

ANA JULIA CORRÊA

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS  
CARBAPENÊMICOS EM BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DE  
AMOSTRAS CLÍNICAS DE UM HOSPITAL PRIVADO DE JOINVILLE, SC.**

JOINVILLE

2018

14

ANA JULIA CORRÊA

**INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS  
CARBAPENÊMICOS EM BACILOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DE  
AMOSTRAS CLÍNICAS DE UM HOSPITAL PRIVADO DE JOINVILLE, SC.**

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente na Universidade da Região de Joinville.

Orientador: Prof: Dr. Paulo Henrique Condeixa de França.

JOINVILLE

2018

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

Corrêa, Ana Julia

C824i

Investigação de marcadores genotípicos de resistência aos carbapenêmicos em bacilos gram negativos isolados de amostras clínicas de um hospital privado de Joinville, SC./ Ana Julia Corrêa; orientador Dr. Paulo Henrique Condeixa de França. – Joinville: UNIVILLE, 2018.

95 p.: il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)

1. Bactérias gram-negativas. 2. Carbapenêmicos. 3. Infecção hospitalar – Joinville (SC). I. França, Paulo Henrique Condeixa de (orient.). II. Título.

CDD 616.014

**Termo de Aprovação**

**“Investigação de Marcadores Genotípicos de Resistência aos Antibióticos  
Carbapenêmicos em Bacilos Gram Negativos Isolados de Amostras Clínicas em  
Joinville, Santa Catarina”**

por

Ana Julia Corrêa

Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestra em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

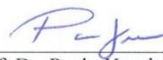


Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

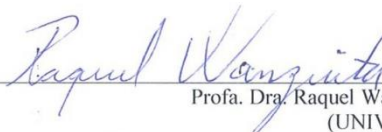
**Banca Examinadora:**



Prof. Dr. Paulo Henrique Condeixa de França  
Orientador (UNIVILLE)



Prof. Dra. Jussara Kasuko Palmeiro  
(CHC-UFPR)



Prof. Dra. Raquel Wanzuitta  
(UNIVILLE)

Joinville, 25 de outubro de 2018

## AGRADECIMENTOS

A presente dissertação de mestrado não poderia chegar a bom porto sem o precioso apoio de várias pessoas.

Em primeiro lugar, não posso deixar de agradecer ao meu orientador, professor doutor Paulo Henrique Condeixa de França, por toda a paciência, empenho e sentido prático com que me orientou; e principalmente ter me apoiado mesmo nas adversidades.

À minha coorientadora Roseneide Campos Deglmann que com toda a sua experiência em microbiologia me deu fundamental suporte científico.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus colegas do Laboratório de Biologia Molecular da Univille, cujo apoio foi imprescindível para a realização deste trabalho.

Aos profissionais do Hospital Dona Helena em especial à bioquímica Vanessa Cristine Kobs que mesmo com sua rotina atribulada sempre esteve disponível para me ajudar.

Ao professor doutor Marcelo Pilonetto e à Lavinia Nery Villa Stangler Arend por serem nossos parceiros e nos cedido cepas padrão importantes para este trabalho.

Por último, quero agradecer à minha família e amigos pelo apoio incondicional que me deram, especialmente ao meu marido e minha sogra pelos incansáveis momentos em que ficaram com meu filho para que eu pudesse me dedicar a esta dissertação.

## RESUMO

O ambiente hospitalar é local altamente seletivo de bactérias resistentes aos antibióticos, as quais associam-se a altos índices de morbimortalidade e elevação dos custos hospitalares. Os bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de carbapenemases são os principais microrganismos causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) no Brasil. A rápida disseminação destes patógenos, aliada à recente identificação de cepas portadoras do gene *mcr-1*, que confere resistência às polimixinas, constituem um grave desafio à saúde pública. A investigação dos determinantes moleculares de resistência aos antimicrobianos, além de contribuir com a epidemiologia das IRAS, constitui ferramenta importante para o controle e prevenção de infecções. Neste contexto, objetivou-se Investigar a ocorrência dos principais genes codificadores de resistência aos carbapenêmicos em bacilos Gram-negativos isolados de pacientes internados e ambulatoriais. A pesquisa avaliou 157 isolados resistentes a ao menos um carbapenêmico, identificados em um hospital geral privado, em Joinville/SC, durante nove anos consecutivos, a partir de março de 2009. Os dados referentes ao tipo de amostra, setor hospitalar e perfil fenotípico dos isolados foram coletados junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar da instituição. A identificação das espécies deu-se por método automatizado e a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos via disco-difusão em ágar. A susceptibilidade fenotípica à polimixina B foi confirmada via definição da concentração inibitória mínima por microdiluição em caldo. A investigação dos genes codificantes de carbapenemases *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e do gene *mcr-1* foi realizada via Reação em Cadeia da Polimerase. Os isolados analisados foram derivados de lavado broncoalveolar (31%; n=48), *swab* retal (20%; n=32), secreção de ferida (15%; n=24), urina (14%; n=22), sangue (6%; n=9) e outros tipos de amostras com menor frequência (14%; n=22). A maioria dos isolados foi coletada na Unidade de Terapia Intensiva (41%; n=65) e nas unidades de internação (37%; n=58). Quanto à frequência dos isolados, 71 (45%) pertenciam ao complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (ABC), 43 (27%) foram identificados como *Pseudomonas aeruginosa*, 31 (20%) *Klebsiella pneumoniae* e 12 (8%) as demais espécies. A maioria dos isolados (80,2%; n=126)

foram positivos para um ou mais genes investigados. Concomitância de genes de resistência foi identificada em 89 (57%) isolados, a maioria destes (79%) pertencentes ao ABC, seguido pela *K. pneumoniae* (17%). Foram identificados 41 (26%) isolados positivos para o gene *bla*<sub>KPC</sub> e 39 (25%) para *bla*<sub>VIM</sub>, além de 13 (8%) portadores do *bla*<sub>NDM-1</sub> e 9 (6%) do *mcr-1*. Os isolados *mcr-1* positivos foram confirmados via sequenciamento do *amplicon*. Nenhum isolado apresentou os genes *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> ou *bla*<sub>OXA-143-like</sub>. Não houve isolado resistente à polimixina B, incluindo os *mcr-1* positivos. Conclui-se que, dentre os BGN apresentando resistência fenotípica aos carbapenêmicos, houve alta frequência e concomitância de marcadores moleculares de resistência, principalmente nos anos mais recentes da série histórica analisada, o que corrobora com a reconhecida ampla disseminação e variedade de genes codificantes de carbapenemases no Brasil e alerta para a necessidade de intensificação de medidas de controle de prevenção de IRAS por microrganismos multirresistentes.

Keywords: Bacilos Gram-negativos, Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde, Carbapenemases, Marcadores genotípicos, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.

## ABSTRACT

The hospital environment is a highly selective site of antibiotic resistant bacteria, which are associated with high morbidity and mortality rates and higher hospital costs. Gram-negative bacilli that produce carbapenemases are the main microorganisms that cause Healthcare Associated Infections (HAI) in Brazil. The rapid spread of these pathogens, together with the recent identification of strains bearing the *mcr-1* gene, which confers resistance to polymyxins, constitute a serious public health challenge. The investigation of molecular determinants of antimicrobial resistance, besides contributing to the epidemiology of HAI, is an important tool for the control and prevention of infections. In this context, we aimed to investigate the occurrence of the main genes encoding resistance in Gram-negative bacilli resistant to carbapenems isolated from clinical samples of inpatients and outpatients. The study evaluated 157 isolates resistant to at least one carbapenem antibiotic identified in a private general hospital in Joinville, SC, for nine consecutive years, starting in March 2009. Data regarding the type of sample, hospital sector and phenotypic profile of the isolates were collected from the institution's Infection Control Service. The identification of the species was performed by automated method and the evaluation of susceptibility to antibiotics via disc-diffusion in agar. The phenotypic susceptibility to polymyxin B was confirmed with the definition of the minimum inhibitory concentration by microdilution in broth. Investigation of the genes encoding carbapenemases *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>OXA-143-like</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> and the *mcr-1* gene was performed via Polymerase Chain Reaction. The isolates analyzed were derived from bronchoalveolar lavage (31%, n = 48), rectal swab (20%, n = 32), wound secretion (15%, n = 24), urine (14%; n = 22), (6%, n = 9) and other less frequent sample types (14%, n = 22). Most of isolates were collected at the Intensive Care Unit (41%; n = 65) and at the hospitalization units (37%; n = 58). As to the frequency of the isolates, 71 (45%) belonged to the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex (ABC), 43 (27%) were identified as *Pseudomonas aeruginosa*, 31 (20%) *Klebsiella pneumoniae* and 12 (8%) other species. Most isolates (80.2%; n = 126) were positive for one or more genes investigated. Concomitance of resistance genes was identified in 89 (57%) isolates, the majority of these (79%) belonging to ABC,



followed by *K. pneumoniae* (17%). We identified 41 (26%) *bla*<sub>KPC</sub>-positive and 39 (25%) *bla*<sub>VIM</sub>-positive isolates, as well as 13 (8%) *bla*<sub>NDM-1</sub> and 9 (6%) *mcr-1* carriers. The *mcr-1* positive isolates were confirmed via amplicon sequencing. No isolates showed the *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> or *bla*<sub>OXA-143-like</sub> genes. There was no polymyxin B resistant isolate, including the *mcr-1* positive ones. It is concluded that, among Gram-negative bacilli presenting phenotypic resistance to carbapenems, there was a high frequency and concomitance of molecular markers of resistance, especially in the most recent years of the historical series analyzed, which corroborates with the recognized wide spread and variety of genes encoding carbapenemases in Brazil and warns of the need to intensify measures for prevention of HAI by multiresistant microorganisms.

Keywords: Gram-negative bacilli, Healthcare Associated Infections, Carbapenemases, Genotypic markers, *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática da interação dos diversos ambientes na disseminação dos microrganismos multirresistentes .....23
- Figura 2 - Mecanismo de hidrólise do antibiótico  $\beta$ -lactâmico pela ação da metalo  $\beta$ -lactamase .....27
- Figura 3 - Mecanismo de ação das serino  $\beta$ -lactamases .....30

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes alvos do estudo .....	37
Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes <i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>bla</i> <sub>SPM-1</sub> e <i>mcr-1</i> .....	38
Tabela 3 - Cepas padrão utilizadas no estudo .....	39

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFB	Ácido Fenilborônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BGN	Bacilo gram-negativo
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CNS	Conselho Nacional de Saúde
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
ESBL	<i>Extended-spectrum beta-lactamase</i> / Beta-lactamase de Espectro Estendido
EUA	Estados Unidos da América
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> / Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	<i>Deoxyribonucleotide triphosphates</i> / Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic Acid</i> / Ácido Etilenodiaminotetracético
EPI	Equipamento de proteção individual
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
HDH	Hospital Dona Helena
IMP	Imipenemase
IRAS	Infecções relacionadas à assistência à saúde
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LBA	Lavado broncoalveolar
MβL	Metallo beta-lactamase
MDR	<i>Multidrug resistant</i> / Resistente a várias drogas
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i> / Concentração inibitória mínima
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> / <i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina
MS	Ministério da Saúde
NDM	<i>New Delhi metallo-β-lactamase</i>
OIE	<i>World Organization for Animal Health</i>
OXA	Oxacilinase

pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> / Reação em Cadeia da Polimerase
SCIH	Serviço de Controle de Infecção Hospitalar
Ta	Temperatura de anelamento
SCIRAS	Serviço de Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UI	Unidade de Internação
UNIVILLE	Universidade da Região de Joinville
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VRE	<i>Vancomycin-resistant Enterococci</i> / <i>Enterococcus</i> resistente à vancomicina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. OBJETIVOS .....	18
2.1. OBJETIVO GERAL .....	18
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	19
3.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA A SAÚDE .....	19
3.2. EPIDEMIOLOGIA DAS IRAS .....	20
3.3. AQUISIÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES NO AMBIENTE HOSPITALAR.....	21
3.4.1. Enterobactérias .....	23
3.4.2. Bacilos Gram-negativos não fermentadores .....	24
3.5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS.....	24
3.5.1. As carbapenemases.....	25
3.5.1.1. Metallo $\beta$ -lactamases .....	26
3.5.1.1.1. Imipenemase (IMP) .....	27
3.5.1.1.2. Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM) .....	28
3.5.1.1.3. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM) .....	28
3.5.1.1.4. São Paulo Metallo $\beta$ -lactamase (SPM) .....	29
3.5.1.1.5. <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase (KPC) .....	30
3.5.1.1.6. Oxacilinases .....	31
3.6. MECANISMO DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA, GENE <i>mcr-1</i> . .....	32
4. METODOLOGIA.....	33
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO .....	33
4.2. PERÍODO E LOCAIS DA PESQUISA .....	33
4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO .....	33
4.3.1. Critérios de inclusão .....	33
4.3.2. Critérios de exclusão .....	33
4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS .....	34
4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS .....	34
4.5.1. Métodos fenotípicos .....	34
4.5.2. Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases e <i>mcr-1</i> .....	36

4.5.2.1. Obtenção do DNA microbiano.....	36
4.5.2.2. Investigação de genes alvos .....	36
4.5.2.3. Eletroforese .....	39
4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	40
4.7. ASPECTOS ÉTICOS.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....	42
6. CONCLUSÃO.....	70
REFERÊNCIAS.....	72
APÊNDICE I.....	88
APÊNDICE II.....	93

## 1. INTRODUÇÃO

O ambiente hospitalar, principalmente a Unidade de Terapia Intensiva (UTI), é considerado local altamente seletivo de bactérias multirresistentes devido à concentração de indivíduos potencialmente críticos, ao uso de dispositivos invasivos, como a ventilação mecânica e o cateter venoso central, e ao alto consumo de antimicrobianos (CORNEJO-JUÁREZ et al., 2015; ACUÑA et al., 2017; ZIÓŁKOWSKI et al., 2018).

O surgimento de bactérias multirresistentes no ambiente hospitalar se dá por diversas maneiras, dentre as quais destacam-se a admissão de pacientes previamente colonizados por tais cepas, mutações ou aquisição de múltiplos genes de resistência por microrganismos patogênicos ou ainda a indução da expressão de genes que já estavam presentes em cepas aparentemente sensíveis (FILIUS et al., 2005). Embora a resistência bacteriana seja um processo evolutivo natural, o uso indevido e excessivo de antibióticos está acelerando o desenvolvimento destas cepas (WHO, 2015).

As infecções causadas por microrganismos multirresistentes estão associadas às elevadas taxas de mortalidade e morbidade e ao aumento nos custos hospitalares devido à falta de opções terapêuticas e à permanência prolongada do paciente no ambiente hospitalar (WILSON et al., 2016; ANVISA, 2017). O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estima que, nos Estados Unidos da América (EUA), mais de 2 milhões de pessoas por ano são infectadas por bactérias multirresistentes, com 23.000 mortes associadas e custos decorrentes com cuidados de saúde aproximando-se dos 20 bilhões de dólares (CDC, 2013). Por sua vez, na Europa foram estimados 386.000 casos de infecção e 25.000 mortes ao ano por tais microrganismos (COLOMB-COTINAT et al., 2016).

*Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, enterobactérias produtoras de carbapenemases e  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ESBL), *Enterococcus* spp. resistentes à vancomicina (VRE) e *Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina (MRSA) são considerados os principais microrganismos multirresistentes nos serviços de saúde no Brasil (ANVISA, 2015).

Os bacilos Gram-negativos (BGN) são considerados o grupo de bactérias com maior número de causadores de infecções relacionadas à assistência à saúde



(IRAS), incluindo a maioria dos casos de pneumonias e infecções do trato urinário adquiridas no ambiente hospitalar, assim como 25 a 30% das infecções sanguíneas e de sítios cirúrgicos (MEHRAD et al., 2015).

Os antibióticos pertencentes à classe dos carbapenêmicos estão entre os medicamentos considerados de última escolha para o tratamento de IRAS causadas por BGN (MELETIS et al., 2016). Cepas produtoras de carbapenemases, enzimas que hidrolisam os antibióticos carbapenêmicos, eram consideradas casos isolados e raros; entretanto, nos dias atuais, estas cepas estão distribuídas por todo o mundo, tornando-se um grande desafio para a área da saúde (SEKIROV et al., 2016). Em abril de 2016, o *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) publicou dados referentes às infecções por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos nos diversos países da Europa, comprovando alta endemicidade na Itália, Grécia e Turquia. Nordmann e Poirel (2014) relataram a distribuição mundial de cepas produtoras de carbapenemases, destacando-se como principais reservatórios de algumas destas enzimas: a Índia subcontinental para *New Delhi metallo-β-lactamase* (NDM), os EUA, Israel, Grécia e Itália para *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), e a Turquia e norte da África para OXA-48.

No Brasil, desde a detecção da primeira metalo β-lactamase (MβL) identificada em *P. aeruginosa* em 2002, diversos estudos vêm reportando a presença de carbapenemases adquiridas em BGN (PELLEGRINO et al., 2002). Lincopan e colaboradores (2005) relataram o primeiro caso de MβL em *K. pneumoniae* no Brasil e, mais recentemente, Nicoletti e colaboradores (2015) reportaram a presença de uma nova carbapenemase - BKC-1 (*Brazilian Klebsiella carbapenemase* - 1) em cepas de *K. pneumoniae* isoladas de amostras clínicas de hospitais de São Paulo.

A rápida disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases tem preocupado diversos órgãos de saúde mundial, que descrevem uma crise global e o risco do retorno à era pré-antibiótica, principalmente pela restrita opção terapêutica para infecções graves causadas por estas cepas, que usualmente consiste na utilização da tigeciclina e polimixinas (SEIBERT et al., 2014; LIU et al., 2016)

No entanto, em novembro de 2015, um grupo de pesquisadores chineses publicou o primeiro relato de resistência à polimixina codificada por um gene plasmidial, denominado *mcr-1* (*mobile colistine resistance*), em isolado clínico humano (LIU et al., 2016). Desde então, pesquisadores em diversos países, como

EUA, Itália, África do Sul e Portugal, publicaram artigos apontando a presença do gene *mcr-1* em isolados de alimentos, animais e amostras clínicas (VASQUEZ et al., 2016; PRINCIPE et al., 2018; NEWTON-FOOT et al., 2017; MENDES et al., 2018). No Brasil, a presença deste gene em isolados clínicos humanos já foi detectada nas regiões Sul (ROSSI et al., 2017; PILONETTO et al., 2018; DALMOLIN et al., 2018), Sudeste (CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; AIRES et al., 2017) e Nordeste (FERNANDES et al., 2016).

A rápida disseminação de bactérias multirresistentes, principalmente as produtoras de carbapenemases e, mais recentemente, as portadoras do gene *mcr-1*, é considerado problema de extrema importância, sendo necessárias ações urgentes que incluam melhor adesão ao controle das IRAS e ao uso criterioso de antimicrobianos em humanos e animais (SAMPAIO e GALES, 2016; PINTO et al., 2018). Neste contexto, o estudo dos determinantes moleculares de resistência aos antimicrobianos pode constituir uma ferramenta importante para o controle e prevenção de infecções, contribuindo também para o entendimento da epidemiologia das IRAS (BRAUN et al., 2014).

Mediante o exposto, objetivou-se investigar marcadores genotípicos em BGN resistentes aos carbapenêmicos, isolados de amostras clínicas, como uma ferramenta de vigilância epidemiológica, visando à compreensão do panorama local e auxílio ao controle da disseminação da multirresistência. Para tanto, aplicou-se este estudo em um hospital privado de médio porte localizado na cidade mais populosa do estado, Joinville, SC.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar a ocorrência dos principais genes codificadores de resistência aos carbapenêmicos em bacilos gram-negativos isolados de pacientes no ambiente hospitalar.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil de sensibilidade aos antibióticos de isolados clínicos correspondentes a bacilos gram-negativos resistentes aos antibióticos carbapenêmicos.

- Verificar a presença dos genes codificadores de metalo  $\beta$ -lactamases, serina  $\beta$ -lactamases (KPC e oxacilinases) e do gene *mcr-1* nos isolados clínicos investigados.

- Comparar os perfis fenotípico e genotípico dos bacilos gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos.

- Determinar os sítios de infecção frequentemente associados aos isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos.

- Analisar a evolução temporal e a distribuição setorial dos isolados clínicos resistente aos carbapenêmicos.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA A SAÚDE

O Ministério da Saúde (MS), na Portaria nº 2.616 de 12/05/1998, define Infecção Hospitalar como infecções adquiridas após 48 h à admissão do paciente na unidade hospitalar e que se manifestam durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998). Oliveira e colaboradores (2012) definem “Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) como toda e qualquer infecção adquirida por um indivíduo seja em instituições hospitalares, atendimentos ambulatoriais na modalidade de hospital dia ou domiciliar, e que possa estar associada a algum procedimento assistencial, seja ele terapêutico ou diagnóstico.

O surgimento de processos infecciosos em decorrência da assistência à saúde se deu ao longo do século XX em consequência do desenvolvimento de manobras médicas invasivas e do uso de terapias imunossupressoras. Estas infecções eram anteriormente designadas como “infecções hospitalares”, porém esta designação dava um sentido restrito ao real significado e, portanto, este termo foi atualmente substituído por IRAS (PADOVEZE e FORTALEZA, 2014).

As IRAS estão associadas ao aumento nos custos do tratamento do paciente, aumento no tempo de internação dos indivíduos hospitalizados refletindo ao aumento da morbidade e mortalidade dos pacientes submetidos a procedimentos clínicos, o que representa um risco significativo à saúde dos usuários dos serviços de saúde (AL-TAWFIQ e TAMBYAH, 2014; SOUZA et al., 2015;).

Pacientes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são considerados os indivíduos mais vulneráveis a aquisição destas infecções, pois além de apresentarem uma condição crítica de saúde, estão sujeitos ao uso de procedimentos invasivos (cateteres venosos centrais, sondas vesicais de demora, ventilação mecânica), imunossupressores, período de internação prolongado, colonização por microrganismos multirresistentes e uso de antimicrobianos de amplo espectro. Concomitantemente, estes fatores favorecem a seleção natural de microrganismos levando a colonização e/ou infecção por cepas multirresistentes (OLIVEIRA et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2010).

A rápida disseminação e o surgimento dos microrganismos multirresistentes, tem se tornado um grande desafio visto as implicações que poderão ocorrer à longo prazo para a saúde pública global. Desta forma, a responsabilidade pelo controle destas cepas deve ser realizada de maneira conjunta da população dentro e fora do ambiente hospitalar (MATHUR e SINGH, 2013).

Segundo Svaldi e SiqueiraA (2010), o hospital é o local onde os profissionais das diversas áreas da saúde trabalham em prol da população de forma individual ou coletiva através de serviços e ações que contribuem para a promoção, prevenção e recuperação da saúde.

No entanto, o ambiente hospitalar também está associado à seleção e disseminação de microrganismos multirresistentes devido aos fatores já mencionados, mas principalmente ao uso incorreto dos antimicrobianos e por reunir pessoas com diferentes vulnerabilidades à infecção tornando-se um habitat favorável ao surgimento destas cepas (JACOBS e ALVES, 2014).

As UTIs compreendem as maiores taxas destes patógenos, devido à gravidade e instabilidade do quadro clínico do paciente com necessidade de cuidados intensivos, além de fatores como limpeza, desinfecção, estrutura física, quantidades de equipamentos e superfícies em determinadas unidades (GASPAR, BUSATO e SEVERO, 2012). O ambiente ocupado por pacientes colonizados e/ou infectados pode tornar-se contaminado e os microrganismos, disseminados por contaminação cruzada apresentando como principal via a transferência dos patógenos entre as mãos dos profissionais de saúde e pacientes (OLIVEIRA e DAMASCENO, 2010; GOMES et al.,2014).

### 3.2. EPIDEMIOLOGIA DAS IRAS

Segundo a *World Health Organization* (WHO, 2005-2006), as IRAS atingem cerca de 30% dos pacientes nas UTIs, e a mortalidade atribuível pode chegar a 44%. Na Europa estima-se que 4.100.000 de indivíduos adquirem IRAS por ano nos serviços de saúde com 110.000 mortes/ ano associadas direta ou indiretamente a estas infecções. (ECDC, 2016) Em 2014, foram publicados resultados do projeto de pesquisa americano denominado HAI (*Healthcare-Associated Infections*) o qual demonstrou a prevalência de IRAS nos Estados Unidos da América. Esta pesquisa

apontou 722.000 casos de IRAS com 75.000 mortes associadas, nos hospitais de cuidados intensivos norte-americanos em 2011 (MAGILL et al., 2014).

No Brasil, a partir do ano de 2010 a notificação de indicadores de infecção de corrente sanguínea (IPCS) em pacientes sob uso de cateter venoso central (CVC) tornou-se obrigatória em todos os estabelecimentos de saúde com ao menos 10 leitos de UTI; em janeiro de 2014, além da obrigatoriedade da notificação destas infecções para todos os serviços de saúde independentemente do número de leitos de UTI, os marcadores de resistência microbiana associados a estas infecções e a notificação das infecções de sítio cirúrgico (ISC) também tornaram-se obrigatórias (ANVISA, 2014). A partir de novembro de 2016, o Programa Nacional de Prevenção de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (PNPCIRAS) incluiu ainda os indicadores de Pneumonia Associada à Ventilação Mecânica (PAV) e de Infecção do Trato Urinário (ITU) associadas à sonda vesical de demora (ANVISA, 2016).

Em decorrência do PNPCIRAS, os dados referentes às IRAS podem ser verificados no Boletim de Segurança do Paciente e Qualidade de Serviços em Saúde, sendo o mais recentemente publicado em dezembro de 2017, em que é apresentado um aumento de 120% na taxa de adesão dos hospitais quanto à notificação de IRAS entre os anos de 2011 e 2016 e uma redução geral na densidade de incidência das IRAS neste mesmo período (ANVISA, 2017).

### 3.3. AQUISIÇÃO DE MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES NO AMBIENTE HOSPITALAR

A transmissão das infecções nas instituições de saúde se dá através de três elementos: local onde o microrganismo habita, metaboliza e se reproduz chamado de reservatório; via de transmissão, ou seja, o meio pelo qual o agente infeccioso é transportado até o hospedeiro; as condições imunológicas do paciente quando exposto ao agente infeccioso (CDC, 2017).

Os patógenos implicados nas infecções hospitalares são transmitidos ao indivíduo tanto via endógena, ou seja, pela própria microbiota do paciente quanto pela via exógena a qual inclui veículos como mãos, secreção salivar, fluidos corpóreos, ar e materiais contaminados, como, equipamentos e instrumentos utilizados em procedimentos médicos invasivos que ultrapassam as barreiras de

defesa natural do corpo humano (GARCIA et al., 2013). As mãos dos profissionais de saúde constituem a principal rota na transmissão exógena de microrganismos multirresistentes entre pacientes colonizados e pacientes que anteriormente não apresentavam estes microrganismos (ANVISA, 2014).

Alguns indivíduos podem estabelecer uma relação comensal, ou seja, sem manifestação clínica de infecção, deste modo atuando como carreadores do microrganismo, e outros ainda podem desenvolver a manifestação clínica. Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a diversos microrganismos patogênicos e principalmente ao uso de antibióticos potentes e de amplo espectro (MARTINS et al., 2013). Como forma de adaptação natural, estas bactérias desenvolvem resistência aos antimicrobianos e uso indiscriminado destes medicamentos gera pressão seletiva induzindo o aumento da resistência bacteriana tanto em bactérias patogênicas quanto em bactérias endógenas comensais (MARTINS et al., 2013; GARCIA et al., 2013).

O uso de antibióticos é o fator mais importante associado à resistência bacteriana em todo o mundo, entretanto é necessário ressaltar que estes medicamentos são também comumente utilizados em ração animal para prevenir, controlar e tratar doenças, e para promover o crescimento de animais para o consumo humano impactando diretamente a saúde humana (figura 1) (CDC, 2013).

Tendo em vista a ameaça crescente à saúde humana e o impacto econômico gerado pelos microrganismos multirresistentes, a WHO percebeu a necessidade da realização de ações visando o controle destes microrganismos, entre elas a organização de uma comissão tripartida envolvendo a *Food and Agriculture Organization* (FAO), *World Organization for Animal Health* (OIE) e a WHO foi realizada definindo a multirresistência como uma questão prioritária a ser abordada quanto ao impacto global do uso de antimicrobianos na saúde humana, animal e ao ecossistema (WHO, 2017). Este conceito que visa à comunicação de diversos setores para projetar e implementar programas, políticas, legislação e pesquisa com o intuito de melhorar a saúde pública mundial é atualmente designado “*One Health*” (WHO, 2017).

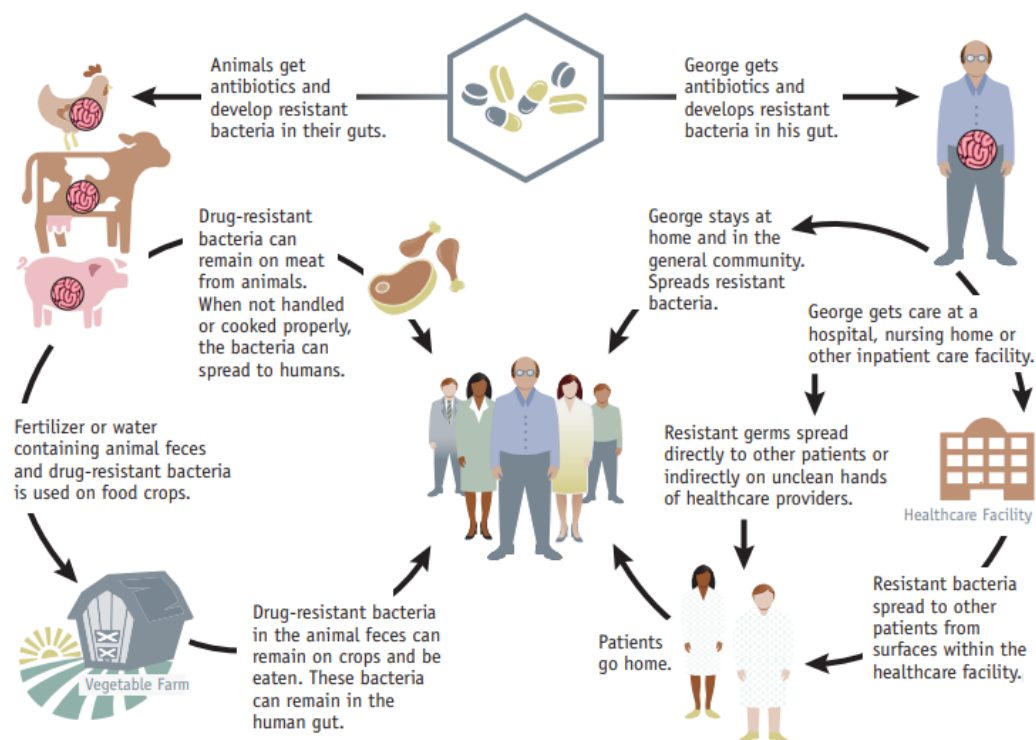


Figura 1. Representação esquemática da interação dos diversos ambientes na disseminação dos microrganismos multirresistentes (CDC, 2013).

### 3.4. OS BACILOS GRAM-NEGATIVOS

#### 3.4.1. Enterobactérias

Estas bactérias representam o maior e mais heterogêneo grupo de bacilos gram-negativos. São microrganismos ubíquos na natureza principalmente no solo, água e vegetação. São também encontrados como parte da microbiota gastrointestinal de seres humanos (MURRAY, ROSENTHAL e PFALLER, 2014).

Estes organismos frequentemente causam infecções adquiridas na comunidade e também são comumente isoladas em pacientes hospitalizados como agentes causadores de IRAS. Nas últimas décadas um aumento na frequência de enterobactérias multirresistentes vem sendo observado com predomínio de cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases (JACOB et al., 2013). As  $\beta$ -lactamases de maior importância para este grupo são as  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e as



carbapenemases. Estas enzimas são predominantes nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (SEIBERT et al., 2014).

#### 3.4.2. Bacilos Gram-negativos não fermentadores

Os bacilos Gram-negativos não fermentadores constituem um grupo extremamente diverso de bactérias e amplamente distribuídos na natureza, principalmente no solo e na água. Podem também ser encontrados colonizando o trato gastrointestinal de indivíduos hospitalizados principalmente na UTI (CHERKAOUI et al., 2015). Caracterizam-se por serem estritamente aeróbios, não produtores de esporos, necessidades nutricionais mínimas, tolerância às variações das condições físicas e incapacidade de utilizar carboidratos como fonte de energia através do metabolismo fermentativo, degradando-os por via oxidativa. São também capazes de desenvolver resistência aos antimicrobianos e aos mecanismos de defesa do hospedeiro (DELIBERALI et al., 2011; KAASE et al., 2012).

São intrinsecamente resistentes a muitos antibióticos e capazes de produzir  $\beta$ -lactamases de amplo espectro e metalo  $\beta$ -lactamases além de adquirir facilmente novos mecanismos de resistência (MALINI et al., 2009). Raramente causam infecções comunitárias, porém desde a década de 1970 estas bactérias vêm se destacando no ambiente hospitalar representando aproximadamente 15% das IRAS causadas por BGN. No ambiente hospitalar podem ser isolados em diversas superfícies como ventiladores mecânicos, colchões e até mesmo na pele dos profissionais de saúde (DIJKSHOORN, NEMEC e SEIFERT, 2007).

As principais espécies de importância médica são a *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp., *Stenotrophomonas maltophilia* e complexo *Burkholderia cepacia*. (DELIBERALI et al., 2011; BHARGAVA, KAR e SAHA, 2015). As espécies de *Acinetobacter* spp. multirresistentes vêm representando patógenos emergentes nos ambientes hospitalares, em especial nas UTIs, destacando-se a espécie *A. baumannii* (MARTINS e BARTH, 2013).

#### 3.5. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS

Diversos mecanismos são responsáveis pela resistência aos carbapenêmicos entre os bacilos Gram-negativos como a diminuição da permeabilidade da membrana externa (perda ou alterações na estrutura de porinas), alteração do sítio de ligação aos antibióticos, atividade de bombas de efluxo (diminuem a concentração do antibiótico no interior da bactéria) e por ação enzimática como as carbapenemases (KARAM et al., 2016).

Estes mecanismos não são determinados somente por mutações cromossômicas, mas também pela aquisição de genes transferíveis entre diferentes espécies bacterianas; o mecanismo de resistência mais importante nos bacilos Gram-negativos é a produção de  $\beta$ -lactamases destacando-se as carbapenemases (GOMEZ et al., 2014).

### 3.5.1. As carbapenemases

Carbapenemases são enzimas pertencentes às  $\beta$ -lactamases com capacidade de hidrolisar antibióticos carbapenêmicos e à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (NORDMANN e POIREL, 2014). Além disso, cepas produtoras de carbapenemases estão associadas à resistência a outras classes de antimicrobianos devido à localização dos genes codificadores em estruturas móveis (íntegrans, transposons e plasmídeos), em sua grande maioria, facilmente transferíveis a outras espécies bacterianas previamente resistentes a outras classes de antibióticos, dando origem a isolados multirresistentes e pan-resistentes (NORDMANN, POIREL e DORTET, 2012).

São classificadas por Ambler de acordo com a homologia de aminoácidos em 3 classes: A (KPC), B (metalo  $\beta$ -lactamases - M $\beta$ L) e D (oxacilinas) (AMBLER, 1980). Por sua vez, Bush e Jacoby (2010) baseiam-se no substrato alvo, no perfil de inibição destas enzimas e na expressão fenotípica dos isolados clínicos, dividindo-as em 4 grupos (2f, 2df, 3a, 3b): 2f possui alto potencial hidrolítico aos carbapenêmicos, oximino  $\beta$ -lactâmicos e cefamicinas (KPC-2, IMI-1, SME-1); 2df hidrolisam a oxacilina e carbapenêmicos (OXA-23, OXA-48); 3a amplo espectro hidrolítico incluindo os carbapenêmicos, porém não inativam os monobactâmicos (IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1) e 3b promove hidrólise preferencial dos carbapenêmicos (CphA, SFh-1).

As carbapenemases pertencentes às classes A e D de Ambler têm como principal característica a presença de um grupamento serina no sítio ativo, as de classe A podem ser codificadas por gene cromossomal como a SME (*Serratia marcescens* enzyme), IMI-1 (*Imipenem-hydrolysing  $\beta$ -lactamase*), SFC-1 (*Serratia fonticola* carbapenemase-1); ou plasmidial como a KPC (KPC-2 a KPC-13), IMI (IMI-1 a IMI-3), derivados da GES (*Guiana extended spectrum*) como GES-2, -4, -5, -6, -14, -14, -15, -16 -18, -20, e -24, mas todas tem a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos, são parcialmente inibidos pelo ácido clavulânico e inativados pelo ácido fenilborônico (CODJOE e DONKOR, 2018; BONNIN et al., 2017).

Cepas produtoras de carbapenemases apresentam um dos padrões de resistência mais preocupantes encontrados na UTI devido à resistência apresentada por estes organismos aos antibióticos de última escolha para bacilos gram-negativos (KARAM et al., 2016). A emergência de BGN produtores destas enzimas representa um sério problema de saúde pública em todo o mundo, em especial o aumento na prevalência de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases (KPC) e carbapenemase do tipo oxacilinase 48 (OXA-48) (LEE et al., 2016).

As carbapenemases mais frequentes em enterobactérias são as M $\beta$ L, dentre as quais destacam-se Verona integron–encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM), imipenemase (IMP) e New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM); e as serino carbapenemases como a KPC e a oxacilinase 48 (OXA-48) (ATAIDE e ABADE, 2015). Em BGN não fermentadores destacam-se as serina carbapenemases (OXA-23, OXA-24, OXA-25, OXA-26 e OXA 27) e as M $\beta$ L (IMP, VIM, NDM-1) (NORDMANN e POIREL, 2002).

#### 3.5.1.1. Metallo $\beta$ -lactamases

As M $\beta$ L são caracterizadas por terem como cofator enzimático o zinco, hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos com exceção dos monobactâmicos e não são inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases como o ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, entretanto são inativadas pelo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (PALZKILL, 2012). São mais frequentemente detectadas em isolados de *P. aeruginosa*, *A. baumannii* e *K. pneumoniae* ao redor do mundo estando associadas às IRAS e a altas taxas de mortalidade e morbidade (MALLATI e RAMAIAH, 2018).

São divididos em 4 subgrupos (B1, B2, B3 e B4) de acordo com a homologia sequencial dos aminoácidos e embora todos os subgrupos necessitem de íons metálicos para a sua atividade catalítica, o número destes íons pode variar (JIANG et al., 2018). Essas enzimas podem ser produzidas intrinsecamente por algumas bactérias tais quais *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas* sp e *Elizabethkingia meningosepticum* (*Chryseobacterium meningosepticum*) *Serratia fonticola* ou ainda adquiridas (MOJICA et al., 2016).

O mecanismo de ação das metalo  $\beta$ -betalactamases aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos consiste na quebra da ligação amida presente no anel  $\beta$ -lactâmico com o auxílio de um ou dois cátions divalentes de zinco ( $Zn^{2+}$ ) os quais coordenam moléculas de água que servem como nucleófilos reativos rompendo o anel e consequentemente inativando o antibiótico (figura 2) (SACHA, 2008).

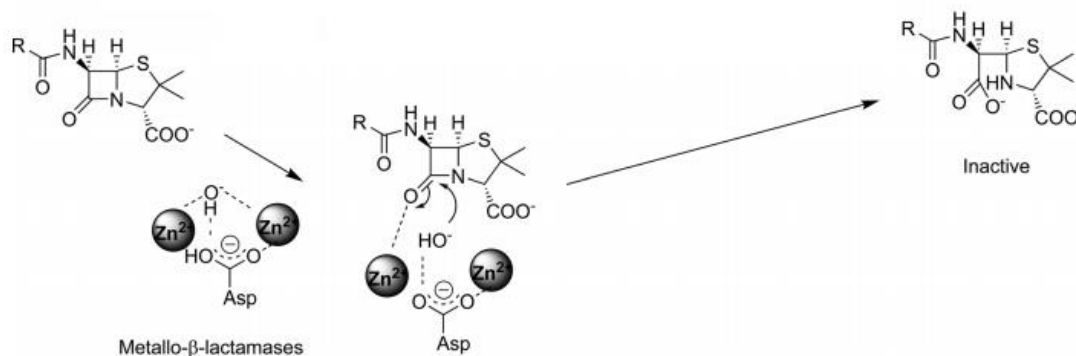


Figura 2. Mecanismo de hidrólise do antibiótico  $\beta$ -lactâmico pela ação da metalo  $\beta$ -lactamase (WRIGTH, 2011).

### 3.5.1.1.1. Imipenemase (IMP)

Inicialmente detectada no Japão em 1988 em isolado de *P. aeruginosa*, posteriormente esta enzima foi detectada em diversas espécies de BGN sugerindo a sua transferência horizontal, além da predominância de isolados produtores de IMP tipo-específicos demonstrando uma expansão clonal ((WATANABE, 1991; HONG et al., 2015). A caracterização molecular demonstrou que o gene *bla*<sub>IMP-1</sub> está integrado

como um cassete gênico em um íntegron de classe 1 pertencente a um plasmídeo conjugativo (SHAKIBAIE et al., 2017).

Atualmente são conhecidas 51 variantes, sendo 33 identificadas em *P. aeruginosa*, e estão divididas em grupos em que o percentual de similaridade dos aminoácidos varia entre 90 a 99%, com atividades hidrolíticas muito semelhantes entre si (HONG et al., 2015).

#### 3.5.1.1.2. Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase (VIM)

Em 1999, Laurette e colaboradores detectaram pela primeira vez esta enzima em uma cepa de *P. aeruginosa* resistente aos antibióticos carbapenêmicos isolada em amostra clínica de um paciente internado na UTI do Hospital Universitário de Verona a qual foi associada a um surto hospitalar (LAURETTE et al., 1999). Trata-se de uma enzima zinco dependente codificada por um gene móvel inserido em um cassete gênico, a qual é inibida pelo EDTA, um agente quelante (POIREL et al., 2000).

Apresenta uma ampla especificidade de substrato incluindo os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos, com notável atividade hidrolítica na carbenicilina, temocilina, à maioria das cefalosporinas e aos carbapenêmicos e menor atividade à penicilina G, ampicilina, oximino-cefalosporinas (cefotaxima e ceftazidima) e ceftaxitina (FRANCESCHINI et al., 2000).

A família VIM, é considerada o maior grupo dentro do subgrupo B1 das M $\beta$ L constituindo atualmente 46 variantes as quais já foram identificadas em BGN não fermentadores e em enterobactérias com maior frequência na Europa, região em que foi originalmente encontrada (MAKENA et al., 2016; GONÇALVES et al., 2017). É identificada mais frequentemente em *P. aeruginosa* e *P. putida* e raramente nas enterobactérias (CODJOE e DONKOR, 2018).

#### 3.5.1.1.3. New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)

Descrita pela primeira vez na Índia em 2009 em isolado de *K. pneumoniae* oriunda de amostra urinária; é considerada a M $\beta$ L mais comum caracterizando-se

pela alta afinidade hidrolítica às cefalosporinas em particular à cefuroxima, cefotaxima e cefalotina e também às penicilinas (YONG et al., 2009).

Inicialmente esta enzima foi detectada na Índia, Paquistão e Bangladesh em enterobactérias, e posteriormente nos BGN não fermentadores (*Pseudomonas spp* e *Acinetobacter spp.*) e no decorrer dos anos foi disseminando-se para diversas regiões como Europa, EUA, Canadá, Japão, Austrália e Brasil (KUMARASAMY et al., 2010; JOHNSON e WOODFORD., 2013). A maior prevalência ocorre em *E. coli* e *K. pneumoniae* principalmente na região subcontinental da Índia e centro-sul asiático (BUSHNELL et al., 2013).

No Brasil, o primeiro reporte de NDM-1 ocorreu em 2013 na cidade Porto Alegre - Rio Grande do Sul em isolado de *Providencia rettgeri* derivado de fragmento tecidual de pé diabético (CARVALHO-ASSEF et al., 2013). Desde então outros estudos foram realizados no país descrevendo esta carbapenemase não somente em enterobactérias, mas também em BGN não fermentador como o *A. baumannii* isolado de um paciente internado em um hospital de Tubarão - Santa Catarina (SCHUELTER-TREVISOL et al., 2016; BARBERINO et al., 2017).

#### 3.5.1.1.4. São Paulo Metalo $\beta$ -lactamase (SPM)

Descrita pela primeira vez por Toleman e colaboradores (2002) em isolado de *P. aeruginosa* de paciente hospitalizado em São Paulo; caracteriza-se por ser uma M $\beta$ L adquirida com atividade hidrolítica às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos (TOLEMAN et al., 2002). A mobilidade do gene *bla*<sub>SPM-1</sub> foi inicialmente associada a plasmídio entretanto, estudos mais detalhados verificaram a localização cromossomal deste gene (SALABI et al., 2010).

Posteriormente Gales e colaboradores (2003) realizaram um estudo multicêntrico em que detectou a presença desta enzima em cinco estados brasileiros (Paraná, São Paulo, Bahia, Ceará, Distrito Federal).

Durante alguns anos a SPM-1 foi considerada restrita ao Brasil, entretanto estudos como o de Salabi e colaboradores (2010) e Hopkins e colaboradores (2016) reportaram esta enzima na Europa e Reino Unido, respectivamente.

O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, não foi detectado em outras espécies até o momento (ROSSI, 2011).

### 3.5.1.1.5. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)

Pertencente à classe A de Ambler representa a enzima mais importante deste grupo devido a sua disseminação global e amplo espectro de substratos incluído a maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos os carbapenêmicos, cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam (YIGIT et al., 2008; PITOUT et al., 2015).

Trata-se de uma serino  $\beta$ -lactamase que se caracteriza pela presença de uma serina como cofator enzimático; esta serina é um alfa aminoácido apolar que contém um grupo hidroxila ( $\text{OH}^-$ ) lateral (GHUYSEN, 1991). O mecanismo de ação das serino  $\beta$ -lactamases consiste em uma associação inicial não covalente da enzima ao antibiótico para produzir o complexo de Michaelis (não covalente), posteriormente o anel  $\beta$ -lactâmico sofre a ação do grupo hidroxilo livre presente na serina, produzindo um éster acílico covalente que, quando hidrolisado, a enzima é ativada e o fármaco inativado (figura 3) (GHUYSEN, 1991; LIVERMOORE, 1995).

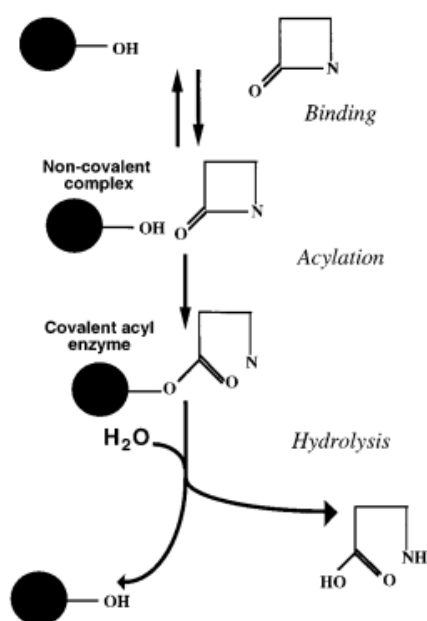


Figura 3. Mecanismo de ação das serino  $\beta$ -lactamases (LIVERMOORE, 1985).

Foi descrita pela primeira vez nos EUA em 2001 por Yigit e colaboradores em isolado de *K. pneumoniae* a qual inicialmente foi considerada produtora de KPC-1; porém, um erro no sequenciamento de uma única base no gene que codificava esta enzima foi detectado e, em 2008, foi reclassificada como KPC-2 (YIGIT et al., 2008). Posteriormente, outras variantes foram detectadas e até o momento totalizam 23, as quais estão presentes em sua maioria nas enterobactérias e duas delas em BGN não fermentadores como *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (YOON et al., 2018).

Em algumas regiões do mundo, como América do Norte (algumas regiões dos EUA), América Latina (Colômbia, Brasil e Argentina), Europa (Grécia e Itália), Oriente Médio (Israel) e Ásia (algumas regiões de China), a disseminação de KPC tornou-se endêmica (ALBIGER et al., 2015; PITOUT et al., 2015). No Brasil, em 2009 foi reportado o primeiro caso em isolado de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 em paciente internado em uma UTI de um hospital terciário de Recife - Pernambuco (MONTEIRO et al., 2009).

#### 3.5.1.1.6. Oxacilinases

As oxacilinases são enzimas pertencentes à classe D de Ambler mais frequentemente produzidas por BGN não fermentadores e assim como as carbapenemases de classe A também são serino-carbapenemases; inativam principalmente os carbapenêmicos e algumas cefalosporinas, como cefepime, no entanto, não há ação hidrolítica para a ceftazidima (MEDEIROS e LINCOPAN, 2013). As oxacilinases são as carbapenemases mais comuns em *A. baumannii* e representam um dos principais mecanismos de resistência aos carbapenêmicos nestas bactérias. Entretanto, também são encontradas em *Pseudomonas* spp., enquanto a OXA-48 é raramente detectada em enterobactérias no Brasil (SAMPAIO e GALES, 2015; CODJOE e DONKOR, 2017).

Atualmente, em *Acinetobacter* spp., as  $\beta$ -lactamases de classe D com atividade de carbapenemases são divididas em seis subfamílias mais frequentemente identificadas: OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-58-like, OXA-143-like, OXA-235-like e OXA-51-like sendo esta última intrínseca à espécie *A. baumannii* (RODRIGUEZ et al., 2017). A primeira oxacilinase capaz de hidrolisar imipenem foi detectada em



1985 na Escócia por Paton e colaboradores em isolamento de *A. baumannii* oriunda de hemocultura, apresentando resistência ao imipenem, à todas as cefalosporinas e às penicilinas. A partir deste achado a emergência e disseminação das oxacilinas vem sendo bem documentada por todo o mundo como os estudos realizados na Europa, EUA, América Latina e Ásia (NORDMANN et al., 2011; LOLANS et al., 2006; LABARCA et al., 2016; WANG et al., 2007). A OXA-23 é a mais prevalente no mundo e no Brasil o primeiro relato da presença do gene *bla*<sub>OXA-23-like</sub> foi em 1999 na cidade de Curitiba – PR em isolamento de *A. baumannii* (DALLA COSTA et al., 2003; WANG et al., 2015).

### 3.6. MECANISMO DE RESISTÊNCIA À POLIMIXINA, GENE *mcr-1*.

Descrito pela primeira vez por Liu e colaboradores (2016) durante um estudo de vigilância sobre a resistência bacteriana em isolados de *E. coli* comensais derivados de animais destinados ao consumo humano (LIU et al., 2016). Este gene plasmidial designado *mobile colistin resistance (mcr-1)* codifica uma fosfoetanolamina transferase capaz de transferir uma fosfoetanolamina catiônica ao grupamento fosfato do lipídio A presente na parede celular bacteriana impedindo a interação das polimixinas (MACNAIR et al., 2018).

Isolados bacterianos resistentes às polimixinas já haviam sido reportados, porém envolvendo mutações cromossômicas sem a transferência horizontal de genes de resistência às polimixinas (CHENG et al., 2010; LIU et al., 2016).

A presença do gene *mcr-1* vem sendo detectada em diversos países em todo o mundo: Europa, Américas, Norte da África e Ásia, em amostras do meio ambiente, animais, alimentos e em amostras clínicas humanas (IRRGANG et al., 2016). No Brasil, até o momento, 32 isolados portadores do gene *mcr-1* foram reportados; no Espírito Santo em isolamento de *K. pneumoniae* (n=1), Rio Grande do Norte em *E. coli* (n=1), Rio de Janeiro em *E. coli* (n=2), Rio Grande do Sul em *K. pneumoniae* (n=1), São Paulo em isolamento de *E. coli* (n=1) e mais recentemente no Paraná 26 isolados de *E. coli* entre os quais a maioria sensível à polimixina (AIRES et al., 2017; FERNANDES et al., 2016; ROSSI et al., 2017; CONCEIÇÃO-NETO et al., 2017; DALMOLIN et al., 2018; PILLONETTO et al., 2018).

## **4. METODOLOGIA**

### **4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO**

Trata-se de um estudo transversal, descritivo e experimental destinado, à investigação molecular de BGN resistentes aos carbapenêmicos isolados de amostras clínicas de pacientes em internação hospitalar.

### **4.2. PERÍODO E LOCAIS DA PESQUISA**

O estudo foi desenvolvido no Hospital Dona Helena (HDH), hospital geral privado com 189 leitos, e no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), localizados na cidade de Joinville, SC. Foram considerados os isolados clínicos pertencentes ao grupo dos BGN resistentes a pelo menos um carbapenêmico identificados por 9 anos consecutivos a parti de março de 2009 durante a avaliação microbiológica assistencial rotineira realizada pelo Laboratório de Análises Clínicas do HDH.

### **4.3. CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO**

#### **4.3.1. Critérios de inclusão**

Foram incluídos BGN resistentes a pelo menos um antibiótico carbapenêmico (meropenem/ imipenem/ ertapenem), isolados e identificados a partir de amostras clínicas de pacientes internados e atendidos em ambulatórios do HDH.

#### **4.3.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os isolados correspondentes à mesma espécie bacteriana provenientes do mesmo paciente e período de internação dispondo perfil fenotípico idêntico. As cepas mantidas congeladas que apresentaram falha na reativação com fins de propiciar a subsequente extração do DNA genômico ou que apresentaram sinais de contaminação foram excluídas do estudo. Adicionalmente,

um isolado foi excluído devido a não correspondência entre as codificações empregadas no HDH e na UNIVILLE.

#### 4.4. IDENTIFICAÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS

As amostras clínicas foram submetidas aos procedimentos rotineiros para a identificação do microrganismo correspondente a cada isolado empregando-se o sistema automatizado “Microscan Walkaway” (Siemens, Munique, Alemanha), conforme instruções do fabricante, paralelamente à realização da bacterioscopia pelo Gram.

Após realizada a identificação, os isolados foram cultivados em placas de Petri contendo o meio de cultura Ágar MacConkey (Kasvi, Roseto Degli Abruzzi, Itália), sob incubação a 37°C, por 24 horas, e analisados macro e microscopicamente. Em seguida, foram repicados em ágar Mueller Hinton (Kasvi) sob incubação a 37°C, por 24 horas. Colônias crescidas neste meio de cultura foram transferidas para tubos criogênicos de 2 mL contendo seis miçangas de vidro estéreis e meio próprio para congelamento a -80°C, contendo 6% de glicerol, 37 g.L<sup>-1</sup> de caldo BHI (*Brain Heart Infusion*, Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha) e 0,6 g.L<sup>-1</sup> de ágar (Himedia, Mumbai, Índia). Antes do congelamento para conservação a longo prazo, os isolados foram inicialmente incubados a 37°C durante 48 horas, seguido de manutenção sob resfriamento a -20°C por 24 horas.

#### 4.5. AVALIAÇÃO DO PERFIL DE SENSIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

##### 4.5.1. Métodos fenotípicos

A determinação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão em ágar (“Kirby e Bauer”). Foram utilizados os discos contendo antimicrobianos (de acordo com o microrganismo analisado) nas seguintes quantidades indicadas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de cada ano vigente (Documentos M100S-19 à M100S-25): ácido nalidíxico (30 µg), amicacina (30 µg), ampicilina (10 µg), ampicilina/sulbactam (10/10 µg), aztreonam (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), cefalotina (30 µg),

cefoxitina (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), colistina (10 µg), ceftriaxona (30 µg), doxaciiclina (30 µg), ertapenem (10 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), levofloxacina (5 µg), meropenem (10 µg), nitrofurantoína (300 µg), norfloxacino (10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10 µg), polimixina B (300 UI), tigeciclina (15 µg), tobramicina (10 µg) e trimetoprima/sulfametoxazol (1,25/23,75 µg). Todos os discos utilizados foram provenientes do mesmo fabricante (Oxoid, Cambridge, Inglaterra).

Preparou-se uma suspensão bacteriana (inóculo) a partir da seleção de colônias isoladas de cultura em ágar MacConkey com crescimento prévio de 18 a 24 horas que então foi comparada com turvação padrão 0,5 na escala de McFarland (DensiCHECK Plus – BioMérieux, Rio de Janeiro, Brasil). A seguir, essa suspensão foi semeada em placa contendo meio de cultura ágar Mueller Hinton (BioMérieux) e cinco minutos após foi feita a aplicação dos discos de antimicrobianos. Em seguida, a placa foi incubada em posição invertida em estufa a 35°C, por 16 a 18 horas. A interpretação dos halos de inibição foi realizada conforme as recomendações vigentes do CLSI para cada ano correspondente.

Para a detecção fenotípica de carbapenemases foram realizados os métodos descritos na Nota Técnica nº 01/2013 (ANVISA, 2013) a qual dispõe sobre as medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multirresistentes. A produção de carbapenemases se dá pela diferença de tamanhos de halos entre discos com antibióticos carbapenêmicos e discos com antibióticos acrescidos de bloqueadores enzimáticos, como o EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) e o AFB (ácido fenilborônico). Os isolados que apresentam diferença quanto ao comparativo de diâmetros entre os discos com e sem EDTA igual ou superior a 5 mm são considerados potenciais produtores de MβL. Caso essa diferença ocorra entre os discos com e sem AFB considera-se um provável isolado produtor de KPC. A triagem para a presença da produção de KPC em cepas pertencentes ao grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) é indicado a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a detecção do gene *bla<sub>KPC</sub>*, pois a utilização do AFB pode acarretar resultados falso positivos. Adicionalmente, não há padronização vigente para a triagem fenotípica de carbapenemases para os BGN não fermentadores, sendo recomendável a realização de PCR. Entretanto, a Nota Técnica 01/2016/CECISS/LACEN de Santa Catarina determina que bactérias não

fermentadoras da glicose resistentes e/ou com resistência intermediária aos carbapenêmicos e/ou polimixina isoladas de culturas oriundas de amostras clínicas (com exceção daquelas provenientes de *swab* de vigilância), sejam encaminhadas ao LACEN-SC (GOVERNO DE SANTA CATARINA, 2016).

Os dados referentes à identificação e perfil de sensibilidade aos antimicrobianos dos isolados de pacientes internados que foram caracterizados durante a rotina de investigação microbiológica anterior à proposição da pesquisa e que foram incluídos no estudo foram obtidos por meio de consulta, autorizada pelo Serviço de Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (SCIRAS) do HDH, aos registros respectivos.

#### 4.5.2. Pesquisa dos genes codificadores de carbapenemases e *mcr-1*

##### 4.5.2.1. Obtenção do DNA microbiano

Para a obtenção do DNA bacteriano, foi utilizado o método de choque térmico descrito por Vaneechoutte et al. (1995) e Baratto & Megiolaro (2012), com modificações, a partir de cultivo em meio sólido (ágar Mueller Hinton). Primeiramente, duas a três colônias de uma cultura pura, coletadas com alça de inoculação, foram ressuspensas em 100 µL de água destilada estéril, em microtubo de 1,5 mL. As suspensões foram submetidas a banho fervente por 5 min e, em seguida, a choque térmico em banho de gelo por 5 min. O procedimento de fervura e resfriamento foi repetido, seguido de centrifugação (Eppendorf 5415 R, Hamburgo, Alemanha) a 8.000 x g por 10 min. Ao final do processamento, o sobrenadante foi coletado e o precipitado, descartado.

O sobrenadante contendo o DNA bacteriano foi qualificado e quantificado por meio de análise espectrofotométrica (leituras a 260 e 280 nm) em aparelho Epoch (BioTek Instruments, Winooski, EUA) e, em seguida, armazenado a -20°C até o uso subsequente.

##### 4.5.2.2. Investigação de genes alvos

A investigação dos genes alvo foi realizada via PCR em volume final de 50 µL, empregando-se 50 a 500 ng de DNA extraído, em aparelho XP Cyler (Bier Technology, Tóquio, Japão). Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes alvos do estudo.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência (5' a 3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	Woodford et al. (2006)
<i>bla</i> <sub>OXA-143-like</sub>	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149	Higgins et al. (2010)
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	177	Monteiro et al. (2012)
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	785	Monteiro et al. (2009)
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	661	Monteiro et al. (2012)
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	Mendes et al. (2007)
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	Poirel et al. (2011)
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	Ellington et al. (2007)
<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	Liu et al. (2016)

Para a pesquisa de genes codificadores de algumas oxacilinases - *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143-like</sub> no complexo *A. calcoaceticus* - *A. baumannii* (ABC) foi realizada Multiplex PCR com a termociclagem consistindo de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3 min, seguida de 30 ciclos envolvendo 1 min a 94°C, 30 seg a 52°C e 1 min a 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min. À mistura de reagentes acrescentou-se 1 U Platinum® Taq DNA Polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 200 µM dNTPs (GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido), 1X PCR Buffer (Invitrogen), 20 pmols de cada iniciador (DNA Express, São Paulo, Brasil) e 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub> (Invitrogen).

A investigação do gene *bla*<sub>OXA-48-like</sub> foi realizada apenas nas enterobactérias e o *bla*<sub>SPM-1</sub> somente em *Pseudomonas* spp., enquanto que a investigação de *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub> e *mcr-1* foi realizada para todos os isolados. A PCR para os genes citados deu-se em reações individuais, utilizando-se as mesmas quantidades de polimerase, dNTPs, tampão e MgCl<sub>2</sub> indicados acima. As termociclagens específicas para cada alvo investigado estão descritas na tabela 2.

Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> e *mcr-1*.

Alvo	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos
	°C (tempo)	°C (tempo)	°C (tempo)	n°
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	94 (1 min)	63 (40 s)	72 (30 s)	35
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	94 (1 min)	60 (1 min)	72 (1 min)	40
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	94 (1 min)	62 (1 min)	72 (1 min)	35
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	94 (30 s)	68,8 (1 min)	72 (1 min)	40
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	94 (30 s)	52 (40 s)	72 (50 s)	36
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	94 (30 s)	55,5 (40 s)	72 (50 s)	40
<i>mcr-1</i>	94 (30 s)	61,5 (1 min)	72 (30 s)	40

Os isolados *mcr-1* positivos foram submetidos ao sequenciamento bidirecional direto, com emprego do kit Big Dye® Terminator v3.1 em plataforma ABI

Prism™ 3500 (Applied Biosystems, Carlsbad, EUA) e comparado às sequências nucleotídicas disponíveis em um banco de dados de acesso livre (GenBank).

Para a confirmação da efetividade do método de detecção dos genes alvo foram utilizadas as cepas padrão descritas na tabela 3 como controles positivos.

Tabela 3 - Cepas padrão utilizadas no estudo.

<b>Alvo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Local de origem</b>	<b>n°Origem</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7572
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7892
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	3174
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7740
<i>bla</i> <sub>OXA-143-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7572
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lacen/PR	12692 RM
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lacen/PR	5379 RM
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lacen/PR	12486 RM
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	<i>Enterobacter cloacae</i>	Lacen/PR	13493 RM
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>Serratia marcescens</i>	Lacen/PR	12492 RM
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lacen/PR	12983 RM

ABC: Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*; Fiocruz: Fundação Oswaldo Cruz; Lacen: Laboratório Central de Saúde Pública.

#### 4.5.2.3. Eletroforese

Foi realizada eletroforese submersa (tampão TBE) em gel de agarose a 1%, contendo 0,5 ug/mL de brometo de etídeo, para a verificação dos produtos das reações de PCR. Na sequência, a confirmação se deu via exposição à luz ultravioleta em transiluminador (MiniBis-Pro Photodocumentation System – DNR Bio-Image Systems Ltd., Jerusalém, Israel), seguido de registro digitalizado.

Além de serem utilizados controles positivos e branco, foi realizada a confirmação da obtenção dos produtos (*amplicons*) correspondentes aos segmentos planejados por meio da comparação de tamanhos com um padrão disponível



comercialmente (100 pb Ladder, Fermentas, Burlington, Canadá), também exposto a mesma condição de eletroforese. Sendo assim, pela análise dos perfis eletroforéticos obtidos foi determinada a ocorrência dos elementos genéticos investigados.

#### 4.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A amostra do estudo foi definida por conveniência. Os dados foram analisados via estatística descritiva calculando-se as frequências absolutas e relativas. As variáveis categóricas foram expressas como números absolutos e percentagens e as variáveis contínuas como médias e desvios padrão.

#### 4.7. ASPECTOS ÉTICOS

O projeto de pesquisa foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UNIVILLE, conforme diretrizes estabelecidas na Resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e complementares, sob o parecer de número 788.455. Em relação ao projeto aprovado originalmente, foi solicitada a análise e aprovação de emenda relativamente a alterações no cronograma, metodologia e objetivos específicos, a qual encontra-se sob análise. Tal solicitação se fez necessária devido à gestação e parto prematuro da pesquisadora responsável pelo estudo, impedindo a continuidade da execução do estudo no prazo pré-determinado. Adicionalmente, decidiu-se ampliar o número de genes a serem investigados nas amostras de pacientes internados no ambiente hospitalar que apresentaram cultura positiva para BGN resistentes aos carbapenêmicos.

Os dados relacionados ao perfil de sensibilidade aos antimicrobianos correspondentes ao período 2009 a 2018 foram autorizados e coletados junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) do HDH. As cepas bacterianas foram isoladas, armazenadas e analisadas mantendo-se a identificação do paciente correspondente sob sigilo absoluto, sendo apenas identificadas por codificação definida exclusivamente para a pesquisa.

Nenhum procedimento realizado exclusivamente para os fins da pesquisa teve qualquer impacto aos pacientes acometidos no período de condução do estudo, não

influenciando a conduta clínica e o prognóstico. Todos os preceitos éticos e os requisitos dispostos na Resolução CNS 466/2012 e complementares, que regulamentam as pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, foram estritamente observados pelos pesquisadores.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Conforme as normas do Programa de Pós Graduação em Mestrado em Saúde e Meio Ambiente da UNIVILLE, este capítulo será apresentado na forma de artigo científico que será encaminhado para publicação no periódico “*Brazilian Journal of Microbiology*”.

1                   **MARCADORES GENOTÍPICOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS**  
2                   **RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS ISOLADOS DE**  
3                   **AMOSTRAS CLÍNICAS**

4                   ***Marcadores moleculares de bactérias resistentes aos carbapenêmicos***

5                   Ana Julia Corrêa Gonçalves da Luz, Vanessa Cristine Kobs, Rafael Eduardo  
6                   Valdez, Roseneide Campos Deglmann, Paulo Henrique Condeixa de França.

7  
8                   **RESUMO**

9  
10                  **Introdução:** Bacilos Gram-negativos (BGN) produtores de carbapenemases  
11                  são os principais causadores de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde  
12                  no Brasil. Sua rápida disseminação constitui grave problema de saúde pública  
13                  atual. Objetivou-se investigar determinantes moleculares de resistência  
14                  antibiótica em BGN resistentes aos carbapenêmicos. **Métodos:** Foram  
15                  avaliados 157 isolados clínicos coletados durante 9 anos consecutivos em  
16                  hospital geral no sul do Brasil. A identificação das espécies deu-se por método  
17                  automatizado e a avaliação da susceptibilidade aos antibióticos via disco-  
18                  difusão em ágar. Os genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub>,  
19                  *bla*<sub>OXA-143-like</sub>, *bla*<sub>OXA-48-like</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub> e *mcr-1* foram  
20                  investigados via Reação em Cadeia da Polimerase. **Resultados:** O complexo  
21                  *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* (ABC) foi o mais  
22                  frequente (45%), seguido de *Pseudomonas aeruginosa* (27%). A maioria dos  
23                  isolados (80,2%) foi positiva para um ou mais genes investigados, com maior  
24                  frequência de *bla*<sub>KPC</sub> (26%) e *bla*<sub>VIM</sub> (25%). Concomitância de genes de  
25                  resistência foi identificada em 89 (57%) isolados, a maioria destes (79%)  
26                  pertencente ao ABC, seguido pela *K. pneumoniae* (17%). Todos os 9 (5,7%)  
27                  isolados portadores do gene *mcr-1* mostraram-se sensíveis à polimixina B via  
28                  microdiluição em caldo. **Conclusão:** Observou-se alta frequência e  
29                  concomitância de marcadores de resistência, principalmente nos anos mais  
30                  recentes da série histórica analisada.

31  
32                  Palavras-chave:            Carbapenemases,            Marcadores            genotípicos,  
33                  *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas* spp. , Gene *mcr-1*.

34

## 35 **INTRODUÇÃO**

36

37 O ambiente hospitalar, principalmente a Unidade de Terapia Intensiva  
38 (UTI), é considerado local altamente seletivo de bactérias multirresistentes e as  
39 infecções causadas por estes microrganismos estão associadas à elevadas  
40 taxas de mortalidade e morbidade e ao aumento nos custos hospitalares  
41 devido à falta de opções terapêuticas e à permanência prolongada do paciente  
42 no ambiente hospitalar<sup>4,5</sup>.

43 Os antibióticos pertencentes à classe dos carbapenêmicos estão entre os  
44 medicamentos considerados de última escolha para o tratamento de IRAS  
45 causadas por BGN<sup>6</sup>. Cepas produtoras de carbapenemases eram  
46 consideradas casos isolados e raros; entretanto, nos dias atuais, estas cepas  
47 estão distribuídas por todo o mundo com destaque à Índia subcontinental para  
48 *New Delhi metallo-β-lactamase* (NDM), os EUA, Israel, Grécia e Itália para  
49 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), e a Turquia e norte da África  
50 para OXA-48, tornando-se um grande desafio para a área da saúde<sup>7,8</sup>.

51 A rápida disseminação de bactérias produtoras de carbapenemases tem  
52 preocupado diversos órgãos de saúde mundial, que descrevem uma crise  
53 global e o risco do retorno à era pré-antibiótica<sup>9</sup>. Portanto, o panorama atual  
54 aponta a necessidade de ações urgentes que incluam melhor adesão ao  
55 controle das IRAS e ao uso criterioso de antimicrobianos em humanos e  
56 animais<sup>10</sup>. Neste contexto, o estudo dos determinantes moleculares de  
57 resistência aos antimicrobianos pode constituir uma ferramenta importante para  
58 o controle e prevenção de infecções, contribuindo também para o entendimento  
59 da epidemiologia das IRAS<sup>11</sup>.

60

## 61 **MATERIAL E MÉTODO**

62

### 63 **Caracterização do estudo e seleção dos isolados clínicos**

64

65 Estudo de natureza transversal, descritivo e experimental destinado, à  
66 investigação molecular de BGN resistentes a ao menos um carbapenêmicos

67 isolados e identificados a partir de amostras clínicas de pacientes internados e  
68 atendidos em ambulatórios em um hospital privado da cidade de Joinville/SC,  
69 identificados por 9 anos consecutivos a partir de março de 2009.

70 As amostras clínicas foram processadas durante a avaliação microbiológica  
71 assistencial rotineira realizada pelo setor de microbiologia do laboratório  
72 hospitalar empregando-se o método automatizado “Microscan Walkaway”  
73 (Siemens, Munique, Alemanha), paralelamente à realização de bacterioscopia  
74 pelo Gram.

75 Aprovação ética foi obtida do Comitê de Ética em Pesquisa da  
76 Universidade da Região de Joinville, sob o Parecer 788.455.

77

### 78 **Determinação fenotípica de suscetibilidade aos antibióticos**

79

80 A determinação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos foi realizada  
81 empregando-se o método de disco-difusão em ágar (“Kirby e Bauer”) e a  
82 interpretação dos halos de inibição se deu de acordo com as recomendações  
83 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) de cada ano vigente.

84 A susceptibilidade fenotípica à polimixina B foi confirmada por microdiluição  
85 em caldo para a obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), conforme  
86 instruções do fabricante do kit Policimbac (Probac, São Paulo, Brasil)

87 A triagem fenotípica de enterobactérias produtoras de carbapenemases  
88 isoladas a partir de maio de 2013 foi realizada segundo os métodos descritos  
89 na Nota Técnica nº 01/2013 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária  
90 (ANVISA)<sup>12</sup>.

91

### 92 **Obtenção do DNA bacteriano e investigação dos genes alvo**

93

94 A extração do DNA bacteriano foi realizada utilizando-se choque térmico,  
95 conforme previamente descrito<sup>13,14</sup>, a partir de cultivo em ágar Mueller Hinton e  
96 a investigação dos genes alvo foi realizada via Reação em Cadeia da  
97 Polimerase (PCR) em volume final de 50 µL, empregando-se 50 a 500 ng de  
98 DNA extraído. Os iniciadores utilizados estão descritos na tabela 1. Para a

99 verificação dos produtos das reações de PCR foi realizado a eletroforese  
100 submersa (tampão TBE) em gel de agarose a 1%.

101 Para a pesquisa de genes codificantes de algumas oxacilinases - *bla*<sub>OXA-23-</sub>  
102 *like*, *bla*<sub>OXA-24-like</sub>, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143-like</sub> no complexo *A.*  
103 *calcoaceticus* - *A. baumannii* (ABC) foi realizada Multiplex PCR com a  
104 termociclagem consistindo de uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por 3  
105 min, seguida de 30 ciclos envolvendo 1 min a 94°C, 30 s a 52°C e 1 min a  
106 72°C. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 min<sup>15</sup>. A investigação do  
107 gene *bla*<sub>OXA-48-like</sub> foi realizada apenas nas enterobactérias e o *bla*<sub>SPM-1</sub> somente  
108 em *Pseudomonas spp.*, enquanto que a investigação de *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>,  
109 *bla*<sub>IMP</sub> e *mcr-1* foi realizada para todos os isolados. A PCR para os genes  
110 citados deu-se em reações individuais. As termociclagens específicas para  
111 cada alvo investigado estão descritas na tabela 2.

112 Os isolados *mcr-1* positivos foram submetidos ao sequenciamento  
113 bidirecional direto, seguido de comparação às sequências nucleotídicas  
114 disponíveis em banco de dados de acesso livre (GenBank).

115 Para a confirmação da efetividade do método de detecção dos genes alvo  
116 foram utilizadas as cepas padrão descritas na tabela 3 como controles  
117 positivos.

118

## 119 **Análise estatística**

120

121 A amostra do estudo foi definida por conveniência. Os dados foram  
122 analisados via estatística descritiva calculando-se as frequências absolutas e  
123 relativas. As variáveis categóricas foram expressas como números absolutos e  
124 percentagens e as variáveis contínuas como médias e desvios padrão.

125

## 126 **RESULTADOS**

127

### 128 **Frequência e distribuição setorial dos isolados clínicos**

129

130 Foram incluídos no estudo 157 isolados clínicos. Os pertencentes ao ABC  
131 compreenderam 45% (n=71), seguidos de *P. aeruginosa* (27%; n=43), *K.*

132 *pneumoniae* (19%; n=31), complexo *E. cloacae* (4%; n=7) e o restante (5%,  
133 n=5) distribuído entre espécies com menor frequência (Tabela 3). O período  
134 correspondente aos dois anos mais recentes apresentou maior número de  
135 isolados resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, tendo sido a maioria  
136 identificada como *P. aeruginosa* neste período (ano 8: 46%; ano 9: 39%;  
137 Tabela 4).

138 Os isolados estudados foram coletados de lavado broncoalveolar (LBA)  
139 (31%; n=48), swab retal (20%; n=32) secreção de ferida (15%; n=24), urina  
140 (14%; n=22), hemocultura (6%; n=9) e outros tipos de amostras com menor  
141 frequência (14%; n=22). Quanto à distribuição dos isolados no ambiente  
142 hospitalar, 41% (n=65) foram derivados da UTI, 37% (n=58) oriundos das  
143 unidades de internação, 13% (n=20) do Pronto Atendimento e 9% (n=14) dos  
144 isolados distribuíram-se entre o centro cirúrgico e pacientes ambulatoriais. A  
145 evolução temporal em relação ao tipos de amostra e à distribuição setorial dos  
146 isolados está demonstrada na tabela 5.

147

#### 148 **Suscetibilidade fenotípica aos antibióticos**

149

150 Todos os BGN estudados eram resistentes ao imipenem. Quanto ao  
151 meropenem, 99,3% (n=145/146) dos isolados testados para este antibiótico  
152 apresentaram resistência, enquanto todas as enterobactérias testadas (n=39)  
153 apresentaram resistência ao ertapenem. Para a polimixina B, todos os isolados  
154 testados (n=133) foram sensíveis.

155 A distribuição dos perfis de suscetibilidade frente aos antibióticos testados  
156 está representada nas figuras 1 (BGN não fermentadores; n=116) e 2  
157 (enterobactérias; n=41).

158

#### 159 **Marcadores genotípicos de resistência antibiótica**

160

161 A maioria (80,2%; 126/157) dos isolados apresentaram positividade frente  
162 aos genes investigados. Para *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>KPC</sub> obteve-se um total de 13  
163 (8%), 39 (25%) e 41 (26%) isolados positivos, respectivamente. Todos os  
164 isolados testados resultaram negativos para *bla*<sub>SPM-1</sub> e *bla*<sub>OXA-48-like</sub>. Na



165 investigação genotípica das demais cinco famílias de genes codificantes de  
166 oxacilinas no ABC, obteve-se positividade para os genes *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e  
167 *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (97%) e negatividade para os demais. Quanto ao gene *mcr-1*, 9 (6  
168 %) isolados foram positivos, sendo 6 *K. pneumoniae* e 3 pertencentes ao ABC.  
169 A confirmação fenotípica de sensibilidade destes isolados foi realizada via  
170 microdiluição em caldo, obtendo-se CIM ≤ 1,0 µg/mL. Adicionalmente, o  
171 sequenciamento confirmou a presença do gene *mcr-1*, com exceção de uma  
172 reação falha.

173 A figura 3 exemplifica os padrões eletroforéticos resultantes da PCR na  
174 investigação dos genes estudados. A distribuição dos isolados frente aos  
175 genes codificantes de carbapenemases e ao gene *mcr-1* está descrita na  
176 tabela 6 e a distribuição da ocorrência dos genes durante o período do estudo  
177 está descrita na figura 4.

178 Adicionalmente, foi observada a co-produção de genes em 89 (57%)  
179 isolados, a maioria (79%, n=70) pertencente ao ABC, seguido pela *K.*  
180 *pneumoniae* (17%, n=15). As concomitâncias encontradas foram *bla*<sub>OXA-51-like</sub> +  
181 *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (74%, 53/72), todas em isolados do ABC; *bla*<sub>KPC</sub> + *bla*<sub>VIM</sub> (22%,  
182 7/31) em *K. pneumoniae*; *bla*<sub>KPC</sub> + *bla*<sub>OXA-51-like</sub> + *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (8%, 6/72) e *bla*<sub>VIM</sub>  
183 + *bla*<sub>OXA-51-like</sub> + *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (7%, 5/72), ambos no ABC, e *bla*<sub>NDM-1</sub> + *bla*<sub>VIM</sub> em  
184 cepas identificadas como complexo *E. cloacae* (n=2), *K. pneumoniae* (n=1) e *P.*  
185 *aeruginosa* (n=2).

186 Todos os isolados que apresentaram positividade para o gene *mcr-1*  
187 apresentavam concomitantemente outros genes investigados: *mcr-1* + *bla*<sub>KPC</sub> +  
188 *bla*<sub>VIM</sub> + *bla*<sub>OXA-51-like</sub> + *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (n=2; ABC), *mcr-1* + *bla*<sub>KPC</sub> + *bla*<sub>OXA-51-like</sub> +  
189 *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (n=1; ABC), *mcr-1* + *bla*<sub>KPC</sub> + *bla*<sub>VIM</sub> (n=2; *K. pneumoniae*), *mcr-1* +  
190 *bla*<sub>KPC</sub> (n=3; *K. pneumoniae*) e *mcr-1* + *bla*<sub>NDM-1</sub> (n=1; *K. pneumoniae*).

191

## 192 DISCUSSÃO

193

194 Os antibióticos carbapenêmicos são considerados como última opção  
195 terapêutica para o tratamento de diversas infecções causadas por BGN  
196 multirresistentes<sup>16</sup>. O aumento de isolados clínicos resistentes a essas drogas,  
197 principalmente nas UTIs, é um sério problema de saúde pública mundial,

198 estando associado a altos índices de mortalidade e morbidade, além de altos  
199 custos para os hospitais<sup>17</sup>.

200 A UTI é o setor hospitalar que alberga o maior número de isolados  
201 resistentes aos carbapenêmicos, como já descrito por diversos autores, porém  
202 o microrganismo mais prevalente e o principal sítio acometido variam conforme  
203 o local estudado<sup>18</sup>. Tempe e colaboradores (2015) avaliaram 123 isolados  
204 resistentes aos carbapenêmicos em um hospital público terciário indiano, tendo  
205 identificado maior frequência para *A. baumannii* (79%, 27/34), seguido de *P.*  
206 *aeruginosa* (70%, 24/34), *K. pneumoniae* (45%, 14/31) e *E. coli* (41%, 10/24),  
207 obtidos de aspirado traqueal (62,5%), urina (22,5%) e sangue (15%)<sup>19</sup>. De  
208 forma semelhante, no presente estudo observou-se o ABC com maior  
209 frequência, porém o lavado broncoalveolar foi o tipo de amostra mais  
210 representada. Nos dois estudos, tais amostras clínicas representam microbiota  
211 do trato respiratório inferior.

212 A produção de carbapenemases é um importante mecanismo de  
213 resistência nas bactérias Gram-negativas, com maior frequência nas  
214 enterobactérias. Nestas, a detecção da produção de carbapenemases  
215 codificadas por genes plasmidiais vem sendo reportada em todos os  
216 continentes, com destaque para as enzimas KPC, mais comumente produzida  
217 pela *K. pneumoniae*, NDM e OXA-48<sup>20,21,22</sup>.

218 Viegas e Soares (2018), em estudo realizado em um hospital público em  
219 Minas Gerais, entre 2014 e 2016, com isolados de enterobactérias resistentes  
220 aos carbapenêmicos, identificaram a ocorrência do gene *bla*<sub>KPC</sub> em 63,4% dos  
221 casos e negatividade para os demais genes testados (*bla*<sub>OXA</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>)<sup>23</sup>. Pinto  
222 e colaboradores (2014) em um estudo multicêntrico realizado em hospitais  
223 terciários de Porto Alegre, Rio Grande do Sul, relataram a ocorrência de *bla*<sub>KPC</sub>  
224 (48,5%), *bla*<sub>OXA-48-like</sub> (3%) e *bla*<sub>NDM</sub> (2%) em enterobactérias resistentes aos  
225 carbapenêmicos<sup>24</sup>. Na Índia, um estudo realizado em 2010, em um hospital  
226 universitário de 1.660 leitos, detectou maior prevalência do gene *bla*<sub>NDM</sub> (58%)  
227 em enterobactérias, seguido por *bla*<sub>OXA-181-like</sub> (2%), *bla*<sub>VIM</sub> (1%) e negatividade  
228 para os demais genes testados (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub> e *bla*<sub>SPM</sub>),  
229 acrescentando ainda que 42% dos isolados positivos para *bla*<sub>NDM</sub> eram  
230 sensíveis aos carbapenêmicos<sup>25</sup>. Ye e colaboradores (2017) analisaram, em

231 um hospital universitário chinês, 78 isolados resistentes aos carbapenêmicos,  
232 reportando *bla*<sub>KPC</sub> (33,3% dos casos), *bla*<sub>VIM-1</sub> (7,7%), *bla*<sub>IMP-2</sub> (7,7%) e *bla*<sub>IMP-1</sub>  
233 (3,8%)<sup>26</sup>. Em todos os trabalhos citados, *K. pneumoniae* foi o microrganismo  
234 mais frequente. No presente estudo, de modo similar, a enterobactéria mais  
235 prevalente foi também *K. pneumoniae*, enquanto o gene mais frequente foi  
236 *bla*<sub>KPC</sub>, seguido de *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>, não sendo detectados os genes *bla*<sub>OXA-48-</sub>  
237 *like* e *bla*<sub>SPM</sub>. O reporte do gene *bla*<sub>VIM</sub> em enterobactérias no Brasil é  
238 considerado pouco frequente, Martins e colaboradores (2017) descreveram um  
239 caso (0,2%) de positividade para este gene em um estudo realizado em 50  
240 hospitais brasileiros , enquanto que em nosso trabalho o percentual atingido foi  
241 de 39% (16/41) dos isolados, taxas elevadas de *bla*<sub>VIM</sub> em enterobactérias são  
242 mais frequentes na Europa e na África<sup>27,28</sup>

243 Embora as carbapenemases sejam mais frequentes nas enterobactérias,  
244 diversos estudos vêm demonstrando a problemática da produção destas  
245 enzimas pelos BGN não fermentadores, os quais são considerados importantes  
246 patógenos oportunistas nas IRAS, com capacidade de rápida aquisição de  
247 resistência a diversas classes de antibióticos e facilidade de adaptação em  
248 ambientes hostis, tornando a terapia ainda mais limitante<sup>29,30</sup>.

249 Genes codificantes de carbapenemases em *P. aeruginosa* são descritos no  
250 mundo todo. No Brasil, estudos recentes como os de Rossi e colaboradores  
251 (2017) realizado em Uberlândia, Minas Gerais, e Rizek colaboradores (2014)  
252 em São Paulo demonstraram a presença de *bla*<sub>SPM-1</sub> (10,7%) e *bla*<sub>VIM</sub> (5,3%); e  
253 *bla*<sub>SPM-1</sub> (32%), *bla*<sub>VIM</sub> (4%) e *bla*<sub>KPC</sub> (1%), respectivamente<sup>31,32</sup>. Em nosso  
254 estudo, diferentemente dos estudos referidos, o gene *bla*<sub>SPM-1</sub> não foi  
255 detectado, enquanto *bla*<sub>VIM</sub> foi o mais prevalente (32%, 14/43) na espécie. A  
256 elevada prevalência de *bla*<sub>VIM</sub> em *P. aeruginosa* vem sendo descrita na Europa,  
257 Ásia-Pacífico e meio leste africano, com casos esporádicos e raros no Brasil<sup>33</sup>.

258 Na última década, o *A. baumannii*, principal microrganismo pertencente ao  
259 ABC, vem sendo destacado como um importante agente nas IRAS devido ao  
260 aumento de cepas resistentes a diversos antibióticos, impulsionadas pela  
261 aquisição de elementos genéticos móveis e ativação de mecanismos  
262 intrínsecos de resistência<sup>34</sup>. Este fato é bastante preocupante, tendo em vista

263 que às infecções causadas por estes microrganismos atribuem-se taxas de  
264 mortalidade entre 30 e 75% dos casos<sup>3</sup>.

265 As carbapenemases, principalmente as oxacilinases, são consideradas o  
266 principal mecanismo de resistência aos carbapenêmicos no *Acinetobacter spp.*,  
267 com maior prevalência da OXA-23 na América Latina e casos esporádicos de  
268 MβL<sup>35,36</sup>.

269 No Brasil, Kobs e colaboradores (2016) realizaram estudo em um hospital  
270 de Joinville, Santa Catarina, investigando os genes *bla*<sub>OXA-23-like</sub>, *bla*<sub>OXA-24-</sub>  
271 *like*, *bla*<sub>OXA-51-like</sub>, *bla*<sub>OXA-58-like</sub> e *bla*<sub>OXA-143-like</sub> em 78 isolados do ABC, tendo  
272 determinado que a maioria (91%) albergava *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e *bla*<sub>OXA-23-like</sub> de forma  
273 concomitante, além da negatividade para os demais genes analisados<sup>37</sup>. Neves  
274 e colaboradores (2016) conduziram um estudo realizado na UTI de um hospital  
275 terciário universitário de Minas Gerais, entre 2009 e 2010, com 56 isolados de  
276 *A. baumannii* resistentes aos carbapenêmicos, sendo reportada a ocorrência  
277 de *bla*<sub>OXA-51-like</sub> (100% dos casos), seguido de *bla*<sub>OXA-23-like</sub> (51,2%) e *bla*<sub>OXA-143-like</sub>  
278 (18,3%) e negatividade para os demais genes (*bla*<sub>OXA-58-like</sub>, *bla*<sub>VIM-like</sub>, *bla*<sub>IMP-1</sub>  
279 e *bla*<sub>IMP-like</sub>)<sup>38</sup>. Em nosso estudo, assim como os demais citados, os genes  
280 *bla*<sub>OXA-51-like</sub> e *bla*<sub>OXA-23-like</sub> foram os mais prevalentes, corroborando com a  
281 estimativa de que OXA-23 é a principal oxacilinase codificada por gene móvel  
282 no ABC no Brasil<sup>37,38</sup>. Adicionalmente, também detectamos a presença de  
283 genes codificantes de MβL (*bla*<sub>VIM</sub> - 6% e *bla*<sub>NDM-1</sub> - 1%) e *bla*<sub>KPC</sub> (7%) em ABC,  
284 o que pode ser considerado raro na América Latina<sup>36</sup>.

285 Em decorrência do aumento das infecções causadas por microrganismos  
286 resistentes aos carbapenêmicos, a utilização das polimixinas vem sendo  
287 considerada uma importante opção terapêutica, embora seja conhecida a sua  
288 toxicidade potencial<sup>39</sup>. Até pouco tempo atrás, a resistência a estes antibióticos  
289 estava associada exclusivamente a mecanismos cromossomais; porém, em  
290 2016, Liu e colaboradores na China publicaram o primeiro caso de resistência à  
291 colistina codificada por um gene (*mcr-1*) localizado em plasmídeo<sup>9</sup>. A partir  
292 deste achado, diversos estudos vêm sendo publicados reportando a presença  
293 do gene *mcr-1* e suas variantes em isolados clínicos resistentes às  
294 polimixinas<sup>40,41,42,43</sup>. No presente estudo, diferentemente das publicações  
295 referidas, os isolados portadores de *mcr-1* (*K. pneumoniae*; n=6 e *A.*

296 *baumannii*; n=3) eram sensíveis à polimixina B, tendo sido apenas 2 isolados  
297 oriundos de pacientes que fizeram uso deste antibiótico. Pilonetto e  
298 colaboradores (2018), em um estudo recente realizado com BGN de cinco  
299 cidades do Paraná, também detectaram a presença de isolados portadores de  
300 *mcr-1* apresentando sensibilidade às polimixinas, porém correspondentes à *E.*  
301 *coli*<sup>44</sup>. Em particular, do nosso conhecimento, até o presente estudo, não  
302 existiam relatos confirmando a presença do gene *mcr-1* em *A. baumannii*  
303 derivados de amostras clínicas humanas no Brasil.

304 Ainda no presente estudo, todos os isolados portadores do gene *mcr-1*  
305 apresentaram coexistência com um ou mais genes codificantes de  
306 carbapenemases, com maior prevalência do *bla*<sub>KPC</sub> (8 casos) e somente 1  
307 isolado também apresentando *bla*<sub>NDM-1</sub>. Os casos já descritos envolve a  
308 associação do gene *mcr-1* ao *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>NDM-5</sub>, *bla*<sub>VIM-1</sub>, *bla*<sub>KPC-3</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub> em  
309 *E. coli* e ao *bla*<sub>KPC-2</sub> em *K.pneumoniae*<sup>45-50</sup>. Entre os genes codificantes de  
310 carbapenemases, diversas concomitâncias também já foram descritas, como  
311 *bla*<sub>NDM-1</sub> + *bla*<sub>KPC-2</sub> (*Citrobacter freundii*), *bla*<sub>VIM-2</sub> + *bla*<sub>KPC-2</sub> (*K. pneumoniae*).  
312 *bla*<sub>NDM-1</sub> + *bla*<sub>OXA-48</sub> + *bla*<sub>VIM-1</sub> (*K. pneumoniae*), *bla*<sub>IMP-1</sub> + *bla*<sub>VIM-2</sub> (*A.*  
313 *baumannii*)<sup>51-54</sup>. Com exceção das associações com *bla*<sub>OXA-48</sub> e/ou *bla*<sub>IMP-1</sub>,  
314 todas as demais foram encontradas neste estudo, não tendo sido evidenciadas  
315 diferenças fenotípicas específicas relacionadas a tais associações.

316 Algumas limitações podem ser destacadas neste estudo. O número de  
317 isolados avaliados foi relativamente pequeno e, adicionalmente, o estudo foi  
318 realizado em um único hospital. Por outro lado, ao abranger nove anos  
319 consecutivos, a investigação permitiu identificar um acréscimo relevante de  
320 isolados portadores de genes de resistência antibiótica em anos mais recentes.  
321 Desta forma, recomendamos que sejam realizados estudos multicêntricos, com  
322 abordagem fenotípica e molecular, para a investigação dos mecanismos  
323 associados à resistência aos carbapenêmicos e às polimixinas, em vista da  
324 escassez destes dados do Brasil. Sugerimos também a investigação da relação  
325 clonal dos isolados, importante iniciativa para o rastreamento e controle no  
326 ambiente hospitalar.

327

328 **CONFLITO DE INTERESSE:** Os autores declararam nenhum conflito de  
329 interesse.

330

### 331 REFERÊNCIAS

332 1. Wilson APR, Livermore DM, Otter JA, et al. Prevention and control of  
333 multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: Recommendations from a  
334 Joint Working Party. *J Hosp Infect.* 2016;92(March 2015):S1-S44.  
335 doi:10.1016/j.jhin.2015.08.007

336 2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretriz Nacional para  
337 Elaboração de Programa de Gerenciamento do Uso de antimicrobianos  
338 em Serviços de Saúde . 2017:90.

339 3. Mehrad B, Clark NM, Zhanel GG, Lynch JP. Antimicrobial resistance in  
340 hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Chest.*  
341 2015;147(5):1413-1421. doi:10.1378/chest.14-2171

342 4. Cornejo-Juárez P, Vilar-Compte D, Pérez-Jiménez C, Ñamendys-Silva  
343 SA, Sandoval-Hernández S, Volkow-Fernández P. The impact of hospital-  
344 acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology  
345 intensive care unit. *Int J Infect Dis.* 2015;31:e31-e34.  
346 doi:10.1016/j.ijid.2014.12.022

347 5. Ziółkowski G, Pawłowska I, Krawczyk L, Wojkowska-Mach J. Antibiotic  
348 consumption versus the prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter*  
349 *baumannii* and *Clostridium difficile* infections at an ICU from 2014-2015. *J*  
350 *Infect Public Health.* 2018. doi:10.1016/j.jiph.2018.02.003

351 6. Meletis G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future  
352 perspectives. *Ther Adv Infect Dis.* 2016;3(1):15-21.  
353 doi:10.1177/2049936115621709

354 7. Sekirov I, Croxen MA, Ng C, et al. Epidemiologic and genotypic review of  
355 carbapenemase-producing organisms in British Columbia, Canada,  
356 between 2008 and 2014. *J Clin Microbiol.* 2016;54(2):317-327.  
357 doi:10.1128/JCM.02289-15

358 8. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase  
359 producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clin Microbiol Infect.*  
360 2014;20(9):821-830. doi:10.1111/1469-0691.12719

- 361 9. Liu YY, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin  
362 resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A  
363 microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis.*  
364 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- 365 10. Sampaio JLM, Gales AC. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae  
366 in Brazil: focus on  $\beta$ -lactams and polymyxins. *Brazilian J Microbiol.*  
367 2016;47:31-37. doi:10.1016/j.bjm.2016.10.002
- 368 11. Braun SD, Monecke S, Thürmer A, et al. Rapid identification of  
369 carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide  
370 microarray-based assay. *PLoS One.* 2014;9(7).  
371 doi:10.1371/journal.pone.0102232
- 372 12. ANVISA. Nota Técnica Nº 01/2013. *Câmara Técnica Resist Microbiana*  
373 *Em Serviços Saúde.* 2013:1-22.
- 374 13. Vaneechoutte M, Dijkshoorn L, Tjernberg I, et al. *Identification of*  
375 *Acinetobacter Genomic Species by Amplified Ribosomal DNA Restriction*  
376 *Analysis.* Vol 33.; 1995.  
377 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC227870/pdf/330011.pdf>.  
378 Accessed August 2, 2018.
- 379 14. Milton Baratto C, Megiolaro F. *Comparação de Diferentes Protocolos de*  
380 *Extração de Dna de Bactérias Para Utilização Em RAPD-PCR.*  
381 <https://editora.unoesc.edu.br/index.php/acet/article/viewFile/1574/pdf>.  
382 Accessed August 2, 2018.
- 383 15. WOODFORD N, ELLINGTON M, COELHO J, et al. Multiplex PCR for  
384 genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp.  
385 *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(4):351-353.  
386 doi:10.1016/j.ijantimicag.2006.01.004
- 387 16. El-Gamal MI, Brahim I, Hisham N, Aladdin R, Mohammed H, Bahaaeldin  
388 A. Recent updates of carbapenem antibiotics. *Eur J Med Chem.*  
389 2017;131:185-195. doi:10.1016/j.ejmech.2017.03.022
- 390 17. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. *Current.*  
391 2013:114. doi:CS239559-B
- 392 18. Zilahi G, Artigas A, Martin-Loeches I. What's new in multidrug-resistant  
393 pathogens in the ICU? *Ann Intensive Care.* 2016;6:96.

- 394 doi:10.1186/s13613-016-0199-4
- 395 19. Chaudhary K, Lalwani P, Tudu M, et al. Carbapenem Resistance Patterns  
396 in General Intensive Care Unit of a Tertiary Care Hospital in India. *MAMC*  
397 *J Med Sci.* 2015;1(2):85. doi:10.4103/2394-7438.157918
- 398 20. van Duin D, Doi Y. The global epidemiology of carbapenemase-producing  
399 Enterobacteriaceae. *Virulence.* 2017;8(4):460-469.  
400 doi:10.1080/21505594.2016.1222343
- 401 21. Wilson H, Török ME. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing and  
402 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Microb Genomics.* 2018.  
403 doi:10.1099/mgen.0.000197
- 404 22. Lorenzoni VV, Silva D da C, Rampelotto RF, Brites PC, Villa B, Hörner R.  
405 Evaluation of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in a tertiary-level  
406 reference hospital in Rio Grande do Sul, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.*  
407 2017;50(5):685-688. doi:10.1590/0037-8682-0209-2017
- 408 23. Viegas DM, Soares VM. Prevalence of carbapenemase in  
409 Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems  
410 isolated in a tertiary referral hospital Prevalência de carbapenemases em  
411 enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos  
412 isoladas em um hospital. doi:10.5935/1676-2444.20180017
- 413 24. Pinto FDM, Simas DM, Baldin CP, et al. Prevalência de carbapenemases  
414 em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais  
415 terciários de Porto Alegre. 2014;34(1):47-52.
- 416 25. Mariappan S, Sekar U, Kamalanathan A. Carbapenemase-producing  
417 Enterobacteriaceae: Risk factors for infection and impact of resistance on  
418 outcomes. 2017. doi:10.4103/2229-516X.198520
- 419 26. Ye Y, Xu L, Han Y, Chen Z, Liu C, Ming L. Mechanism for carbapenem  
420 resistance of clinical enterobacteriaceae isolates. *Exp Ther Med.* 2018.  
421 doi:10.3892/etm.2017.5485
- 422 27. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, et al. Genomic epidemiology of  
423 global VIM-producing Enterobacteriaceae. *J Antimicrob Chemother.*  
424 2017;72(8):2249-2258. doi:10.1093/jac/dkx148
- 425 28. Martins AF, Bail L, Ito CAS, et al. Antimicrobial activity of plazomicin  
426 against Enterobacteriaceae-producing carbapenemases from 50 Brazilian



- 427 medical centers. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2018;90(3):228-232.  
428 doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.11.004
- 429 29. Silva Júnior VV da, Ferreira LD, Alves LR, et al. Detection of multidrug-  
430 resistant *Pseudomonas aeruginosa* harboring bla GES-1 and bla GES-11  
431 in Recife, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2017;50(6):764-768.  
432 doi:10.1590/0037-8682-0532-2016
- 433 30. Liew SM, Rajasekaram G, Puthuchearu SD, Chua KH. Detection of VIM-  
434 2-, IMP-1- and NDM-1-producing multidrug resistant *Pseudomonas*  
435 *aeruginosa* in Malaysia. *Integr Med Res.* 2018.  
436 doi:10.1016/j.jgar.2018.01.026
- 437 31. Rossi Gonçalves I, Dantas RCC, Ferreira ML, Batistão DW da F, Gontijo-  
438 Filho PP, Ribas RM. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*:  
439 association with virulence genes and biofilm formation. *Brazilian J*  
440 *Microbiol.* 2017;48(2):211-217. doi:10.1016/j.bjm.2016.11.004
- 441 32. Rizek C, Fu L, dos Santos LC, et al. Characterization of carbapenem-  
442 resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates, carrying multiple  
443 genes coding for this antibiotic resistance. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.*  
444 2014;13(1):43. doi:10.1186/s12941-014-0043-3
- 445 33. Kazmierczak KM, Rabine S, Hackel M, et al. Multiyear, Multinational  
446 Survey of the Incidence and Global Distribution of Metallo-Lactamase-  
447 Producing Enterobacteriaceae and *Pseudomonas aeruginosa*. 2016.  
448 doi:10.1128/AAC.02379-15
- 449 34. Wright MS, Iovleva A, Jacobs MR, Bonomo RA, Adams MD. Genome  
450 dynamics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* during infection  
451 and treatment. *Genome Med.* 2016;8(1):1-12. doi:10.1186/s13073-016-  
452 0279-y
- 453 35. Petrova AP, Stanimirova ID, Ivanov IN, et al. Carbapenemase Production  
454 of Clinical Isolates *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas*  
455 *aeruginosa* from a Bulgarian University Hospital. *Folia Med (Plovdiv).*  
456 2017;59(4):413-422. doi:10.1515/folmed-2017-0060
- 457 36. Rodríguez CH, Nastro M, Famiglietti A. Carbapenemases in  
458 *Acinetobacter baumannii*. Review of their dissemination in Latin America.  
459 *Rev Argent Microbiol.* 2018;50(3):327-333. doi:10.1016/j.ram.2017.10.006

- 460 37. Vanessa Cristine Kobs D, Cristine Kobs V, Augustini Ferreira J, et al. The  
461 role of the genetic elements bla<sub>oxa</sub> and ISAba1 in the Acinetobacter  
462 calcoaceticus-Acinetobacter baumannii complex in carbapenem  
463 resistance in the hospital setting. *Rev Soc Bras Med Trop.* 49(4):433-440.  
464 doi:10.1590/0037-8682-0002-2016
- 465 38. Neves FC, Clemente WT, Lincopan N, et al. Clinical and microbiological  
466 characteristics of OXA-23- and OXA-143-producing Acinetobacter  
467 baumannii in ICU patients at a teaching hospital, Brazil. *Brazilian J Infect*  
468 *Dis.* 2016;20(6):556-563. [http://www.scielo.br/pdf/bjid/v20n6/1413-8670-](http://www.scielo.br/pdf/bjid/v20n6/1413-8670-bjid-20-06-0556.pdf)  
469 [bjid-20-06-0556.pdf](http://www.scielo.br/pdf/bjid/v20n6/1413-8670-bjid-20-06-0556.pdf). Accessed September 19, 2018.
- 470 39. Srinivas P, Rivard K. Polymyxin Resistance in Gram-negative Pathogens.  
471 *Curr Infect Dis Rep.* 2017;19(11):38. doi:10.1007/s11908-017-0596-3
- 472 40. Rossi F, Girardello R, Morais C, et al. Plasmid-mediated mcr-1 in  
473 carbapenem-susceptible Escherichia coli ST156 causing a blood  
474 infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil? *Clinics.*  
475 2017;72(10):642-644. doi:10.6061/clinics/2017(10)09
- 476 41. Fernandes MR, McCulloch JA, Vianello MA, et al. First Report of the  
477 Globally Disseminated IncX4 Plasmid Carrying the mcr-1 Gene in a  
478 Colistin-Resistant *Escherichia coli* ST101 isolated from a Human Infection  
479 in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2016;60(August):AAC.01325-16.  
480 doi:10.1128/AAC.01325-16
- 481 42. Dalmolin TV, Martins AF, Zavascki AP, de Lima-Morales D, Barth AL.  
482 Acquisition of the mcr-1 gene by a high-risk clone of KPC-2-producing  
483 Klebsiella pneumoniae ST437/CC258, Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*  
484 2018;90(2):132-133. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2017.09.016
- 485 43. Wang R, Van Dorp L, Shaw LP, et al. The global distribution and spread  
486 of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. doi:10.1038/s41467-018-  
487 03205-z
- 488 44. PILLONETTO M, MAZZETTI A, BECKER GN, SIEBRA CA, AREND LN,  
489 BARTH AL. Low level of polymyxin resistance among mcr-1 positive  
490 Escherichia coli from human source in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.*  
491 2018;Submitted:#pagerange#. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2018.08.009
- 492 45. Zhong L-L, Zhang Y-F, Doi Y, et al. Coproduction of MCR-1 and NDM-1

- 493 by Colistin-Resistant *Escherichia coli* Isolated from a Healthy Individual  
494 Downloaded from. 2017;61:1962-1978. doi:10.1128/AAC.01962-16
- 495 46. Mediavilla JR, Patrawalla A, Chen L, et al. and bla NDM-5 , Causing a  
496 Complicated Urinary Tract Infection in a Patient from the United States.  
497 *MBio*. 2016;7(4):5-8. doi:10.1128/mBio.01191-16.Editor
- 498 47. Aires CAM, Da Conceição-Neto OC, Tavares E Oliveira TR, et al.  
499 Emergence of the plasmid-mediated mcr-1 gene in clinical KPC-2-  
500 producing *Klebsiella pneumoniae* sequence type 392 in Brazil. *Antimicrob*  
501 *Agents Chemother*. 2017;61(7):1-9. doi:10.1128/AAC.00317-17
- 502 48. Tacão M, Tavares R dos S, Teixeira P, et al. Mcr-1 and bla<sub>kpc-3</sub>in  
503 *escherichia coli* sequence type 744 after meropenem and colistin therapy,  
504 Portugal. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(8):1419-1421.  
505 doi:10.3201/eid2308.170162
- 506 49. Poirel L, Kieffer N, Liassine N, Thanh D, Nordmann P. Plasmid-mediated  
507 carbapenem and colistin resistance in a clinical isolate of *Escherichia coli*.  
508 *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):281. doi:10.1016/S1473-3099(16)00006-2
- 509 50. Beyrouthy R, Robin F, Lessene A, et al. MCR-1 and OXA-48 in vivo  
510 acquisition in KPC-producing *Escherichia coli* after colistin treatment.  
511 *Antimicrob Agents Chemother*. 2017;61(8). doi:10.1128/AAC.02540-16
- 512 51. Wu W, Espedido B, Feng Y, Zong Z. *Citrobacter freundii* carrying bla  
513 KPC-2 and bla NDM-1 : characterization by whole genome sequencing  
514 OPEN. *Nat Publ Gr*. 2016. doi:10.1038/srep30670
- 515 52. Falco A, Ramos Y, Franco E, Guzmán A, Takiff H. A cluster of KPC-2 and  
516 VIM-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST833 isolates from the pediatric  
517 service of a Venezuelan Hospital. doi:10.1186/s12879-016-1927-y
- 518 53. Barguigua A, El otmani F, Lakbakbi el yaagoubi F, Talmi M, Zerouali K,  
519 Timinouni M. First report of a *Klebsiella pneumoniae* strain coproducing  
520 NDM-1, VIM-1 and OXA-48 carbapenemases isolated in Morocco.  
521 *APMIS*. 2013;121(7):675-677. doi:10.1111/apm.12034
- 522 54. Davoodi S, Boroumand MA, Sephehriseresht S, Pourgholi L. Detection of  
523 VIM- and IMP-type Metallo-Beta-Lactamase genes in *Acinetobacter*  
524 *baumannii* isolates from patients in two hospitals in Tehran. *Iran J*  
525 *Biotechnol*. 2015;13(1). doi:10.15171/ijb1088

- 526 55. Higgins PG, Lehmann M, Seifert H. Inclusion of OXA-143 primers in a  
527 multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent  
528 OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. *Int J Antimicrob Agents*.  
529 2010;35(3):305. doi:10.1016/j.ijantimicag.2009.10.014
- 530 56. Monteiro J, Widen RH, Pignatari ACC, Kubasek C, Silbert S. Rapid  
531 detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *J*  
532 *Antimicrob Chemother*. 2012;67(4):906-909. doi:10.1093/jac/dkr563
- 533 57. Mendes RE, Kiyota KA, Monteiro J, et al. Rapid detection and  
534 identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-  
535 time PCR assay and melt curve analysis. *J Clin Microbiol*.  
536 2007;45(2):544-547. doi:10.1128/JCM.01728-06
- 537 58. Poirel, L., Walsh, T. R., Cuvillier, V., & Nordmann, P. (2011). *Multiplex*  
538 *PCR for detection of acquired carbapenemase genes*. *Diagnostic*  
539 *Microbiology and Infectious Disease*, 70(1), 119–  
540 123. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2010.12.002
- 541 59. Ellington MJ, Kistler J, Livermore DM, Woodford N. Multiplex PCR for rapid  
542 detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases [1]. *J*  
543 *Antimicrob Chemother*. 2007;59(2):321-322. doi:10.1093/jac/dkl481  
544

545 Tabela 1 - Iniciadores utilizados na detecção dos genes alvo do estudo.

<b>Alvo</b>	<b>Sequência (5' a 3')</b>	<b>Produto (pb)</b>	<b>Referência</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	GATCGGATTGGAGAACCAGA ATTTCTGACCGCATTTCAT	501	15
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	GGTTAGTTGGCCCCCTTAAA AGTTGAGCGAAAAGGGGATT	246	15
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	TAATGCTTTGATCGGCCTTG TGGATTGCACTTCATCTTGG	353	15
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	AAGTATTGGGGCTTGTGCTG CCCCTCTGCGCTCTACATAC	599	15
<i>bla</i> <sub>OXA-143-like</sub>	TGGCACTTTCAGCAGTTCCT TAATCTTGAGGGGGCCAACC	149	55
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCGC	177	56
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	TCGCTAAACTCGAACAGG TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	785	56
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	TTGGCCTTGCTGTCCTTG ACACCAGTGACAATATCACCG	661	56
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382	57
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	GGAATAGAGTGGCTTAAYTCTC GGTTTAAAYAAAACAACCACC	232	58
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	AAAATCTGGGTACGCAAACG ACATTATCCGCTGGAACAGG	271	59
<i>mcr-1</i>	CGGTCAGTCCGTTTGTTC CTTGGTCGGTCTGTAGGG	309	9

546

547

548 Tabela 2 - Termociclagens empregadas para a investigação dos genes *bla*<sub>OXA-</sub>  
 549 *48-like*, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>NDM-1</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>SPM-1</sub> e *mcr-1*.

Alvo	Desnaturação	Hibridização	Extensão	Ciclos
	°C (tempo)	°C (tempo)	°C (tempo)	n°
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	94 (1 min)	63 (40 s)	72 (30 s)	35
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	94 (1 min)	60 (1 min)	72 (1 min)	40
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	94 (1 min)	62 (1 min)	72 (1 min)	35
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	94 (30 s)	68,8 (1 min)	72 (1 min)	40
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	94 (30 s)	52 (40 s)	72 (50 s)	36
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	94 (30 s)	55,5 (40 s)	72 (50 s)	40
<i>mcr-1</i>	94 (30 s)	61,5 (1 min)	72 (30 s)	40

550

551

552 Tabela 3 - Cepas padrão utilizadas no estudo.

<b>Alvo</b>	<b>Microrganismo</b>	<b>Local de origem</b>	<b>n° Origem</b>
<i>bla</i> <sub>OXA-23-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7572
<i>bla</i> <sub>OXA-24-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7892
<i>bla</i> <sub>OXA-51-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	3174
<i>bla</i> <sub>OXA-58-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7740
<i>bla</i> <sub>OXA-143-like</sub>	ABC	Fiocruz/RJ	7572
<i>bla</i> <sub>OXA-48-like</sub>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Lacen/PR	12692 RM
<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Lacen/PR	5379 RM
<i>bla</i> <sub>SPM-1</sub>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Lacen/PR	12486 RM
<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	Lacen/PR	13493 RM
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	<i>Serratia marcescens</i>	Lacen/PR	12492 RM
<i>mcr-1</i>	<i>Escherichia coli</i>	Lacen/PR	12983 RM

553 ABC: Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*; Fiocruz: Fundação

554 Oswaldo Cruz; Lacen: Laboratório Central de Saúde Pública.

555

556

557 Tabela 4 - Distribuição dos bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos durante o período do estudo.

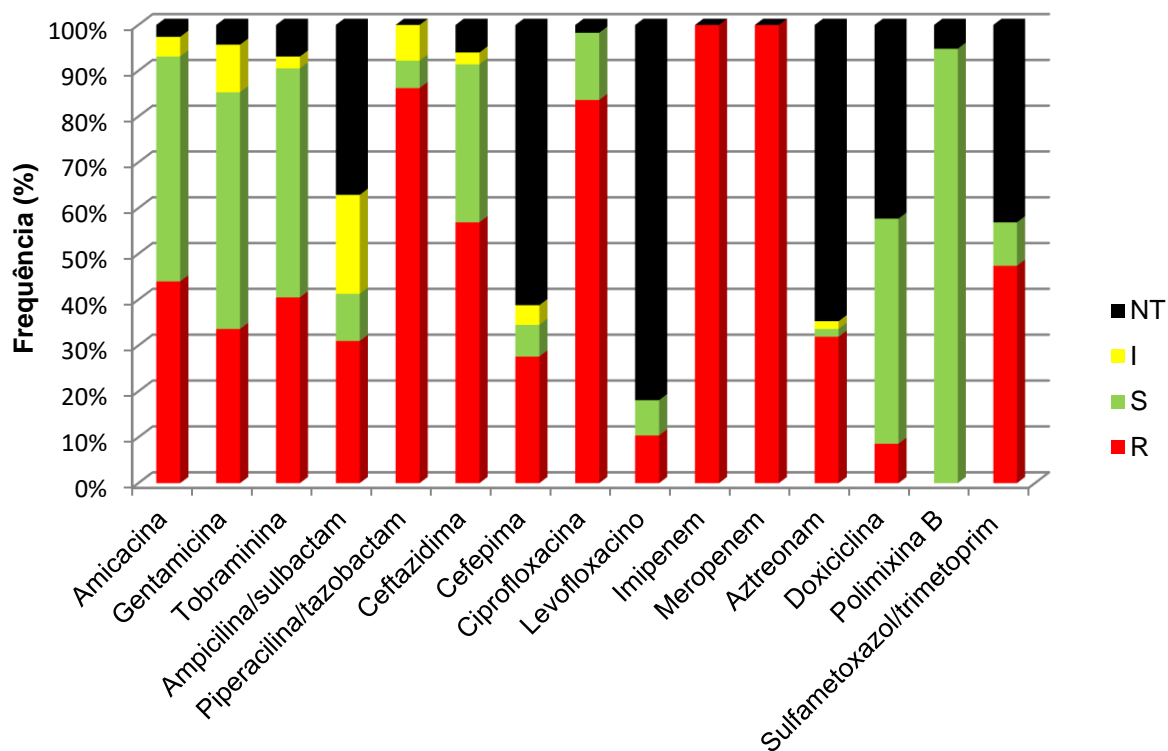
Microrganismo [n (%)]	ANO									Total
	1*	2	3	4	5	6	7	8	9	
ABC	13	11	7	13	14	6	17	35	41	157
<i>Acinetobacter lwofii</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (2)	1 (1)
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (3)	0	1 (1)
<i>Enterobacter</i> sp.	0	0	0	0	0	0	0	1 (3)	0	1 (1)
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	0	0	0	0	0	1 (3)	0	1 (1)
Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	0	0	0	0	0	4 (11)	3 (7)	7 (4)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0	0	0	0	3 (22)	0	9 (54)	7 (20)	12 (29)	31 (19)
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	0	1 (7)	0	0	0	0	1 (1)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (8)	0	1 (14)	3 (23)	1 (7)	1 (17)	4 (23)	16 (46)	16 (39)	43 (27)

558 \*Ano 1: 2009; ABC: complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*.



559 Tabela 5 - Distribuição dos isolados clínicos de acordo com o tipo de amostra e setor hospitalar durante o período do estudo.

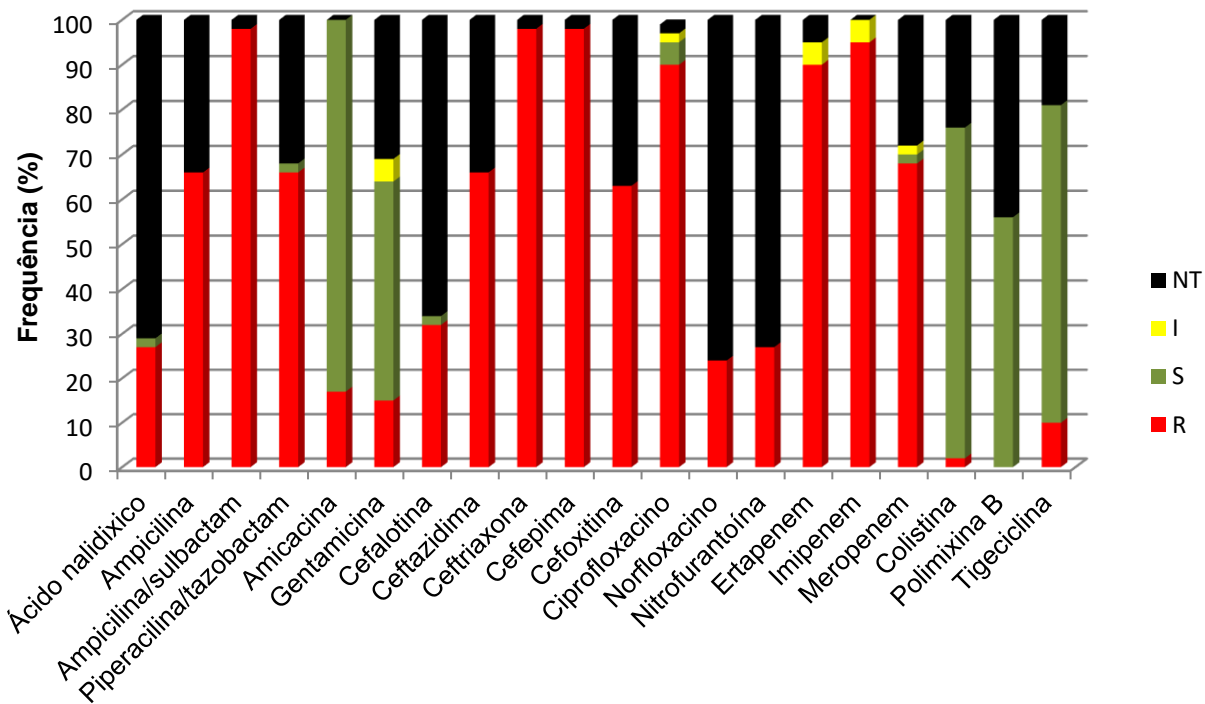
	ANO									Total
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
<b>TIPO DE AMOSTRA</b> <b>[n (%)]</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>35</b>	<b>41</b>	<b>157</b>
Lavado broncoalveolar	8 (61)	5 (45)	2 (29)	8 (61)	5 (36)	2 (33)	4 (24)	10 (29)	4 (10)	48 (31)
Swab retal	0	0	0	0	3 (22)	2 (33)	5 (29)	6 (17)	16 (39)	32 (20)
Secreção de ferida	1 (8)	3 (27)	2 (29)	1 (8)	2 (14)	1 (17)	2 (12)	5 (14)	7 (17)	24 (15)
Urina	1 (8)	0	0	1 (8)	2 (14)	0	4 (23)	7 (20)	7 (17)	22 (14)
Hemocultura	0	2 (18)	0	1 (8)	0	0	2 (12)	1 (3)	3 (7)	9 (6)
Outros:	3 (23)	1 (9)	3 (42)	2 (15)	2 (14)	1 (17)	0	6 (17)	4 (10)	22 (14)
Secreção cirúrgica	0	0	1	0	0	1	0	1	0	3
Úlcera de pressão	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4
Líquido abdominal	0	0	1	1	0	0	0	0	0	2
Líquido pleural	1	0	0	0	1	0	0	0	0	2
Aspirado traqueal	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Ponta de cateter	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Fragmento ósseo	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Líquido peritoneal	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Secreção brônquica	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Secreção de gastrostomia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
Secreção de ouvido	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
Fragmento de tecido	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
Líquor	0	1	0	1	0	0	0	0	0	2
<b>SETOR HOSPITALAR</b> <b>[n (%)]</b>	<b>13</b>	<b>11</b>	<b>7</b>	<b>13</b>	<b>14</b>	<b>6</b>	<b>17</b>	<b>35</b>	<b>41</b>	<b>157</b>
UTI	11 (84)	7 (64)	1 (14)	8 (61)	6 (43)	3 (50)	7 (41)	10 (29)	12 (29)	65 (41)
Unidade de Internação	0	4 (36)	3 (43)	4 (31)	4 (29)	2 (33)	7 (41)	19 (54)	15 (37)	58 (37)
Pronto Atendimento	1(8)	0	0	1 (8)	3 (21)	0	2 (12)	4 (11)	9 (22)	20 (13)
Centro Cirúrgico	1(8)	0	2 (29)	0	0	0	0	0	1 (2)	4 (3)
Externo	0	0	1 (14)	0	1 (7)	1 (17)	1 (6)	2 (6)	4 (10)	10 (6)



560

561 Figura 1. Perfil de suscetibilidade *in vitro* dos bacilos Gram-negativos não  
 562 fermentadores (*Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp.). NT: não testado, I:  
 563 intermediário, S: sensível, R: resistente.

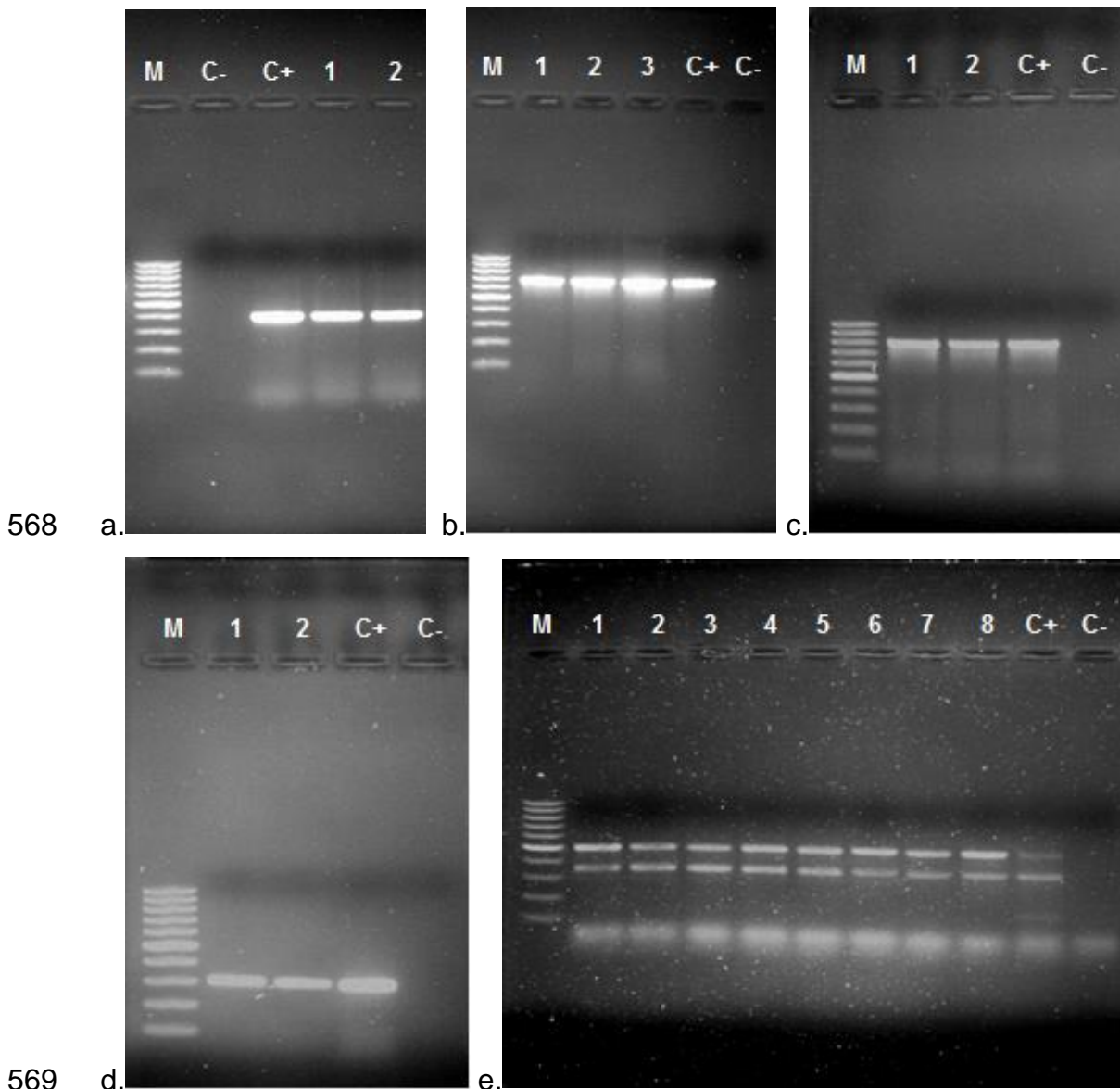
564



565

566 Figura 2. Perfil de suscetibilidade *in vitro* das enterobactérias. NT: não testado,

567 I: intermediário, S: sensível, R: resistente.

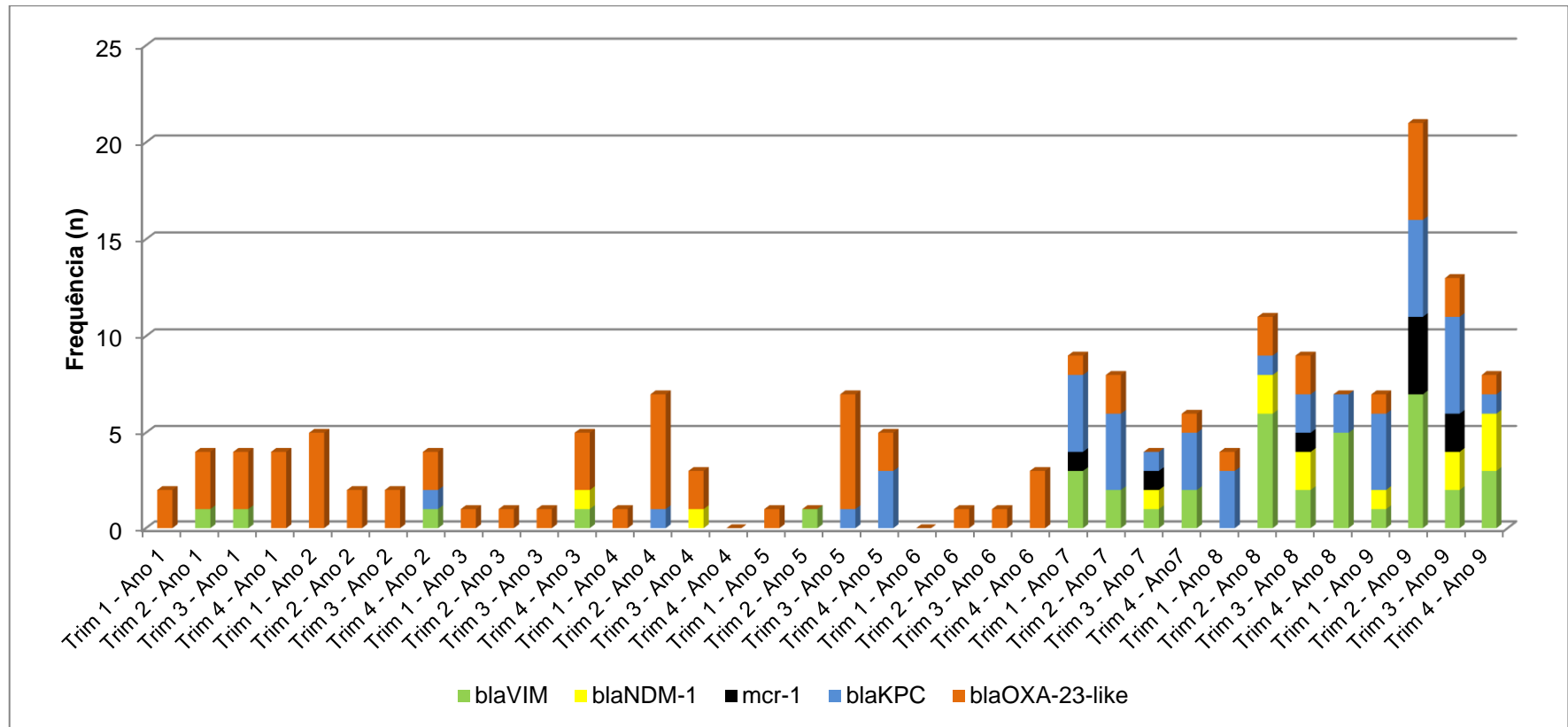


570 Figura 3. Identificação dos elementos genéticos (a) *bla*<sub>VIM</sub>, (b) *bla*<sub>NDM-1</sub>, (c)  
 571 *bla*<sub>KPC</sub>, (d) *mcr-1* e (e) *bla*<sub>OXA's</sub> via PCR. (M) Marcador molecular (100 bp,  
 572 Fermentas, Ontario, Canada); (1-8) Amostras de isolados clínicos; (C+)  
 573 controle positivo e (C-) controle negativo.

574 Tabela 6 - Distribuição dos isolados portadores dos genes investigados.

Microrganismos [% (n/N)]	Genes produtores de carbapenemases de acordo com a classificação de Ambler										
	classe A	classe B			classe D						<i>mcr-1</i>
	KPC	NDM-1	SPM-1	VIM	OXA-48	OXA-51	OXA-23	OXA-24	OXA-58	OXA-143	
ABC	7 (11/157)	1 (2/157)	N/T	6 (9/157)	N/T	96 (69/72)	96 (69/72)	0	0	0	2 (3/157)
<i>Acinetobacter lwofii</i>	1 (1/157)	0	N/T	0	N/T	1 (1/72)	1 (1/72)	0	0	0	0
<i>Citrobacter freundii</i>	0	0	N/T	0	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0
<i>Enterobacter</i> sp.	0	0	N/T	1 (1/157)	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0
<i>Enterobacter aerogenes</i>	0	0	N/T	0	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0
Complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	0	2 (4/157)	N/T	2 (4/157)	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	17 (27/157)	2 (4/157)	N/T	7 (11/157)	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	4 (6/157)
<i>Pseudomonas</i> sp.	0	0	0	0	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1 (2/157)	2 (3/157)	0	9 (14/157)	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	N/T	0

575 ABC: complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*; N/T: não testado; n: número de isolados positivos; N: número total de isolados  
576 testados.



577

578

Figura 4. Distribuição dos marcadores genotípicos durante o período do estudo. Trim: trimestre. Ano 1: 2009.

## 6. CONCLUSÃO

No presente estudo foram investigados o perfil fenotípico e a ocorrência dos principais genes codificantes de resistência aos antibióticos carbapenêmicos e do gene *mcr-1*, associado à resistência às polimixinas, em BGN isolados de pacientes internados ou ambulatoriais, em hospital terciário durante 9 anos consecutivos, a partir de março de 2009. Nossas principais conclusões obtidas foram:

- Todos os isolados testados eram resistentes ao imipenem. Dentre os BGN não fermentadores, as maiores taxas de resistência observadas foram para meropenem (100%), piperacilina/tazobactam (86%) e ciprofloxacina (84%), enquanto para as enterobactérias os antibióticos com maior prevalência de resistência foram as ceftriaxona (98%), cefepime (98%), ampicilina (66%), ampicilina/sulbactam (98%), meropenem (68%) e ertapenem (90%). Todos os isolados testados foram sensíveis para a polimixina B.

- A maioria dos isolados (80,2%) resistentes aos carbapenêmicos foi positiva para um ou mais genes investigados, com maior frequência de *bla<sub>KPC</sub>* (26%) e *bla<sub>VIM</sub>* (25%). Concomitância de genes de resistência foi identificada em 89 (57%) isolados, a maioria destes (79%) pertencente ao ABC, seguido pela *K. pneumoniae* (17%). Todos os 9 (5,7%) isolados portadores do gene *mcr-1* mostraram-se sensíveis à polimixina B.

- A maioria dos BGN resistentes aos carbapenêmicos foram isolados de LBA (31%), seguido de *swab* retal (20%), secreção de ferida (15%), urina (14%) e outros (20%).

- Foi observada uma maior concentração dos isolados clínicos resistentes aos carbapenêmicos nos últimos 3 anos analisados (93 vs. 64 referentes ao 6 primeiros anos da série histórica), com maior prevalência na UTI (41%), unidades de internação (37%) e pronto atendimento (13%).

- Os genes detectados nos isolados de BGN analisados foram os codificantes das carbapenemases *bla<sub>OXA-51-like</sub>* (96% no ABC), *bla<sub>OXA-23-like</sub>* (96% no ABC), *bla<sub>VIM</sub>* (25% - enterobactérias e não fermentadores), *bla<sub>KPC</sub>* (26% - enterobactérias e não fermentadores), *bla<sub>NDM-1</sub>* (8% - enterobactérias e não fermentadores), além do gene *mcr-1* (3 isolados pertencentes ao ABC e 6 *K. pneumoniae*).





## REFERÊNCIAS

- ACUÑA, M. P; et al. Incidencia de bacterias multi-resistentes en unidades de cuidados intensivos de hospitales chilenos. *Rev Chilena Infectol*, v. 34, n. 6, p. 570-575, 2017.
- AIRES, C. A. M; et al. Emergence of plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST392 in Brazil. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.61, n. 7, 2017.
- ALBIGER, B; et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe: assesment by nacional experts from 38 countries, may 2015. *Euro Surveillace*, v. 20, n. 45, 2015.
- AL-TAWFIQ, J. A; TAMBYAH, P. A. Healthcare associated infections (HAI) perspectives. *Journal of Infection and Public Health*, v. 7, p. 339 - 344, 2014.
- AMBLER, R. The structure of  $\beta$ -lactamase. *Philosophical Transactions of the Royal Society: Biological Sciences*, v. 289, p. 321-331, 1980.
- ANVISA. Nota Técnica nº 01/2013: Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multiresistentes. Brasil, abril, 2013.
- ANVISA. Programa nacional de prevenção e controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (2013 – 2015). Brasil, setembro, 2013.
- ANVISA. Segurança do paciente: Higienização das mãos. Brasil, maio, 2014.
- ANVISA. Nota Técnica GVIMS/GGTES/ANVISA nº 02/2015: Orientações gerais para a implantação da sub-rede analítica de resistência microbiana em serviços de Saúde. Brasil, abril, 2015.

ANVISA. Boletim Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde nº16: Avaliação dos indicadores nacionais das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e Resistência microbiana do ano de 2016. Brasil, dezembro, 2017.

ANVISA. Diretriz nacional para elaboração de programa de gerenciamento do uso de antimicrobianos em serviços de saúde. Brasil, dezembro, 2017.

ATAIDE, L. A; ABADE, S. M. M. Enterobactérias Resistentes a Carbapenêmicos: Estudo em Hospital Universitário. *Jornal of Infection Control*, v. 4, n. 4, 2015.

BARATTO, C.M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de DNA de bactérias para utilização em RAPD-PCR. *Unoesc & Ciência – ACET*, v. 3, n. 1, p. 121-130, 2012.

BARBERINO, M. G; et al. Isolation of blaNDM-producing Enterobacteriaceae in a public hospital in Salvador, Bahia, Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, v. 22, n. 1, p. 47-50, 2017.

BHARGAVA, D; KAR, S e SAHA, M. Prevalence of non-fermentative gram negative bacilli infection in tertiary care hospital in Birgunj, Nepal. *International Journal of Current Microbiology Applied Sciences*, v. 4, n. 7, p. 301-307, 2015.

BONNIN, R. A; et al. Detection of GES-5 Carbapenemase in *Klebsiella pneumoniae*, a Newcomer in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 61, n. 3, p. 1-4, 2017.

BRASIL - Portaria nº 2616/MS/GM, de 12 de maio de 1998. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF. Maio, 1998. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/portarias/2616-98.htm>. Acesso em 10 de agosto, 2016.

BRAUN, S. D; et al. Rapid identification of carbapenemase genes in gram-negative bacteria with an oligonucleotide microarray-based assay. *Plos One*, v. 9, n. 7, julho, 2014.

BUSHNELL, G; et al. Emergence of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase type 1-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae: global case detection and bacterial surveillance. *International Journal of Infectious Diseases*, 2013.

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

CARVALHO-ASSEF, A. D; et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *Journal of Antimicrobial Chemoterapy*, v. 68 n.12, p. 2956-2917, 2013.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Antibiotic resistance threats in the United States, 2013. Abril, 2013. Disponível em: <http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013>. Acessado em: 18 de julho, 2016.

Centers for Disease Control and Prevention (CDC). How infections spread. Março, 2017. Disponível em: <https://www.cdc.gov/infectioncontrol/spread/index.html>. Acessado em: 22 de setembro, 2018.

CHENG, H. Y; et al. Molecular characterization of the PhoPQ-PmrDPmrAB mediated pathway regulating polymyxin B resistance in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Journal of Biomedical Science*, v. 17, n. 60, 2010.

CHERKAOUI, A; et al. Characteristics of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains isolated in Geneva during colonization or infections. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, v. 14, n. 42, p. 1-7, 2015

CODJOE, F. S; DONKOR. E. S. Carbapenem resistance: A review. *Medical Science*, v. 6, n. 1, p. 2-28, 2018.

COLOMB-COTINAT, M; et al. Estimating the morbidity and mortality associated with infections due to multidrug-resistant bacteria (MDRB), France, 2012. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 5, n. 56, 2016.

CONCEIÇÃO-NETO, O. C; et al. Detection of the plasmid-mediated *mcr-1* gene in clinical KPC-2-producing *Escherichia coli* isolates in Brazil. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 50, n. 2, p. 282-284, 2017.

CORNEJO-JUÁREZ, P; et al. The impact of hospital-acquired infections with multidrug-resistant bacteria in an oncology intensive care unit. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 31, p. 31-34, 2015.

DALMOLIN, T. V; et al. Acquisition of the *mcr-1* gene by a high-risk clone of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST437/CC258, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 90, n. 2, p. 132-133, 2018.

DELIBERALI, B; et al. Prevalência de bacilos Gram-negativos não fermentadores de pacientes internados em Porto Alegre-RS. *Jornal Brasileiro de Patologia Medica Laboratorial*, v. 47, n. 5, p. 529-534, 2011.

DIJKSHOORN, L; NEMEC, A e SEIFERT, H. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nature Reviews Microbiology*, v. 5, p. 939–951, 2007.

ELLINGTON, M.J; Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 59, p. 321-322, 2007.

European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Rapid risk assessment: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. Stockholm, 2016.

FERNANDES, M. R. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro Surveillance*, n. 21, v. 17, 2016.

FERNANDES, M. R; et al. First report of the globally disseminated IncX4 plasmid carrying the *mcr-1* gene in a colistin-resistant *Escherichia coli* sequence type 101 isolate from a human infection in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, n. 60, v. 10, p. 6415-6417, 2016.

FIGUEIREDO, D. A., TOLEDO, R. P. V. e NASCIMENTO J. A. Epidemiologia da infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva de um hospital público municipal de João Pessoa-PB. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 17, n. 3, p. 233-240, 2013.

FILIUS P.M; et al. Colonization and resistance dynamics of gram-negative bacteria in patients during and after hospitalization. *Antimicrob Agents Chemother*, vol. 49: 2879–86, 2005.

GALES, A. C; et al. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- $\beta$ -lactamase. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 52, n. 4, p. 699-702, 2003.

GARCIA, L.M; et al. Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.

GASPAR, M. D. R; BUSATO, C. R. e SEVERO, E. Prevalência de infecções hospitalares em um hospital geral de alta complexidade no município de Ponta Grossa. *Acta Scientiarum: Health Sciences*, v. 34, n. 1, p. 23-29, 2012.

GHUYSEN, A. M. Serine  $\beta$ -lactamases and penicillin-binding proteins. *Annual Review of Microbiology*, v. 45, p. 37-67, 1991.

GOMES, A. C; CARVALHO, P. O. DE; LIMA, E. T. A; et al. Caracterização das infecções relacionadas à assistência à saúde em unidade de terapia intensiva. Revista de enfermagem UFPE. Recife, vol.8 n. 6: 1577-85, 2014.

GOMEZ, C. H; et al. Evolución de la resistencia antimicrobiana de bacilos Gram negativos en unidades de cuidados intensivos en Colombia. Biomédica, v. 34, n. 1, p. 91-100, 2014.

GONÇALVES, I. R; et al. Carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: association with virulence genes and biofilm formation. Brazilian Journal of Microbiology, n. 48, p. 211-217, 2017.

GOVERNO DE SANTA CATARINA. Nota técnica 01/2016/CECISS/LACEN. Estabelece o Plano de gerenciamento das ações a ser adotado pelos Serviços de Saúde públicos e privados para redução de Eventos Adversos Infeciosos e orienta quanto ao diagnóstico laboratorial e fluxo de encaminhamento das bactérias multirresistentes ao LACEN-SC. Disponível em: <<http://www.saude.sc.gov.br/index.php/informacoes-gerais-documentos/vigilancia-em-saude/ceciss/legislacao-estadual-ceciss/10654-nota-tecnica-01-2016-ceciss-lacen/file>>. Acesso em: 15 dez. 2018.

HIGGINS, P.G.; LEHMANN, M.; SEIFERT, H. Inclusion of OXA-143 primers in a multiplex polymerase chain reaction (PCR) for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter* spp. International Journal of Antibicrobial Agents, v. 35, n. 3, p. 305, 2010.

HONG, D. J; et al. Epidemiology and characteristics of metallo- $\beta$ -lactamase-Producing *Pseudomonas aeruginosa*. Infection & Chemother, n. 47, v. 2, p. 81-97, 2015.

HOPKINS, K. L; et al. SPM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 in the UK. Journal of Medical Microbiology, v. 65, p. 696-697, 2016.

IRRGANG, A. Prevalence of *mcr-1* in *E. coli* from Livestock and Food in Germany, 2010–2015. *Plos One*, v. 11, n. 7, 2016.

JACOB, J. T; et al. Vital signs: Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 62, n. 9, p. 165-169, 2013.

JACOBS, C., ALVES, I. A. Identificação de microrganismos veiculados por vetores mecânicos no ambiente hospitalar em uma cidade da região noroeste do estado Rio Grande do Sul. *Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção*, v. 4, n. 4, p. 238-242, 2014.

JOHNSON, A. P; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo- $\beta$ -lactamase (NDM)- mediated carbapenem resistance. *Journal of Medical Microbiology*, v. 62, n. 4, p. 499-513, 2013.

KAASE, M; et al. Detection of carbapenemases in *Enterobacteriaceae* by a commercial multiplex PCR. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 50, n. 9, p. 3115-3118, setembro, 2012.

KARAM, G; et al. Antibiotic strategies in the era of multidrug resistance. *Critical Care*, v. 20, n. 136, p. 1-9, 2016.

KUMARASAMY, K; et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet*, v. 10, p. 597-602, 2010.

LABARCA, J. A; et al. Carbapenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii* in the nosocomial setting in Latin America. *Critical Reviews in Microbiology*, v. 42, n. 2, p. 276–292, 2016.

LAURETTI, L; et al. Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, julho, 1999.

LEE, C. R; et al. Global dissemination of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: Epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. 895, p. 1-30, 2016.

LINCOPAN, N; et al. First isolation of metallo- $\beta$ -lactamase-producing multiresistant *Kebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 43, n. 1, p. 516-519, janeiro, 2005.

JIANG, X. W; et al. Biochemical and genetic characterization of a novel metallo- $\beta$ -lactamase from marine bacterium *Erythrobacter litoralis* HTCC 2594. *Nature/Scientific Reports*, v. 8, n. 803, p. 1-9, 2018.

LIU, Y; et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study. *The Lancet*, v. 16, fevereiro, 2016.

LIVERMORE, D. M.  $\beta$ -lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 8, n. 4, p. 557-584, outubro, 1995.

LOLANS, K; et al. Multicity outbreak of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates producing the carbapenemase OXA-40. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 9, p. 2941–2945, 2006.

MACNAIR, C. R; et al. Overcoming *mcr-1* mediated colistin resistance with colistin in combination with other antibiotics. *Nature Communications*, v. 9, n.1, p. 1-8, 2018.

MAGILL, S. S; et al. Multistate Point-Prevalence Survey of Health Care–Associated Infections. *The New England Journal of Medicine*, v. 370, n° 13, p. 1198-1208, março, 2014.



MAKENA, A; et al. Comparison of Verona Integron-Borne Metallo--Lactamase (VIM) Variants Reveals Differences in Stability and Inhibition Profiles. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 60, n. 3, p. 1377-1384, março, 2016.

MALATHI, K; RAMAIAH, S. Mechanism of imipenem resistance in metallo- $\beta$ -lactamases expressing pathogenic bacterial spp. and identification of potential inhibitors: An in silico approach. *Journal of Cellular Biochemistry*, p. 1-8, 2018.

MARTINS, W. M. B. S; et al. SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* ST277 clone recovered from microbiota of migratory birds. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 90, n. 3, p. 221-227, 2017.

MALINI, A; et al. Nonfermenting gram-negative bacilli infections in a tertiary care hospital in Kolar, Karnataka. *Journal of Laboratory Physicians*, v. 1, n. 2, jul/dez, 2009.

MARTINS, L. R. L; et al. Common phenotypic and genotypic antimicrobial resistance patterns found in a case study of multiresistant *E. coli* from cohabitant pets, humans, and household surfaces. *Journal of Environmental Health*, v. 75, n. 6, p. 74-81, jan/ fev, 2013.

MARTINS, A. F. e BARTH, A. L. Acinetobacter multirresistente – um desafio para a saúde pública. *Scientia Medica*, v. 23, n. 1, p. 56-62. Porto Alegre, 2013.

MATHUR, P. e SINGH, S. Multidrug resistance in bacteria: a serious patient safety challenge for India. *Journal of Laboratory Physicians*, v. 5, n.1, p. 5-10, jan/ jun, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3758706/>. Acesso em: 19 de agosto, 2016.

MEDEIROS, M; LINCOPAN, N. Oxacillinase (OXA)-producing *Acinetobacter baumannii* in Brazil: clinical and environmental impact and therapeutic options. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 49, n. 6, p. 391-405, 2013.

MEHRAD, B; CLARK, N. M; Zhanel, G. G. e LYNCH, J. P. Antimicrobial resistance in hospital-acquired gram-negative bacterial infections. *Contemporary Reviews in Critical Care Medicine*, v. 147, n. 5, p. 1413–1421, 2015.

MELETIS, G. Carbapenem resistance: overview of the problem and future perspectives. *Therapeutic Advances in Infectious Disease*, v. 3, n.1, p. 15-21, 2016.

MENDES, R. E; et al. Rapid detection and identification of metallo- $\beta$ -lactamase-encoding genes by multiplex real-time pcr assay and melt curve analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 2, p. 544-547, fevereiro, 2007.

MENDES, A. C; et al. *mcr-1* in Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae* in hospitalized patients, Portugal, 2016–2017. *Emerging Infectious Diseases*, v. 24, n. 4, abril, 2018.

MOJICA, M. F; et al. B1-Metallo-beta-Lactamases: Where do we stand? *Current Drug Targets*, v. 17, n. 9, p. 1029–1050, 2016.

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

MONTEIRO, J; et al. Rapid detection of carbapenemase genes by multiplex real-time PCR. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 67, p. 906-909, janeiro, 2012.

MOURA, M. E. B; et al. Infecção hospitalar: estudo de prevalência em um hospital público de ensino. *Revista Brasileira de Enfermagem*, Brasília, v. 60, n. 4, p. 416-421, jul/ ago, 2007.

MURRAY, P. R; ROSENTHAL, K. S e PFALLER, M. A. *Microbiologia Médica*. 7 ed, Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

NEWTON-FOOT, M; et al. Plasmid-mediated *mcr-1* colistin resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. clinical isolates from the Western Cape region of South Africa. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, v. 6, n. 78, 2017.

NICOLETTI, A. G, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. v. 59, n. 9, p. 5159–5164, setembro, 2015.

NOGUEIRA, P. S. F; et al. Perfil da infecção hospitalar em um hospital universitário. *Revista de Enfermagem da Universidade Estadual do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro*, v. 17, n. 1, p. 96-101. jan/ mar, 2009.

NORDMANN, P e POIREL, L. Emerging carbapenemases in gram-negative aerobes. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 8, n. 6, junho, 2002.

NORDMANN, P; et al. Comparative activity of carbapenem testing: the COMPACT study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, n. 5, p. 1070-1078, 2011.

NORDMANN, P; et al. Emergence of an autochthonous and community-acquired NDM-1 – Producing *Klebsiella pneumoniae* in Europe. *Clinical Infectious Diseases*, v. 54, n. 1, p. 150-151, setembro, 2012.

NORDMANN, P; POIREL, L e DORTET, L. Rapid detection of carbapenemase producing Enterobacteriaceae. *Emerging Infectious Diseases*, v. 18, n. 9, setembro, 2012.

NORDMANN, P e POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among Enterobacteriaceae worldwide. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 20, n. 9, setembro, 2014.

OLIVEIRA, A. C. e DAMASCENO, Q. S. Superfícies do ambiente hospitalar como possíveis reservatórios de bactérias resistentes: uma revisão. *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 44, n. 4, p. 1118-1123, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Infecções relacionadas à assistência em saúde e gravidade clínica em uma unidade de terapia intensiva. *Revista Gaúcha de Enfermagem*, v. 33, n. 3, p. 89-96, 2012.

OLIVEIRA, A.C; SILVA, R. S; PISCOYA D. M. E e IQUIAPAZA R. A. Resistência bacteriana e mortalidade em um centro de terapia intensiva. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*. nov-dez, 2010. Disponível em: [http://www.scielo.br/pdf/rlae/v18n6/pt\\_16.pdf](http://www.scielo.br/pdf/rlae/v18n6/pt_16.pdf). Acesso em: 19 de ago 2016.

PALZKILL, T. Metallo- $\beta$ -lactamase structure and function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1277: 91–104, março, 2012.

PADOVEZE, M. C; FORTALEZA, C. M. C. B. Infecções relacionadas à assistência à saúde: desafios para a saúde pública no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, n. 6, p. 995-1001, 2014.

PATON, R; et al. ARI 1:  $\beta$ -lactamase-mediated imipenem resistance in *Acinetobacter baumannii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 2, p. 81-88, 1993.

PELLEGRINO, F. L. P. C. et al. Occurrence of a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* clone in different hospitals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 40, n. 7, p. 2420-2424, julho, 2002.

PINTO, F. M. et al. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. *Clinical and Biomedical Research*, v. 34, n. 1, 2014.

PITOUT, J. D. D; et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 10, p. 5873-5884, 2015.

POIREL, L; et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 70, n. 1, p. 119–123, 2011.

PRINCIPE, L; et al. Multicenter prospective study on the prevalence of colistin resistance in *Escherichia coli*: relevance of *mcr-1*-positive clinical isolates in Lombardy, Northern Italy. *Infection and Drug Resistance*, v. 11, p. 377–385, 2018.

ROSSI, F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clinical Infectious Diseases*, v. 52, n. 9, p. 1138–1143, 2011.

ROSSI, F; et al. Plasmid-mediated *mcr-1* in carbapenem-susceptible *Escherichia coli* ST156 causing a blood infection: an unnoticeable spread of colistin resistance in Brazil *Clinics*, v. 72, n. 10, p. 642-644, 2017.

SALABI, A. E; et al. First Report of the Metallo- $\beta$ -Lactamase SPM-1 in Europe. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 54, n. 1, p. 582, 2010.

SAMPAIO, J. L. M.; GALES, A. C. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae in Brazil: focus on B-lactams and polymyxins. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. BJM-165, p. 1–7, 2016.

SANTOS, G. S. Fatores de risco para a ocorrência de bactérias multirresistentes em pacientes críticos. 2016. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

SACHA, P; et al. Metallo- $\beta$ -lactamases of *Pseudomonas aeruginosa* - a novel mechanism resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Folia Histochem Cytobiol*, v. 26, n. 2, p. 137-142, 2008.

SEIBERT, G; et al. Infecções hospitalares por enterobactérias produtoras de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase em um hospital escola. *Einstein*, v. 12, n. 3, p. 282-286, 2014.

SERIKOV, Inna et al. Epidemiologic and genotypic review of carbapenemase-producing organisms in british Columbia, Canada, between 2008 and 2014. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 54, n. 2, p. 317-327, fevereiro, 2016.

SHAKIBAIE, M. R; et al. Insight into stereochemistry of a new IMP allelic variant (IMP-55) metallo- $\beta$ -lactamase identified in a clinical strain of *Acinetobacter baumannii*. *Infection, Genetics and Evolution*, n. 51, p. 118-126, 2017.

SOUZA, E. S. et al. Mortalidade e riscos associados a infecção relacionada à assistência à saúde. *Texto & Contexto - Enfermagem*, v. 24, n. 1, p. 220-228, jan/mar, 2015.

SVALDI, J. S. D; SIQUEIRA, H. C. H. Ambiente hospitalar saudável e sustentável na perspectiva ecossistêmica: contribuições da enfermagem. *Escola Anna Nery*, v. 14, n. 3, p. 599-604, 2010.

VANEECHOUTTE, M.; DIJKSHOORN, L.; TJERNBERG, I. Identification of *Acinetobacter* genomic species by amplified ribosomal DNA restriction analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 33, p. 11-15, 1995

VASQUEZ, A. M; et al. Investigation of *Escherichia coli* harboring *mcr-1* resistance gene – Connecticut, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 65, n. 36, p. 979-980, 2016.

WANG, H; et al. Molecular epidemiology of clinical isolates of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from chinese hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, v. 51, n. 11, p. 4022–4028, 2007.

WANG, D; et al. Characterization of *bla<sub>OXA-23</sub>* gene regions in isolates of *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*, v. 48, p. 284-290, 2015.

WATANABE, M; et al. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, n. 1, v. 35, p. 147-151, janeiro, 1991.

WILSON, A. P. R; et al. Prevention and control of multidrug-resistant gram-negative bacteria: recommendations from a joint working party. *Journal of Hospital Infection*, v. 92: S1 - S44, 2016.

WOODFORD, N.; ELLINGTON, M.J.; COELHO, J.M. et al. Multiplex PCR for genes encoding prevalent OXA carbapenemases in *Acinetobacter spp.* *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 27, n. 4, p. 351-353, 2006.

World Health Organization (WHO). Clean care is safer care: global patient safety challenge 2005-2006. Suíça, 2005.

World Health Organization (WHO). Global action plan on antimicrobial resistance. Suíça, 2015.

World Health Organization (WHO). Global antimicrobial resistance surveillance system (GLASS) report: early implementation 2016-2017. Geneva, 2017.

World Health Organization (WHO). One health. Setembro, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/features/qa/one-health/en/>>. Acesso em: 05/12/2018.

WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Chemical Communications*, v. 47, n. 14, p. 4055-4061.

YIGIT, H; et al. Novel carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 45, n. 4, p. 1151–1161, 2008.

YOON, E. J; et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producers in South Korea between 2013 and 2015. *Frontiers in Microbiology*, v. 9, 2018.

YONG, D; et al. Characterization of a New Metallo- $\beta$ -Lactamase gene, *bla*<sub>NDM-1</sub>, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence Type 14 from India. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 53, n. 12, p. 5046-5054, 2009.

ZIÓŁKOWSKI, G. et al. Antibiotic consumption versus the prevalence of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* and *Clostridium difficile* infections at an ICU from 2014–2015. *Journal of Infection and Public Health*, 2018.



**APÊNDICE I** - Distribuição dos isolados quanto ao sítio anatômico e unidade de internação coletados, identificação fenotípica do microrganismo, perfil de sensibilidade fenotípica e marcadores genotípicos de resistência aos antimicrobianos.

Nº paciente	Data da coleta da cultura	Sítio	Unidade de internação	Microrganismo (fenótipo)	PERFIL GENOTÍPICO	PERFIL FENOTÍPICO
732941	02/10/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero
750380	01/03/2010	6	7	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
756991	24/12/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
720169	19/08/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero
720479	20/08/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero
723552	30/08/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
725689	07/09/2009	17	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
679168	31/03/2009	18	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
680022	02/04/2009	12	3	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
725758	08/09/2009	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
764442	25/01/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
773700	24/02/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
774540	26/02/2010	8	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
777722	08/03/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
789007	12/04/2010	20	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
789809	14/04/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
802722	27/05/2010	6	7	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
814601	07/07/2010	5	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Imi, Mero
831555	31/08/2010	6	6	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami*, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
848229	21/10/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
850919	29/10/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
875141	20/01/2011	5	7	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Caz*, Imi, Mero
899601	02/04/2011	15	3	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero
929763	05/07/2011	3	10	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Imi, Mero, Tri/Sulf
949633	02/09/2011	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
982196	09/12/2011	19	6	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Gen*, Tobra*, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
984024	16/12/2011	4	3	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen*, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1020226	08/04/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1041660	07/06/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1041661	07/06/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1044936	15/06/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero
1055762	13/07/2012	20	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1067694	15/08/2012	5	6	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1067424	15/08/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1074727	03/09/2012	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Caz, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1097249	06/11/2012	3	6	ABC	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Doxi, Imi, Mero
1101405	17/11/2012	6	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami*, Tobra, Imi, Mero, Tri/Sulf
1159999	29/04/2013	8	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1207788	11/09/2013	2	10	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1221280	22/10/2013	18	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1221979	25/10/2013	6	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1222454	25/10/2013	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1226279	06/11/2013	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1229629	17/11/2013	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1243322	09/01/2014	2	4	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Imi, Mero, Tri/Sulf
1252824	09/02/2014	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1301292	15/07/2014	2	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1343547	29/11/2014	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf

1363038	05/02/2015	4	8	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1365125	11/02/2015	2	10	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1368351	22/02/2015	6	7	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1500466	02/05/2016	2	11	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1388083	23/04/2015	2	7	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1522736	21/07/2016	5	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1523392	23/07/2016	6	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1635653	21/08/2017	5	1	<i>Acinetobacter lwofii</i>	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1638424	30/08/2017	6	11	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>mcr-1</i>	Pipe/Tazo, Ami, Gent, Caz, Doxi, Imi, Mero, Tri/Sulf
1423751	18/08/2015	2	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1631472	06/08/2017	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1595448	06/04/2017	6	10	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Pipe/Tazo, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1539709	20/09/2016	3	11	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1539709	20/09/2016	7	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Azt, Imi, Mero
1642063	12/09/2017	8	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-1</i>	Ac.Nal, Cipro, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1470493	25/01/2016	3	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Cefe, Ert, Imi, Mer
1643034	15/09/2017	8	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Ac.Nal, Cipro, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1521735	17/07/2016	7	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mer
1575245	26/01/2017	3	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Imi, Mero
1612917	02/06/2017	2	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Genta, Tobra, Imi, Mero
1562780	09/12/2016	8	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo*, Azt, Cefe, Imi, Mero
1482882	05/03/2016	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Amp*, Pipe/Tazo, Ami, Imi, Mer
1575408	27/01/2017	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Pipe/Tazo*, Tobra, Azt, Cefe*, Imi, Mero
1611665	02/06/2017	13	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Genta, Tobra, Cefe, Imi, Mero
1531122	19/08/2016	2	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1574135	23/01/2017	6	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Pipe/Tazo, Azt, Caz*, Cefe*, Imi, Mero
1615625	12/06/2017	6	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Azt, Imi, Mero
1558574	27/11/2016	14	6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1529374	13/08/2016	2	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1490833	31/03/2016	3	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Pipe/Tazo, Ami, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1615427	12/06/2017	8	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Ac. Nal, Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Azt, Cefe, Imi, Mero
1565697	23/12/2016	3	8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo*, Ami, Gen, Tobra, Azt*, Imi, Mer
1505119	17/05/2016	6	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Azt, Imi, Mero
1529328	13/08/2016	6	6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Pipe/Tazo, Ami*, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1558564	25/11/2016	10	6	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1544374	06/10/2016	8	11	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1458414	10/12/2015	5	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1529398	13/08/2016	2	2	<i>Citrobacter freundii</i>	negativo	Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1522736	21/07/2016	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Imi, Mero
1478183	10/02/2016	2	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Genta, Tobra, Azt, Cefe*, Imi, Mero
1584051	27/02/2017	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Caz, Cefe, Imi, Mero
1527326	06/08/2016	4	8	<i>Enterobacter</i> sp.	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert*, Imi, Mero
1496657	19/04/2016	8	6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero, Tige, Coli
1504099	14/05/2016	2	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1526045	02/08/2016	3	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1494892	12/04/2016	8	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Ac. Nal, Cipro, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi
1522881	21/07/2016	2	1	<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativo	Cipro*, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert*, Imi*
1583547	26/02/2017	8	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Ac. Nal, Cipro, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1594318	04/04/2017	2	10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1521943	18/07/2016	9	7	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero, Tige
1529685	15/08/2016	8	1	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Ac. Nal, Cipro, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Mero
1456949	06/12/2015	8	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Ac. Nal, Nor, Amp/Sulb, Ami, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit

1591519	24/03/2017	2	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Imi, Mer
1636407	23/08/2017	5	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-1</i>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mer
1567804	30/12/2016	6	6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1596201	08/04/2017	2	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1601408	29/04/2017	6	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1416357	26/07/2015	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Tobra, Cefe, Imi, Mero, Tri/Sulf
1550826	29/10/2016	8	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Ac, Nal, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit, Tige
1647033	29/09/2017	2	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero
993131	19/12/2011	6	7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Cefe, Imi, Mero
867533	22/12/2010	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
692303	13/05/2009	6	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Pipe/Tazo, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
982167	08/12/2011	6	6	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Gen*, Tobra*, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1058438	21/07/2012	15	6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1182279	30/06/2013	3	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen*, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1243322	09/01/2014	2	4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1242170	05/01/2014	6	6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Pipe/Tazo, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1251338	04/02/2014	8	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1210569	20/09/2013	16	7	<i>Pseudomonas sp.</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Ami*, Gen*, Azt, Caz, Cefe*, Imi, Mer
1316337	02/09/2014	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Cefl*, Imi, Mero
1047384	21/06/2012	8	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo*, Ami, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1134308	26/02/2013	3	7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Azt, Caz*, Cefe, Imi, Mero
1594849	03/04/2017	3	3	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1613621	05/06/2017	8	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>mcr-1</i>	Ac, Nal, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Mero, Nit, Tige
1386976	20/04/2015	3	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen*, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi*, Mero*
1391119	04/05/2015	8	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>mcr-1</i>	Cipro, Nor, Amp/Sulb, Ami, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1473881	04/02/2016	6	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Imi, Mero, Tri/Sulf
1557148	21/11/2016	3	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>mcr-1</i>	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1411408	09/07/2015	8	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Ac, Nal, Cipro, Nor, Amp/Sulb, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1453433	24/11/2015	8	6	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>mcr-1</i>	Ac, Nal, Cipro, Nor, Amp/Sulb, Ami, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1375152	15/03/2015	5	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1381146	02/04/2015	2	10	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	negativo	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Cfo, Cro, Caz, Ert, Imi, Mero
1614456	08/06/2017	3	1	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1621957	04/07/2017	6	10	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub> , <i>mcr-1</i>	Cipro, Amp/Sulb*, Pipe/Tazo, Ami, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1407852	27/06/2015	2	1	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1410471	06/07/2015	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo*, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1438990	07/10/2015	6	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1628890	27/07/2017	2	2	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Caz, Imi, Mero, Tri/Sulf
1630943	04/08/2017	3	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1645091	22/09/2017	6	7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo*, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1645163	23/09/2017	7	11	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo*, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1649993	10/10/2017	2	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo*, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1657510	06/10/2017	2	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1640485	06/09/2017	8	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Cefe, Imi, Mero
1640796	07/09/2017	8	2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Ac, Nal, Nor, Pipe/Tazo, Azt, Cefe, Imi, Mero
1654881	27/10/2017	17	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Pipe/Tazo, Caz, Cefe, Imi, Mero
1651189	15/10/2017	2	11	ABC	negativo	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami*, Caz, Cefe, Imi, Mero
1640312	05/09/2017	5	1	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Imi, Mero
1640293	05/09/2017	2	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Cipro, Pipe/Tazo, Ami, Tobra, Azt, Cefe*, Imi, Mero
1663791	28/11/2017	2	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Ami, Gen, Tobra, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1673954	06/01/2018	8	2	complexo <i>Enterobacter cloacae</i>	negativo	Ac, Nal, Nor, Amp/Sulb, Ami, Cefl, Cro, Cefe, Ert, Imi, Nit
1675151	12/01/2018	7	11	ABC	<i>bla</i> <sub>OXA-51</sub> , <i>bla</i> <sub>OXA-23</sub> , <i>bla</i> <sub>VIM</sub>	Cipro, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Ami, Imi, Mero, Tri/Sulf
1676777	16/01/2018	2	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero

1676780	16/01/2018	2	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, bla<sub>VIM</sub></i>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1680723	29/01/2018	6	6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub></i>	Pipe/Tazo, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1661525	20/11/2017	2	2	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla<sub>NDM-1</sub>, mcr-1</i>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Gen, Cfo, Cro, Caz, Cefe, Ert, Imi, Mero
1659883	14/11/2017	2	1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativo	Ac. Nal, Cipro, Levo, Pipe/Tazo, Gen, Tobra, Azt, Caz, Cefe, Imi, Mero
1682886	05/02/2018	2	11	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla<sub>VIM</sub></i>	Cipro, Amp, Amp/Sulb, Pipe/Tazo, Cfo, Cro, Caz, Ert, Imi, Mero

**Sítio:** (1) Líquido de drenagem; (2) *Swab* retal; (3) Lavado broncoalveolar; (4) Secreção cirúrgica; (5) Sangue; (6) Secreção de ferida; (7) Úlcera de pressão; (8) Urina; (9) Ponta de cateter; (10) Fragmento ósseo; (11) Partes moles; (12) Líquido peritoneal; (13) Secreção brônquica; (14) Secreção de gastrostomia; (15) Líquido abdominal; (16) Secreção de ouvido; (17) Aspirado traqueal; (18) Líquido pleural; (19) Fragmento de tecido; (20) Líquor.

**Setor:** (1) Unidade de Terapia Intensiva; (2) Pronto Atendimento; (3) Centro Cirúrgico; (4) Unidade de Internação A; (5) Unidade de Internação B; (6) Unidade de Internação C; (7) Unidade de Internação D; (8) Unidade de Internação G; (9) Centro Obstétrico; (10) Atendimento Ambulatorial; (11) Unidade de Internação H.

**Microrganismo:** (ABC) Complexo *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii*.

**Perfil fenotípico:** (Ac. Nal) Ácido nalidíxico; (Ami) Amicacina; (Amp) Ampicilina; (Amp/Sulb) Ampicilina + Sulbactam; (Azt) Aztreonam; (Caz) Ceftazidima; (Cefe) Cefepima; (Cefl) Cefalotina; (Cfo) Cefoxitina; (Cipro) Ciprofloxacino; (Col) Colistina; (Cro) Ceftriaxona; (Doxi) Doxiciclina; (Ert) Ertapenem; (Gen) Gentamicina; (Imi) Imipenem; (Levo) Levofloxacino; (Mero) Meropenem; (Nit) Nitrofurantoína; (Nor) Norfloxacino; (Pipe/Tazo) Piperacilina + Tazobactam; (Pol B) Polimixina B; (Tige) Tigeciclina; (Tobra) Tobramicina; (Tri/Sul) Trimetoprima + Sulfametoxazol.

\*Antimicrobianos que apresentaram perfil de sensibilidade intermediário.

**APÊNDICE II** – Comprovantes de submissão do artigo à Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção.



[CAPA](#)   [SOBRE](#)   [PÁGINA DO USUÁRIO](#)   [PESQUISA](#)   [ATUAL](#)  
[ANTERIORES](#)   [NOTÍCIAS](#)   [NORMAS PARA AUTORES](#)   [HOSPITAL SANTA](#)  
[CRUZ](#)   [FACEBOOK](#)   [PPGPS - PROMOÇÃO DA SAÚDE](#)   [SUBMISSÕES](#)  
[ONLINE](#)

**IDIOMA**



**USUÁRIO**

Logado como:  
ajcorrea

- [Meus periódicos](#)
- [Perfil](#)
- [Sair do sistema](#)

Capa > Usuário > Autor > **Submissões Ativas**

## Submissões Ativas

[ATIVO](#)   [ARQUIVO](#)

<a href="#">ID</a>	<a href="#">MM-DD ENVIADO</a>	<a href="#">SEÇÃO</a>	<a href="#">AUTORES</a>	<a href="#">TÍTULO</a>	<a href="#">SITUAÇÃO</a>
13362	03-27	ART ORG	Corrêa	<a href="#">MARCADORES GENOTÍPICOS DE BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS...</a>	Aguardando designação

1 a 1 de 1 itens

### Iniciar nova submissão

[CLIQUE AQUI](#) para iniciar os cinco passos do processo de submissão.



**AUTOR**

- Submissões
- [Ativo \(1\)](#)
  - [Arquivo \(0\)](#)
  - [Nova submissão](#)

**CONTEÚDO DA REVISTA**

Pesquisa

Escopo da Busca

**[RECI] Agradecimento pela Submissão**

Lia Gonçalves Possuelo <liapossuelo@unisc.br>

Qua, 27/03/2019 19:06

Para: Sra Ana Julia Corrêa <anajulia\_correa@hotmail.com>

Sra Ana Julia Corrêa,

Agradecemos a submissão do seu manuscrito "MARCADORES GENOTÍPICOS DE BACILOS GRAM NEGATIVOS RESISTENTES AOS ANTIBIÓTICOS CARBAPENÊMICOS ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS" para Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção. Através da interface de administração do sistema, utilizado para a submissão, será possível acompanhar o progresso do documento dentro do processo editorial, bastando logar no sistema localizado em:

O ID do manuscrito é 13362 e deverá ser mencionado em toda correspondência enviada para a revista ou em contato com a secretaria da RECI.

Se houver mudança em seu endereço postal e/ou endereço eletrônico, por favor, acesse o sistema da RECI e faça a atualização de seus dados cadastrais. Enfatizamos a importância de manter também os demais dados do seu perfil atualizados, principalmente as palavras-chave referentes a sua(s) área(s) de conhecimento.

URL do Manuscrito:

<https://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia/author/submission/13362>

Login: ajcorrea

Em caso de dúvidas, envie suas questões para este email. Agradecemos mais uma vez considerar nossa revista como meio de transmitir ao público seu trabalho.

Lia Gonçalves Possuelo

Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção

Dra. Lia Gonçalves Possuelo, UNISC

Dra. Andréia Rosane de Moura Valim, UNISC

Dra. Luciana de Souza Nunes, UNIPAMPA

Dra Nathalia Halax Orfão, UNIR

Dr. Marcelo Carneiro, UNISC

REV EPIDEMIOL CONTROL INFECT

<http://online.unisc.br/seer/index.php/epidemiologia>



## AUTORIZAÇÃO


Nome do autor: Ana Julia Corrêa

RG: 4427132

Título da Dissertação: **INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES GENOTÍPICOS DE RESISTÊNCIA AOS CARBAPENÊMICOS EM BACIOS GRAM NEGATIVOS ISOLADOS DE AMOSTRAS CLÍNICAS DE UM HOSPITAL PRIVADO DE JOINVILLE, SC.**

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 08 de abril de 2019.

  
Assinatura do aluno