produce these enzymes. Although MHT fulfilled the first two characteristics, it is an inaccurate test, since false-positive results may be found in isolates producing other  $\beta$ -lactamases with some marginal carbapenemase activity, such as AmpC and ESBLs [5,10].

The results of the present study indicate that the quantification of MHT may be a practical and more accurate tool to be used for KPC detection. According to the quantification, several ER and MR were generated, for which, different SN and SP values were obtained. For both substrates analyzed, our results clearly demonstrated that higher ratios originated higher SP values, whereas lower ratios originated higher SN. Therefore, as previously hypothesized, ER and MR ratios are directly proportional to SP and inversely proportional to SN in KPC detection. It is interesting to note that SN was 100% for both substrates only when even very small enhanced growth were considered as positive, as indicated by the low ER and MR generated ( $< 0.2$ ), which represent the conventional or qualitative MHT interpretation, but at a price of an unacceptable low SP values. Increasing the cut-off of ER and MR to values between 0.2 and 0.37, the SN slightly decreases to 96-98% and substantially improves the SP values to 90.7 to 98.5 depending on the ratio and the substrate. However, the highest SN combined with higher SP was found when the ER and MR were equivalent to 0.45 for both substrates. Using this cut-off to perform the screening for KPC detection, 96% of KPC-

producing isolates were correctly identified. Only two KPC-producing isolates were not detected. It could be possibly due to a low enzymatic activity, at least, for one of them, which was resistant only to ETP (MIC=4.0 mg/L), with susceptible MICs to IPM and MEM, even considering the current CLSI breakpoints. Adopting 0.45 as cut-off, MR and ER SP were very high, 99.4% and 100%, respectively. SP was higher for MR because using ETP as a substrate two isolates would be considered as KPC-producing. These isolates were two *E. cloacae* and both showed the presence of AmpC  $\beta$ -lactamase whereas one of them also confirmed ESBL production.

Regarding overall accuracy, MR tended to have a better performance compared to ER, with an AUC of 0.997 compared to 0.990 for ER. These results were driven by the better SP values when using MEM as substrate. The agreement analysis of intra- and inter-observer indicated that the readings are reproducible and that the ratios generated in different days are reliable.

This study was designed to evaluate the quantification of MHT for KPC detection, regarding this carbapenemase represents the main resistance mechanism among carbapenem-resistant Enterobacteriaceae worldwide. Although it could be expected that the quantification of MHT would be useful to detect other carbapenemases, since MHT is not specific for KPC, it requires further studies, especially considering the recent findings of negative MHT for some NDM-1 and other metallo  $\beta$ -lactamase-producing isolates [16,17]. A limitation of our study was that KPC type was not fully characterized by sequencing. Regarding only KPC-2 has been described in Brazil [18], we believe that our results can be extrapolated for KPC carbapenemases in general.

Quantification of MHT primarily aims to differentiate the presence of carbapenemase production from other enzymes with minimal carbapenemase activity. It is also known that

the 0.45 cut-off found in our study should not be taken as definitive, and its accuracy should be further investigated.

## Conclusions

Our study showed that quantification of MHT with either ETP or MEM increases SP of the test for the detection of KPC enzyme in Enterobacteriaceae with no impairment in the SN. In summary, it could represent an easy, inexpensive and accurate alternative for KPC screening in clinical laboratories.

## Methods

### Bacterial strains

Tests were performed with a panel of distinct genera of Enterobacteriaceae resistant or with reduced susceptibility to ETP and/or MEM by disc-diffusion test (zone of inhibition  $\leq$  21 mm) [19]. A total of 50 KPC-producing and 334 non-carbapenemase-producing clinical isolates were included in the panel, which were recovered from 13 Brazilian hospitals from 2009 to 2011. All of them were previously identified by conventional techniques and by use of VITEK2 (bioMérieux, France). Carbapenems MICs were performed according to CLSI [14] and the distribution of MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> both groups are shown in Table 3. Carbapenemases were first investigated by multiplex real-time PCR for detection of *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> genes [20]. None other carbapenemase than KPC was detected. All isolates were double-checked for the presence of *bla*<sub>KPC</sub> by a different set of primers in a simplex PCR [21]. The positive control strains used in this study included a KPC-producing *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705, a VIM-producing *P. aeruginosa*; a GES-producing *K. pneumoniae*, a NDM-producing *K. pneumoniae*, a OXA-48- producing *K.*

*pneumoniae* and a IMP- producing *P. aeruginosa*.

#### MHT performance and quantification

The MHT was performed for all isolates as recommended by CLSI [14]. In order to investigate the performance of both substrates, ETP and MEM disks were placed on the agar plate seeded with *E. coli* ATCC 25922 (indicator strain). The isolates were inoculated in a straight line out from the edge of the disk to the edge of the plate. The plates were incubated at  $35 \pm 2$  °C during 20 hours. The KPC-producing *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705 was used as positive control in all experiments. For both substrates, the size of enhanced growth of indicator strain was measured in millimeters (mm) with a ruler, for each isolate tested and for the positive control used in each experiment separately, as demonstrated in Figure 2. For data analysis, a ratio (R) was calculated according the formula below and then, an ETP enhanced growth ratio (ER) and a MEM enhanced growth ratio (MR) were established for all isolates evaluated:

$$R = \frac{\text{size of enhanced growth obtained from isolate tested (mm)}}{\text{size of the enhanced growth obtained from positive control strain (mm)}}$$

The use of a ratio instead of using only the measurement of the enhanced growth generated by each isolate was chosen in order to minimize the variations inherent to the method, since it minimizes possible distinct growths that a same isolate could produce in a distinct day test and also discount variations due to different agar media or disk suppliers, for example. The readings were done through the back of the plate in a dark background. To ensure the test reproducibility and the intra- and inter-observer integrity, 30 isolates (15 KPC-producers and 15 KPC-non producers) were randomly selected to be tested again and the interpretation

were performed by two independent investigators who were blinded for the carbapenemase results.

#### Statistical analysis

The SN, SP and ROC curves and their respective 95% CI for ER and MR were calculated using SPSS version 18.0. SN and SP were calculated using PCR as gold standard. The agreement between intra-observer of two distinct investigator and inter-observer readings was assessed by Bland-Altman analysis, assuming the first reading as standard. Statistical significance was considered when the *P* value was  $< 0.05$ .

#### Competing interests

The authors have no competing interests to declare.

#### Authors' contribution

VBR participated in the design of the study, performed the microdilution method, carried out the phenotypic and molecular tests and drafted the manuscript. ARL contributed in phenotypic and molecular tests. APZ conceived the study, performed the statistical analysis and drafted the manuscript. ALB coordinated the study, participated in its design and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

#### Authors' information

APZ and ALB are research fellows from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Ministry of Science and Technology, Brazil.

#### Acknowledgments



We are most grateful to Dr. Jaime Rocha and Dr. Felipe Tuon who kindly provided some KPC isolates.

### **Funding**

This work was supported by Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE - project nº 09-270), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS – process nº 10/0026-1), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

### **References**

1. Patel JB, Rasheed JK, Brandon Kitchel MS: **Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology and laboratory detection.** *Clin Microb News* 2009; **31**: 55-62.
2. Quale J: **Global spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*.** *Microbe* 2008; **3**: 516-520.
3. Nordmann P, Cuzon G, Naas T: **The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria.** *Lancet Infect Dis* 2009; **9**: 228-236.
4. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A: **Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae.** *J Clin Microbiol* 2009; **47**: 1631-1639.
5. Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A: **Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid.** *J Clin*

*Microbiol* 2010; **48**: 1323-1332.

6. Tsakris A, Themeli-Digalaki K, Poulou A, Vrioni G, Voulgari E, Koumaki V, Agodi A, Pournaras S, Sofianou D: **Comparative evaluation of combined-disk tests using different boronic acid compounds for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing enterobacteriaceae clinical isolates.** *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 2804-2809.

7. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E: **Phenotypic screening of carbapenemases and associated beta-lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae.** *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 1295-1302.

8. Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N: **A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin.** *Clin Microbiol Infect* 2011; **17**: 552-556.

9. Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB: **Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae.** *J Clin Microbiol* 2007; **45**: 2723-2725.

10. Carvalhaes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC: **Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false-positive results.** *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 249-251.

11. Pournaras S, Poulou A, Tsakris A: **Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds.** *J Antimicrob Chemother* 2010; **65**: 1319-1321.
12. 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**: 659-667.
13. Hirsch EB and 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.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 22th Informational Supplement.** Approved document M100-S22, Vol. **32** No. 3. CLSI, Wayne, PA; 2012.
15. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA, **International Klebsiella Study Group: Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases.** *Antimicrob Agents Chemother* 2003; **47**: 3554-3560.
16. Doyle D, Peirano G, Lascols C, Lloyd T, Church DL, Pitout JD: **Laboratory detection of enterobacteriaceae that produce carbapenemases.** *J Clin Microbiol* 2012; **50**: 3877-3880.
17. Girlich D, Poirel L, Nordmann P: **Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae.** *J Clin Microbiol* 2012; **50**:477-479.

18. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM: **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.
19. Clinical and Laboratory Standard Institute: **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 19th Informational Supplement.** Approved document M100-S19, Vol. **29** No. 3. CLSI, Wayne, PA; 2009.
20. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S: **Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR.** *J Antimicrob Chemother* 2012; **67**: 906-909.
21. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC: **Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*.** *Antimicrob Agents Chemother* 2001; **45**: 1151-1161.

**Table 1.** Sensitivity (SN) and specificity (SP) of distinct values of ertapenem (ER) enhanced growth ratios.

ER	SN(%)	SP(%)
0.045	100.0	28.4
0.095	100.0	29.3
0.106	100.0	63.5
0.118	100.0	64.1
0.134	100.0	65.6
0.171	100.0	67.1
0.211	96.0	90.7
0.254	96.0	91.3
0.293	96.0	92.5
0.317	96.0	97.0
0.367	96.0	97.3
0.450	96.0	99.4
0.583	94.0	99.7
0.683	92.0	99.7
0.750	82.0	99.7
0.850	70.0	99.7
0.950	58.0	99.7

**Table 2.** Sensitivity (SN) and specificity (SP) of distinct values of meropenem (MR) enhanced growth ratios.

MR	SN(%)	SP(%)
0.045	100.0	28.4
0.095	100.0	29.3
0.113	100.0	79.0
0.134	100.0	79.9
0.162	100.0	81.7
0.191	100.0	82.3
0.225	98.0	94.6
0.268	98.0	95.2
0.293	98.0	95.8
0.350	96.0	98.5
0.450	96.0	100.0
0.550	94.0	100.0
0.560	90.0	100.0
0.750	86.0	100.0
0.838	66.0	100.0
0.888	62.0	100.0
0.950	54.0	100.0

**Table 3.** Minimal inhibitory concentration (MIC) of carbapenems of the 384 isolates evaluated.

Isolates	MIC (mg/L) <sup>a</sup>												
	n	Imipenem				Meropenem				Ertapenem			
		MIC <sup>b</sup>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	MIC <sup>b</sup>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range	MIC <sup>b</sup>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	Range
<b>KPC-producing isolates</b>	50	-	16	128	1.0-256	-	32	128	4.0- >256	-	64	256	4.0- >256
<i>Klebsiella spp.</i>	36	-	16	64		-	32	64		-	64	128	
<i>Enterobacter spp.</i>	10	-	8	64		-	16	128		-	32	256	
<i>S. marcescens</i>	3	-	128	256		-	32	64		-	64	128	
<i>K. georgiana</i>	1	256	-	-		128	-	-		128	-	-	
<b>Non-carbapenemase-producing isolates</b>	334	-	0.5	2.0	≤0.5-32		0.5	4.0	≤0.5-32		4.0	16	≤0.5-128
<i>Enterobacter spp.</i>	220	-	0.5	2.0			0.5	2.0			4.0	8.0	
<i>Klebsiella spp.</i>	89	-	1.0	4.0			1.0	8			4.0	32	
<i>E. coli</i>	17	-	0.5	4.0			1.0	4.0			4.0	16	
<i>S. marcescens</i>	5	-	1.0	4.0			1.0	4.0			2.0	8.0	
<i>P. mirabilis</i>	1	2.0	-	-		0.5	-	-		0.5	-	-	
<i>M. morgani</i>	1	4.0	-	-		0.5	-	-		0.5	-	-	
<i>C. freundii</i>	1	≤0.5	-	-		0.5	-	-		0.5	-	-	

<sup>a</sup> Determined by broth microdilution; <sup>b</sup> Result of MIC of species with a single isolate.

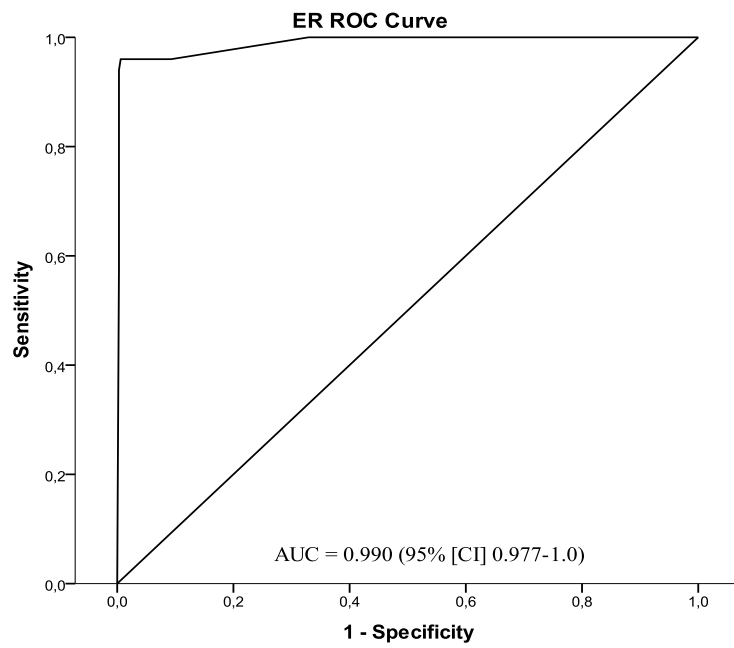
**Figures legends**

**Figure 1.** Ertapenem enhanced growth ratio (ER) ROC Curve (A) and meropenem enhanced growth ratio (MR) ROC Curve (B). AUC= area under the curve; CI= confidence interval.

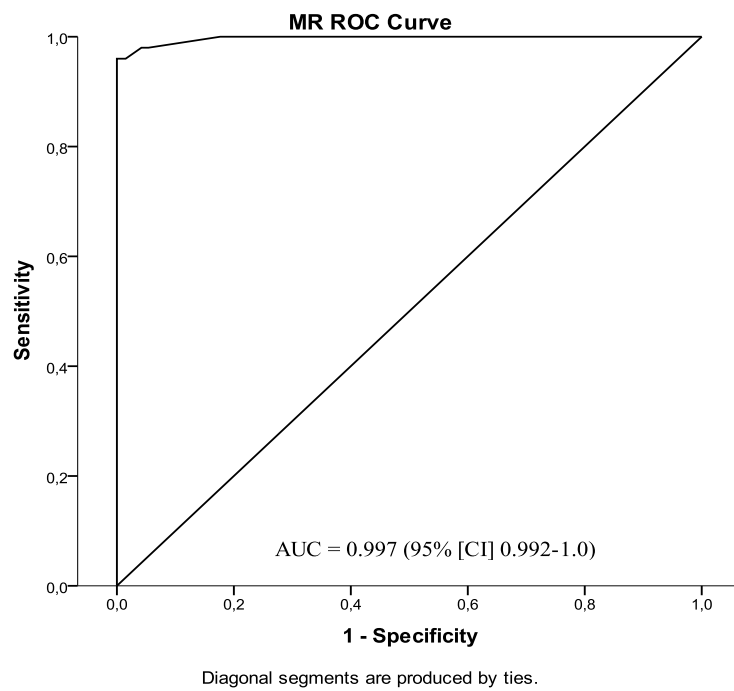
**Figure 2.** Quantification of modified Hodge test (MHT). The enhanced growth ratio of ETP and MEM subtracts were obtained from the measure (mm) of the enhanced growth of *E. coli* ATCC 25922 for both, the isolate and the KPC- producing positive control (*K. pneumoniae* ATCC BAA 1705) and a ratio was calculated. In this example, B is the positive control and the enhanced growth measured for ETP was 10 mm. The enhanced growth measured for isolates A and C were 5 and 2 mm, respectively, resulting in ETP enhanced ratios (ER) of 0.5 and 0.2, respectively.

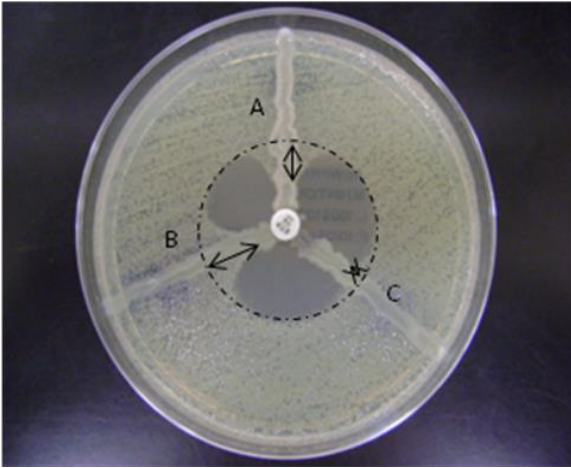


A



B

**Figure 1**



**Figure 2**

**4.3. MANUSCRITO III** – Evaluation of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing isolates in Southernmost Brazilian region.

Manuscrito a ser submetido para publicação no Journal of Clinical Microbiology



**Evaluation of *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems and molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing isolates in Southernmost Brazilian region**

Running title: *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibility to carbapenems in Southern Brazilian region

Vanessa Bley Ribeiro<sup>1,2</sup>, Leonardo Neves Andrade<sup>3</sup>, Adriano Rostirolla Linhares<sup>1</sup>, Juliana Barin<sup>4</sup>, Ana Lúcia da Costa Darini<sup>3</sup>, Alexandre P. Zavascki<sup>5</sup>, Afonso Luis Barth<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> *Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil;* <sup>2</sup> *Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil;* <sup>3</sup> *Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brazil;* <sup>4</sup> *Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, UFRGS, Porto Alegre, Brazil;* <sup>5</sup> *Infectious Diseases Service, HCPA, Porto Alegre, Brazil.*

\* Corresponding Author: Afonso Luis Barth

Mailing address: Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Unidade de Microbiologia e Biologia Molecular, Serviço de Patologia Clínica, 2350 Ramiro Barcelos St, 90035-903. Porto Alegre, Brazil.

Phone/fax: +55 (51) 33598607. E-mail: albarth@hcpa.ufrgs.br



## Abstract

Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* has been frequently reported worldwide and represents a serious concern due to the limited therapeutic option. The aim of this study was to investigate the resistance mechanisms of 345 clinical isolates with reduced susceptibility to carbapenems recovered from 11 distinct hospitals located in southern Brazil, as well as to investigate the molecular epidemiology of KPC producers. *bla*<sub>KPC-2</sub> gene was detected in 14 (4%) isolates. Most of them presented a high level resistance against  $\beta$ -lactams and ciprofloxacin; and the most active drugs were polymyxin B and amikacin. The genetic environment analysis did not allow a complete characterization, as partial amplifications were obtained. Plasmids carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> gene were not typeable and most of them had ~20kb. Among non-carbapenemase producers (96%) most of them remained susceptible to IPM and MEM, and was identified as ESBL and/or AmpC producers. In conclusion, our results showed that, among  $\beta$ -lactamase producers, the major mechanisms involved in the reduced susceptibility to carbapenems in the isolates studied are the ESBL and AmpC production, instead of true carbapenemases. Only KPC carbapenemases were found, highlighting the role of these enzymes in acquired resistance to carbapenems in *Enterobacteriaceae* family. Our results contribute to compose the scenery of KPC in Brazil and for epidemiological characterization of KPC-2-producing Brazilian isolates.

**Keywords:** *Enterobacteriaceae*, *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, carbapenem, multidrug-resistant isolates.

## Introduction

Antimicrobial resistance in clinical isolates of the *Enterobacteriaceae* family is a serious concern. Carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* have been frequently reported worldwide (Brink et al, 2012; Gales et al., 2012; Gupta et al., 2011) and severely limits treatment options (Magiorakos et al., 2011; Nordmann et al., 2009). Although a large diversity of carbapenemases can be found among *Enterobacteriaceae*, the most common enzymes responsible for carbapenem resistance in this family are *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases (KPC) (Giakkoupi et al., 2011; Gupta et al., 2011). They are plasmid-mediated enzymes which are disseminated worldwide and, currently, represent an important public health problem (Walsh et al., 2010). KPC producers have been increasingly detected in Brazil since 2009 (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Monteiro et al., 2009; Pavez et al., 2009; Zavascki et al., 2009). The aim of this study was to investigate the carbapenem resistance mechanisms among clinical isolates with reduced susceptibility to carbapenems recovered from 11 distinct hospitals located in southernmost Brazilian state, as well as to investigate the molecular epidemiology of KPC producers.

## Material and Methods

### *Bacterial isolates*

A total of 345 non-duplicated clinical enterobacterial isolates resistant or with reduced susceptibility to carbapenems, zone of inhibition  $\leq 21$  mm to ertapenem (ETP) and/or meropenem (MEM) (CLSI, 2009), were selected from June 2009 to July 2011, as part of a regional surveillance project to detect carbapenem resistance among *Enterobacteriaceae*. The isolates from infection sites were recovered from 9 hospitals located in Porto Alegre city, capital of Rio Grande do Sul state, Brazil, and two hospitals located in the countryside. These



isolates were previously identified by conventional techniques in the institutions of origin. The automated system Vitek2 (bioMérieux, France) was used to confirm the identification of the KPC-producing isolates. The susceptibility profile was initially evaluated by disk-diffusion. Minimum inhibitory concentration (MIC) to carbapenems were determined for all isolates using broth microdilution and interpreted according to CLSI (CLSI, 2012). MICs for ceftazidime, cefepime, ampicillin-sulbactam, amikacin, ciprofloxacin, polymyxin B and tigecycline were evaluated only against to KPC-producing isolates. Susceptibility to polymyxin and tigecycline was defined as  $\leq 2$   $\mu\text{g/ml}$  and  $\leq 1$   $\mu\text{g/ml}$ , respectively (EUCAST, 2013; CLSI, 2012).

#### *Phenotypic assays to detect ESBL and AmpC $\beta$ -lactamases*

The presence of ESBL was investigated using the synergism of clavulanic acid with ceftazidime and cefotaxime discs (CLSI, 2012). Detection of AmpC  $\beta$ -lactamase was performed using MEM disk supplemented with cloxacillin and a positive phenotype was considered when an increase of  $\geq 5$  mm in zone diameter around discs containing the inhibitor, compared to the meropenem disc alone, was observed (Giske et al., 2011).

#### *$\beta$ -lactamase encoding-genes and clonal relatedness*

Carbapenemases were investigated by multiplex real-time PCR for detection of *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>NDM</sub>, *bla*<sub>OXA-48</sub> and *bla*<sub>IMP</sub> genes (Monteiro et al., 2012). Conventional PCR were performed to detect the presence of *bla*<sub>SPM-1</sub> carbapenemase and *bla*<sub>CTX-M</sub> ESBL genes (Gaspareto et al., 2007; Paterson et al., 2003). Sequencing of *bla*<sub>KPC</sub> gene was performed as previously described (Yigit et al., 2001). PCR products were purified using ExoStar kit (GE Healthcare) and sequenced using a BigDye Terminator version 3.1 and a ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer instructions. GenBank was

used to access the *bla*<sub>KPC</sub> sequences deposited to date and BioEdit program was used to compare the similarity between sequences. The positive control strains included the KPC-producing *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 and VIM, IMP, SPM, GES, NDM and OXA-48-producing isolates referred by Carvalhaes *et al.* (2012).

Clonal relatedness among KPC producers was established by DNA macrorestriction using *Xba*I enzyme followed by pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), using the CHEF DRII apparatus (Bio-Rad). The results were analyzed using BioNumerics software (Applied Maths) and a similarity >85% upon dendrogram analysis was considered to represent the same PFGE pattern groups.

#### *Genetic environment and plasmid characterization of KPC-producing isolates*

The classic transposon Tn4401 genetic environment of *bla*<sub>KPC</sub> gene was investigated using the association of strategies describes by Naas (2008) and Curiao (2010). The non-conserved region between *IstB* and *bla*<sub>KPC</sub> was analysed by comparison of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) patterns obtained by digestion of amplicons with PstI, HindIII, and BamHI (Andrade *et al.*, 2011).

Plasmids were searched using PCR-Based Replicon Typing (PBRT) scheme to detect replicons of the major plasmid incompatibility (Inc) groups among *Enterobacteriaceae* (Carattoli, 2005). The identification of plasmids was accomplished using genomic DNA digested by *S1* enzyme followed by PFGE and hybridization with specific probes.

## **Results**

Among the 345 *Enterobacteriaceae* isolates, 224 (64.9%) were identified as *Enterobacter* spp. (75% *E. cloacae*, 2.7%, *E. aerogenes* and 22.3% were identified only to genus level), followed by 94 (27.2%) *Klebsiella* spp. (98.9% *K. pneumoniae* and 1.1% *K. oxytoca*), 18

(5.2%) *E. coli*, 8 (2.3%) *Serratia marcescens* and 1 (0.3%) *Proteus mirabilis*. The isolates were recovered from infection of several clinical specimens, including urine, blood, sputum, catheter and surgical wound.

The *bla<sub>KPC</sub>* gene was identified in 14 (4.0%) isolates: six (42.9%) *E. cloacae*, five (35.7%) *K. pneumoniae* and three (21.4%) *S. marcescens*. *bla<sub>KPC</sub>* sequencing revealed 100% identity with the KPC-2 gene. None of the other carbapenemase investigated were detected among the isolates. High level resistance was observed for most  $\beta$ -lactam drugs among KPC-2-producing isolates; amikacin and polymyxin B presented the highest susceptibility rates (Table 1). Co-production of CTX-M was detected in two isolates of *K. pneumoniae* (22 PRO and 134 PRO). PFGE analysis showed two different clonal patterns for KPC-producing *E. cloacae* (E1 and E2). The isolates belonging to E1 and E2 clones presented 100% identity. Among the KPC-producing *K. pneumoniae*, 4 distinct clonal patterns were observed (K1 to K4). The 2 isolates classified as K2 showed a similarity of 86.7%. For KPC-producing *S. marcescens* 2 clones were identified (S1 and S2). Isolates belonging to S1 clone were 100% identical, whereas the S2 clone presented a similarity of 82.4% to S1 (Table 1).

The analysis of genetic environment of *bla<sub>KPC-2</sub>* genes showed six altered platforms (i-vi) compared to the classic Tn4401, demonstrated in the Figure 1. All isolates showed the presence of the insertion sequence *ISKpn6* (*tnpA*) just downstream to *bla<sub>KPC-2</sub>* in all isolates. On the other hand, the *ISKpn7* (*istA* and *istB*) was only detected in *K. pneumoniae* 134PRO, whereas partial amplification of this IS was accomplished for both *S. marcescens* 177HC and 79PRO, and for *K. pneumoniae* 144PRO. *K. pneumoniae* 134PRO also presented a fragment of 200pb in the variable region between *istB* and *bla<sub>KPC</sub>*. The Tn3 (*tnpR* and *tnpA*) upstream to *ISKpn7-bla<sub>KPC-2</sub>-ISKpn6* was detected in *K. pneumoniae* 22PRO and 144PRO and *S. marcescens* 151PRO. The study of the inverted repeated (IRR and IRL) was not totally successful (Figure 1).

Plasmid analysis revealed that plasmids carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> had ~20Kb for most of isolates (Table 1). Only the *E. cloacae* 189HC and *K. pneumoniae* clones K3 and K4 harbored *bla*<sub>KPC-2</sub> in different plasmids sizes, respectively ~100, 48 and 30Kb. Although different Inc groups were observed among the isolates, all plasmids associated with *bla*<sub>KPC-2</sub> were untypeable, according to PBRT scheme.

Three hundred thirty one (95.9%) isolates were identified as non-carbapenemase producers. The distribution of carbapenem MICs demonstrated distinct patterns according to each bacterial genus (Table 2). About 20% of *Enterobacter* spp. were highly resistant to ERT (MIC > 4 µg/ml), while for *Klebsiella* spp., *E. coli* and *S. marcescens* this value achieved, at least, 40%. *S. marcescens* and *P. mirabilis* presented the highest susceptible rates (Table 2). Overall, 133 of 134 *Enterobacter* spp. with ERT low level resistance (2-4 µg/ml) were susceptible to IPM and MER, whereas 35 of 43 isolates with ERT high level resistance (MIC > 4 µg/ml) remained susceptible to both antimicrobials. For *Klebsiella* spp., of the 26 isolates with ERT low level resistance, 25 and 23 were susceptible to IPM and MEM, respectively. The susceptibility rates were considerably reduced among the 37 *Klebsiella* spp. highly resistant to ERT, reaching 75.7% for IPM and 32.4% for MEM. Among *E. coli* and *S. marcescens*, all isolates with ERT low level resistance remain susceptible to other carbapenems whereas isolates with ERT high level resistance the susceptibility profile to IPM and MEM was very similar to those obtained for *Klebsiella* spp.

Among ERT resistant isolates non-carbapenemase producers, 60.5% of *Enterobacter* spp. demonstrated an AmpC hyperproduction phenotype, 18.6% confirmed CTX-M production and 11.9% presented both mechanisms. Likewise, for *Klebsiellae*, 54% were CTX-M producers and 27% just presented an ESBL phenotype, according to CLSI ESBL epidemiologic criteria (2012). For *E. coli*, 43.8% were CTX-M producers and 31.3% and 18.8% revealed an AmpC

and an ESBL phenotype, respectively. About *S. marcescens*, 33.3% showed an AmpC hiperproduction phenotype.

## Discussion

KPC production in *Enterobacteriaceae* has been an increasing problem worldwide (Gupta et al., 2011). In Brazil, the first evidences of KPC-producing were from isolates recovered in 2005 (Zavascki et al., 2010; Pavez et al., 2009). However, outbreaks have been reported in several Brazilian regions after 2009 and endemic rates of KPC-2-producing isolates have been noted in many regions since then (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Seki et al., 2011). Despite of the increasing incidence of these organism in our country, only sporadic cases has been related in Rio Grande do Sul, the southernmost Brazilian region (Ribeiro et al., 2012; Andrade et al., 2011; Zavascki et al., 2009).

In this study we evaluated isolates resistant or with reduced susceptibility to carbapenems and the investigation of encoding-carbapenemase genes detected only the presence of *bla*<sub>KPC-2</sub> among the population analyzed. A low prevalence (4%) of KPC-2 producing isolates was found when compared to other Brazilian regions, which were facing increasing incidence of this carbapenemase (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Seki et al., 2011). High resistance rates to  $\beta$ -lactams and quinolone were found among the isolates, with virtually 100% of resistance to all  $\beta$ -lactam agents and 100% of resistance to ciprofloxacin. Polymyxin B was the most active antibiotic. Except for *S. marcescens*, which are intrinsically resistant to this drug, a single *E. cloacae* presented a low level resistance (MIC= 4  $\mu$ g/ml). High *in vitro* susceptibility rates to amikacin was also observed and this profile is similar to other KPC-2-producing isolates recovered in Brazil and in other countries (Andrade et al., 2011; Hirsch and Tam, 2010; Marchaim et al., 2008). For tigecycline, 8 (57%) isolates were classified as

resistant according to EUCAST breakpoints. On the other hand, if FDA breakpoints were applied this drug would be a very active agent, as only two isolates (14.3%) presented MIC  $\geq$  2  $\mu$ g/ml.

According to PFGE analysis, 2 distinct clonal patterns were observed among *E. cloacae* and *S. marcescens*. Moreover, some variations could be observed in the susceptibility profile of isolates belonging to the same clonal group. Although the mechanisms responsible for determining these distinct phenotypic profiles were not fully investigated in our study, it is probably due to the expression of outer membrane proteins and/or production of other  $\beta$ -lactamases (Dai et al., 2012; García-Fernández et al., 2012; Cuzon et al., 2010, Kitchel et al., 2010). An even higher diversity in susceptibility profile was observed among KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates, for which four distinct clones were observed. The co-production of a CTX-M by *K. pneumoniae* 22PRO probably contributed for the higher MICs for cefepime and ceftazidime (16 times) compared to those obtained for the other K2 clone (149PRO).

Tn4401, a Tn3-based transposon, is the genetic environmental that generally contains *bla*<sub>KPC</sub> genes (Cuzon et al., 2010; Naas et al., 2008). The classic isoforms “a” and “b” have been reported in Brazil in different genus of *Enterobacteriaceae* (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011). For the isolates studied we found altered platforms, regarding only partial amplifications of Tn4401 structures were obtained. Whereas for all isolates the IS*Kpn6* was observed, there was an unsuccessful amplification of inverted repeated sequences in most of the isolates, suggesting a distinct insertion site. It is important to note that the absence of amplification for IRR and IRL was also reported by Pereira et al. (2012), among Brazilian isolates. Only *K. pneumoniae* 134PRO revealed the presence of IS*Kpn7* and resulted in a positive amplification (200pb) between *istB* and *bla*<sub>KPC</sub> gene. Although the variable region is compatible with the isoform “b”, the absence of amplification of *tnpR* and *tnpA* difficults the

interpretation, considering that this region characterizes the inherited structure of Tn3 transposon. For some other isolates only a partial amplification of *ISKpn7* was observed, possibly indicating the occurrence of another transposition event, as previously reported (Pereira et al., 2012; Cuzon et al., 2010). Furthermore, the fact that most of isolates did not present amplification between *istB* and *bla<sub>KPC</sub>* gene could be determinant for the high level resistance to carbapenems observed among KPC-2 producers. Previous reports have shown that deletions in this variable region (directly upstream to *bla<sub>KPC</sub>* gene) can affect the gene expression and influence the level of carbapenem resistance (Kitchel et al., 2010; Gootz et al., 2009). Overall, our results demonstrate the rapid evolution of the structures that surrounds the *bla<sub>KPC-2</sub>* gene and further investigation will be necessary to clarify the genetic context of the isolates studied.

The plasmid analysis of KPC-2 producers showed some plasmids of variable sizes and belonging to distinct Inc groups. Despite of this fact, all plasmids carrying *bla<sub>KPC-2</sub>* were not typeable by PBRT, as previously reported by other authors (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011). Most of them (78.6%) had ~20Kb and only three different plasmids containing *bla<sub>KPC-2</sub>* of 30, 48 and 100Kb were identified in an *E. cloacae* 189HC and in two other *K. pneumoniae* (144PRO and 134PRO). A large diversity of plasmid of several sizes and distinct Inc group have been associated with KPC-producing isolates around the world (Chen et al., 2012; Pereira et al., 2012; Ribeiro et al., 2012; Andrade et al., 2011) highlighting the successful dissemination of this resistance genetic determinant.

In conclusion, most of isolates with reduced susceptibility to carbapenems confirmed to be non-carbapenemase producers. The low susceptibility against ERT in contrast to the high susceptibility to IPM and MER, as well as the high percentage of AmpC and ESLB found suggest that these  $\beta$ -lactamases, probably coupled with distinct patterns of porin alteration, are the major mechanisms involved in the reduced susceptibility to carbapenems in the isolates

studied. The action of these two mechanisms is already well established in ERT resistance by many authors (García-Fernández et al., 2010; Doumith et al., 2009, Carvalhaes et al., 2010), evidencing that this carbapenem is not the best substrate to predict carbapenem resistance.

Only KPC carbapenemases were detected among the isolates evaluated, highlighting the role of these enzymes in acquired resistance to carbapenemase in *Enterobacteriaceae* family. Our results contribute to compose the scenery of KPC in Brazil and for epidemiological characterization of KPC-2-producing Brazilian isolates. Further investigation will be needed to clarify the genetic environment of *bla*<sub>KPC-2</sub> gene, in order to better understand the mechanisms involved in the spread of KPC isolates.

## References

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> 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; 55:3579-583.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo F, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219-28.

Carvalhaes CG, Cayô R, Assis DM, Martins ER, Juliano L, Juliano MA, Gales AC. Detection of SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* and Class D  $\beta$ -Lactamase-Producing *Acinetobacter baumannii* Isolates by Use of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry and



Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J Clin Microbiol* 2013; 51:287-90.

Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Complete nucleotide sequences of blaKPC-4- and blaKPC-5-harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57:269-76.

Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI) - Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 19th Informational Supplement; Approved document M100-S19, Vol.29 N°.3, Wayne, PA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards Antimicrobial Susceptibility Testing; 22th Informational Supplement; Approved document M100-S22, Vol.32 N°.3, Wayne, PA, 2012.

Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Emergence of bla KPC-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.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase blaKPC-2 gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1349-56.

Dai W, Sun S, Yang P, Huang S, Zhang X, Zhang L. Characterization of carbapenemases, extended spectrum  $\beta$ -lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. *Infect Genet Evol* 2012; 7:14C:1-7.

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.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.0, 2013. <http://www.eucast.org>.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:354-60.

García-Fernández A, Villa L, Carta C, Venditti C, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. *Klebsiella pneumoniae* ST258 producing KPC-3 identified in Italy carries novel plasmids and OmpK36/OmpK35 porin variants. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2143-5.

García-Fernández A, Miriagou V, Papagiannitsis CC, Giordano A, Venditti M, Mancini C, Carattoli A. Na ertapenem-resistant extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone carries a novel OmpK36 porin variant. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4178-84.

Gaspareto PB, Martins AF, Zavascki AP, Barth AL. Occurrence of *bla*<sub>SPM-1</sub> and *bla*<sub>IMP-1</sub> genes of metallo- $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. *Braz J Microbiol* 2007; 38:108-109.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of blaKPC-2-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1510-1513.

Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:552-556.

Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding blaKPC carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1998-2004.

Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53:60-67.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1119-25.

Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3203-6.

Kitchel B, Rasheed JK, Endimiani A, Hujer AM, Anderson KF, Bonomo RA, Patel JB. Genetic factors associated with elevated carbapenem resistance in KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:4201-7.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, Paterson DL, Rice LB, Stelling J, Struelens MJ, Vatopoulos A, Weber JT, Monnet DL. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18, 268-81.

Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1413-8.

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; 53:333-4.

Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S: Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67: 906-909.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase blaKPC gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1257-63.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-236.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1631-1639.

Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1323-32.

Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, Yeiser B, Bonomo MD, Rice LB, Bonomo RA, International *Klebsiella* Study Group. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47:3554-3560.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2702.

Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11(ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 2012. Epub ahead of print.

Queenan AM and Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:440-58.

Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, Sandri AM, Silva MP, Campos JC, Sampaio JL, Barth AL. Detection of blaKPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:2776-7.

Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceição M de S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves C de F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen Ø, Asensi MD. Molecular epidemiology

of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:274-7.

Walsh, TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36S3:S8-14.

Woodford N, Dallow JW, Hill RL, Palepou MF, Pike R, Ward ME, Warner M, Livermore DM. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 29:456-9.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1151-61.

Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:286-8.

Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Barth AL. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis* 2010; 14:539-40.

**Table 1.** Clinical, laboratorial and molecular data of KPC-2- producing isolates

KPC-producers	Hosp.	Minimum Inhibitory Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) <sup>1</sup>										Pulsogroup	Plasmid analyses		Tn <sup>6</sup>
		IMP	MEM	ERT	CPM	CAZ	MAS	AMI	CIP	PB	TGC		~ Size(s) detected <sup>3</sup>	Inc groups detected <sup>4</sup>	
<i>E. cloacae</i> 5HC <sup>2</sup>	A	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	<b>512</b>	<b>128</b>	> <b>256</b>	> <b>512</b>	<b>16</b>	2	2	E1	<u>20</u> , 100, 250, 300	nd <sup>5</sup>	vi
<i>E. cloacae</i> 10HC <sup>2</sup>	A	<b>128</b>	> <b>256</b>	> <b>256</b>	> <b>512</b>	<b>256</b>	> <b>256</b>	> <b>512</b>	> <b>64</b>	<b>4</b>	2	E1	<u>20</u> , 100, 250, 300	nd	vi
<i>E. cloacae</i> 58HC <sup>2</sup>	A	<b>16</b>	<b>16</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	> <b>256</b>	> <b>512</b>	<b>32</b>	2	2	E1	<u>20</u> , 100, 250, 300	nd	vi
<i>E. cloacae</i> 118HC	A	<b>64</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	> <b>256</b>	2	> <b>64</b>	2	1	E2	<u>20</u> , 388	N	vi
<i>E. cloacae</i> 182HC	A	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	8	<b>16</b>	> <b>256</b>	2	<b>16</b>	2	0.5	E2	<u>20</u> , 100	N	vi
<i>E. cloacae</i> 189HC	A	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>256</b>	> <b>512</b>	<b>128</b>	> <b>256</b>	4	<b>32</b>	2	2	E1	<u>20</u> , 35, <u>100</u> , 120	A/C, F	v
<i>K. pneumoniae</i> 174HC	A	<b>256</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>64</b>	<b>32</b>	> <b>256</b>	4	<b>64</b>	2	2	K1	<u>20</u>	A/C	vi
<i>K. pneumoniae</i> 22PRO*	B	<b>4</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	> <b>512</b>	<b>256</b>	<b>256</b>	32	> <b>64</b>	2	0.25	K2	<u>20</u> , 48, 145	nd	ii
<i>K. pneumoniae</i> 134PRO	C	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>128</b>	<b>512</b>	<b>16</b>	> <b>256</b>	4	> <b>64</b>	2	<b>4</b>	K3	<u>48</u> , 120, 194	A/C	i
<i>K. pneumoniae</i> 144PRO	A	<b>8</b>	<b>32</b>	<b>128</b>	16	<b>64</b>	> <b>256</b>	4	> <b>64</b>	2	1	K4	<u>30</u> , 120	A/C	iv
<i>K. pneumoniae</i> 149PRO*	B	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>16</b>	> <b>256</b>	16	<b>2</b>	2	1	K2	<u>20</u> , 48, 150	L/M	vi
<i>S. marcescens</i> 177HC	A	<b>16</b>	<b>8</b>	<b>16</b>	<b>32</b>	<b>32</b>	<b>256</b>	2	> <b>64</b>	> <b>64</b>	2	S1	<u>20</u> , 145, 200	nd	iii
<i>S. marcescens</i> 79PRO	A	<b>128</b>	<b>32</b>	<b>64</b>	<b>512</b>	8	> <b>256</b>	16	<b>64</b>	<b>64</b>	1	S1	<u>20</u>	nd	iii
<i>S. marcescens</i> 151PRO	B	<b>256</b>	<b>64</b>	<b>128</b>	<b>128</b>	<b>32</b>	> <b>256</b>	$\leq$ 1	<b>4</b>	> <b>64</b>	<b>4</b>	S2	<u>20</u> , 194	nd	ii

Abreviations: Hosp., hospital; ERT, ertapenem; MEM, meropenem; IMP, imipenem; CPM, cefepime; CAZ, ceftazidime; AMS, ampicillin-sulbactam; AMI, amikacin; CIP, ciprofloxacin, PB, polymyxin B; TGC, tigecycline; Tn, transposon.

\*CTX-M producers.

<sup>1</sup> Resistance is indicated in bold.

<sup>2</sup>The *bla*<sub>KPC-2</sub> genetic environmental and plasmid-carrying of *E. cloacae* 5HC, 10HC and 58HC were studied and reported by Andrade et al. (2011).

<sup>3</sup>Underlining indicates size of the plasmid carrying *bla*<sub>KPC-2</sub>.

<sup>4</sup> Plasmids (Inc groups) detected in this study did not carrying *bla*<sub>KPC-2</sub> genes.

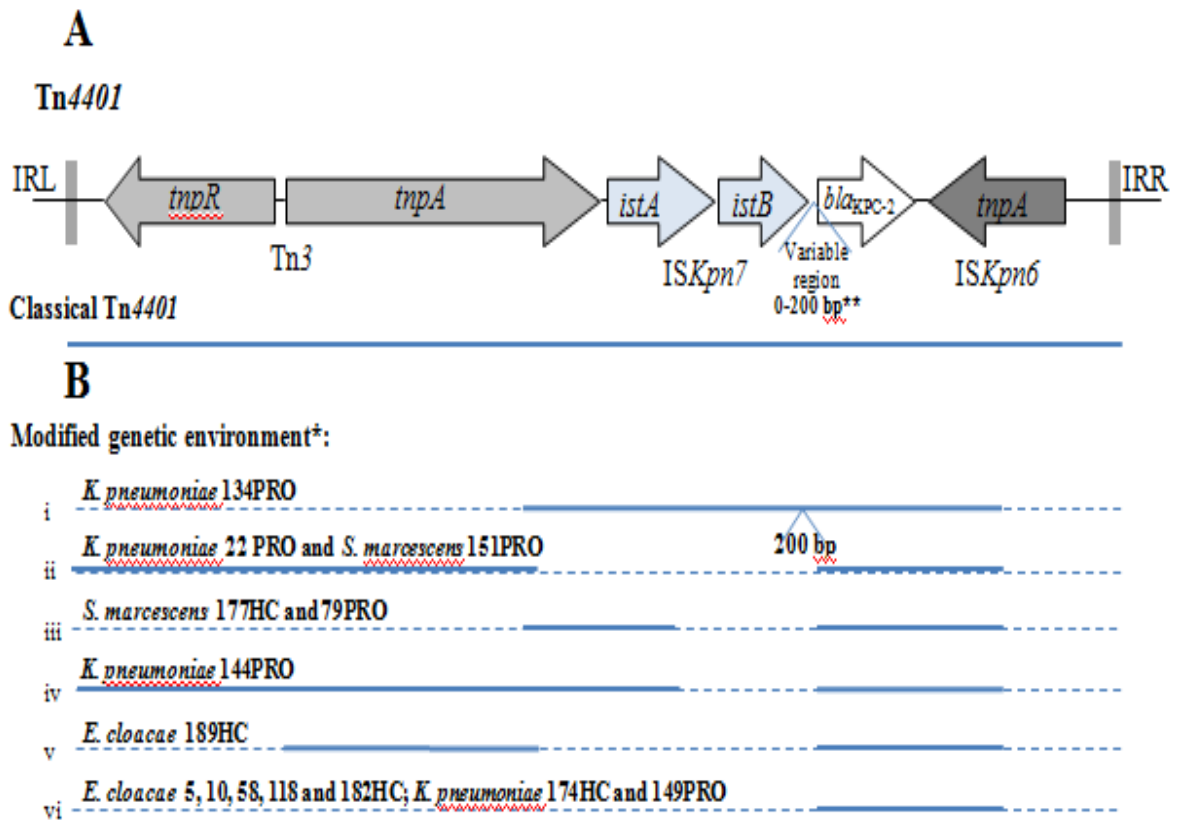
<sup>5</sup>nd: not detected.

<sup>6</sup>Platform established according to Figure 1.

**Table 2.** Distribution of carbapenem minimum inhibitory concentration (MIC) for non-carbapenemase producers.

Non-carbapenemase producing isolates	MIC ( $\mu\text{g/ml}$ )(%)					%R
	$\leq 0.5$	1	2	4	$>4$	
<b><i>Enterobacter</i> spp. (n=218)</b>						
IPM	118 (54.1)	67 (30.7)	23 (10.6)	8 (3.7)	2 (0.9)	4.6
MEM	144 (66.1)	45 (20.1)	20 (9.2)	6 (2.8)	3 (1.4)	4.2
ERT	10 (4.6)	31 (14.2)	57 (26.1)	77 (35.3)	43 (19.7)	81.1
<b><i>Klebsiella</i> spp. (n=89)</b>						
IPM	44 (49.4)	23 (25.8)	12 (13.5)	7 (7.9)	3 (3.4)	11.3
MEM	40 (44.9)	11 (12.4)	11 (12.4)	14 (15.7)	13 (14.6)	30.3
ERT	16 (18.0)	10 (11.2)	10 (11.2)	16 (18.0)	37 (41.6)	70.8
<b><i>E. coli</i> (n=18)</b>						
IPM	12 (66.7)	4 (22.2)	-	1 (5.6)	1 (5.6)	11.2
MEM	6 (33.3)	4 (22.2)	4 (22.2)	3 (16.7)	1 (5.6)	22.3
ERT	2 (11.1)	-	1 (5.6)	7 (38.9)	8 (44.4)	88.9
<b><i>S.marcescens</i> (n=5)</b>						
IPM	1 (20.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	1 (20.0)	-	20.0
MEM	2 (40.0)	2 (40.0)	-	1 (20.0)	-	20.0
ERT	2 (40.0)	-	1 (20.0)	-	2 (40.0)	60.0
<b><i>P. mirabilis</i> (n = 1)</b>						
IPM	-	-	1 (100.0)	-	-	0.0
MEM	1 (100.0)	-	-	-	-	0.0
ERT	1 (100.0)	-	-	-	-	0.0





**Figure 1.** Schematic representation showing intact Tn4401 (A) and modified genetic environment found in the bacteria studied (B). \* Fragments amplified by PCR; \*\* Performed by restriction fragment length polymorphism (RFLP).



## 5. DISCUSSÃO GERAL

Nossos resultados evidenciaram uma baixa prevalência de isolados produtores de KPC entre os anos de 2009-2011, onde dos 345 isolados clínicos avaliados durante este período, apenas 14 (4%) foram produtores da enzima. Embora os isolados tenham sido selecionados a partir de uma redução de sensibilidade aos carbapenêmicos pelo teste de disco-difusão (CLSI 2009), diferenças expressivas foram observadas entre os perfis de sensibilidade de IPM e MEM comparadas ao de ERT quando avaliados pelo método de microdiluição (CLSI, 2012). Uma taxa de sensibilidade inferior a 10% foi observada para o ERT em comparação a uma taxa de mais de 73% para os demais carbapenêmicos. Entre os isolados não produtores de KPC, as  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC e CTX-M foram as mais prevalentes nos gêneros *Enterobacter* e *Klebsiella*, respectivamente, possivelmente, justificando a resistência observada ao ERT. Embora apenas ESBLs do tipo CTX-M tenham sido investigadas, a presença de outras enzimas, como TEM e SHV, também devem apresentar uma contribuição considerável na resistência observada entre os isolados, conforme demonstrado previamente por outros autores (Yang et al., 2012; Doumith et al., 2009). Modificações nos padrões das principais porinas de membrana estão intimamente relacionadas ao desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos, desempenhando um papel crítico, principalmente, em isolados que apresentam um elevado nível de resistência a estes antibióticos (Doumith et al., 2009). Diversos estudos têm mostrado que cepas produtoras de AmpC e/ou ESBL com alguma alteração de permeabilidade, podem desenvolver resistência aos carbapenêmicos, apresentando uma perda de sensibilidade mais pronunciada para o ERT e apenas uma discreta diminuição de sensibilidade para os demais carbapenêmicos (Carvalho et al., 2010; Doumith et al., 2009; Jacoby et al., 2004). Apesar disso, Yang e colaboradores (2012) investigaram os mecanismos envolvidos na resistência ao ERT no gênero *Enterobacter* e encontraram que mais de 50% dos isolados avaliados não apresentaram alterações no perfil das porinas de membrana, destacando o papel quase exclusivo das  $\beta$ -lactamases. Em nosso estudo mais de 80% dos isolados foram caracterizados como produtores de ESBL e/ou AmpC, possivelmente, justificando a redução de sensibilidade aos carbapenêmicos, verificada a partir das elevadas taxas de resistência ao ERT em contraste às altas taxas de sensibilidade à IMP e MEM. No entanto, o perfil das porinas de membrana permanece a ser investigado para que se possa estabelecer a real contribuição destas proteínas no desenvolvimento da resistência observada ao ERT nestes isolados.

Com relação aos produtores de KPC, foram identificados isolados de *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *K. georgiana*, todos produtores da enzima KPC-2 confirmando a epidemiologia do país, onde este tem sido o único gene descrito (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Zavascki et al., 2010). Cabe ressaltar que esta foi a primeira descrição mundial da presença do gene *bla*<sub>KPC</sub> no gênero *Kluyvera*, o qual é raramente patogênico e tem sido pouco associado com relatos de multirresistência. Todos os isolados produtores de KPC apresentaram um perfil de sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos condizente com a produção da enzima e foi observado um elevado nível de resistência aos carbapenêmicos e às quinolonas, corroborando com o perfil relatado por outros autores para isolados brasileiros (Pereira et al., 2012; Andrade et al., 2011; Seki et al., 2011). Com relação à epidemiologia molecular, foram observados dois padrões clonais para os isolados de *E. cloacae* e *S. marcescens* e quatro para os isolados de *K. pneumoniae*, sendo que os mesmos foram obtidos de uma, duas e três instituições, respectivamente. Padrões de sensibilidade variáveis puderam ser observados entre isolados pertencentes ao mesmo grupo clonal, possivelmente, podendo ser atribuídos à presença de mecanismos de resistência adicionais, frequentemente caracterizados entre isolados produtores de KPC (Hirsch e Tam, 2010; Quale et al., 2008). A co-produção de CTX-M, possivelmente, foi um fator determinante para as diferenças nos níveis de resistência a determinados antibióticos, observadas entre os isolados de *K. pneumoniae* K2 (22PRO) e K2' (149 PRO), já que apenas o primeiro revelou a presença da enzima. O envolvimento de outros mecanismos de resistência, como alterações de permeabilidade, permanecem a ser investigados e não podem ser descartados, considerando o elevado nível de resistência aos carbapenêmicos observado para a maioria dos isolados produtores de KPC neste estudo.

Com relação ao contexto genético, o *Tn4401* tem sido reportado como principal ambiente que abriga o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> (Andrade et al., 2011; Curiao et al., 2010; Cuzon et al., 2010; Kitchel et al., 2009). No entanto, na análise dos isolados deste estudo foram verificadas plataformas alteradas que evidenciaram semelhanças tanto com o *Tn4401* quanto com o *Tn801*-like, embora apenas uma caracterização parcial dos ambientes genéticos em questão tenha sido possível. Três dos isolados de *E. cloacae* (5, 10 e 58 HC) avaliados neste estudo já haviam demonstrado uma plataforma não típica, relatada previamente por Andrade et al. (2011). Outros resultados similares aos obtidos neste estudo, como a não amplificação das IRR e IRL, têm sido descritos para outros produtores de KPC (Cuzon et al., 2010), inclusive entre isolados brasileiros (Pereira et al., 2012), sugerindo sítios de inserção diferentes daqueles caracterizados por Naas et al. (2008). A ausência de amplificação ou ampliações

parciais da *ISKpn7* e da região derivada do Tn3 (*tnpA* e *tnpR*) também foram encontradas em nossos isolados e igualmente têm sido reportadas por outros autores, evidenciando a ocorrência de eventos de transposição diversos, os quais têm sido responsáveis pela caracterização de uma variedade cada vez maior de ambientes genéticos que circundam o *bla<sub>KPC</sub>* (Chen et al., 2012a; Chen et al., 2012b; Pereira et al., 2012; Gomes et al., 2011, Shen et al., 2009). Desta forma, a continuidade na investigação destas plataformas é fundamental para uma caracterização mais competente e abrangente dos contextos genéticos em questão.

Ainda como parte da caracterização molecular, a análise plasmidial dos isolados produtores de KPC revelou uma grande variedade de plasmídeos de tamanhos variáveis (20-388Kb) e pertencentes a diversos grupos de incompatibilidade, como IncN, IncA/C, IncF e IncL/M. Apesar disto, a maioria dos plasmídeos relacionados ao carregamento do gene *bla<sub>KPC</sub>* foi de aproximadamente 20Kb e todos não-tipáveis, de acordo com o esquema proposto por Carattoli (2005). Esta característica já havia sido reportada para os isolados 5, 10 e 58 HC (Andrade et al., 2011), bem como para outros produtores da enzima (Pereira et al., 2012; Cuzon et al., 2010).

Enquanto a principal consequência da disseminação dessas enzimas consiste na restrição de opções terapêuticas que restam para o tratamento das infecções graves causadas por estes microrganismos, o maior desafio permanece sendo a identificação destes isolados pelos métodos comumente utilizados nos laboratórios clínicos. Muitas técnicas podem ser usadas na detecção de carbapenemases, que variam desde métodos fenotípicos até métodos moleculares avançados (Chen et al., 2012, Miriagou et al., 2010). Os métodos fenotípicos não exigem metodologias sofisticadas, geralmente são de fácil execução no laboratório e fornecem informações relevantes que auxiliam na elucidação dos mecanismos de resistência e na condução do diagnóstico clínico-laboratorial. Neste contexto, nós avaliamos o método baseado na utilização do AB e o método do MHT, que consistem nas principais metodologias fenotípicas utilizadas na detecção de KPC. O teste dos discos combinados com AB, quando realizado com o substrato IPM, revelou 100% de SN e 96,1% de SP na detecção da enzima, confirmando resultados prévios que apontaram este como o melhor substrato para execução do teste (Pasteran et al., 2009). Quando o MEM foi utilizado, foi possível observar uma queda considerável na SP, possivelmente, atribuída à presença de  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC. A maioria dos isolados que resultaram em um teste falso-positivo, também demonstrou sinergismo com a cloxacilina, evidenciando que o MEM é mais afetado por estas  $\beta$ -lactamases. Embora sinergismos também sejam observados na presença de outras enzimas,

diversos estudos têm demonstrado o excelente desempenho dos testes que utilizam o AB na detecção de isolados produtores de KPC (Birgy et al., 2012; Giske et al., 2011). Com relação ao MHT, a metodologia convencional alcançou uma SN de 92,9%, independentemente do substrato utilizado, em contraste a uma baixa SP, que variou de 66,5 à 82,2% para ERT e MEM, respectivamente. Apesar de ser um teste amplamente utilizado, diversas críticas têm sido levantadas em relação ao seu uso, devido à sua baixa SP e interpretação subjetiva que, muitas vezes, impedem uma definição clara de um resultado positivo ou negativo (Girlich et al., 2012b, Carvalhaes et al., 2009; Pasteran et al., 2009). Diversos estudos têm proposto estratégias fenotípicas alternativas para aumentar SP dos testes fenotípicos na detecção de carbapenemases (Birgy et al., 2012; Giske et al., 2011; Pasteran et al., 2010). Considerando que o MHT é um teste barato, de simples execução e elevada SN para detecção de KPC, neste trabalho nós propusemos uma leitura quantitativa do teste, a fim de eliminar a sua subjetividade. Esta análise incluiu 384 isolados de enterobactérias (50 produtores de KPC e 334 não produtores de carbapenemases) e resultou em 17 razões distintas para cada substrato testado, obtidas a partir da medida das reentrâncias do isolado teste e do controle positivo. Nossos resultados mostraram que os maiores valores combinados de SN e SP foram obtidos utilizando a razão de 0,45 como ponto de corte, tanto para MEM quanto para ERT. A sensibilidade encontrada para ambos os substratos foi equivalente aos resultados obtidos pelo MHT convencional, descrito por outros autores (Doyle et al., 2012; Girlich et al., 2012b), porém, discretamente superior àquela encontrada por nós no outro estudo (Manuscrito 3). Por outro lado, uma SP superior a 99% foi alcançada para ambos os substratos, sugerindo a eliminação dos resultados falsos-positivos considerados na leitura convencional. Diversos estudos têm provado que cepas produtoras de ESBL e/ou AmpC com alterações de permeabilidade, frequentemente resultam em um teste falso-positivo, por apresentarem um fenótipo de MHT fracamente positivo (Pasteran et al., 2010; Carvalhaes et al., 2009). Este ponto torna-se ainda mais crítico em locais onde a prevalência de carbapenemases é muito baixa, fazendo com o que o teste apresente ainda menor poder discriminatório. Neste sentido, a proposta de leitura sugerida neste trabalho foi capaz de manter a elevada SN do teste e, ao mesmo tempo, eliminar a subjetividade na interpretação dos resultados, alcançando uma elevada SP. Considerando que o MHT não é específico para a detecção de KPC, existe a necessidade de um estudo mais amplo, que contemple uma diversidade maior de carbapenemases, já que alguns estudos relatam falhas na detecção de MBL pelo MHT, principalmente no que se refere à enzima NDM (Doyle et al., 2012; Thomson, 2010). Por

outro lado, Girlich e colaboradores (2012b) demonstraram um aumento expressivo na sensibilidade do teste para detecção desta enzima quando o mesmo foi realizado com suplementação de  $Zn^{+2}$ . Embora uma validação mais abrangente seja necessária para avaliar o real desempenho da quantificação proposta na detecção de carbapenemases, o elevado poder discriminatório do MHT observado em nosso estudo para detecção de KPC sugere que o teste possa constituir uma ferramenta útil aos laboratórios clínicos no diagnóstico destas enzimas, principalmente em locais onde existe uma alta prevalência de KPC em detrimento de outras carbapenemases, como é o caso do Brasil.

A redução nos pontos de corte dos carbapenêmicos pelo CLSI, a partir de junho de 2010, aumentou a sensibilidade na detecção de isolados produtores de carbapenemases, porém, diminuiu a sua especificidade. Com base nos pontos de corte atuais, a partir dos resultados obtidos pelo teste de disco-difusão, foi possível observar um aumento considerável de isolados classificados como intermediários ou resistentes, mesmo tendo-se em vista a baixa prevalência de carbapenemases entre os isolados, para os quais os carbapenêmicos ainda poderiam representar uma opção terapêutica viável. Portanto, a aplicação de metodologias práticas como o teste de discos combinados com AB e o MTH quantificado, os quais podem gerar uma análise altamente específica, parece constituir uma alternativa eficiente a ser utilizada junto à interpretação do antibiograma para melhor discriminar a produção de KPC e melhor adequar a informação sobre o perfil de sensibilidade dos isolados.

Sobretudo, a partir da caracterização fenotípica e genotípica dos isolados avaliados neste estudo, foi possível constatar que a reduzida sensibilidade aos carbapenêmicos observada esteve associada principalmente à produção de  $\beta$ -lactamases do tipo ESBL e AmpC, ao invés de carbapenemases. Apesar da baixa prevalência, foi demonstrada a presença de cepas produtoras de KPC na população estudada, corroborando com o panorama verificado em praticamente todo território brasileiro. Tomados em conjunto, nossos resultados contribuem para o conhecimento da epidemiologia local de resistência aos carbapenêmicos e dos isolados produtores de KPC, apontando as características plasmidiais que envolvem o carreamento o gene *bla*<sub>KPC</sub> e elucidando parte do contexto genético no qual o mesmo está inserido.





## 6. CONCLUSÕES GERAIS

Como conclusões gerais deste trabalho podemos destacar:

1. A produção de ESBL e AmpC foi altamente prevalente entre os isolados com reduzida sensibilidade aos carbapenêmicos;
2. A baixa prevalência de KPC entre estes isolados;
3. O primeiro relato mundial de um isolado de *K. georgiana* produtor de KPC-2, consolidando o elevado potencial de disseminação dessas enzimas inter-espécies, inclusive em patógenos incomuns e raramente patogênicos, como é o caso do gênero *Kluyvera*;
4. A presença exclusiva do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> entre os isolados de *E. cloacae*, *K. pneumoniae* e *S. marcescens*, identificados como produtores da enzima, corroborando com a epidemiologia molecular dos isolados brasileiros;
5. Um elevado nível de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos e às quinolonas para a maioria dos isolados produtores de KPC, bem como um perfil de sensibilidade variável frente às demais classes de antimicrobianos testadas;
6. A presença de dois grupos clonais entre os isolados de *E. cloacae* e *S. marcescens* e quatro grupos clonais entre os isolados de *K. pneumoniae*;
7. A caracterização parcial do ambiente genético que envolve o gene *bla*<sub>KPC</sub> dos isolados avaliados, evidenciando estruturas presentes no Tn4401 e no Tn801;
8. A presença de plasmídeos não tipáveis e de tamanhos variáveis envolvendo o carreamento do gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, com prevalência dos plasmídeos de ~ 20 Kb;
9. A elevada SN e SP para o método de discos combinados com o AB na detecção de isolados produtores de KPC, com a utilização do IPM como substrato;
10. O maior poder discriminatório do MHT quantificado em relação ao MHT convencional na detecção de isolados produtores de KPC.



## 7. REFERÊNCIAS

Abbott SL. *Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and Other Enterobacteriaceae*. In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML and Warnock DW editors. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington: 10th edition, ASM Press, 639-57; 2011.

Adler M, Anjum M, Andersson DI, Sandegren L. Influence of acquired  $\beta$ -lactamases on the evolution of spontaneous carbapenem resistance in *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 2013; 68:51-9.

Alba J, Ishii Y, Thomson K, Moland ES, Yamaguchi K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4760-2.

Almeida AC, Vilela MA, Cavalcanti FL, Martins WM, Morais MA Jr, Morais MM. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 6:2205-6.

Alvarez M, Tran JH, Chow N, Jacoby GA. Epidemiology of conjugative plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:533-7.

Anderson KF, Lonsway DR, Rasheed JK, Biddle J, Jensen B, McDougal LK, Carey RB, Thompson A, Stocker S, Limbago B, Patel JB. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2007; 45:2723-5.

Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Clímaco EC, Martinez R, Bellissimo-Rodrigues F, Basile-Filho A, Evaristo MA, Del Peloso PF, Ribeiro VB, Barth AL, Paula MC, Baquero F, Cantón R, Darini AL, Coque TM. Dissemination of *bla*<sub>KPC-2</sub> 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.

Anne Marie Queenan, Carlos Torres-Viera, Howard S. Gold, Yehuda Carmeli, George M. Eliopoulos, Robert C. Moellering, Jr., John P. Quinn, Janet Hindler, Antone A. Medeiros and Karen Bush. SME-Type Carbapenem-Hydrolyzing Class A  $\beta$ -Lactamases from Geographically Diverse *Serratia marcescens* Strains. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:3035-9.

Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae, U.S. rivers. Emerg Infect Dis 2005; 11:260-4.

Babini GS, Livermore DM. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. collected from intensive care units in Southern and Western Europe in 1997-1998. J Antimicrob Chemother 2000; 45:183-9.

Baraniak A, Izdebski R, Herda M, Fielt J, Hryniewicz W, Gniadkowski M, Kern-Zdanowicz I, Filczak K, Łopaciuk U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:4565-7.

Barrios H, Garza-Ramos U, Ochoa-Sanchez LE, Reyna-Flores F, Rojas-Moreno T, Morfin-Otero R, Rodriguez-Noriega E, Garza-Gonzalez E, Gonzalez G, Volkow P, Cornejo-Juarez P; Red-MEReBa Study Group, Silva-Sanchez J. A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae clinical isolates in Mexico. Antimicrob Agents Chemother 2012; 56:4032-4.

Bebrone C, Bogaerts P, Delbrück H, Bennink S, Kupper MB, Rezende de Castro R, Glupczynski Y, Hoffmann KM. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. Antimicrob Agents Chemother 2012; Oct 31. Epub ahead of print.

Bhavnani SM, Ambrose PG, Craig WA, Dudley MN, Jones RN; SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Outcomes evaluation of patients with ESBL- and non-ESBL-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* species as defined by CLSI reference methods: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. Diagn Microbiol Infect Dis 2006; 54:231-6.

Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decré D, Arlet G, Bingen E. Phenotypic screening of carbapenemases and associated  $\beta$ -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012; 50:1295-302.

Bogaerts P, Montesinos I, Rodriguez-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:361-2.

Bonnet R, Sampaio JL, Chanal C, Sirot D, De Champs C, Viillard JL, Labia R, Sirot J. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3061-8.

Bonnin RA, Poirel L, Naas T, Pirs M, Seme K, Schrenzel J, Nordmann P. Dissemination of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1-producing *Acinetobacter baumannii* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18:E362-5.

Bratu S, Landman D, Alanm M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC carbapenem-hydrolysing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother* 2005a; 49: 776-8.

Bratu S, Landman D, Haag R, Recco R, Eramo A, Alam M, Quale J. Rapid spread of carbapenem-resistance of *Klebsiella pneumoniae* in New York city. *Arch Intern Med* 2005b; 165: 1430-5.

Breathnach AS, Cubbon MD, Karunaharan RN, Pope CF, Planche TD. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* outbreaks in two hospitals: association with contaminated hospital waste-water systems. *J Hosp Infect* 2012; 82:19-24.

Brink AJ, Coetzee J, Clay CG, Sithole S, Richards GA, Poirel L, Nordmann P. Emergence of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC-2) in South Africa. *J Clin Microbiol* 2012; 50:525-7.

Brink AJ, Coetzee J, Corcoran C, Clay CG, Hari-Makkan D, Jacobson RK, Richards GA, Feldman C, Nutt L, van Greune J, Deetlefs JD, Swart K, Devenish L, Poirel L, Nordmann P. Emergence of OXA-48 and OXA-181 Carbapenemases among Enterobacteriaceae in South

Africa and Evidence of In Vivo Selection of Colistin Resistance as a Consequence of Selective Decontamination of the Gastrointestinal Tract. *J Clin Microbiol* 2013; 51:369-72.

Brun-Buisson C, Legrand P, Philippon A, Montravers F, Ansquer M, Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. *Lancet* 1987; 2:302-6.

Burckhardt I, Zimmermann S. Using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry to detect carbapenem resistance within 1 to 2.5 hours. *J Clin Microbiol* 2011; 49:3321-4.

Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo F, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219-28.

Carrër A, Poirel L, Pitout JD, Church D, Nordmann P. Occurrence of an SME-2-producing *Serratia marcescens* isolate in Canada. *Int J Antimicrob Agents* 2008; 31:181-2.

Carvalhoes CG, Picão RC, Nicoletti AG, Xavier DE, Gales AC. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false-positive results. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65: 249-51.

Casellas JM, Goldberg M. Incidence of strains producing extended spectrum beta-lactamases in Argentina. *Infection* 1989; 17:434-6.

Casewell MW, Phillips I. Aspects of the plasmid-mediated antibiotic resistance and epidemiology of *Klebsiella* species. *Am J Med* 198; 70:459-62.

Castanheira M, Toleman MA, Jones RN, Schmidt FJ, Walsh TR. Molecular characterization of a beta-lactamase gene, *bla*<sub>GIM-1</sub>, encoding a new subclass of metallo-beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4654-61.

Castanheira M, Deshpande LM, Mathai D, Bell JM, Jones RN, Mendes RE. Early dissemination of NDM-1- and OXA-181-producing Enterobacteriaceae in Indian hospitals: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 2006-2007. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:1274-8.

Chang CJ, Ye JJ, Yang CC, Huang PY, Chiang PC, Lee MH. Influence of third-generation cephalosporin resistance on adult in-hospital mortality from post-neurosurgical bacterial meningitis. *J Microbiol Immunol Infect* 2010; 43:301-9.

Chen L, Mediavilla JR, Endimiani A, Rosenthal ME, Zhao Y, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla<sub>KPC</sub>*) variants. *J Clin Microbiol* 2011; 49:579-85.

Chen L, Chavda KD, Fraimow HS, Mediavilla JR, Melano RG, Jacobs MR, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Complete nucleotide sequence of *bla<sub>KPC-4</sub>* and *bla<sub>KPC-5</sub>* harboring IncN and IncX plasmids from *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in New Jersey. *Antimicrob Agents Chemother* 2012a. Epub ahead of print.

Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Jacobs MR, Levi MH, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Partial excision of *bla<sub>KPC</sub>* from Tn4401 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2012b; 56:1635-8.

Chen L, Chavda KD, Mediavilla JR, Zhao Y, Fraimow HS, Jenkins SG, Levi MH, Hong T, Rojzman AD, Ginocchio CC, Bonomo RA, Kreiswirth BN. Multiplex real-time PCR for detection of an epidemic KPC- producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012c; 56:3444-7.

Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist* 2012; 5:133-41.

Chong Y, Ito Y, Kamimura T. Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infect Genet Evol* 2011; 11:1499-504.

Clinical and Laboratory Standard Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 19th Informational Supplement; Approved document M100-S19, Vol.29 N°. 3, Wayne, PA, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 21th Informational Supplement; Approved document M100-S21, Vol.31 N°.1, Wayne, PA, 2011.

Cornaglia G, Guan L, Fontana R, Satta G. Diffusion of meropenem and imipenem through the outer membrane of *Escherichia coli* K-12 and correlation with their antibacterial activities. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1902-8.

Cornaglia G, Garau J, Livermore DM. Living with ESBLs. Introduction. *Clin Microbiol Infect* 2008; 14:1-2.

Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, Robustillo A, Baquero F, Coque TM, Cantón R. Emergence of *bla*<sub>KPC-3</sub>-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1608-14.

Cuzon G, Naas T, Nordmann P. Functional characterization of Tn4401, a Tn3-based transposon involved in *bla*<sub>KPC</sub> gene mobilization. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b; 55:5370-3.

Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produce beta-lactamase *bla*<sub>KPC-2</sub> gene. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:1349-56.

Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011a; 55:2420-3.

D'Alincourt Carvalho-Assef AP, Leão RS, da Silva RV, Ferreira AG, Seki LM, Asensi MD, Marques EA. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2010; 68:337-8.

Delbrück H, Bogaerts P, Kupper MB, Rezende de Castro R, Bennink S, Glupczynski Y, Galleni M, Hoffmann KM, Bebrone C. Kinetic and crystallographic studies of extended-spectrum GES-11, GES-12, and GES-14  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:5618-25.

Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence of plasmidic AmpC type beta-lactamase-mediated resistance in *Escherichia coli*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America 2004). *Int J Antimicrob Agents* 2006; 28:578-81.



Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother* 2012; 67:1660-5.

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.

El Garch F, Bogaerts P, Bebrone C, Galleni M, Glupczynski Y. OXA-198, an acquired carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4828-33.

El Salabi A, Borra PS, Toleman MA, Samuelsen Ø, Walsh TR. Genetic and biochemical characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase, TMB-1, from an *Achromobacter xylosoxidans* strain isolated in Tripoli, Libya. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:2241-5.

Emborg J, Dalgaard P, Ahrens P. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafoods. *Int J Syst Evol Microbiol* 2006; 56:2473-9.

Fairfax MR, Queenan AM, Lephart PR, Kaye KS, Dror M, Arnous N, Salimnia TT, Mitchell RA, Alangaden G, Salimnia H. Detection of 2 SME-1 carbapenemase-producing *Serratia marcescens* in Detroit. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 71:325-6.

Fehlberg LC, Carvalho AM, Campana EH, Gontijo-Filho PP, Gales AC. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraíba, Northeastern Brazil. *Braz J Infect Dis* 2012; 16:577-80.

Frère JM, Galleni M, Bush K, Dideberg O. Is it necessary to change the classification of  $\beta$ -lactamases? *J Antimicrob Chemother* 2005; 55:1051-3.

Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52:699-702.

Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012; 73:354-60.

García C P, Rubilar P C, Vicentini H D, Román G J C, León C E, Muñoz C G, Domínguez Y M, González R G, Bello T H, Labarca L J. Clinical and molecular characterization of ESBL-producing enterobacteria isolated from bacteremia in a university hospital. *Rev Chilena Infectol* 2011; 28:563-71.

Giakkoupi P, Papagiannitsis CC, Miriagou V, Pappa O, Polemis M, Tryfinopoulou K, Tzouvelekis LS, Vatopoulos AC. An update of the evolving epidemic of *bla*<sub>KPC-2</sub>-carrying *Klebsiella pneumoniae* in Greece (2009-10). *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:1510-3.

Giakkoupi P, Tzouvelekis LS, Tsakris A, Loukova V, Sofianou D, Tzelepi E. IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2247-53.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Comparison of the SUPERCARBA, CHROMagar KPC and Brilliance CRE screening media for detection of Enterobacteriaceae with reduced susceptibility to carbapenems. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2012c. Epub ahead of print.

Girlich D, Poirel L, Nordmann P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2012b; 50:477-9.

Girlich D, Poirel L, Szczepanowski R, Schlüter A, Nordmann P. Carbapenem-hydrolyzing GES-5-encoding gene on different plasmid types recovered from a bacterial community in a sewage treatment plant. *Appl Environ Microbiol* 2012a; 78:1292-5.

Giske CG, Gezelius L, Samuelsen Ø, Warner M, Sundsfjord A, Woodford N. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo- $\beta$ -lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:552-6.

Glupczynski Y, Huang TD, Bouchahrouf W, Rezende de Castro R, Bauraing C, Gérard M, Verbruggen AM, Deplano A, Denis O, Bogaerts P. Rapid emergence and spread of OXA-

48-producing carbapenem resistant Enterobacteriaceae isolates in Belgian hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:168-72.

Gomez SA, Pasteran FG, Faccone D, Tijet N, Rapoport M, Lucero C, Lastovetska O, Albornoz E, Galas M; KPC Group, Melano RG, Corso A, Petroni A. Clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* ST258 harbouring KPC-2 in Argentina. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:1520-4.

Gootz TD, Lescoe MK, Dib-Hajj F, Dougherty BA, He W, Della-Latta P, Huard RC. Genetic organization of transposase regions surrounding *bla*<sub>KPC</sub> carbapenemase genes on plasmids from *Klebsiella* strains isolated in a New York City hospital. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:1998-2004.

Goren MG, Chmelnitsky I, Carmeli Y, Navon-Venezia S. Plasmid-encoded OXA-48 carbapenemase in *Escherichia coli* from Israel. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:672-3.

Gregory CJ, Llata E, Stine N, Gould C, Santiago LM, Vazquez GJ, Robledo IE, Srinivasan A, Goering RV, Tomashek KM. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Puerto Rico associated with a novel carbapenemase variant. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:476-84.

Grundmann H, Livermore DM, Giske CG, Canton R, Rossolini GM, Campos J, Vatopoulos A, Gniadkowski M, Toth A, Pfeifer Y, Jarlier V, Carmeli Y; CNSE Working Group. Carbapenem-non susceptible Enterobacteriaceae in Europe: conclusions from a meeting of national experts. *Euro Surveill* 2010; 15:pii: 19711.

Gülmez D, Woodford N, Palepou MF, Mushtaq S, Metan G, Yakupogullari Y, Kocagoz S, Uzun O, Hascelik G, Livermore DM. 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; 31:523-6.

Gupta N, Limbago BM, Patel JB, Kallen AJ. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. *Clin Infect Dis* 2011; 53:60-7.

Hidalgo-Grass C, Warburg G, Temper V, Benenson S, Moses AE, Block C, Strahilevitz J. KPC-9, a novel carbapenemase from clinical specimens in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:6057-9.

Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Hoan TC, Sievert DM, Pollok DA, Fridkin SK, National Healthcare Safety network Team; Participating National Healthcare Safety Network Facilities. NHSN annual update: antimicrobial resistant pathogens associated with healthcare associated-infections: annual summary of data reported to the National Healthcare safety Network at Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29:996-1011.

Hirsch EB, Tam VH. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1119-25.

Hrabák J, Studentová V, Walková R, Zemlicková H, Jakubu V, Chudácková E, Gniadkowski M, Pfeifer Y, Perry JD, Wilkinson K, Bergerová T. Detection of NDM-1, VIM-1, KPC, OXA-48, and OXA-162 carbapenemases by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2012; 50:2441-3.

Iversen, C., N. Mullane, B. McCardell, B. D. Tall, A. Lehner, S. Fanning, R. Stephan, H. Joosten. *Cronobacter* gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of *Enterobacter sakazakii*, and proposal of *Cronobacter sakazakii* gen. nov., comb. nov., *Cronobacter malonaticus* sp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., *Cronobacter* genomospecies 1, and of three subspecies, *Cronobacter dublinensis* subsp. *dublinensis* subsp. nov., *Cronobacter dublinensis* subsp. *lausannensis* subsp. nov., and *Cronobacter dublinensis* subsp. *lactaridi* subsp. nov. *Int J Syst Evol Bacteriol* 2008; 58:1442-7.

Jacoby GA, Mills DM, Chow N. Role of  $\beta$ -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other  $\beta$ -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:3203-6.

Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22:161-82.

Jácome PR, Alves LR, Cabral AB, Lopes AC, Maciel MA. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:4990.

Jeong SH, Bae IK, Kim D, Hong SG, Song JS, Lee JH, Lee SH. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4809-10.

Jones CH, Tuckman M, Keeney D, Ruzin A, Bradford PA. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:465-75.

Jones RN, Kirby JT, Rhomberg PR. Comparative activity of meropenem in US medical centers (2007): initiating the 2nd decade of MYSTIC program surveillance. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2008; 61:203-13.

Kallen AJ, Hidron AI, Patel J, Srinivasan A. Multidrug resistance among gram-negative pathogens that caused healthcare-associated infections reported to the National Healthcare Safety Network, 2006-2008. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2010; 31:528-31.

Kilic A, Aktas Z, Bedir O, Gumral R, Bulut Y, Stratton C, Tang YW, Basustaoglu AC. Identification and characterization of OXA-48 producing, carbapenem-resistant Enterobacteriaceae isolates in Turkey. *Ann Clin Lab Sci* 2011; 41:161-6.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3365-70.

Kitchel B, Rasheed JK, Patel JB, Srinivasan A, Navon-Venezia S, Carmeli Y, Brolund A, Giske CG. Molecular epidemiology of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:3365-70.

Ko KS, Lee JY, Baek JY, Suh JY, Lee MY, Choi JY, Yeom JS, Kim YS, Jung SI, Shin SY, Heo ST, Kwon KT, Son JS, Kim SW, Chang HH, Ki HK, Chung DR, Peck KR, Song JH.

Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. *J Med Microbiol* 2010; 59:822-8.

Koh TH, Cao DY, Chan KS, Wijaya L, Low SB, Lam MS, Ooi EE, Hsu LY. *bla*(OXA-181)-positive *Klebsiella pneumoniae*, Singapore. *Emerg Infect Dis* 2012; 18:1524-5.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn Jr WC. *Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*. Philadelphia: 6th edition, Lippincott-Williams & Wilkins, 2005.

Kumarasamy KK, Toleman MA, Walsh TR, Bagaria J, Butt F, Balakrishnan R, Chaudhary U, Doumith M, Giske CG, Irfan S, Krishnan P, Kumar AV, Maharjan S, Mushtaq S, Noorie T, Paterson DL, Pearson A, Perry C, Pike R, Rao B, Ray U, Sarma JB, Sharma M, Sheridan E, Thirunarayan MA, Turton J, Upadhyay S, Warner M, Welfare W, Livermore DM, Woodford N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis* 2010; 10:597-602.

Landman D, Urban C, Bäcker M, Kelly P, Shah N, Babu E, Bratu S, Quale J. Susceptibility profiles, molecular epidemiology, and detection of KPC-producing *Escherichia coli* isolates from the New York City vicinity. *J Clin Microbiol* 2010; 48:4604-7.

Lascols C, Peirano G, Hackel M, Laupland KB, Pitout JD. Surveillance and molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* that produce carbapenemases; the first report of OXA-48-like enzymes in North America. *Antimicrob Agents Chemother* 2012. Epub ahead of print.

Lat A, Clock SA, Wu F, Whittier S, Della-Latta P, Fautleroy K, Jenkins SG, Saiman L, Kubin CJ. Comparison of polymyxin B, tigecycline, cefepime, and meropenem MICs for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* by broth microdilution, Vitek 2, and Etest. *J Clin Microbiol* 2011; 49:1795-8.

Leavitt A, Carmeli Y, Chmelnitsky I, Goren MG, Ofek I, Navon-Venezia S. Molecular epidemiology, sequence types, and plasmid analyses of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:3002-6.

Lee K, Yum JH, Yong D, Lee HM, Kim HD, Docquier JD, Rossolini GM, Chong Y. Novel acquired metallo-beta-lactamase gene, *bla*(SIM-1), in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4485-91.

Livermore DM, Hope R, Brick G, Lillie M, Reynolds R; BSAC Working Parties on Resistance Surveillance. Non-susceptibility trends among Enterobacteriaceae from bacteraemias in UK and Ireland, 2001-06. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:41-54.

Livermore DM. Has the era of untreatable infections arrived? *Journal of Antimicrob Chemother* 2009; 64:29-36.

Livermore DM, Woodford N. The beta-lactamase threat in Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. *Trends Microbiol* 2006; 14:413-20.

Lopez JA, Correa A, Navon-Venezia S, Correa AL, Torres JA, Briceño DF, Montealegre MC, Quinn JP, Carmeli Y, Villegas MV. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. *Clin Microbiol Infect* 2011; 17:52-6.

Lowe CF, Kus JV, Salt N, Callery S, Louie L, Khan MA, Vearncombe M, Simor AE. Nosocomial Transmission of New Delhi Metallo- $\beta$ -Lactamase-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Toronto, Canada. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2013; 34:49-55.

Lowman W, Sriruttan C, Nana T, Bosman N, Duse A, Venturas J, Clay C, Coetzee J. NDM-1 has arrived: first report of a carbapenem resistance mechanism in South Africa. *S Afr Med J* 2011; 101:873-5.

Lyon JA. Imipenem/cilastatin: the first carbapenem antibiotic. *Drug Intell Clin Pharm* 1985; 19:895-9.

Martinez-Martinez L, Pascual A, Hernandez-Alles S, Alvarez-Díaz D, Suárez AI, Tran J, Benedí VJ, Jacoby GA. Roles of  $\beta$ -lactamases and porines in activities of carbapenems and cephalosporines against *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:1669-73.

Martins AF, Kuchenbecker R, Sukiennik T, Boff R, Reiter KC, Lutz L, Machado AB, Barth AL. Carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* producing the OXA-23 enzyme: dissemination in Southern Brazil. *Infection* 2009; 37:474-6.

Mataseje LF, Boyd DA, Hoang L, Imperial M, Lefebvre B, Miller M, Poutanen SM, Roscoe D, Willey BM, Mulvey MR. Carbapenem-hydrolyzing Oxacillinase-48 and Oxacillinase-181 in Canada, 2011. *Emerg Infect Dis* 2013; 19:157-60.

Mathers AJ, Hazen KC, Carroll J, Yeh AJ, Cox HL, Bonomo RA, Sifri CD. First Clinical Cases of OXA-48 Producing Carbapenem Resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States: the "menace" arrives in the New World. *J Clin Microbiol* 2012. Epub ahead of print.

Matthews SJ and Lancaster JW. Doripenem monohydrate, a broad-spectrum carbapenem antibiotic. *Clin Ther* 2009; 31:42-63.

Miriagov V, Tzouvelekis LS, Rossiter S, Tzelepi E, Angulo FJ, Whichard JM. Imipinem resistance in *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1297-300.

Miró E, Agüero J, Larrosa MN, Fernández A, Conejo MC, Bou G, González-López JJ, Lara N, Martínez-Martínez L, Oliver A, Aracil B, Oteo J, Pascual A, Rodríguez-Baño J, Zamorano L, Navarro F. Prevalence and molecular epidemiology of acquired AmpC  $\beta$ -lactamases and carbapenemases in Enterobacteriaceae isolates from 35 hospitals in Spain. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012. Epub ahead of print.

Moland ES, Black JA, Ourada J, Reisbig MD, Hanson ND, Thomson KS. Occurrence of newer beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* isolates from 24 U.S.hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:3837-42.

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; 53:333-4.

Moquet O, Bouchiat C, Kinana A, Seck A, Arouna O, Bercion R, Breurec S, Garin B. Class D OXA-48 carbapenemase in multidrug-resistant enterobacteria, Senegal. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:143-4.



Moran Gilad J, Carmeli Y, Schwartz D, Navon-Venezia S. Laboratory evaluation of the CHROMagar KPC medium for identification of carbapenem-non susceptible Enterobacteriaceae. *Diagn Microbiol Infect Dis* 2011; 70:565-7. .

Mugnier PD, Poirel L, Naas T, Nordmann P. Worldwide dissemination of the *bla*OXA-23 carbapenemase gene of *Acinetobacter baumannii*. *Emerg Infect Dis* 2010; 16:35-40.

Naas T, Cuzon G, Villegas MV, Lartigue MF, Quinn JP, Nordmann P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*<sub>KPC</sub> gene. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52:1257-63.

Naas T, Nordmann P. OXA-type  $\beta$ -lactamases. *Curr Pharm Des* 1999; 5:865-79.

Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:4423-4.

Navon-Venezia S, Chmelnitsky I, Leavitt A, Schwaber MJ, Schwartz D, Carmeli Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3098-101.

Navon-Venezia S, Leavitt A, Schwaber MJ, Rasheed JK, Srinivasan A, Patel JB, Carmeli Y; Israeli KPC Kpn Study Group. 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. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:818-20.

Nazic H, Poirel L, Nordmann P. Further identification of plasmid-mediated quinolone resistance determinant in Enterobacteriaceae in Turkey. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49:2146-7.

Nicolau DP. Carbapenems: a potent class of antibiotics. *Expert Opin Pharmacother* 2008; 9:23-37.

Nicoletti AG, Fehlberg LC, Picão RC, Machado A de O, Gales AC. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; 56:4563-4.

Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* 2003; 67:593-656.

Nordmann P and Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect* 2002; 8:321-31.

Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 2009; 9:228-36.

Nordmann P, Girlich D, Poirel L. Detection of carbapenemase producers in Enterobacteriaceae by use of a novel screening medium. *J Clin Microbiol* 2012b; 50:2761-6.

Nordmann P. Gram negative bacteriae with resistance to carbapenems. *Médecine Sciences* 2010; 26:950-9.

Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Clin Microbiol Infect* 2011; 18:E506-13.

Pagès JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol* 2008; 6:893-903.

Palepou, M. F., N. Woodford, R. Hope, M. Colman, J. Glover, M. Kaufmann, C. Reynolds LR and Livermore DM. Novel class A carbapenemase, KPC-4, in an *Enterobacter* isolate from Scotland. Abstr. 1134\_01\_20. Abstr. 15th Eur Cong Clin Microbiol Infect Dis 2005, Copenhagen, Denmark.

Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, Rapoport M, Corso A. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2009; 47:1631-9.

Pasteran F, Mendez T, Rapoport M, Guerriero L, Corso A. Controlling false-positive results obtained with the Hodge and Masuda assays for detection of class a carbapenemase in species of enterobacteriaceae by incorporating boronic Acid. *J Clin Microbiol* 2010; 48:1323-32.

Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, Radice G, Maggiora R, Rapoport M, Faccione D, Di Martino A, Galas M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2008; 14:1178-80.

Patel JB, Rasheed JK, Brandon Kitchel MS. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology and laboratory detection. *Clin Microb News* 2009; 31:55-62.

Paterson DL, Bonomo RA. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin Microbiol Rev* 2005; 18:657-86.

Pavez M, Mamizuka EM, Lincopan N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:2702.

Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD. Carbapenem-hydrolysis  $\beta$ -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2009; 63:265-8.

Pereira PS, de Araujo CF, Seki LM, Zahner V, Carvalho-Assef AP, Asensi MD. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). *J Antimicrob Chemother* 2012. Epub ahead of print.

Perez F, Endimiani A, Ray AJ, Decker BK, Wallace CJ, Hujer KM, Ecker DJ, Adams MD, Toltzis P, Dul MJ, Windau A, Bajaksouzian S, Jacobs MR, Salata RA, Bonomo RA. 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.

Perry JD, Naqvi SH, Mirza IA, Alizai SA, Hussain A, Ghirardi S, Orega S, Wilkinson K, Woodford N, Zhang J, Livermore DM, Abbasi SA, Raza MW. Prevalence of faecal carriage of Enterobacteriaceae with NDM-1 carbapenemase at military hospitals in Pakistan and evaluation of two chromogenic media. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:2288-94.

Picão RC, Santos AF, Nicoletti AG, Furtado GH, Gales AC. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:796-7.

Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4398-401.

Pitout JD, Laupland KB. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infect Dis* 2008; 8:159-66.

Poirel L, Rodríguez-Martínez JM, Al Naiemi N, Debets-Ossenkopp YJ, Nordmann P. Characterization of DIM-1, an integron-encoded metallo-beta-lactamase from a *Pseudomonas stutzeri* clinical isolate in the Netherlands. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:2420-4.

Poirel L, Weldhagen GF, De Champs C, Nordmann P. A nosocomial outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* isolates expressing the extended-spectrum beta-lactamase GES-2 in South Africa. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:561-5.

Poirel L, Weldhagen GF, Naas T, De Champs C, Dove MG, Nordmann P. GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 145:2598-2603.

Poirel L, Bernabeu S, Fortineau N, Podglajen I, Lawrence C, Nordmann P. Emergence of OXA-48-producing *Escherichia coli* clone ST38 in France. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4937-8.

Poirel L, Castanheira M, Carrër A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, Nordmann P. OXA-163, an OXA-48-related class D  $\beta$ -lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 2011b; 55:2546-51.

Poirel L, Héritier C, Tolün V, Nordmann P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:15-22.

Poirel L, Naas T, Nordmann P. Diversity, epidemiology, and genetics of class D beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010b; 54:24-38.

Poirel L, Le Thomas I, Naas T, Karim A, Nordmann P. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:622-32.

Pollini S, Maradei S, Pecile P, Olivo G, Luzzaro F, Docquier JD, Rossolini GM. FIM-1, a new acquired metallo- $\beta$ -lactamase from *a Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate from Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 2012. Epub ahead of print.

Potron A, Nordmann P, Lafeuille E, Al Maskari Z, Al Rashdi F, Poirel L. Characterization of OXA-181, a carbapenem-hydrolyzing class D beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:4896-9.

Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis* 2003; 9:999-1002.

Pournaras S, Poulou A, Tsakris A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother* 2010; 65:1319-21.

Qi Y, Wei Z, Ji S, Du X, Shen P, Yu Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. *J Antimicrob Chemother* 2011; 66:307-12.

Quale J. Global spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Microbe* 2008; 3: 516-20.

Queenan AM and Bush K. Carbapenemases: the Versatile  $\beta$ -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20:440-58.

Queenan AM, Shang W, Schreckenberger P, Lolans K, Bush K, Quinn J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:3485-7.

Queenan AM, Torres-Viera C, Gold HS, Carmeli Y, Eliopoulos GM, Moellering RC Jr, Quinn JP, Hindler J, Medeiros AA, Bush K. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:3035-9.

Radice M, Power P, Gutkind G, Fernández K, Vay C, Famiglietti A, Ricover N, Ayala JA. First class a carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:1068-9.

Radice M, Power P, Di Conza J, Gutkind G. Early dissemination of CTX-M-derived enzymes in South America. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46:602-4.

Rasheed JK, Biddle JW, Anderson KF, Washer L, Chenoweth C, Perrin J, Newton DW, Patel JB. Detection of the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase type 2 Carbapenem-hydrolyzing enzyme in clinical isolates of *Citrobacter freundii* and *K. oxytoca* carrying a common plasmid. *J Clin Microbiol* 2008; 46:2066-9.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2080-6.

Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, Medeiros AA. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40:2080-6.

Richter SN, Frasson I, Franchin E, Bergo C, Lavezzo E, Barzon L, Cavallaro A, Palù G. 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 Pathog* 2012; 4:7.

Robledo IE, Aquino EE, Santé MI, Santana JL, Otero DM, León CF, Vázquez GJ. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54:1354-7.

Robledo IE, Aquino EE, Vázquez GJ. Detection of the KPC Gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-Based Nosocomial Surveillance Study in Puerto Rico. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:2968-70.

Robledo IE, et al. First report of a KPC-4 and CTX-M producing *K. pneumoniae* (Kp) isolated from Puerto Rico (PR). Abstr. C2-1933. Abstr. 47th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2007. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Robledo, I. E., G. J. Vázquez, E. E. Aquino, E. S. Moland, K. Thomson, M. I. Santé and N. D. Hanson. A novel KPC variant, KPC-6, in a *Klebsiella pneumoniae* (Kp) Isolated in Puerto Rico (PR). Abstr. C2-3738. Abstr. 48th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2008. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Rodriguez-Martinez JM, Nordmann P, Fortineau N, Poirel L. VIM-19, a metallo-beta-lactamase with increased carbapenemase activity from *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:471-6.

Scaife W, Young HK, Paton RH, Amyes SG. Transferable imipenem-resistance in *Acinetobacter* species from a clinical source. J Antimicrob Chemother 1995; 36:585-6.

Seki LM, Pereira PS, de Souza Mda P, Conceição Mde S, Marques EA, Porto CO, Colnago EM, Alves C de F, Gomes D, Assef AP, Samuelsen Ø, Asensi MD. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. Diagn Microbiol Infect Dis 2011; 70:274-7.

Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama T, Kanamori M, Kirikae T. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo-beta-lactamase from a *Citrobacter freundii* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 2008; 52:4194-7.

Sevillano E, Gallego L, García-Lobo JM. First detection of the OXA-40 carbapenemase in *P. aeruginosa* isolates, located on a plasmid also found in *A. baumannii*. Pathol Biol (Paris) 2009; 57:493-5.

Shen P, Wei Z, Jiang Y, Du X, Ji S, Yu Y, Li L. Novel genetic environment of the carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. Antimicrob Agents Chemother 2009; 53:4333-8

Smith Moland E, Hanson ND, Herrera VL, Black JA, Lockhart TJ, Hossain A, Johnson JA, Goering RV, Thomson KS. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing beta-

lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. J Antimicrob Chemother 2003; 51:711-4.

Steward CD, Mohammed JM, Swenson JM, Stocker SA, Williams PP, Gaynes RP, McGowan JE Jr, Tenover FC. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. J Clin Microbiol 2003; 41:351-8.

Suh B, Bae IK, Kim J, Jeong SH, Yong D, Lee K. Outbreak of meropenem-resistant *Serratia marcescens* mediated by chromosomal AmpC beta-lactamase overproduction and outer membrane protein loss. Antimicrob Agents Chemother 2010; 54:5057-61.

Szabó D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, Bethel CR, Doi Y, Deeley K, Paterson DL. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to ertapenem in *Enterobacter cloacae*. Antimicrob Agents Chemother 2006; 50: 2833-35.

Tenover FC, Kalsi RK, Williams RB, Carey RB, Stocker S, Lonsway D, Rasheed JK, Biddle JW, McGowan JE, Hanna B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. Emerg Infect Dis 2006; 12:1209-13.

Thomson KS. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. J Clin Microbiol 2010; 48:1019-25.

Tibbetts R, Frye JG, Marschall J, Warren D, Dunne W. 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*. J Clin Microbiol 2011; 46:3080-3.

Tsakris A, Voulgari E, Poulou A, Kimouli M, Pournaras S, Ranellou K, Kosmopoulou O, Petropoulou D. In vivo acquisition of a plasmid-mediated *bla*(KPC-2) gene among clonal isolates of *Serratia marcescens*. J Clin Microbiol 2010; 48:2546-9.

Tsakris A, Kristo I, Poulou A, Markou F, Ikonomidis A, Pournaras S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. J Antimicrob Chemother 2008; 62:1257-60.



Turner PJ. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broad- spectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Dis* 2009; 63:217-22.

Tzouveleki LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other Enterobacteriaceae: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev* 2012; 25:682-707.

Velge P, Wiedemann A, Rosselin M, Abed N, Boumart Z, Chaussé AM, Grépinet O, Namdari F, Roche SM, Rossignol A, Virlogeux-Payant I. Multiplicity of *Salmonella* entry mechanisms, a new paradigm for *Salmonella* pathogenesis. *Microbiology open* 2012; 3:243-58.

Villar HE, Danel F, Livermore DM. Permeability to carbapenems of *Proteus mirabilis* mutants selected for resistance to imipenem or other beta-lactams. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:365-70.

Villegas MV, Lolans K, Correa A, Kattan JN, Lopez JA, Quinn JP, Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51:1553-5.

Wachino J, Yoshida H, Yamane K, Suzuki S, Matsui M, Yamagishi T, Tsutsui A, Konda T, Shibayama K, Arakawa Y. SMB-1, a novel subclass B3 metallo-beta-lactamase, associated with ISCR1 and a class 1 integron, from a carbapenem-resistant *Serratia marcescens* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55:5143-9.

Walsh, TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents* 2010; 36S3:S8-14.

Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:147-51.

Williamson DA, Sidjabat HE, Freeman JT, Roberts SA, Silvey A, Woodhouse R, Mowat E, Dyet K, Paterson DL, Blackmore T, Burns A, Heffernan H. Identification and molecular characterisation of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase-1 (NDM-1)- and NDM-6-producing Enterobacteriaceae from New Zealand hospitals. *Int J Antimicrob Agents* 2012; 39:529-33.

Wolter DJ, Kurpiel PM, Woodford N, Palepou MF, Goering RV, Hanson ND. Phenotypic and enzymatic comparative analysis of the novel KPC variant KPC-5 and its evolutionary variants, KPC-2 and KPC-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:557-62.

Wolter, D. J., G. J. Vazquez, I. E. Robledo, M. I. Sante, R. V. Goering, and N. D. Hanson. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing betalactamase in *Pseudomonas aeruginosa* from the Puerto Rico Medical Center Hospitals (PRMCHs). Abstr. C2-1928. Abstr. 47th Intersci Conf Antimicrob Agents Chemother 2007. American Society for Microbiology, Washington, DC.

Woodford N, Eastaway AT, Ford M, Leanord A, Keane C, Quayle RM, Steer JA, Zhang J, Livermore DM. Comparison of BD Phoenix, Vitek 2, and MicroScan automated systems for detection and inference of mechanisms responsible for carbapenem resistance in Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol* 2010; 48:2999-3002.

Woodford N, Tierno PM Jr, Young K, Tysall L, Palepou MF, Ward E, Painter RE, Suber DF, Shungu D, Silver LL, Inglima K, Kornblum J, Livermore DM. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48:4793-9.

Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, Román JC, Mora GC, García P. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol* 2012; 61:1270-9.

Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. Characterization of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese university hospital. *J Clin Microbiol* 2012; 50:223-6.

Yang J, Chen Y, Jia X, Luo Y, Song Q, Zhao W, Wang Y, Liu H, Zheng D, Xia Y, Yu R, Han X, Jiang G, Zhou Y, Zhou W, Hu X, Liang L, Han L. Dissemination and characterization of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in an intensive care unit in China. *Trends Microbiol* 2011; 19:588-95.

Yang YJ, Wu PJ, Livermore DM. Biochemical characterization of a beta-lactamase that hydrolyzes penems and carbapenems from two *Serratia marcescens* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:755-8.

Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45:1151-61.

Yong D, Bell JM, Ritchie B, Pratt R, Toleman MA, Walsh TR. A novel sub-group metallo-beta-lactamase, AIM-1, emerges in *Pseudomonas aeruginosa* (PAS) from Australia. Presented at: 47<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Chicago, IL, USA, 2007.

Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, Walsh TR. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, *bla*(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53:5046-54.

Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of *bla*<sub>IMI-2</sub> in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50:1610-11.

Zagorianou A, Sianou E, Iosifidis E, Dimou V, Protonotariou E, Miyakis S, Roilides E, Sofianou D. Microbiological and molecular characteristics of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* endemic in a tertiary Greek hospital during 2004-2010. *Euro Surveill* 2012; 17, pii: 20088.

Zalas-Więcek P, Michalska A, Gospodarek E. *Morganella* sp. rods-characteristics, infections, mechanisms of resistance to antibiotics. *Postepy Hig Med Dosw* 2012; 66:242-51.

Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberkmecht AC, Barth AL. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 34:286-8.

Zavascki AP, Zoccoli CM, Machado AB, de Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Barth AL. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? *Int J Infect Dis* 2010; 14:539-40.

Zavascki AP, Carvalhaes CG, Picão RC, Gales AC. Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*: resistance mechanisms and implications for therapy. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2010; 8:71-93.

Zhanel GG, Johanson C, Embil JM, Noreddin A, Gin A, Vercaigne L, Hoban DJ. Ertapenem: review of a new carbapenem. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2005; 3:23-39.

Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, Thomson K, Rubinstein E, Hoban DJ, Noreddin AM, Karlowsky JA. Comparative review of the carbapenems. *Drugs* 2007; 67:1027-52.

Zhang R, Wang XD, Cai JC, Zhou HW, Lv HX, Hu QF, Chen GX. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* with high qnr prevalence in a Chinese hospital. *J Med Microbiol* 2011; 60:977-82.

**ANEXO – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE**  
**Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação**  
**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE**

A Comissão Científica e a Comissão de Pesquisa e Ética em Saúde, que é reconhecida pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS como Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

**Projeto:** 09-270

**Versão do Projeto:** 16/07/2009

**Pesquisadores:**

AFONSO LUIS BARTH  
VANESSA BLEY RIBEIRO  
LISANDRA SILVANI MASSI  
KATIA RUSCHEL PILGER DE OLIVEIRA

**Título:** DETECÇÃO DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS E AVALIAÇÃO DE CARBAPENEMASES EM ISOLADOS CLÍNICOS DA FAMÍLIA ENTEROBACTERIACEAE NO HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

Este projeto foi Aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos, de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde. Os membros do CEP/HCPA não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores. Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/HCPA.

Porto Alegre, 27 de agosto de 2009.

  
Prof.<sup>a</sup> Nadine Clausen  
Coordenadora do GPPG e CEP-HCPA

