

**JULIANA FERRAZ ROSA**

**Caracterização molecular dos mecanismos de  
resistência aos carbapenêmicos de isolados clínicos de  
*Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae***

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da  
Universidade de São Paulo para obtenção de título de  
Mestre em Ciências

Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Professora PhD. Silvia Figueiredo Costa

**São Paulo**

**2015**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Rosa, Juliana Ferraz

Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* / Juliana Ferraz Rosa. -- São Paulo, 2015.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Silvia Figueiredo Costa.

Descritores: 1.*Enterobacter aerogenes* 2.*Enterobacter cloacae*  
3.Carbapenêmicos 4.Transplante 5.Beta-lactamases 6.Farmacorresistência  
bacteriana

USP/FM/DBD-351/15

Trabalho realizado com auxílio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

“Ainda que eu fale as línguas dos homens e dos anjos, se não tiver amor, serei como o bronze que soa ou como o címbalo que retine. Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conheça todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei. E ainda que eu distribua todos os meus bens entre os pobres e ainda que entregue o meu próprio corpo para ser queimado, se não tiver amor, nada disso me aproveitará. O amor é paciente, é benigno; o amor não arde em ciúmes, não se ufana, não se ensoberbece, não se conduz inconvenientemente, não procura os seus interesses, não se exaspera, não se ressentido do mal; não se alegra com a injustiça, mas regozija-se com a verdade; tudo sofre, tudo crê, tudo espera, tudo suporta. O amor jamais acaba; mas, havendo profecias, desaparecerão; havendo línguas, cessarão; havendo ciência, passará; Agora, pois, permanecem a fé, a esperança e o amor, estes três; porém o maior destes é o amor”.

Paulo de Tarso Bíblia Sagrada. 1 Coríntios 13:1-13.

## **Dedicatória**

---

Aos meus pais,

Celina Ferraz Rosa e Antônio Cambraia Rosa

Que sempre me apoiaram em minhas escolhas

E por me ensinarem valores que sempre levarei em toda minha vida.

Aos meus irmãos André Luis Rosa e Ana Paula Ferraz Rosa

Eduardo Salgado e Lorenzo Ferraz Salgado

Que sempre me incentivaram

E a Deus e Jesus Cristo por sempre me sustentarem.

## **Agradecimentos**

---

A minha orientadora, Profa. PhD. Silvia Figueiredo Costa pela confiança e por todo incentivo, carinho e oportunidades que me concedeu durante anos no Laboratório de Investigação Médica – LIM 54, destacando sua admirável paciência, competência, entusiasmo, profissionalismo e ética.

A minha co-orientadora, Profa. PhD. Anna Sara Levin, igualmente agradeço por todas as oportunidades oferecidas no LIM 54, destacando também sua grandeza de competência, profissionalismo e ética.

Ao Dr. Jorge Isaac Garcia e Dr. Cilmara Polido Garcia, por sempre apostarem em meu desenvolvimento, por meio de valorosos conhecimentos e experiências que pude desenvolver como técnica de seus projetos.

Ao Prof. Dr. Mauro Giudice, Prof.<sup>a</sup> Dr Ineke van der Heijden e Doutoranda Camila Rizek e Mestre Mariama Tomaz, profissionais do Lim 54, agradeço por toda ajuda.

As preciosas técnicas do projeto, Fabiana Lancini e Juliana Calil e as alunas de pós-graduação, Ana Paula Marchi Rosin, Gleice Leite e Larissa Marques de Oliveira. Obrigada pelo grande trabalho realizado, espero que vocês saibam que essa conquista não é só minha, mas de todos que participaram deste projeto.

A todos os funcionários, estagiários, técnicos de projetos e alunos, agradeço por toda ajuda que tive e por tantos momentos agradáveis que estivemos juntos no Lim 54.

E finalmente, as secretárias Sueli Raymundo, Andréia Aparecida de Paula Alcaia e Roseli Antônio Santo, agradeço por toda ajuda oferecida a minha pessoa, lembrarei sempre da tamanha simpatia, paciência e de todo trabalho que realizaram para que esse projeto fosse concluído.

### **Normalização adotada**

Esta tese de mestrado está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*, da *National Library of Medicine*.

# Sumário

---

## Sumário

Lista de abreviaturas e siglas .....	x
Lista de tabelas.....	xii
Lista de figuras.....	xiv
Lista de gráficos.....	xvi
Anexos .....	xvii
Resumo .....	xviii
Abstract.....	xxi
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 Gênero <i>Enterobacter</i> .....	2
1.2 <i>Enterobacter spp</i> e infecções relacionados a assistência à saúde (IRAS).....	4
1.3 <i>Enterobacter cloacae</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	6
1.4 Mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos.....	10
1.5 Carbapenêmicos.....	11
1.6 Testes realizados para determinar resistência aos carbapênemicos.....	13
1.7 Interpretação dos Pontos de Cortes para Carbapenêmicos .....	16
1.8 Mecanismos de resistência aos Carbapenêmicos em <i>Enterobacter spp</i> .....	17
1.8.1 $\beta$ -lactamases AmpC .....	18
1.8.2 Enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos.....	19
1.8.3 <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos no Brasil. ....	30
1.8.4 Impermeabilidade da Membrana Externa (Porinas e Bomba de efluxo) .....	32
1.9 Controle e prevenção de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.....	36
1.10 Justificativa do Trabalho.....	38
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>39</b>
2.1 Objetivo principal .....	40
2.2 Objetivos secundários .....	40
<b>3 MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 Identificação e armazenamento dos isolados de <i>Enterobacter spp.</i> ....	42
3.2 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos .....	42
3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em caldo (Microdiluição).....	42
3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em ágar.....	45
3.3 Testes Moleculares .....	47
3.3.1 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene de resistência aos carbapenêmicos.....	47

3.3.2	Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção de metalo-β- lactamases.....	48
3.3.3	Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção das ESBLs .....	49
3.3.4	Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção da oxacilinase OXA-48 .....	49
3.3.5	Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção da Bomba de Efluxo (AcrART).....	50
3.3.6	Sequenciamento dos produtos amplificados.....	50
3.3.7	Técnica de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE).....	51
3.3.8	Análise de Proteína da Membrana Externa.....	53
3.4	Teste Fenotípico.....	55
3.4.1	Diluição em ágar com Inibidor de Bomba de Efluxo CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) para detecção da atividade da Bomba de Efluxo .....	55
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
4.1	Identificação e distribuição de <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> nos três hospitais estudados.....	58
4.2	Perfil dos 39 pacientes infectados por <i>E.aerogenes</i> resistentes aos carbapenêmicos do Hospital das Clínicas.....	60
4.3	Resultados da sensibilidade aos antimicrobianos .....	64
4.3.1	Resultados da sensibilidade aos antimicrobianos e MIC 50 e 90 dos 44 isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> e dos 8 isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> .....	64
4.3.2	Análise do CIM do sistema automatizado ViTek com CIM da Diluição em caldo .....	66
4.4	Testes Moleculares .....	70
4.4.1	Resultados dos PCRs para Detecção dos Genes Codificadores das Carbapenemases .....	70
4.4.2	Resultados dos PCRs para Detecção dos Genes Codificadores <i>bla</i> <sub>TEM-164</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M-2 grupo</sub> e <i>bla</i> <sub>SHV</sub> e <i>bla</i> <sub>OXA-48</sub> .....	72
4.4.3	Resultados dos PCRs para Detecção do Gene Codificador da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC .....	74
4.4.4	Resultados do Pulsed Field (PFGE).....	75
4.4.5	Resultados da análise das Proteínas de Membrana Externa .....	78
4.5	Estudo Fenotípico .....	82
4.5.1	Resultados do Inibidor de Bomba de Efluxo CCCP.....	82
4.6	Resultados dos isolados de <i>E. aerogenes</i> e <i>E. cloacae</i> com todos mecanismos de resistência encontrados.....	84
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>91</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>117</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>139</b>

# Listas

---

## Abreviaturas e siglas

AMPC	Enzimas do tipo cefalosporinase
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
CCCP	Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone
CESP	Grupo ( <i>Citrobacter spp</i> ; <i>Enterobacter spp</i> , <i>Serratia spp</i> e <i>Proteus spp</i> )
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standards Institute
DMT	Drug/metabolite transporter superfamily
ESBL	$\beta$ -lactamase de Espectro Estendido
GES	Guiana extended-spectrum
GIM	German Imipenemase
HGIS	Hospital Geral de Itapeçerica da Serra
IRAs	Infecções relacionadas a assistência à saúde
IMP	Imipenemase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase
LIM-54	Laboratório de Investigação Médica- 54
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion family
MBL	Metallo- $\beta$ -lactamases
MC	MacConkey
ME	Membrana externa
MFS	Major Facilitator Superfamily
MH	Mueller-Hinton
MHCA	Mueller Hinton Cátion Ajustado
NDM	New Delhi
NMC/IMI	Imipenemase/ non-metallo carbapenemase-A
NMP 1	1-naphtylmethyl -piperazine
OMP	Proteína da Membrana Externa

PAβN	Fenilalanina-Arginina β- Naftilamida
PBA	Ácido 3-phenylboronico
PBP	Proteínas ligadoras de penicilinas ou Penicillin Binding Protein
PBS	Tampão de Fosfato Sódico
PCR	Reação de Cadeia de Polimerase/ Polymerase Chain Reaction
PFGE	Pulsed Field Gel Electrophoresis
PMSF	Fluoreto de Fenil-Metil-Sulfonila
RND	Resistance-Nodulation-cell Division Superfamily
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SIM	Seoul Imipenemase
SME	<i>Serratia marcescens</i> enzyme
SMR	Small Multidrug Resistante
SPM	São Paulo Metalo β-lactamase
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UTI	Unidades de Terapia Intensiva
VIM	Verona Imipenemase

## Tabelas

<b>Tabela 1 -</b>	Classificação das $\beta$ -lactamases desenvolvidas por Karen Bush e George A. Jacoby em 2010 .....	8
<b>Tabela 2 -</b>	Pontos de cortes do CLSI e EUCAST para analisar a resistência aos carbapenêmicos .....	16
<b>Tabela 3 -</b>	$\beta$ -lactamases encontradas em <i>Enterobacter aerogenes</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	28
<b>Tabela 4 -</b>	$\beta$ -lactamases encontradas em <i>Enterobacter cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos .....	29
<b>Tabela 5 -</b>	Pontos de corte proposto pelo CLSI 2012 para determinar a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para o método de Microdiluição em Agar para Fosfomicina e em caldo para os demais antimicrobianos estudados.....	46
<b>Tabela 6 -</b>	Primers utilizados para identificação das carbapenemases Serino, Classe A de Ambler.....	47
<b>Tabela 7 -</b>	Primers utilizados para identificação das Metalo- $\beta$ -Lactamases, Classe B de Ambler .....	48
<b>Tabela 8 -</b>	Primers utilizados para identificação das ESBLs .....	49
<b>Tabela 9 -</b>	Primer utilizado para identificação da Oxacilinase OXA-48 da Classe D de Ambler .....	49
<b>Tabela 10 -</b>	Primers utilizados para identificação dos genes AcrART - Bomba de Efluxo .....	50
<b>Tabela 11 -</b>	Distribuição dos 130 isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> por Hospitais .....	59
<b>Tabela 12 -</b>	Sensibilidade dos antimicrobianos dos 44 isolados de <i>E. aerogenes</i> e 8 isolados de <i>E.cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos, pelo método de diluição de acordo com os critérios do CLSI 2012.....	64
<b>Tabela 13 -</b>	Concentração inibitória mínima (CIM) 50 e 90 dos antimicrobianos testados nos 44 isolados de <i>E. aerogenes</i> e 8 isolados de <i>E.cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos, segundo critério do CLSI-2012.....	65

<b>Tabela 14 -</b>	Demonstração dos dados dos 39 isolados de <i>E. aerogenes</i> resistentes aos carbapenêmicos do HC, distribuídos por ano (2005 a 2011) e os resultados das concentrações inibitórias mínimas do Vitek e Microdiluição em caldo.....	69
<b>Tabela 15 -</b>	Identificação dos genes codificadores de carbapenemase pelo método de PCR nos 44 isolados de <i>E. aerogenes</i> e nos 8 isolados de <i>E. cloacae</i> .....	70
<b>Tabela 16 -</b>	Identificação dos genes codificadores de ESBL e OXA-48 pela técnica de PCR, nos 44 isolados de <i>E. aerogenes</i> e nos 8 isolados de <i>E. cloacae</i> .....	72
<b>Tabela 17 -</b>	Identificação do gene codificador da Bomba de efluxo pela técnica de PCR, nos 44 isolados de <i>E. aerogenes</i> e nos 8 isolados de <i>E. cloacae</i> .....	74
<b>Tabela 18 -</b>	Correlação do perfil de SDS de proteínas da membrana externa, gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> , <i>bla<sub>TEM</sub></i> e <i>bla<sub>CTX</sub></i> e bomba de efluxo AcrART de 22 <i>Enterobacter aerogenes</i> e 5 <i>Enterobacter cloacae</i> .....	81
<b>Tabela 19 -</b>	Resultados da atividade de bomba de efluxo utilizando o inibidor CCCP para os três carbapenêmicos: Imipenem, Meropenem e Ertapenem.....	83
<b>Tabela 20 -</b>	Resultados dos 39 isolados de <i>E. aerogenes</i> resistentes aos carbapenêmicos do HC-FMUSP distribuído por ano.....	90

## Figuras

<b>Figura 1 -</b>	Mecanismos primários de resistência aos $\beta$ -lactâmicos em <i>Enterobacteriaceae</i> .....	11
<b>Figura 2 -</b>	Esquema dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos.....	17
<b>Figura 3 -</b>	Distribuição do gene <i>bla<sub>KPC</sub></i> em isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> e <i>Enterobacter cloacae</i> no Brasil.....	31
<b>Figura 4 -</b>	Foto do API (Biomerieux) para identificação das Enterobactérias Fermentadoras de Glicose, demonstrando <i>Enterobacter aerogenes</i> .....	58
<b>Figura 5 -</b>	Foto do API (Biomerieux) para identificação das Enterobactérias Fermentadoras de Glicose, demonstrando <i>Enterobacter cloacae</i> .....	58
<b>Figura 6 -</b>	Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador de <i>bla<sub>KPC</sub></i> .....	71
<b>Figura 7 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR <i>bla<sub>NDM</sub></i> .....	71
<b>Figura 8 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR <i>bla<sub>TEM</sub></i> .....	72
<b>Figura 9 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR <i>bla<sub>CTX</sub></i> .....	73
<b>Figura 10 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR <i>bla<sub>SHV</sub></i> .....	73
<b>Figura 11 -</b>	Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR <i>bla<sub>OXA-48</sub></i> .....	73
<b>Figura 12 -</b>	Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR da bomba de efluxo AcrART.....	74
<b>Figura 13 -</b>	Dendograma dos 39 <i>Enterobacter aerogenes</i> do Hospital das Clínicas - FMUSP.....	75
<b>Figura 14 -</b>	Dendograma dos 5 isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> do Hospital de Itapeçerica da Serra.....	76
<b>Figura 15 -</b>	Dendograma dos 8 isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> do Hospital de Londrina.....	77

<b>Figura 16</b>	Foto de gel de eletroforese em campo pulsado de isolados de <i>E. aerogenes</i> e <i>E. cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos dos 3 Hospitais analisados.....	77
<b>Figura 17 -</b>	Foto de SDS, proteínas de membrana externa de isolados de <i>E. aerogenes</i> e <i>E. cloacae</i> resistentes aos carbapenêmicos.....	81
<b>Figura 18 -</b>	Foto dos meios Mueller-Hinton em concentrações diferentes de Meropenem com e sem inibidor CCCP, demonstrando a atividade da mesma.....	84

## Gráficos

- Gráfico 1 -** Distribuição de 39 pacientes do HC, infectados por *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos por sexo.....60
- Gráfico 2 -** Distribuição de 39 pacientes do HC, infectados por *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos que entraram em óbito .....60
- Gráfico 3 -** Distribuição por faixa etária dos 39 pacientes do HC, infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos nos anos de 2005 a 2011.....61
- Gráfico 4 -** Distribuição dos dias de internação dos 39 pacientes do HC, infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos por tempo .....62
- Gráfico 5 -** Distribuição dos 39 pacientes do HC, infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos segundo tempo de internação.....63

## **Anexos**

<b>Anexo 1 -</b>	Informações gerais sobre os 39 pacientes do hospital das Clínicas.....	140
<b>Anexo 2 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador <i>bla<sub>GES</sub></i> .....	141
<b>Anexo 3 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador <i>bla<sub>SPM</sub></i> .....	141
<b>Anexo 4 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador <i>bla<sub>VIM</sub></i> .....	141
<b>Anexo 5 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador <i>bla<sub>GIM</sub></i> .....	142
<b>Anexo 6 -</b>	Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador <i>bla<sub>IMP</sub></i> .....	142

**Resumo**

---

Rosa Ferraz J. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos de isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*. [Dissertação - Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

**INTRODUÇÃO:** Nas últimas três décadas *E. aerogenes* e *E. cloacae* vem sendo reportado como importante patógeno de infecção relacionada a assistência à saúde e vem cada vez mais apresentando resistência a vários antibióticos incluindo os carbapenêmicos. Poucos estudos, entretanto, avaliaram os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em espécies de *Enterobacter* no Mundo e no Brasil. **OBJETIVO:** Avaliar a presença de genes codificadores de carbapenemases, genes de  $\beta$ - lactamases de espectro estendido e de bomba de fluxo AcrAB-TolC e alteração de proteínas de membrana externa de 44 isolados de *E. aerogenes* e 8 isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos de 03 hospitais brasileiros. **MATERIAL E MÉTODOS:** Para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), foi realizado o teste de microdiluição em caldo, com os antibióticos: Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Cefepima, Tigeciclina e Polimixina B e para Fosfomicina foi realizado o teste de diluição em ágar, segundo CLSI. Foi realizado PCR para identificar os genes codificadores de Serino Beta-lactamase da Classe A de Ambler (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMI</sub> e *bla*<sub>GES</sub>), de Metallo-beta-lactamase da Classe B de Ambler (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> e *bla*<sub>NDM</sub>), de Oxacilinas da Classe D de Ambler (*bla*<sub>OXA-48</sub>), as ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX</sub> e *bla*<sub>SHV</sub>) e da bomba de efluxo AcrAB-TolC. A tipagem molecular foi feita pela técnica de PFGE, as proteínas de membrana externa pelo método de SDS-PAGE e a atividade da bomba de efluxo por meio da determinação da CIM dos carbapenêmicos com e sem inibidor Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). **RESULTADOS:** No período de 2005 a 2011, foram analisados, 130 isolados de *Enterobacter spp*, 105 (80,8%) dos isolados foram identificados como *Enterobacter aerogenes*, destes 44 (41,9%) apresentaram resistência ao Imipenem, Ertapenem ou Meropenem e 25 (19,2%) foram identificados como *Enterobacter cloacae*, destes 8 (32,0%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos. Os isolados de *E. aerogenes* apresentaram CIMs que variaram de 2 a 128 $\mu$ g/mL para Imipenem, 4 a 64 $\mu$ g/mL para Meropenem e para Ertapenem 1 a  $\geq$ 128  $\mu$ g/mL e os isolados de *E. cloacae* apresentaram CIMs que variaram de 8 a 64 $\mu$ g/mL para Imipenem, 2 a 16 $\mu$ g/mL para Meropenem e 8 a 64  $\mu$ g/mL para Ertapenem. Todos isolados foram sensíveis a Fosfomicina, Polimixina B e Tigeciclina. A única carbapenemase identificada foi KPC, que estava presente em ambos isolados e em todos hospitais estudados. Os 39 isolados de *E. aerogenes* apresentaram 5 clones diferentes, sendo o clone A predominante. Os 5 isolados de *E. aerogenes* do Hospital de Itapeverica da Serra pertenciam ao mesmo clone. Os 8 isolados de *E. cloacae* apresentaram 2 clones diferentes. E a maioria dos isolados analisados apresentou mecanismos de resistência aos carbapenêmicos como: gene *bla*<sub>KPC</sub> associado com o gene *bla*<sub>TEM</sub> e/ou *bla*<sub>CTX</sub>, associado com diminuição ou ausência de proteína 35-36kDa e 39 kDa. **CONCLUSÃO:** Em nosso estudo foi observado alta resistência aos carbapenêmicos nos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* nos 3 hospitais estudados. Os mecanismos observados que contribuíram para a resistência aos carbapenêmicos foram: a presença de KPC, ESBL e impermeabilidade da membrana para os isolados de *E. aerogenes* e para os isolados de *E. cloacae* foi observado também como mecanismo o gene da bomba de efluxo

AcrART. Para os isolados de *E. aerogenes*, não foi observado o gene da bomba de efluxo, mas todos isolados analisados apresentaram atividade da bomba de efluxo para os carbapenêmicos, possivelmente nos indicando a presença de outra bomba de efluxo ainda não identificada.

**Descritores:** 1. *Enterobacter aerogenes* 2. *Enterobacter cloacae* 3. Carbapenêmicos 4. Transplante 5. beta lactamases 6. Farmacorresistência Bacteriana.

## **Abstract**

---

Rosa Ferraz J. Molecular characterization of mechanisms of resistance to carbapenems in clinical isolates of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*. [Dissertation – Master Degree]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

**INTRODUCTION:** In the last three decades, *E. aerogenes* and *E. cloacae* have been reported as important opportunistic pathogens in humans. They have been showing an increase resistance to multiple antibiotics including carbapenem. Few studies, however, evaluated the mechanisms of resistance to carbapenem in *Enterobacter* species in the world and in Brazil. **OBJECTIVES:** To evaluate the presence of genes encoding carbapenemases, genes of  $\beta$ -lactamases of extended spectrum and AcrAB TolC- efflux pump and amendment of outer membrane proteins of 44 isolates of *E. aerogenes* and 8 isolates of *E. cloacae* carbapenems resistant of 03 Brazilian hospitals. **METHODS:** To determine the minimum inhibitory concentration (MIC), microdilution broth test was performed for the followings antibiotics: Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Cefepima, Tigecycline and Polymyxin B and agar dilution for Fosfomicin, according to CLSI. PCR was performed to identify the genes encoding Serino Beta-lactamase Class A Ambler (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>IMI</sub> and *bla*<sub>GES</sub>) of Metallo-beta-lactamase Class B Ambler (*bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GIM</sub>, *bla*<sub>SIM</sub>, *bla*<sub>SPM</sub> and *bla*<sub>NDM</sub>) of Oxacilinases Class D Ambler (*bla*<sub>OXA-48</sub>), the ESBL (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>CTX</sub>) and efflux pump AcrAB-TolC. Molecular typing was performed by PFGE, outer membrane proteins by SDS-PAGE method and the activity of the efflux pump by carbapenem's MIC by agar dilution with and without inhibitor Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP). **RESULTS:** In the period from 2005 to 2011, 130 isolates of *Enterobacter spp* were analyzed, 105 (80.8%) isolates were identified as *Enterobacter aerogenes*, of these 44 (41.9%) were resistant to Imipenem, Meropenem or Ertapenem and 25 (19.2%) were identified as *Enterobacter cloacae*, and 8 (32.0%) showed resistance to carbapenems. The isolated *E. aerogenes* presented MIC ranging from 2 to 128 $\mu$ g/ml for Imipenem, 4 to 64 $\mu$ g/ml for Meropenem and Ertapenem 1 to  $\geq$ 128 mg/mL. *E. cloacae* isolated showed MIC ranged from 8 to 64 $\mu$ g/ml for Imipenem, 2 to 16 $\mu$ g/ml for Meropenem and 8 to 64 mg/mL to Ertapenem. All isolates were susceptible to fosfomicin, polymyxin B and tigecycline. The only carbapenemase identified was KPC, which was present in both isolated and in all hospitals studied. The 39 isolates of *E. aerogenes* presented five different clones, the clone A being predominant. The five isolates of *E. aerogenes* in the Hospital of Itapeceirica da Serra belong to same clone. Eight isolates of *E. cloacae* showed two different clones. Most of the isolates analyzed showed resistance mechanisms to carbapenems like: *bla*<sub>KPC</sub> gene associated with *bla*<sub>TEM</sub> gene and / or *bla*<sub>CTX</sub> associated with a decreased or absent protein 35-36kDa and 39 kDa. **CONCLUSION:** In our study, we observed high carbapenem resistance in isolates of *E. aerogenes* and *E. cloacae* in the three studied hospitals. The observed mechanisms that contributed to resistance to carbapenems were: the presence of KPC, ESBL and impermeability of the membrane in *E. aerogenes* and in *E. cloacae* isolates. *E. cloacae* presented also that gene of the efflux pump AcrART. Among *E. aerogenes*, the gene wasn't observed, but all isolates analyzed demonstrated active efflux pump to carbapenems possibly indicating the presence of other efflux pump still unidentified.

**Descriptors:** 1. *Enterobacter aerogenes* 2. *Enterobacter cloacae* 3. Carbapenems 4. Transplantation 5. beta lactamases 6. Drug Resistance, Bacterial.

# **1 Introdução**

---

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Gênero *Enterobacter*

O gênero *Enterobacter spp* é um dos membros da família *Enterobacteriaceae*. Bactérias pertencentes a esta família são isoladas com frequência em amostras biológicas e são distribuídas amplamente na natureza, são encontradas no solo, água, plantas e, no trato gastrointestinal de seres humanos e animais <sup>(1)</sup>. Algumas características importantes dos membros desta família, são a capacidade de disseminar facilmente entre humanos, por transmissão cruzada através das mãos, bem como alimentos e águas contaminadas e de adquirir material genético através de transferência horizontal de genes, mediada por plasmídeos e transposons <sup>(2)</sup>.

Representantes deste gênero são cocobacilos Gram-negativos com 0,5 a 2 µm de largura e 2 a 4 µm de comprimento. Suas características morfológicas em meios de ágar sangue nos revelam colônias secas ou mucóides relativamente grandes, de cor cinza opaco a branca e alguns isolados podem apresentar hemólise. Entretanto, a diferenciação das *Enterobacteriaceae* é baseada principalmente na presença ou não de diferentes enzimas codificadas por genes cromossômicos. Sendo assim, por meio de uma série de provas que avaliam diferentes características metabólicas dos microorganismos, é possível estabelecer um perfil bioquímico e identificar as espécies <sup>(1)</sup>.

Como muitos isolados do gênero *Enterobacter* produzem grandes quantidades de gás, durante muitos anos esta bactéria foi denominada *Aerobacter aerogenes*. Somente em 1962 foi designada *Enterobacter* pelos pesquisadores Edwards e Ewing <sup>(1)</sup>. O gênero *Enterobacter* contém na atualidade 14 espécies das 16

descritas, isto porque, o *Enterobacter agglomerans* atualmente é denominado gênero *Pantoea*, o *Enterobacter intermedius* gênero *Kluyvera* ficando ambos, com as seguintes denominações: *Pantoea agglomerans* e *Kluyvera intermedius*, respectivamente e o *Enterobacter sakazakii*, foi recentemente classificado no gênero *Cronobacter*<sup>(3,4)</sup>. Os principais isolados de amostras clínicas do gênero *Enterobacter* são: *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter gergoviae*, e *Enterobacter hormaechei*<sup>(3,4)</sup>.

As fontes de infecção desta bactéria podem ser endógena (colonização da pele, trato gastrointestinal ou do trato urinário), e exógena, resultante da sua natureza ubíqua. Estudos mostraram que este micro-organismo pode ser encontrado em mãos, endoscópios, produtos derivados de sangue, aparelhos para monitorização de pressão e, estetoscópios<sup>(3,5)</sup>. Surtos hospitalares foram atribuídos a contaminação de dispositivos de monitoramento de pressão, fluidos intravenosos, soluções de nutrição parenteral, soluções salinas isotônicas, albumina, termômetros digitais, equipamentos de diálise, entre outros<sup>(3,5)</sup>.

Embora infecções comunitárias por *Enterobacter* spp. sejam relatadas ocasionalmente, as infecções nosocomiais são bem mais frequentes<sup>(3)</sup>. Os pacientes mais susceptíveis a infecções por *Enterobacter* spp., são aqueles que permanecem períodos prolongados em UTI. Outros fatores de riscos são: o uso prévio de antimicrobianos, malignidade, doença hepatobiliar, úlceras do trato gastrointestinal, uso de dispositivos externos, tais como cateteres venosos e sérias condições subjacentes, tais como queimaduras, ventilação mecânica e imunossupressão<sup>(3)</sup>.

## 1.2 *Enterobacter* spp. e infecções relacionados a assistência à saúde (IRAS)

As espécies de *Enterobacter* estão entre os Gram-negativos mais comuns em IRAS, sendo consideradas patógenos hospitalares emergentes, que comprometem principalmente pacientes internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI) e imunodeprimidos (6-9). Estudos demonstram que estão associados com até 8 % de casos de bacteremias hospitalares e são o segundo patógeno Gram-negativo mais comum em pneumonias em pacientes de UTI em algumas casuísticas (6-9).

Um estudo de 84 pacientes com sepse neonatal conduzido em Teerã, nos anos de 2003 a 2006, demonstrou que o patógeno mais comumente isolado foi *Enterobacter* e que a suscetibilidade deste micro-organismo ao Imipenem e gentamicina reduziu gradualmente ao longo dos anos do estudo e suas taxas de mortalidade e morbidade foram respectivamente 27,4% e 89,3% (10).

Outro estudo com 1.831 recém-nascidos, internados durante um período de 10 meses em duas unidades de cuidados intensivos neonatais em Manila, nas Filipinas, demonstrou que 1.017 (55,5%) pacientes foram colonizados e 358 (19,6%) desenvolveram bacteremia. Os micro-organismos mais encontrados foram *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Acinetobacter* e *Pseudomonas aeruginosa*. Dos isolados de infecções invasivas, 20% eram resistentes ao Imipenem. Os fatores significativamente associados com um risco aumentado de bacteremia por esse agente foram ventilação mecânica e prematuridade (11).

Jones em 2010, revisou a literatura médica e os resultados do Programa de vigilância antimicrobiana SENTRY (1997-2008) para estabelecer os patógenos mais frequentes de pneumonia adquirida no hospital e pneumonia associada à ventilação mecânica. Em todos os estudos, seis micro-organismos foram os mais frequentes:

*Staphylococcus aureus* (28,0%), *Pseudomonas aeruginosa* (21,8%), espécies de *Klebsiella* (9,8%), *Escherichia coli* (6,9%), *Acinetobacter* (6,8%) e as espécies *Enterobacter* (6,3%)<sup>(12)</sup>.

Outro estudo conduzido para identificar os agentes etiológicos de infecções de pé diabético, analisou um total de 298 amostras de cultura, destes 165 (55%) swabs de ferida, 108 (36%) amostras de tecido e 25 (9 %) amostras de ossos, de 107 pacientes. Entre todas as culturas 83,5% ( 223/267 ) foram monomicrobiana e 16,4% (44/267) foram polimicrobiana. As bactérias mais frequentemente isoladas foram espécies de *Pseudomonas* (29,8%), *Staphylococcus aureus* (16,7%), espécies de *Enterococcus* (11,5%), *Escherichia coli* (7,1%), e as espécies de *Enterobacter* (7,1%)<sup>(13)</sup>.

Mais recentemente um estudo elaborado por Sadler et al. em 2012, demonstrou que espécies de *Enterobacter* estão em quarto lugar entre os isolados de pacientes internados na UTI e não-UTI dos EUA e da Europa, com frequência semelhante em ambas as regiões<sup>(14)</sup>.

Na América Latina, o gênero *Enterobacter* ocupa o quinto lugar dentre os patógenos mais isolados em pacientes pediátricos<sup>(15)</sup>. Por outro lado, no Brasil, este gênero é responsável por 6% a 8,5% das infecções hospitalares em pacientes internados em UTI, e são a terceira enterobactéria mais prevalente em infecções do trato urinário, tecidos moles e sepse<sup>(16)</sup>.

Andrade et al, no ano de 2003 a 2008, relataram os perfis de sensibilidade antimicrobiana dos cinco bacilos Gram-negativos mais frequentes isolados nos hospitais brasileiros que participam de um Programa Sentinela. Neste estudo foi analisado um total de 3.220 bacilos Gram-negativos. As amostras foram coletadas

consecutivamente entre janeiro de 2003 e maio de 2008. Os Gram-negativos mais frequentes isolados de infecções da corrente sanguínea foram *Escherichia coli* (12,8% do total), *Klebsiella spp* (12,5%), *Pseudomonas aeruginosa* (9,6%), *Acinetobacter spp.* (8,0%) e *Enterobacter spp* (6,4%), assim se apresentando como o quinto micro-organismo mais presente em infecções de corrente sanguínea nesse estudo brasileiro <sup>(17)</sup>.

### **1.3 *Enterobacter cloacae* e *Enterobacter aerogenes***

Dentre todas as espécies, *Enterobacter cloacae* é a mais frequente em pacientes com IRAS, mas nos últimos anos, a descrição de infecções por *Enterobacter aerogenes* vem aumentando <sup>(18, 19)</sup>. Estes patógenos são responsáveis por uma ampla variedade de IRAS, incluindo bacteremias, meningites, infecções respiratórias, infecções da pele e tecidos moles, infecções do trato urinário (ITU), endocardite, artrite séptica, osteomielites e infecções relacionadas a dispositivos intravasculares e próteses <sup>(19)</sup>. Estas espécies também são responsáveis por várias infecções comunitárias, como: infecções do trato urinário, infecções da pele e tecidos moles, infecções de feridas, entre outras <sup>(20)</sup>.

Os principais fatores de risco para IRAS causada por estes micro-organismos incluem, hospitalização de mais de duas semanas, procedimentos invasivos nas últimas 72 horas, tratamento com antibióticos nos últimos 30 dias e a presença de cateter venoso. Fatores de risco específicos para a infecção causada por isolados de *E. cloacae* e *E. aerogenes* nosocomiais multirresistentes incluem: uso recente de cefalosporinas de amplo espectro ou aminoglicosídeos e internação em UTI <sup>(21, 22)</sup>.

Como mencionado anteriormente *E. cloacae* é bem reconhecido como patógeno nosocomial que pode desenvolver resistência a várias classes de antibióticos<sup>(23, 24)</sup>. No entanto, *E. aerogenes* é o que vem se destacando como um importante patógeno nosocomial desde 1990, devido sua eficiente resposta adaptativa ao stress ambiental<sup>(25, 26)</sup>. É uma das principais causas de IRAS em todo o mundo e um dos patógenos mais frequente descrito em infecções nosocomiais do trato respiratório e trato urinário de hospitais da Europa<sup>(7, 27)</sup>.

Este micro-organismo é responsável por 15 a 25% de todas as infecções em comparação a outras espécies. É considerado o terceiro patógeno mais comumente recuperado do trato respiratório em algumas casuísticas e frequentemente é isolado na urina e no trato gastrointestinal de pacientes hospitalizados. Também é responsável por 8% dos casos de bacteremias nosocomias, com mortalidade de 29%, apresentando alta resistência a antibióticos de largo espectro<sup>(6, 27, 28)</sup>.

Para Hubert et al. (1994), a prevalência destas espécies de *Enterobacter* aumentou consideravelmente desde a introdução das cefalosporinas de espectro estendido na prática médica. Como isolados destas espécies exibem uma notável capacidade de adaptação, frequentemente estes micro-organismos desenvolvem resistência aos antimicrobianos de largo espectro, incluindo cefalosporinas de quarta geração. Nos últimos anos, estudos demonstraram que isolados clínicos destas espécies são naturalmente resistentes as aminopenicilinas e que cada vez mais exibem alto nível de resistência à ampicilina, amoxicilina/ácido-clavulânico e as cefalosporinas de espectro estendido. Estudos na França, Bélgica e Espanha identificaram o predomínio de clones de *Enterobacter* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido, que estavam associados a elevada mortalidade<sup>(7, 29, 30)</sup>.

Segundo Jaffar et al. 2009 a escolha de uma terapia apropriada para o tratamento de infecções por *Enterobacter* spp está cada vez mais complicada devido a sua resistência aos antimicrobianos e ao desenvolvimento desta resistência durante a terapia. O gênero *Enterobacter* pertence a um grupo de bactérias denominado CESP (*Citrobacter* spp; *Enterobacter* spp, *Serratia* spp e *Proteus* spp) ou atualmente designado como, grupo ESCPM (*Enterobacter* spp; *Serratia marcescens*; *Citrobacter freundii*, *Providencia* spp e *Morganella morganii*) que são bacilos Gram-negativos produtores constitutivos de beta-lactamases cromossômicas, denominadas cefalosporinas do tipo AmpC da Classe C de Ambler (Tabela 1), que quando expressas em grandes quantidades por qualquer indução ou seleção de mutantes desreprimidos, podem hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, penicilinas, e monobactâmicos. Sendo assim, durante o uso de antimicrobianos, espécies de *Enterobacter* podem expressar um aumento da sua produção e conseqüentemente resistência aos beta-lactâmicos <sup>(15, 31)</sup>.

**Tabela 1** - Classificação das  $\beta$ -lactamases desenvolvidas por Karen Bush e George A. Jacoby em 2010

Grupo Bush-Jacoby 2009	Grupo Bush -Jacoby-Medeiros 1995	Classe Molecular	Substratos	Inibido por		Características funcionais	Algumas enzimas
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas.	N	N	Alta hidrólise as cefalosporinas em relação as benzil-penicilinas e hidrolisa as cefamicinas.	E. coli AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI	C	Cefalosporinas.	N	N	Aumento de hidrólise as Cef tazidimas e de outras oximino- $\beta$ -lactâmicos.	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas.	S	N	Alta hidrólise das benzil-penicilinas em relação as cefalosporinas.	PC1
2b	2b	A	Penicilinas, primeiras gerações de cefalosporinas.	S	N	Hidrolisa igualmente a benzil-penicilinas e as cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1

continua

**Tabela 1 -** Classificação das  $\beta$ -lactamases desenvolvidas por Karen Bush e George A. Jacoby em 2010 (conclusão)

Grupo Bush-Jacoby 2009	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros 1995	Classe Molecular	Substratos	Inibido por		Características funcionais	Algumas enzimas
				CA or TZB <sup>a</sup>	EDTA		
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmico.	S	N	Alta hidrólise aos oximino- $\beta$ -lactâmicos (cefotaxime, ceftazidime, ceftriaxone, Cefepima, Aztreonam).	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	N	N	Resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e Tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2bre	NI	A	Cefalosporinas de espectro estendido, monobactâmicos	N	N	Aumento da hidrólise das oximino- $\beta$ -lactâmicos combinado com resistência ao ácido clavulânico, sulbactam e Tazobactam.	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilinas.	S	N	Aumento da hidrólise das carbenicilinas.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilinas Cefepima.	S	N	Aumento da hidrólise das carbenicilinas, Cefepima e ceftiprome.	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina.	V	N	Aumento da hidrólise da cloxacilina ou oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Espectro estendido das cefalosporinas.	V	N	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- $\beta$ -lactâmicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicos	V	N	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos.	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro estendido.	S	N	Hidrolisa cefalosporinas, são inibidas por ácido clavulânico mas não por Aztreonam.	CepA
2f	2f	A	Carbapenêmicos	V	N	Aumento da hidrólise dos carbapenêmicos, oximino- $\beta$ -lactâmicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B(B1)	Carbapenêmicos	N	S	Amplo espectro de hidrólise incluindo carbapenêmicos mas não monobactâmicos (Aztreonam).	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1
		B(B3)					L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B(B2)	Carbapenêmicos	N	S	Hidrolisa preferencialmente os carbapenêmicos.	CphA, Sfh-1

**Fonte:** Karen Bush and George A. Jacoby. Updated Functional Classification of  $\beta$ -Lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2010; 54(3):969. (32). Adaptado. **CA:** Ácido clavulânico; **TZB:** Tazobactam.

Uma característica chave do grupo ESCPM de bactérias é o potencial de indução de níveis elevados de AmpC, na presença de  $\beta$ -lactâmicos, contudo, tais efeitos são geralmente revertido quando o estímulo dos  $\beta$ -lactâmicos é removido<sup>(33)</sup>. Destas bactérias mutantes induzíveis com hiperprodução constitutiva de  $\beta$ -lactamases, podem multiplicar até  $10^5$  a  $10^7$ , e são altamente resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos.

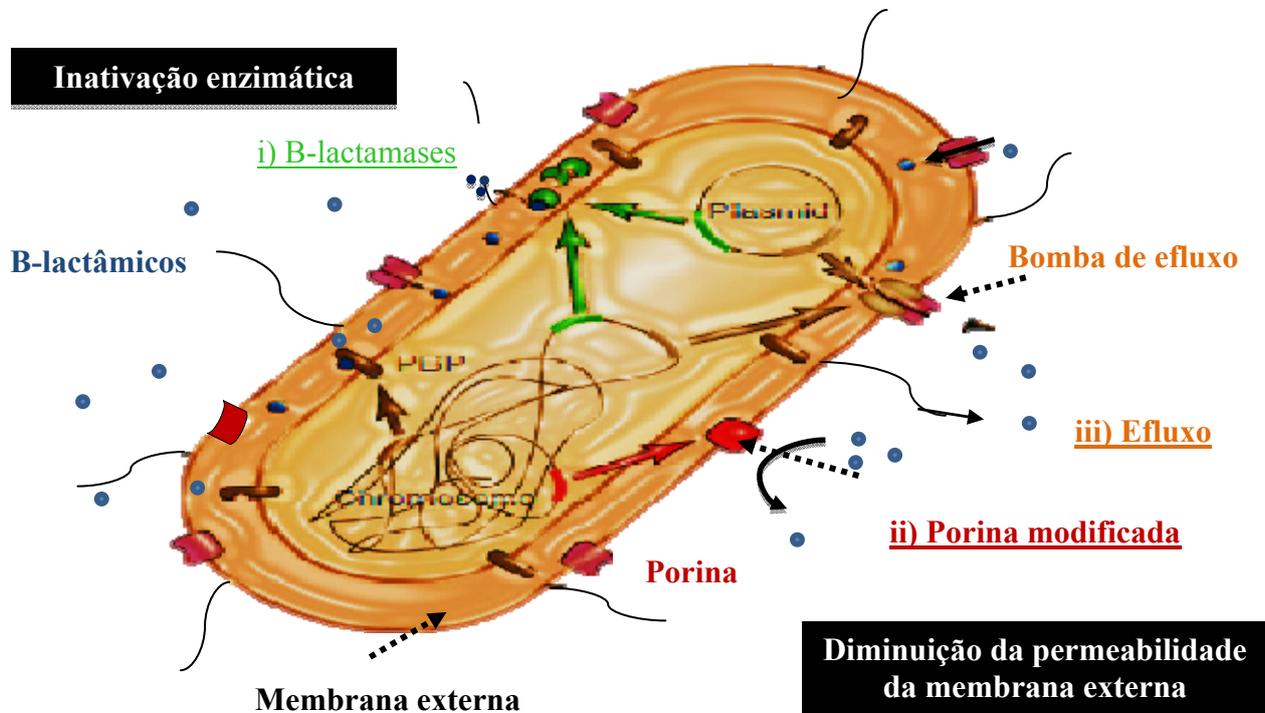
Outro dado importante é que estes antibióticos são rapidamente inativados por estas beta-lactamases, sendo assim, a resistência é facilmente documentada *in vitro*, e pode ocorrer rapidamente *in vivo*<sup>(31, 33, 34)</sup>.

Um estudo elaborado por Mendes e colaboradores, avaliou um total de 36.614 isolados coletados de mais de 60 centros médicos (2000-2007), e demonstrou que taxas de resistência mediada por produção desreprimidas de AmpC são maiores em *Enterobacter cloacae* (26,6 - 38,7%), em comparação com outras espécies e, geralmente, mais elevadas para isolados das regiões da América Latina e Ásia-Pacífico<sup>(35)</sup>.

#### **1.4 Mecanismos de resistência aos $\beta$ -lactâmicos**

A resistência aos  $\beta$ -lactâmicos pode ser associada à três mecanismos: I) limitação do acesso intracelular da droga através da sua membrana externa, por meio da impermeabilidade ao antibiótico (perda de porina de membrana externa e bomba de efluxo), associado a uma produção de enzimas do tipo AmpC cefalosporinase e ou  $\beta$ -lactamases de espectro estendido ESBL; II) degradação do antibiótico por meio de enzimas hidrolisadoras da droga como a produção de carbapenemases do tipo serina

e metalo- $\beta$ -lactamases e III) proteção dos alvos da droga por meio da alteração das PBPs<sup>(2, 36-38)</sup>, como apresentado na Figura 1, a seguir.



**Figura 1 -** Mecanismos primários de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae*

Canais hidrofílicos formados por porinas permitem a absorção de  $\beta$ -lactâmicos através da membrana externa da bactéria. No espaço periplasmático, as moléculas dos  $\beta$ -lactâmicos ligam irreversivelmente às proteínas de ligação à penicilina (PBP), que conduz à inibição da síntese do peptidoglicano. **Mecanismos primários da resistência aos  $\beta$ -lactâmicos em *Enterobacteriaceae* incluem o seguinte:** (i) a inativação enzimática do antibiótico pelo cromossoma e / ou **enzimas codificadas por plasmídeos** que possuem atividade hidrolítica contra moléculas dos  $\beta$ -lactâmicos, (ii) redução da permeabilidade da membrana externa através da produção de **porinas modificados**, a perda de expressão de porinas, ou uma mudança no tipo de porinas encontrados na membrana externa, e (iii) o efluxo do antibiótico para o exterior da bactéria através da produção de uma **bomba de efluxo**. **Fonte:** Nordmann, et.al., 2012<sup>(2)</sup>. Adaptado.

## 1.5 Carbapenêmicos

Devido ao surgimento de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e com o advento de cepas multirresistentes, a classe de antimicrobiano mais utilizado por

mais de uma década para tratamento de infecções por estes micro-organismos foram os carbapenêmicos <sup>(39)</sup>. Os carbapenêmicos são os agentes mais potentes prescritos na atualidade, que podem ser utilizados no tratamento de infecções adquiridas no ambiente hospitalar ou na comunidade causada por enterobactérias multirresistentes, devido seu amplo espectro de atividade antibacteriana e sua excelente estabilidade à hidrólise pela maioria das  $\beta$ -lactamases, incluindo  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL) e cefalosporinases AmpC <sup>(38)</sup>.

Os carbapenêmicos são antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que inibem a síntese da parede bacteriana pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Os carbapenêmicos mais usados atualmente são: o Imipenem, o Meropenem, Ertapenem e mais recentemente o Doripenem <sup>(35, 40)</sup>. Entretanto, apenas Imipenem, Meropenem e o Ertapenem são disponíveis para uso clínico no Brasil <sup>(36)</sup>. Estes agentes antimicrobianos são cruciais para o tratamento de infecções hospitalares, infecções relacionadas com transplantes, internações em UTI, e cirurgias. No entanto, na última década a resistência aos carbapenêmicos vêm aumentando consideravelmente, gerando uma grande preocupação mundial <sup>(20-23)</sup>.

O uso generalizado dos carbapenêmicos levou ao aparecimento de espécies de enterobactérias resistentes a esses antimicrobianos em diversas localizações geográficas em todo o mundo <sup>(38, 41, 42)</sup>. Como exemplo deste aumento, temos um estudo recente conduzido por Lefevre et al, em 2013 na França, que avaliaram em 6 meses a colonização por bacilos Gram-negativos resistentes ao Imipenem em 523 pacientes de uma UTI. Foi realizado swab retal no momento da admissão e semanalmente. A taxa de colonização por bacilos Gram-negativos resistentes ao Imipenem, incluindo *E. cloacae* e *E. aerogenes* aumentou de 5,6% para 58,6% ao

fim de 6 meses. O uso de Imipenem por 1 a 3 dias aumentou em 5,9 vezes o risco de aquisição de colonização por Gram-negativos resistentes ao Imipenem e em 7,8 vezes para aqueles que usaram por tempo maior <sup>(43)</sup>.

Outros fatores que podem ter contribuído para esta alta resistência aos carbapenêmicos, além do seu uso abusivo nos hospitais, são: 1) alto uso de outros antibióticos em humanos e animais ocasionando um efeito seletivo na microbiota intestinal, 2) contaminações em ambientes hospitalares facilitando a troca de material genético entre as bactérias, 3) contaminações de bactérias multirresistentes do ambiente hospitalar para o meio ambiente se propagando para comunidade, 4) aumento de pacientes estrangeiros em todos países e 4) altas trocas de pacientes entre hospitais facilitando a entrada e saída de pacientes infectados por micro-organismos resistentes aos carbapenêmicos.

### **1.6 Testes realizados para determinar resistência aos carbapenêmicos**

Os sistemas automatizados Vitek <sup>®</sup>, Vitek 2<sup>®</sup>, BD Phoenix <sup>®</sup>, Walk-Away <sup>®</sup>, são muito utilizados em hospitais de grande porte no mundo, pois além de identificar as bactérias, estes permitem a execução do teste de sensibilidade com maior rapidez. Esta rapidez de liberação dos resultados, se deve ao sistema de detecção de óptica capaz de medir alterações discretas de crescimento bacteriano. A interpretação dos resultados de sensibilidade estão de acordo com as normas do CLSI em nosso país, embora esta metodologia não seja padronizada por este mesmo instituto.

Estes testes são semi-quantitativos, pois avaliam de duas a quatro diluições que representam os limites de sensibilidade e de resistência a cada antimicrobiano, sendo assim, não fornecem o resultado exato da concentração inibitória mínima

(CIM) da droga. Por apresentarem período curto de incubação, podem não identificar corretamente resistência aos antimicrobianos, pois algumas bactérias são capazes de adquirir mecanismos de resistência induzíveis, um exemplo, são as espécies de *Enterobacter* que apresentam resistência mediada por  $\beta$ -lactamases cromossômicas induzíveis (AmpCs).

A nota técnica Nº 01/2013, Medidas de prevenção e controle de infecção por enterobactérias multiresistente, da ANVISA, comenta que a determinação de Concentrações Inibitorias Mínimas para Imipenem, Meropenem, Tigeciclina, Polimixina B ou Colistina, pelo método automatizado não é mandatória para guiar no tratamento.

O E-test é um método quantitativo, baseado numa combinação dos conceitos de testes de diluição e difusão. Ele quantifica diretamente a sensibilidade antimicrobiana. Este teste consiste em uma fita plástica fina, inerte e não porosa de 5mm largura e 50 mm de comprimento, que possui um gradiente exponencial pré-definido do antibiótico seco e estabilizado, onde seu gradiente reflete uma faixa contínua de concentração, que varia de 0,016 a 256 mcg/mL ou 0,002 a 32 mcg/mL dependendo do antimicrobiano. Sua interpretação pode ser realizada segundo os critérios do CLSI, no entanto, esta metodologia não é padronizada pelo CLSI.

O método de disco-difusão é realizado dispensando os discos de antimicrobianos sobre a placa de ágar após a aplicação do inóculo bacteriano com aproximadamente  $1$  a  $2 \times 10^8$  UFC/mL. Uma placa de 150mm pode conter até 12 discos de antimicrobianos, que são feitos de papel filtro empregnado com antimicrobianos em concentrações fixas e distribuídas comercialmente. Todo seu procedimento e sua interpretação são padronizados pelo CLSI.

De todas as técnicas de avaliação da sensibilidade antimicrobiana, as técnicas quantitativas são consideradas o padrão ouro, isto é, para confirmação da CIM, são teste de microdiluição em caldo e teste de diluição em ágar, dependendo do antimicrobiano utilizado, que são padronizadas pelo CLSI, os quais são utilizados em todos laboratórios de referência do mundo.

O teste de ágar diluição é realizado pela incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas de um antimicrobiano nas placas de Petri com meio de cultura, similar ao teste de microdiluição, onde ao invés de ser em placas com ágar, estas concentrações de antimicrobianos são diluídos em caldo em placas estéreis de 96 poços.

Existem alguns estudos interessantes que compararam os três métodos Vitek 2, E-test e microdiluição em caldo no ano de 2009 em 2 isolados de *E.cloacae* para o antimicrobiano Meropenem, o primeiro isolado apresentou CIM VITEK 2:  $\geq 16$  mg/L, E-test: 6 mg/l e seu CIM em microdiluição em caldo foi: 8 mg/L com gene VIM e o segundo isolado apresentou CIM VITEK 2:  $\geq 16$  mg/L, E-test: 6 mg/l e seu CIM em microdiluição em caldo foi: 4 mg/L com gene VIM, embora os resultados apresentaram resistência a CIM teve uma variação de até 4 concentrações, o mesmo não aconteceu com *E.coli* que ocorreu uma divergência nos resultados, o isolado sensível foi liberado como resistente pelo Vitek e E-test <sup>(44)</sup>.

Outro estudo com 50 isolados de *E.cloacae* demonstrou discordância nas concentrações inibitórias mínimas para Ertapenem nos métodos Vitek-2, E-test e ágar diluição, onde o Vitek 2 apresentou CIM mais altos que outros métodos, 11 isolados que eram sensíveis foram liberados resistentes no Vitek 2 <sup>(45)</sup>.

### 1.7 Interpretação dos Pontos de Cortes para Carbapenêmicos

A interpretação e a comparação de resultados de sensibilidade deve levar em consideração a concentração inibitória mínima da metodologia utilizada e o ano que este resultado foi liberado (realizado). Assim, os critérios mais utilizados são as padronizações testes de sensibilidade da Europa denominada EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing e dos USA CLSI- Clinical and Laboratory Standards Institute.

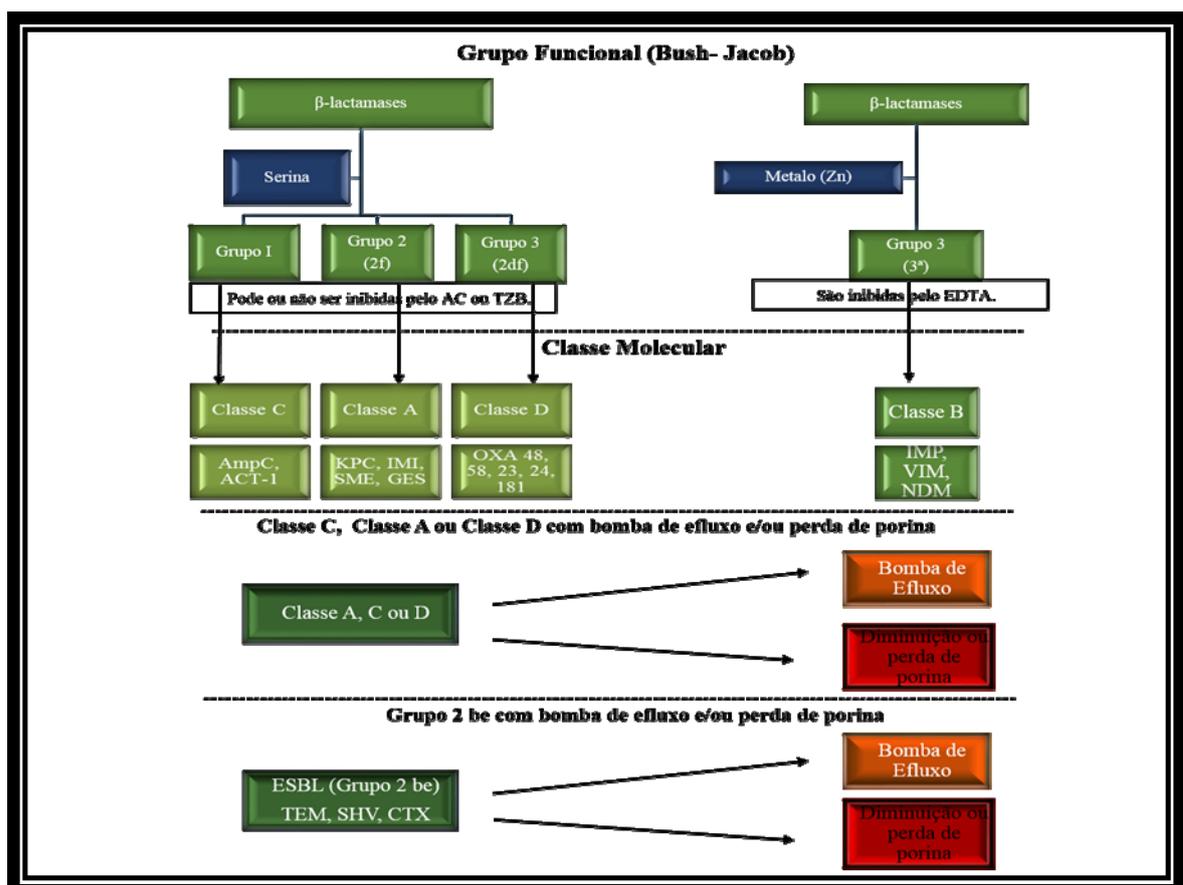
Anualmente os pontos de cortes são reavaliados, assim mudanças nos pontos de corte dos antimicrobianos podem ocorrer e os laboratórios devem permanecer em constante atualização, como demonstra a Tabela 2. Lembrando, que estes mesmos pontos de corte são utilizados em metodologias como E-test e sistemas automatizados como Vitek, que não são padronizados por estes comitês, somente o método de disco difusão e microdiluição em caldo e em ágar são padronizados. Assim, estudo retrospectivos devem levar em consideração todas informações obtidas de cada ano do comitê que seu país segue como referência.

**Tabela 2 -** Pontos de cortes do CLSI e EUCAST para analisar a resistência aos carbapenêmicos

	Pontos de corte CLSI									EUCAST	
	2005			2009			2010/2015			2015	
Antimicrobiano	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S/I	Valor de corte para triagem
<b>Ertapenem</b>	≤2	4	≥8	≤2	4	≥8	≤0,25	0,5	≥1	≤0,25	>0,12
<b>Imipenem</b>	≤4	8	≥16	≤4	8	≥16	≤1	2	≥4	≤1	>1
<b>Meropenem</b>	≤4	8	≥16	≤2	4	≥8	≤1	2	≥4	≤1	>0,12

### 1.8 Mecanismos de resistência aos Carbapenêmicos em *Enterobacter spp*

Embora, mencionados anteriormente todos mecanismos de resistência as  $\beta$ -lactamases. As espécies de *Enterobacter* podem se tornar resistentes aos carbapenêmicos devido a sua superprodução de AmpC  $\beta$ - lactamase da Classe C de Ambler associado com perda de proteína de membrana e /ou produção de carbapenemases da Classe A, B e D de Ambler. Atualmente já se sabe que alguns isolados apresentam resistência quando há associação de perda de proteína de membrana com produção de ESBL da Classe C de Ambler, como demonstra a Figura 2.



**Figura 2 -** Esquema dos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos

### 1.8.1 $\beta$ -lactamases AmpC

Como mencionados anteriormente, os isolados de *Enterobacter* são produtores constitutivos das beta-lactamases AmpC. Esta enzima possui uma massa molecular de 34 a 40 kDa. Estas são cefalosporinases do grupo funcional 1 e classe C de Ambler, segundo a classificação molecular das  $\beta$ -lactamases de Bush-Jacoby-Medeiros (Figura 1), que são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas (incluindo a terceira geração de cefalosporinas, mas geralmente, não os compostos da quarta geração) e monobactâmicos. Em geral, estas enzimas do tipo AmpC são fracamente inibidas pelos inibidores de ESBL clássicos, especialmente o ácido clavulânico. Mas, seus melhores inibidores são: Cloxacilina, Oxacilina e Aztreonam<sup>(46)</sup>.

Existem os genes AmpC que são induzíveis localizados no cromossomo, que são ACT-1, DHA-1, DHA-2 e CMY-13 e existem outros genes AmpC mediados por plasmídeos que são derivados a partir dos genes induzíveis que se tornaram móveis. Estes últimos frequentemente são encontrados ao redor do mundo em enterobactérias nosocomiais e não-nosocomiais. Os genes deste grupo são CMY onde foram encontrados 43 alelos diferentes (<http://www.lahey.org/Studies/>), FOX com sete variantes, ACC, LAT, MIR, com quatro variantes, ACT e MOX com três variantes e DHA com duas variantes.

Em algumas bactérias, as enzimas AmpC são induzíveis e são expressas em níveis elevados devido a mutações. A hiper expressão confere resistência as cefalosporinas de espectro estendido incluindo: Cefotaxima, Ceftazidima, Ceftriaxona. Sendo um problema, principalmente em infecções causadas por *E. aerogenes* e *E. cloacae*, onde um isolado inicialmente sensível pode se tornar

resistente durante a terapia. E em espécies de *Enterobacter* elas estão relacionadas com aumento de resistência aos carbapenêmicos quando associadas a outros mecanismos como perda de porina, já descrito anteriormente<sup>(47)</sup>.

Para detectá-las rapidamente são utilizados testes fenotípicos que são baseados na inibição por cloxacilina, que podem detectar sua hiperprodução. Outra metodologia que podemos realizar são os testes moleculares como: PCR e sequenciamento do DNA da bactéria<sup>(48, 49)</sup>. Embora, os estudos destes genes sejam importantes principalmente os genes AmpC mediados por plasmídeos por permitir visualizar sua mobilidade em outras bactérias, poucos estudos foram realizados em isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae*.

### 1.8.2 Enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos

Dentre as diferentes classes de  $\beta$ -lactamases, as carbapenemases, pertencem à família mais versátil por sua ampla atividade hidrolítica à maioria dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, além de apresentarem uma fraca inibição por inibidores de  $\beta$ -lactamases comerciais. As enzimas carbapenemases estão envolvidas na resistência aos carbapenêmicos. Elas pertencem em sua maioria a duas classes moleculares, distinguíveis pela conformação de seu sítio ativo, as carbapenemases de classe A e as metalo- $\beta$ -lactamases de classe B. Mas também temos a classe D que são as oxacilinas que também estão relacionadas com uma participação da resistência aos carbapenêmicos, como apresenta a Tabela 1<sup>(32, 50, 51)</sup>.

As três grandes famílias de serino-carbapenemases de classe A incluem as enzimas NMC/IMI (Imipenemase/ non-metallo carbapenemase-A), SME (*Serratia marcescens* enzyme) e KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase), que se

caracterizam por hidrolisar uma ampla variedade de antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo: Carbapenêmicos, Cefalosporinas, Penicilinas e Aztreonam e podem ser inibidas pelo Ácido-clavulânico e Tazobactam. O quarto tipo de enzima desta classe são as GES (Guiana extended-spectrum), que apresentam uma pequena taxa de hidrólise ao Imipenem <sup>(52)</sup>.

A NMC-A foi a primeira classe de carbapenemase identificada em um isolado clínico de *E. cloacae* em 1990 na França em um paciente que recebeu tratamento com Imipenem. A NMC-1 hidrolisa Aminocarbopenicilinas, Cefalotinas, Imipenem e Aztreonam <sup>(50, 53)</sup>. Sua atividade é parcialmente inibida pelo Ácido clavulânico, Tazobactam e Sulbactam. Já a SME-1, foi identificada em dois isolados de *Serratia marcescens* em Londres no ano de 1982, e apresentavam resistência as Cefalosporinas, Imipenem e Aztreonam. A IMI-1 foi o terceiro tipo de carbapenemase da classe A identificada em dois isolados de *E. cloacae* no Sul da Califórnia em 1984 <sup>(54)</sup>.

A enzima KPC é atualmente a serino-carbapenemase de maior importância. O primeiro relato desta enzima ocorreu em 2001 nos EUA <sup>(6, 55)</sup>. A enzima KPC confere resistência a todos os  $\beta$ -lactâmicos, incluindo: Penicilinas, Cefalosporinas, Monobactâmicos e Carbapenêmicos. Muitos isolados que contêm o gene codificador desta enzima apresentam altos níveis de resistência aos carbapenêmicos. As últimas serino-carbapenemases identificadas foram as enzimas do tipo GES, que apresentam baixa atividade contra os carbapenêmicos <sup>(56)</sup>.

Dentre todas estas enzimas, as carbapenemases conhecidas como KPC-2, KPC-3 e KPC-4, são as mais descritas, tanto em isolados de *E. aerogenes* como de *E. cloacae* <sup>(6, 57, 58)</sup>, como demonstra Tabela 3 e 4. Um estudo conduzido por Marchaim

et al., 2008, detectou a presença de vários clones que possuíam a carbapenemase KPC-2, neste mesmo estudo foi observado que os pacientes que foram mais afetados por estes micro-organismos eram imunocomprometidos, tiveram múltiplos procedimentos invasivos, e evoluíram com alta taxa de mortalidade <sup>(6)</sup>. Estudos demonstram que a disseminação global de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos têm sido amplamente atribuída a disseminação de uma cepa dominante de *Klebsiella pneumoniae* (KPC) <sup>(59-62)</sup>. A sua rápida disseminação pelo mundo em diversas enterobactérias se deve a localização de seu gene *blaKPC*. Esse gene codificador de KPC está localizado em plasmídeos transferíveis em regiões conservadas denominados transposons Tn3 Tn4401 <sup>(59, 60)</sup>.

Um exemplo de um estudo que deixa explícito a importância da detecção rápida destes genes, para um controle maior nos surtos hospitalares e sua disseminação para outras Enterobactérias, foi realizado por Mathers et al., nos Estados Unidos em 2011 <sup>(65)</sup>. Os autores descreveram em um surto de KPC, infecções causadas por enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos com alta transmissão horizontal de um plasmídeo entre as linhagens e espécies de Enterobactérias. Dos 16 isolados identificados de 14 pacientes, foram encontradas 6 espécies e 4 gêneros de bactérias durante os primeiros 8 meses do surto. Dos 11 isolados, 9 abrigaram o mesmo plasmídeo que carregava o gene *blaKPC* <sup>(63)</sup>.

As Metallo- $\beta$ -lactamases (MBLs) são  $\beta$ -lactamases pertencentes à classe B de Ambler que hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos Monobactâmicos (Aztreonam) e são resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamases. O mecanismo de hidrólise destas enzimas é dependente de dois íons zinco divalentes no sítio ativo da enzima, o que resulta na sua característica inibição por EDTA ou compostos

derivados de ácido tióico que tem a propriedade de quelar o cátion zinco divalente (56, 64).

Como todas as  $\beta$ -lactamases, as MBLs podem ser codificadas cromossomicamente ou transmitidas através de elementos genéticos móveis. O primeiro relato de MBL adquirida em um patógeno de importância clínica foi em 1991, no Japão, em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* resistente ao Imipenem e a outros antimicrobianos anti-pseudomonas<sup>(68)</sup>. Desde então inúmeras MBLs foram identificadas e atualmente são conhecidas seis tipos de MBLs: IMP (Imipenemase), VIM (Verona Imipenemase), SPM (São Paulo metalo  $\beta$ -lactamase), GIM (German Imipenemase), SIM (Seoul Imipenemase) e a mais recente NDM-1 (New Delhi)<sup>(65)</sup>.

A disseminação de MBLs plasmidiais em patógenos de relevância clínica como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp e membros da família Enterobacteriaceae em vários países, mostrou que este mecanismo de resistência é um problema de saúde, pois limita as opções de tratamento para infecções causadas por estes patógenos<sup>(68)</sup>.

Dentre todas as Metalo- $\beta$ -lactamases mencionadas, a NDM-1 é a enzima que vêm gerando maiores preocupações. Esta enzima foi descrita pela primeira vez em 2009, em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* de um paciente hospitalizado em New Delhi na Índia<sup>(65)</sup>. Nos meses seguintes vários países como: Canadá, EUA, Suécia, Reino Unido, Áustria, Bélgica, França, Japão, África, Austrália, China, entre outros, reportaram esta enzima, evidenciando a sua rápida disseminação<sup>(66)</sup>. Em 2012, foi identificada cepa de *Enterobacter cloacae* em úlceras de pé diabético na Índia<sup>(67)</sup>. E no Brasil já foi descrita em *E. cloacae*, *E. coli* (ANVISA, 2013) e em uma publicação recente em *Providência rettigeri*<sup>(68)</sup>.

O gene denominado *bla*<sub>NDM-1</sub>, já foi identificado em *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Proteus* spp, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella oxytoca*, *Morganella morganii*, *Providencia* spp e *Acinetobacter baumannii*. E foi também demonstrado que este gene pode estar presente em diferentes plasmídeos o que proporciona a sua transferência entre diferentes gêneros e espécies de bactérias. Bactérias que possuem genes codificadores desta enzima são comumente resistentes a quase todos os grupos de antibióticos, incluindo: Fluoroquinolonas, Aminoglicosídeos e  $\beta$ -lactâmicos, especialmente Carbapenêmicos, mas são sensíveis a Colistina e às vezes a Tigeciclina <sup>(69)</sup>.

Outras  $\beta$ -lactamases que estão relacionadas com resistência aos carbapenêmicos, são as oxacilinas da classe D de Bush & Jacoby (Tabela 1), que também estão amplamente distribuídas entre as espécies de bactérias Gram-negativas clinicamente relevantes <sup>(32)</sup>. Um elevado grau de diversidade é observado nos níveis bioquímicos e genéticos dessas enzimas, que podem exibir um espectro amplo de hidrólise dos  $\beta$ -lactâmicos. Atualmente este grupo incluem aproximadamente 232 enzimas, onde várias linhagens distintas dentro do grupo OXA são muito divergentes de enzimas que adquiriram a capacidade de hidrolisar os carbapenêmicos <sup>(58)</sup>. Os subtipos mais importantes de oxacilinas que levam resistência aos carbapenêmicos são: OXA-23, OXA-24, OXA-50, OXA-51, OXA-55, OXA-58 e OXA-143. Estudos relatam que as oxacilinas podem conferir resistência apenas moderada para bactérias patogênicas, e sua ação é apenas complemento, pois pode atuar juntamente com outros mecanismos de resistência tais como deficiência de porinas e expressão de bomba de efluxo. Como comentado anteriormente este grupo de enzimas é variável, podendo ser codificado em plasmídeos e cromossomos <sup>(70)</sup>.

Descrições esporádicas ou surtos hospitalares envolvendo OXA-48 em isolados de *K. pneumoniae*, *E. coli* ou *E. cloacae* vêm sendo cada vez mais crescente, e relacionadas com transferência de pacientes hospitalizados de áreas endêmicas, estes quadros têm sido relatados em países como França, Alemanha, Espanha, Países Baixos e Reino Unido <sup>(70-74)</sup>. Um estudo elaborado por Xia Y e seus colaboradores em 2012, encontrou entre 8 isolados de *E. cloacae*, 5 isolados que continham o gene OXA-1 com perfis totalmente divergentes um do outro <sup>(33)</sup>. O primeiro isolado de *E. cloacae*, apresentava juntamente com OXA-1, IMP-8, CTX-M14 e Amp-C conhecida como Act-1, com CIMS  $\geq 8$  mg/L para Ertapenem e 2 mg/L para Imipenem, o segundo isolado apresentou OXA-1, IMP-8 e TEM, com CIMS  $\geq 8$  mg/L para Ertapenem e  $\leq 1$  mg/L para Imipenem, o terceiro isolado apresentava OXA-1, IMP-8, com CIMS 4 mg/L para Ertapenem e  $\leq 1$  mg/L para Imipenem, já o penúltimo isolado só apresentava OXA-1, com CIMS  $\geq 8$  mg/L para Ertapenem e  $\leq 1$  mg/L para Imipenem e o último isolado apresentava os genes OXA-1, IMP-8, CTX-M14, com CIMS  $\geq 8$  mg/L para Ertapenem e  $\leq 1$  mg/L para Imipenem <sup>(39)</sup>.

Na França em 2012, em um estudo conduzido por Birgy et al., foram encontrados outros perfis de beta-lactamases, dos três *Enterobacter cloacae* encontrados 1 apresentava KPC-3, OXA-9, TEM-1, com CIMS de 32 mg/L para Ertapenem e 32 mg/L para Imipenem, 16 mg/L para Meropenem e 8 mg/L para Doripenem e os outros 2 apresentavam hiper produção de Amp C, com CIMS de 4 mg/L para Ertapenem e 0,5 mg/L para Imipenem, 0,5 mg/L para Meropenem e 0,5 mg/L para Doripenem <sup>(75)</sup>.

No Brasil, Andrade e colaboradores em 2011, encontraram 5 isolados de *E. cloacae*, todos apresentando OXA-9 e TEM-1, o que demonstra a grande capacidade

que estes micro-organismos tem para se tornarem cada vez mais resistentes aos carbapenêmicos <sup>(76)</sup>. Um surto recente, ocorrido em um hospital de Jerusalém, identificou 29 isolados de *Klebsiella pneumoniae*, todos pertencentes a um único clone e dois isolados de *E. cloacae* <sup>(80)</sup>. Todos os isolados possuíam os genes *bla*OXA-48 e *bla*CTX-M-14, que estavam localizados no mesmo plasmídeo <sup>(77)</sup>.

Outro importante mecanismo relatado na literatura atualmente na espécie de *Enterobacter*, que não pertencem a estes grupos de carbapenemases que foram descritas anteriormente, mas que pode levar a resistência aos carbapenêmicos é a produção de ESBL em combinação com alteração na permeabilidade da membrana externa <sup>(2, 37, 52, 57)</sup>.

As  $\beta$ -lactamases de espectro estendido (ESBL), são enzimas que pertencem ao grupo 2be no Bush-Medeiros-Jacoby e a Classe A no sistema Ambler. Em geral estas enzimas, são capazes de hidrolisar as Penicilinas (por exemplo, Ampicilina e Piperacilina), Cefalosporinas da primeira, segunda, terceira e quarta geração e a Monobactâmicos como Aztreonam, mas não as Cefamicinas ou Carbapenêmicos (Tabela 1).

Os grupos clinicamente mais importantes de ESBLs são as enzimas CTX-M, seguido de SHV e derivados de TEM, sendo um grupo muito heterogêneo apresentando mais de 700 beta-lactamases já descritas. As ESBLs, particularmente TEM e SHV são facilmente inibidas por inibidores de  $\beta$ -lactamases disponíveis comercialmente, como: Ácido clavulânico, Tazobactam ou Sulbactam, já as enzimas CTX-M são inibidas facilmente por Tazobactam e hidrolisam melhor Cefotaxima e Ceftriaxona. Estas propriedades (inibidores) servem como teste fenotípico para sua detecção.

---

A grande maioria das ESBLs é constituída de enzimas adquiridas, codificadas em genes localizadas em plasmídeos. Sendo, assim, estas enzimas são expressas em vários níveis e diferem entre si nas suas características bioquímicas e atividades contra  $\beta$ -lactâmicos específicos (ex: Cefotaxima, Ceftazidima e Aztreonam).

Assim, o nível de expressão, as propriedades de uma enzima e a presença simultânea de outros mecanismos de resistência, resulta em uma grande diversidade de fenótipos de resistência observados em isolados de ESBL positivos. Esta incrível capacidade de adaptação, originando potentes enzimas, acabam por dificultar tratamentos e métodos eficazes para sua identificação.

Estas enzimas ESBLs, cada vez mais vem sendo identificadas em isolados clínicos do mundo inteiro, inclusive em *E. aerogenes* e *E. cloacae*, como demonstra a Tabela 3 e 4. Atualmente, métodos de sequenciamento permite identificar mais rapidamente variantes destas enzimas, que estão descritas no site [www.lahey.org](http://www.lahey.org).

Um estudo recente conduzido no Chile por Wozniak, 2012, demonstra que isolados de *Enterobacter spp* apresentaram resistência aos carbapenêmicos não pela presença de genes codificadores de carbapenemases e sim devido a enzimas ESBL e AmpC<sup>(78)</sup>.

Portanto, como visto anteriormente, as carbapenemases da classe A (KPC), classe B (IMP, VIM, NDM), ou classe D oxacilinasas, descritas por Karen Bush and George A. Jacoby em 2010, são determinantes importantes na resistência aos carbapenêmicos e um fator que temos que destacar é que seus genes estão principalmente localizados em plasmídeos ou estão associados a várias estruturas genéticas móveis como sequência de inserção, integrons e transposons, por isso, temos observados a grande preocupação em relação a este assunto, pois estes

recursos que a bactéria tem em seu favor, acabam favorecendo sua propagação no ambiente hospitalar, proporcionando a resistência a múltiplos antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, drogas estas que são de ultima escolha <sup>(32)</sup>. Assim, nos últimos anos várias carbapenemases foram identificadas em *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos, que estão descritas nas tabelas 3 e 4 a seguir.

**Tabela 3 -  $\beta$ -lactamases encontradas em *Enterobacter aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos**

<i>Enterobacter aerogenes</i>							
	Enzima	Data /País	Data	CIMIMI	CIMMER	CIMERT	Referência
<b>Classe A</b>	KPC-2	Estados Unidos	2005	DA 4 a 16	DA 4 a 8	DA 8	(32) Bratu, 2005
<b>Serino <math>\beta</math>-lactamase</b>	KPC-2	França	2012	DA 8	DA 8	DA >32	(3) Nordmann, 2012
	KPC-2	China	2013	DA 4	DA 2	DA 4-8	(36) Zhou, 2013
	KPC-2	China	2014	DA 4-16	DA 4-32	DA 8-16	(39) Qin, 2014.
	KPC-2	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
	KPC-3	Estados Unidos	2015	MA 1 a 2	MA 1 a 2	MA 2 a 4	(29) Ahn, 2014
<b>Classe B</b>	IMP-1	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
<b>Metallo <math>\beta</math>-lactamase</b>	VIM-2	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
	NDM-1	China	2015	DA $\geq$ 16	DA 4 a 8	-	(41) Chen, 2015
<b>Oxacilinas</b>							
<b>ESBL</b>	TEM-24	França	2008	E. 32	-	E. >32	(2) Levrefre, et al. 2013
	TEM-1	Reino Unido	2012	DA 16	DA 4	DA 16	(23) Doumith, 2009.
	TEM-20	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
<b>Beta-lactamase de espectro estendido</b>	TEM-20	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
	TEM-24	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
	SHV-5	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
	SHV-12	França	2008	R	-	-	(39) Biendo, 2008.
	SHV-12	Estados Unidos	2015	MA 2	MA 1	MA 4	(29) Ahn, 2014
	SHV-154	Estados Unidos	2015	MA 1	MA 1	MA 2	(29) Ahn, 2014
	CTX-M-15	Estados Unidos	2015	MA 2	MA 2	MA 4	(29) Ahn, 2014
	TEM-141	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
	CTX-M-59	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
	CTX-M-8	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
CTX-M-97	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
CTX-M-15	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
SHV-120	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
<b>AmpC</b>	ACT	Chile	2012	DC 8 a 16	$\leq$ 4 a 8	2 a >8	(25) Wozniak, 2012.
	MIR	Chile	2012	DC 8 a 16	$\leq$ 4 a 8	2 a >8	(25) Wozniak, 2012.
	DHA-1	China	2013	-	-	-	(42) Shou, 2013

DF: Disco difusão; E: E-test; DC: Diluição em Caldo; DA: Diluição em ágar e MA: Método automatizado.

Referência da Tabela 3 e 4, primeiro número tabela, segundo referência: 1 (67); 2 (43); 3(79); 4 (80); 5(81); 6 (82); 7 (83); 8 (84); 9 (85); 10 (86); 11(23); 12 (87); 13 (88); 14 (89); 15 (90); 16 (91); 17 (92); 18 (93); 19 (94); 20 (95); 21 (96); 22 ESCMID 2009; 23 (97); 24 (98), 25 (99); 26 (100), 27 (101); 28 (76); 29 (102); 30 (103); 31 (104); 32(105); 33(106); 34(75); 35(58); 36 (107); 37(39); 38(108); 39 (109); 40(110); 41(111); 42(57)

**Tabela 4 -  $\beta$ -lactamases encontradas em *Enterobacter cloacae* resistentes aos carbapenêmicos**

<i>Enterobacter cloacae</i>							
	Enzima	Data /País	Data	CIM IMI	CIM MER	CIM ERT	Referência
<b>Classe A</b>	KPC-3	Estados Unidos	2003	DA 16	DA 4	DA 16	(32) Bratu, 2005
	KPC-2	China	2008	DA 32	DA 32	-	(5) Cai, 2008
<b>Serino</b>	KPC-2	Israel	2008	E 4 a >32	E 2 a >32	E 4 a >32	Chmlnitsky, 2008
	KPC-2	Estados Unidos	2009	-	-	R	(31) Marshall, 2009
<b><math>\beta</math>-lactamase</b>	KPC-2	China	2009	DA >32	-	-	(30) Wu, 2010
	KPC-2	França	2012	DA 1-24	DA 0,75-16	DA 1,5-32	(3) Nordamann, 2012
	KPC-4	Reino Unido	2012	DA 8	DA 8	DA >16	(23) Doumith, 2009.
	KPC-3	França	2012	DA 32	DA 16	DA 32	(34) Birgy, 2012
	<b>KPC</b>	<b>Brasil</b>	<b>2013</b>	E 0,75 a >32	E 0,75 a >32	E 3 a >32	(35) Jaskulski, 2013.
	<b>KPC-2</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
	IMI-1	Califórnia	1984	DC > 32	DC 4	-	(8) Rasmussen, 1996
	IMI-2	China	2006	DC 64	DC 32	DC 32	(16) Yu, 2006.
	IMI-2	Finlândia	2009	>32	>32	>256	(22) Koskela, 2009.
	KPC-2	Estados Unidos	2015	MA 0,5 a	MA 0,25 a 6	MA 0,25 a 2	(29) Ahn, 2014
	KPC-3	Estados Unidos	2015	MA 2 a 32	MA 1 a 64	MA 2 a 128	(29) Ahn, 2014
	NMC-A	Estados Unidos	2003	E 32 DC 4	E >32	E >32	(20) Pottumarthy, 2003
	NMC-1	Argentina	2004	DC 32	DC 8	-	(21) Radice, 2004.
	NMC-A	França	2012	DA 16	DA 16	DA >32	(3) Nordamann, 2012
	<b>Classe B</b>	IMP-8	Taiwan	2002	DA 0,25 a 4	DA 0,25 a 2	-
IMP-4		Australia	2005	DC >8	DC >8	-	(19) Peleg, 2005.
<b>Metallo <math>\beta</math>-lactamase</b>	IMP-1	China	2008	DA 2	DA 4	DA 16	(4) CHEN, 2009
	IMP-1	França	2012	DA 8 - 32	DA 2- >32	DA >32	(3) Nordamann, 2012
	IMP-8	China	2012	DA $\leq$ 1 - 2	-	DA 4 - $\geq$ 8	Xia, 2012
	IMP-8	China	2013	DA 1	DA 1	DA 2	(36) Zhou, 2013
	IMP-4	China	2013	DA 0,25	DA 0,5	DA 2	(36) Zhou, 2013
	VIM-2	Korea	2003	DA 4	DA 4	-	(11) Jeong, 2003.
	VIM-1	Itália	2004	8	8	-	(24) Castanheira, 2007.
	VIM-1	Grécia	2005	DC 512	DC 125	E >32	(13) Galani, 2005.
	VIM-5	Turquia	2005	DC 2	DC 4	-	(17) Gacar, 2005.
	VIM-1	Itália	2008	DC 32	DC 8	-	(10) Perilli, 2008
	VIM-1	Itália	2009	DC <0,12 a 2	Dc 0,006 a 2	Dc 0,25 a 8	(18) Falcone, 2009.
	VIM-1	Espanha	2009	E 1	E 1	E 1,5	(9) Trevino, 2009
	VIM-1	Espanha	2009	E 8	E 0,5	E 0,19	(9) Trevino, 2009
	VIM-12	Grécia	2010	E1	E 1,5	-	(15) Panopoulou, 2010.
	VIM-31	Belgica	2012	MA 4	MA >16	-	(12) Bogaerts, 2012.
	NDM-1	França	2012	DA 2	DA 2	DA 16	(3) Nordamann, 2012
	VIM-1	França	2012	DA 1->32	DA 0,5->32	DA 0,38->32	(3) Nordamann, 2012
	NDM-1	India	2010	E. 4-8	E. 16-32	E. 8-16	(1) Khan, et al. 2012
NDM-1	<b>Brasil</b>	2013	-	-	-	(40) Rosalis, 2014	
NDM-1	Romenia	2013	E 16 a 32	E 8 a 16	E >32	(33) Székely, 2013	
<b>Oxacilinas</b>	OXA-1	India	2010	E. 4-8	E. 16-32	E. 8-16	(1) Khan, et al. 2012
	<b>OXA-9</b>	<b>Brasil</b>	<b>2011</b>	-	-	-	(28) Andrade, 2011.
	OXA-48	Espanha	2011	DC 2	DC 4	DC 4	(6) Torres, 2013
	OXA-9	França	2012	DA 32	DA 16	DA 32	(34) Birgy, 2012
	OXA-48	França	2012	DA 0,5 -1	DA 0,5 -1,5	0,5-16	(3) Nordamann, 2012
	OXA-1	China	2012	DA $\leq$ 1 - 2	-	DA 4 - $\geq$ 8	Xia, 2012
<b>ESBL</b>	TEM-1	Taiwan	2002	DA 0,25 a 4	DA 0,25 a 2	-	(14) Yan, 2002.
	SHV-2	Taiwan	2002	DA 0,25 a 4	DA 0,25 a 2	-	(14) Yan, 2002.
	SHV-12	Itália	2008	DC 32	DC 8	-	(10) Perilli, 2008
	SHV-12	França	2008	E. 32	-	E. >32	(2) Levrefre, et al. 2013
	SHV-12	Israel	2008	E 4 a >32	E 2 a >32	E 4 a >32	Chmlnitsky, 2008
	SHV-12	Itália	2009	DC 1 a 2	DC 2	DC 2 a 8	(18) Falcone, 2009.
	CTX-M-15	India	2010	E. 4-8	E. 16-32	E. 8-16	(1) Khan, et al. 2012
	SHV-1	India	2010	E. 4-8	E. 16-32	E. 8-16	(1) Khan, et al. 2012
	TEM-1	India	2010	E. 4-8	E. 16-32	E. 8-16	(1) Khan, et al. 2012
	TEM-1	Algeria	2010	DA 2	-	-	(7) Souna, 2014
	CTX-M-1	Algeria	2010	DA 2	-	-	(7) Souna, 2014
	TEM-1	Reino Unido	2012	DA 1 a 8	DA 0,5 a 8	DA 4 a >16	(23) Doumith, 2009.
	CTX-M-3	China	2013	DA 1	DA 1	DA 2	(36) Zhou, 2013
	CTX-M-14	China	2013	DA 4	DA 4	DA 8	(36) Zhou, 2013
	CTX-M-14	China	2012	DA $\leq$ 1 - 2	-	DA 4 - $\geq$ 8	Xia, 2012
	CTX-M-3	China	2012	DA $\leq$ 1 - 8	-	DA $\geq$ 8	Xia, 2012
	<b>CTX-M-2</b>	<b>Brasil</b>	<b>2013</b>	E 0,38-a 0,75	E 0,75 a 0,5	E 4 a 6	(35) Jaskulski, 2013.
	<b>CTX-M-15</b>	<b>Brasil</b>	<b>2013</b>	-	-	R	(26) Seki, 2013.
	SHV-5	Estados Unidos	2015	MA 0,5 a 32	MA 0,25 a 64	MA 0,25 - 128	(29) Ahn, 2014
	CTX-M-5	Estados Unidos	2015	MA 2	MA 2	MA 4	(29) Ahn, 2014
	<b>TEM-1</b>	<b>Brasil</b>	<b>2011</b>	-	-	-	(28) Andrade, 2011.
	<b>TEM-1</b>	<b>Brasil</b>	<b>2012</b>	DA 32	DA 16	DA 32	(34) Birgy, 2012
	<b>TEM-141</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.
<b>CTX-M-8</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
<b>CTX-M-15</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
<b>CTX-M-9</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
<b>SHV-2a</b>	<b>Brasil</b>	<b>2015</b>	E CIM 50 $\geq$ 32	E CIM 50 $\geq$ 12	E CIM 50 $\geq$ 32	(27) Tavares, 2015.	
ACT-1	Algeria	2010	DA 2	-	-	(7) Souna, 2014	
<b>AmpC</b>	ACT	Chile	2012	DC $\leq$ 0,5 a 16	$\leq$ 4 a >16	4 a >8	(25) Wozniak, 2012.
	MIR	Chile	2012	DC $\leq$ 0,5 a 16	$\leq$ 4 a >16	4 a >8	(25) Wozniak, 2012.
	DHA	Chile	2012	DC 16	$\leq$ 4	>8	(25) Wozniak, 2012.
	ACT-1	China	2012	DA 2	-	DA 8	Xia, 2012

DF: Disco difusão; E: E-test; DC: Diluição em Caldo; DA: Diluição em ágar e MA: Método automatizado.

### 1.8.3 *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* resistentes aos carbapenêmicos no Brasil

Dados brasileiros que descrevem resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Enterobacter* spp são escassos. Estudo brasileiro avaliou a sensibilidade aos carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Doripenem) de Enterobactérias de 18 centros; dos 70 *Enterobacter* spp avaliados; 25.7% foram resistentes ao Imipenem; 2.8% ao Meropenem e 5.7% ao Doripenem <sup>(40)</sup>.

O gene codificador *bla*<sub>KPC</sub> foi descrito em isolados clínicos de *E. cloacae* no Rio Grande do Sul <sup>(112)</sup> e Porto Alegre <sup>(76)</sup>. Recentemente Andrade e colaboradores encontraram 6 isolados de *Enterobacter cloacae* que apresentavam o gene KPC-2 <sup>(59)</sup> e em 2009 a 2011 foram identificados isolados de *E. aerogenes*, com presença de KPC em 7 estados do Brasil, os quais foram: Espírito Santo, Minas Gerais, Brasília, Goiás, Pernambuco, Ceara, Alagoas e Bahia <sup>(79)</sup>. O que alerta para possível disseminação desse gene nos hospitais brasileiros (Tabela 2).

No Brasil, em 2013, Jaskulski e colaboradores, avaliaram a resistência à Ertapenem, em um estudo que incluiu 128 amostras de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp, resistentes ao Ertapenem. Os genes detectados foram *bla*<sub>TEM</sub> em 52,9% e 10,3% , *bla*<sub>SHV</sub> em 29,4% e 0,94% , *bla*<sub>CTX-M</sub> em 41,4% e 1,9% e *bla*<sub>CTX-M-2</sub> em 23,5% e 1,9% respectivamente de isolados de *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*. O gene *bla*<sub>KPC</sub>, esteve presente em 12,6% dos *Enterobacter* spp. As porinas da membrana externa, OmpC e OmpF estavam presentes em 6,6% de isolados de *E. cloacae*. Estes resultados indicam que vários mecanismos de resistência contribuíram para o potencial fracasso terapêutico da terapia efetuada com carbapenêmicos e

apontam para a necessidade de melhores métodos de detecção e estratégias de vigilância <sup>(58)</sup>.

Em 2013 ocorreu no país o primeiro surto por enterobactérias positivas para NDM-1 (New Delhi Metallo- $\beta$ -lactamase) ou *bla*<sub>NDM</sub>, que colonizou seis pacientes, todos confirmados laboratorialmente. Os casos confirmados possuíam mediana de idade de 67 anos <sup>(50-73)</sup>, todos eram portadores de doenças de base graves e comorbidades. Recentemente, foi confirmada a colonização por *Enterobacter cloacae*, *E. coli*, *Providencia rettigeri* <sup>(68)</sup> e *Klebsiella pneumoniae* <sup>(113)</sup>, que carregavam o gene *bla*<sub>NDM-1</sub> em hospitais brasileiros.



**Figura 3** - Distribuição do gene *bla*KPC em isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* no Brasil. ★ Locais onde foram identificados isolados de *E. aerogenes* e/ou *E. cloacae*, que apresentavam o gene KPC

#### 1.8.4 Impermeabilidade da Membrana Externa (Porinas e Bomba de efluxo)

A membrana externa (ME) de bactérias Gram-negativas desempenha um papel crucial na resistência bacteriana, pois ela compõe uma camada extra de proteção para o micro-organismo sem comprometer a troca de material necessário para sustentar sua vida. Ao combinar uma bicamada lipídica com proteínas altamente hidrofóbicas formadoras de poros que possuem propriedades específicas de exclusão de tamanho, a ME atua como uma poderosa barreira <sup>(114-115)</sup>. Por isso a permeabilidade da membrana tem um importante papel na sensibilidade dos micro-organismos Gram-negativos frente aos antibióticos, pois pequenas drogas hidrofílicas, tais como  $\beta$ -lactâmicos, utilizam porinas para facilitar seu acesso ao interior das células, enquanto outras drogas como os macrolídeos e drogas hidrofóbicas se difundem através da bicamada lipídica <sup>(114, 115)</sup>. Portanto, a modificação na composição de lipídeos e proteínas da membrana externa que levam a diminuição ou perda de uma proteína ou porina da membrana externa (ME) podem reduzir o acesso de antibióticos ao espaço periplasmático, uma vez que os  $\beta$ -lactâmicos têm que cruzar a membrana externa das bactérias Gram-negativas através de OMPs <sup>(114, 115)</sup>.

Estudos recentes mostraram que a resistência aos antimicrobianos nos Gram-negativos está relacionada com modificações no perfil das (MEs), tanto no tamanho como na redução dos níveis de expressão ou na presença de porinas mutadas, que restringem a entrada do antimicrobiano, e diminuem sua concentração interna, conferindo assim, resistência a várias classes de antibióticos <sup>(78, 116)</sup>. A resistência aos carbapenêmicos por perda ou diminuição de expressão da porina já foi relatada em vários estudos em diferentes espécies da família Enterobacteriaceae em todo o

---

mundo, inclusive em *Enterobacter aerogenes* <sup>(27, 114, 116)</sup>, como também em *Enterobacter cloacae* <sup>(117, 118)</sup>.

Nas enterobactérias até o momento foram encontradas três porinas com importância na resistência bacteriana. A OmpC e seu homólogo OmpK36 de 36kDa encontrada na *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp e Omp1 em *Serratia Marcescens*, OmpF e seu homólogo OmpK35 de 35 kDa encontrada em *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp e Omp 2 em *Serratia marcescens* e, uma terceira proteína denominada OmpA que atua fracamente na resistência bacteriana <sup>(115)</sup>. Sabe-se que a seleção *in vivo* de mutantes deficientes destas porinas são originadas de espécies produtoras de AmpC ou ESBL que foram expostas a terapias prévias com antibióticos carbapenêmicos <sup>(115)</sup>.

O isolamento de uma cepa de *E. aerogenes* resistente ao Imipenem, apontou a porina OprD como responsável pela permeabilidade ao Imipenem. Estudos confirmaram posteriormente que esta mesma proteína permitia a difusão facilitada de carbapenêmicos através da membrana externa <sup>(119, 120)</sup>. Em outro estudo, foi descrito que a resistência ao Imipenem em um isolado de *E. aerogenes* estaria associada com a falta de expressão das proteínas de membrana externa dos análogos da OmpC (42 kDA) e OmpF (39kDA) o que resultou na diminuição da susceptibilidade ao Meropenem e Cefepima <sup>(27)</sup>.

Pages et al, apresentaram dados valiosos quando analisaram o perfil das porinas de 45 isolados clínicos de *E. aerogenes* resistentes aos  $\beta$ -lactâmicos obtidos de hospitais franceses, destes 44% mostraram perda da porina OMP C (45 kDA), com aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de Cefepima, Imipenem e Cefotaxime. Muitas cepas deste estudo apresentaram atividade constitutiva ou

induzida de  $\beta$ -lactamases, mas outras não apresentavam nenhuma atividade de enzimas. Os autores, concluíram que nestas últimas linhagens a resistência aos antibióticos pareciam originar essencialmente de perda de porinas. Assim, podemos considerar que o mecanismo de redução de permeabilidade de membrana externa é uma estratégia eficiente que as bactérias adquiriram para sua sobrevivência quando expostos a estes antimicrobianos <sup>(30, 121, 122)</sup>.

A resistência por impermeabilidade de membrana é atribuída também ao mecanismo de efluxo, caracterizado pela expulsão da droga do interior da bactéria como consequência de uma hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo, reduzindo drasticamente a absorção do fármaco devido à perda de porinas de membrana. Este sistema foi descrito pela primeira vez como um mecanismo de resistência à tetraciclina em *Escherichia coli*. Nos anos seguintes, vários mecanismos de efluxo foram descritos em bactérias Gram-negativas, sendo atualmente considerado como um dos principais determinantes de resistência antimicrobiana <sup>(123, 124)</sup>.

Até o momento, já foram descritas 6 famílias de sistema de efluxo: (1) Major facilitator superfamily (MFS); (2) “Adenosine triphosphate-binding cassette superfamily (ABC)”;

(3) “Small Multidrug resistente (SMR)”;

(4) “Resistance-nodulation-cell division superfamily (RND)”;

(5) “Multidrug and toxic compound extrusion family (MATE)”;

(6) “Drug/metabolite transporter superfamily (DMT)”.

No entanto, as bombas de efluxo associadas à resistência aos antimicrobianos de importância clínica, geralmente pertencem às famílias RND e MFS. Nas Enterobactérias este mecanismo contribui tanto para sua resistência intrínseca como adquirida <sup>(124)</sup>.

A bomba de efluxo mais importante em isolados clínicos de *E. aerogenes* é a AcrABTolC, que expelle uma grande variedade de compostos, incluindo detergentes e agentes antimicrobianos, como as quinolonas, tetraciclinas e cloranfenicol. Esta bomba de efluxo foi identificada como mecanismo de resistência em isolados de *E. aerogenes* multiresistentes<sup>(125-127)</sup>. A atividade da bomba de efluxo em vários isolados clínicos resistentes foi caracterizada por meio de diferentes inibidores de bomba de efluxo que competem com o efluxo de antibióticos.

Estudos demonstraram que o inibidor de bomba de efluxo fenilalanina-arginina  $\beta$ - naftilamida (PA $\beta$ N) é capaz de bloquear o efluxo envolvido na resistência a cloranfenicol em isolados clínicos de *Enterobacter aerogenes*<sup>(128)</sup>. Mas, o inibidor CCCP (Carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone) parece ter efeito mais significativo contra os carbapenêmicos. Um estudo recente feito por Qin et al. em 2014, na China utilizou CCCP associado com Imipenem, Meropenem e Ertapenem em isolados de *E. aerogenes* resistentes a carbapenêmicos e produtores de KPC-2 e foi observado a atividade da bomba de efluxo em alguns isolados para imipenem e meropenem<sup>(109)</sup>.

Um importante estudo demonstrou que a duração de cinco dias de tratamento com Imipenem, pode levar ao desenvolvimento de isolados de *Enterobacter* resistentes ao Imipenem, decorrente da diminuição de síntese de porina juntamente com expressão do sistema de bomba de efluxo<sup>(25)</sup>. Outro estudo, corroborou o papel da alteração da membrana externa na resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Enterobacter*, os autores demonstraram a associação da alteração fisiológica da membrana externa de isolados de *E. aerogenes* decorrente da redução de LPS, perda

---

da porina Omp35 e hiperexpressão de bomba de efluxo AcrABTolC, com resistência aos carbapenêmicos <sup>(26)</sup>.

No entanto, poucos estudos avaliaram a atividade da bomba de efluxo com o inibidor CCCP nos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos no mundo.

### **1.9 Controle e prevenção de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos.**

Na realidade, a verdadeira prevalência de bactérias produtoras de carbapenemase permanece desconhecida, porque muitos países no mundo não relatam a susceptibilidade de espécies de Enterobacter. Portanto, a disseminação mundial de Enterobacteriaceae carreando carbapenemases representa uma ameaça para a saúde pública e requer estratégias dirigidas para detecção e controle de infecções causadas por estes micro-organismos.

Para Patrice Nordmann et al. (2012), a identificação precoce de cepas produtoras de carbapenemase é obrigatória para evitar a disseminação da resistência associada a elementos genéticos móveis e infecções difíceis de serem tratadas <sup>(2)</sup>. Apesar de muitos relatos de cepas produtoras de carbapenemase serem relacionados a isolados nosocomiais, uma das preocupações mais importantes é a propagação de genes codificadores de carbapenemase na comunidade, particularmente em *E. coli* <sup>(2)</sup>.

Um estudo conduzido por Aubron et al. em 2005 identificou 30 isolados de Gram-negativos resistentes ao Imipenem nos rios americanos entre 1999 a 2001. Os autores identificaram isolados de *Enterobacter asburiae* em rios, indicando um reservatório ambiental de enterobactérias resistentes ao Imipenem, inclusive *E. cloacae* que carreavam genes carbapenemases. Dado preocupante pois temos

propagação destes micro-organismos já na natureza, podendo causar infecções na comunidade e não só no ambiente hospitalar <sup>(129)</sup>.

No ambiente hospitalar, a detecção de pacientes infectados e / ou colonizados por *Enterobacter* spp resistentes aos carbapenêmicos deve ser implementada para evitar surtos, um procedimento que pode ser considerado é o uso de ferramentas moleculares desenvolvidas para esse propósito <sup>(2)</sup>.

Assim, algumas medidas de prevenção devem ser realizadas e colocadas em prática constantemente, como: 1) Programas de educação para os médicos e profissionais da saúde a respeito da redução de risco de transmissão de espécies de *Enterobacter* e outros patógenos hospitalares que devem ser implantados em todos os hospitais; 2) Formação de uma equipe de controle de infecção hospitalar em todos os hospitais que executem o seu trabalho ativamente; 3) Boas práticas de prescrição de antibióticos; 4) Observar se a desinfecção no ambiente hospitalar está sendo realizada de maneira efetiva; 5) Acompanhamento constante da incidência de resistência do Hospital, 6) Aprimoramento constante dos profissionais que trabalham no laboratório e outros profissionais da saúde 8) Atualização das metodologias realizadas nos laboratórios, e se for possível modernizar o laboratório de microbiologia introduzindo técnicas moleculares; 8) Incentivar todos profissionais da saúde a realizar estudos sobre resistência para estes, terem consciência da sua importância em seu trabalho; 9) Profissionais do hospital, administradores e estudantes devem ter consciência acima de tudo, que o trabalho bem realizado, é o trabalho onde têm o respeito mútuo, onde um dos seus propósitos é a melhoria da saúde de seu próximo, assim, deve se levar em consideração, que um trabalho de equipe multi-disciplinar é fundamental e deve ser feito com amor, sempre com o

intuito de reduzir as taxas de infecções hospitalares. 10) E os administradores, responsáveis e professores devem levar em consideração que o ensino, isto é, o conhecimento é o único caminho a percorrer para uma redução destas infecções hospitalares e comunitárias de micro-organismos multirresistentes.

### **1.10 Justificativa do Trabalho**

A resistência aos carbapenêmicos na família *Enterobacteriaceae* é um fenômeno emergente que tem importância clínica e epidemiológica. Entretanto, estes mecanismos de resistência são descritos especialmente em isolados de espécies de *Klebsiella* spp, mas em outras enterobactérias como as espécies de *Enterobacter*, poucos estudos foram conduzidos. Portanto, um estudo que avalie a clonalidade e os mecanismos de resistência do *Enterobacter* spp aos carbapenêmicos será útil para compreensão da epidemiologia desse agente e para o delineamento de medidas de controle e prevenção da disseminação da resistência aos carbapenêmicos.

## **2 Objetivos**

---

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo principal**

Caracterizar os mecanismos de resistência dos isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* resistentes aos carbapenêmicos.

### **2.2 Objetivos secundários**

Determinar a sensibilidade dos isolados de *E. cloacae* e *E. aerogenes* aos seguintes antimicrobianos: Imipenem, Ertapenem, Meropenem, Tigeciclina, Polimixina B, Cefepima e Fosfomicina.

Determinar a linhagem clonal dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos.

## **3 Métodos**

---

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Identificação e armazenamento dos isolados de *Enterobacter spp*

As amostras bacterianas isoladas de pacientes internados no Hospital das Clínicas de São Paulo, Hospital Geral de Itapeperica da Serra (HGIS) e do Hospital de Londrina no período de 2005 a 2011, foram armazenadas no banco de cepas do Laboratório de Investigação Médica (LIM 54) do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Posteriormente, os isolados de *Enterobacter spp* foram semeados em ágar MacConkey e isolados em Ágar sangue. Para confirmar sua pureza, estes foram armazenados em caldo BHI-glicerol e estocados em freezer -70°C. Para sua reidentificação utilizamos a prova Bioquímica denominada Rugai Modificado e o método semi-automatizado API 20E (BioMérieux- França).

#### 3.2 Testes de sensibilidade aos antimicrobianos

##### 3.2.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em caldo (Microdiluição)

Os antimicrobianos testados para determinar as CIMs dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* multirresistentes foram os seguintes: Imipenem/cilastatina sódica (Merck & Co. Inc., Elkton, EUA), Meropenem (Astra Zeneca), Ertapenem (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), Sulfato de Polimixina B (Sigma Chemical, St. Louis, Mo.), Cloridrato de Cefepima (Bristol-Myers Squibb, Guayaquil, Equador), Tigeciclina (Sigma).

Os antimicrobianos testados possuem em seu rótulo as seguintes informações: número do lote, prazo de validade e a potência expressa em UI/mg ou µg/mg. A solução estoque dos antimicrobianos foi preparada a uma concentração final de 10mg/mL. Para cada antimicrobiano foi empregado o solvente adequado, conforme os procedimentos padronizados pelo CLSI (2012). Para calcular a quantidade necessária do antimicrobiano foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Peso (mg)} = \frac{\text{Volume (mL)} \times \text{Concentração (mg/mL)}}{\text{Potência (mg/ml)}}$$

Para o preparo das diluições na microplaca foi adicionado um volume de 50µL de meio de cultura Caldo Mueller-Hinton Cátion Ajustado (CMHCA) em todos os poços da microplaca, exceto na coluna 1.

Em todos os poços da coluna 1 foi adicionado 100µL da diluição em concentração mais alta do antimicrobiano testado. Com uma pipeta multicanal, foi realizada a diluição seriada do antibiótico, pipetando 50µL do primeiro poço da linha A (A1) para o segundo poço da linha A (A2). Posteriormente, foi realizada a homogeneização com a pipeta e em seguida foi pipetado 50µL do poço A2 para o A3. Segue-se este mesmo procedimento até o poço A11, tendo este um volume final de 100µL, o qual foi designado como controle de esterilidade (não foram acrescentadas células bacterianas neste poço, com a finalidade de verificar a possível ocorrência de contaminação durante a diluição do antimicrobiano). O último poço de cada linha (A<sub>12</sub>-H<sub>12</sub>) foi utilizado como controle de crescimento bacteriano, ou seja,

---

aos 50 µl de meio de cultura CMHCA, foram adicionados mais 50µL da suspensão bacteriana (diluída 1:100).

A suspensão foi preparada a partir de uma placa com crescimento bacteriano de 18 a 24 horas, esta suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi realizada com auxílio do DensiChek. Posteriormente esta suspensão foi diluída 1:100 em solução fisiológica ( $\sim 1,5 \times 10^6$  UFC/mL). Logo após o preparo da suspensão bacteriana, sem exceder 30 minutos, 50µL da suspensão bacteriana diluída foi adicionada nos poços 1 a 10 e no poço 12 de todas as colunas (A à H). Posteriormente a realização de todo experimento, as microplacas foram incubadas a 37°C por 16 a 20 horas (CLSI, 2012) e sua leitura foi realizada em local iluminado, com auxílio de um espelho para leitura de microplacas. A CIM foi determinada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos poços da microplaca por dois pesquisadores, quando necessário foi utilizado Tecan ®. As leituras do CIMs foram comparadas com os pontos de corte propostos pelo CLSI (2012) e reportados como sensível (S), intermediário (I) e resistente (R) (Tabela 5). Lembrando que para cada antimicrobiano proposto neste estudo, foram utilizados cepas ATCC para confirmação da metodologia empregada CLSI 2012.

### 3.2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em ágar

Para o antimicrobiano denominado Fosfomicina (SIGMA), a identificação da concentração inibitória mínima foi realizada pela metodologia de ágar diluição (CLSI, 2012). Esta metodologia foi efetuada através da incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas do antimicrobiano Fosfomicina (256 µg. mL – 0.25 µg. mL em placas de Petri individuais contendo Ágar Mueller- Hinton acrescidos com 25 mg/litro do suplemento G-6-P (Glucose 6- phosphate – Sigma)), conforme estudo de Cueto, 2006 e Lu, 2011. O ágar Mueller- Hinton foi preparado com 10% a menos de água destilada.

A preparação do inóculo bacteriano foi realizada após o crescimento das bactérias em placas de ágar MacConkey e posteriormente semeadas em Ágar sangue e incubadas por 18 – 24 horas. Como o auxílio de alça de semeadura, colônias isoladas de *E. aerogenes* ou *E. cloacae* foram transferidas para tubos Vitek (BioMérieux), contendo 2 mL de salina (NaCl). A suspensão bacteriana na escala 0,5 de McFarland ( $\sim 1,5 \times 10^8$  UFC/mL) foi medida por um turbidímetro digital (DensiChek™ Plus - BioMérieux), após a realização da suspensão, a mesma foi diluída 1:10.

Posteriormente, as amostras bacterianas diluídas foram inoculadas simultaneamente sobre a superfície do Ágar Mueller-Hinton utilizando um multi-inoculador com 24 pinos, o qual dispensa de 1 a 3 µL contendo aproximadamente o inóculo final de  $1 \times 10^4$  UFC mL. As placas inoculadas foram incubadas a 37° C por 16 a 18 horas. Após este período a CIM foi interpretada de acordo com a observação macroscópica de crescimento bacteriano nos meios contendo diferentes

concentrações e sua CIM foi determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano, de acordo com as recomendações do documento M7-A6 de 2003.

Como controles de qualidade dos testes realizados foram utilizadas as cepas. *Escherichia coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212. Os isolados testados foram classificados como sensíveis (S), intermediário (I) e resistente (R), de acordo com os pontos de corte proposto pelo CLSI de 2012 (Tabela 5).

**Tabela 5** - Pontos de corte proposto pelo CLSI 2012 para determinar a sensibilidade dos agentes antimicrobianos para o método de Microdiluição em Agar para Fosfomicina e em caldo para os demais antimicrobianos estudados

Antimicrobianos	Enterobacteriaceae		
	Ponto de Corte		
	S	I	R
<b>Imipenem</b>	≤ 1	2	≥ 4
<b>Meropenem</b>	≤ 1	2	≥ 4
<b>Ertapenem</b>	≤ 0,25	0,5	> 1
<b>Tigeciclina</b>	≤ 2	4	≥ 16
<b>Polimixina B</b>	≤ 2	4	≥ 8
<b>Cefepima</b>	≤ 8	16	≥ 32
<b>Fosfomicina *</b>	≤ 64	128	≥ 256

**Fonte:** Clinical and Laboratory Standards Institute. *Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Information Supplement*, CLSI document M100-S22, Wayne, Pennsylvania, 2012. \*Fosfomicina/ diluição em Agar

### 3.3 Testes Moleculares

#### 3.3.1 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção do gene de resistência aos carbapenêmicos

A extração do DNA foi realizada segundo o protocolo proposto pelo Kit do fabricante da Amersham Pharmacia Biotech, para realização de extração de DNA de bactérias Gram-negativas, nomeado como: GenomicPrep™ and Tissue DNA Isolation Kit.

Todos isolados de *Enterobacter* spp foram submetidos à metodologia de PCR, para investigar a presença de genes de carbapenemases, foram utilizados primers (iniciadores) específicos para cada gene, como demonstra a tabela 6 a seguir.

**Tabela 6** - Primers utilizados para identificação das carbapenemases Serino, Classe A de Ambler

Mecanismo de resistência	Gene	Sequência de Iniciadores (5'-3')	Tamanho Amplicon	Referência
Carbapenemase	<i>bla<sub>NMC/IMI</sub></i>	CAGAGCAAATGAACGATTTTC TGGTACGCTAGCACGAATAC	502pb	Pasteran, 2009
Carbapenemase	<i>bla<sub>KPC</sub></i>	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTTCAGAGCCTTACTGCCC	893pb	Bradford et al., 2004
Carbapenemase	<i>bla<sub>GES</sub></i>	ATGCGCTTCATTCACGCAC CTATTTGTCCGTGCTCAGG	846pb	Kim et al., 2007

### 3.3.2 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção de Metallo- $\beta$ -lactamases

Todos isolados de *Enterobacter spp* foram submetidos a metodologia de PCR, para detecção das enzimas metallo- $\beta$ - lactamases.

Para investigar a presença destes genes relacionados à resistência aos carbapenêmicos, foi realizada a técnica de PCR com primers (iniciadores) específicos para cada gene, como demonstra a tabela 7 a seguir.

**Tabela 7 -** Primers utilizados para identificação das Metallo- $\beta$ -Lactamases, Classe B de Ambler

Mecanismo de resistência	Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho Amplicon	Referência
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>IMP-1</sub>	GAATAGAATGGCTTAACTCTC CCAAACCACTAGGTTATC	188pb	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>VIM-2</sub>	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	382pb	Biendo, 2008
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>GIM-1</sub>	TCAATTAGCTCTTGGGCTGAC CGGAACGACCATTTGAATGG	72pb	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>SIM-1</sub>	GTACAAGGGATTCGGCATCG TGGCCTGTTCCCATGTGTGAG	569pb	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>SPM</sub>	CTAATCGAGAGCCCTGCTTG CCT TTTCCGCGACCTTGATC	798pb	Mendes <i>et al.</i> , 2007
Carbapenemase	<i>bla</i> <sub>NDM-1</sub>	GGCGGAATGGCTCATCACGA CGCAACACAGCCTGACTTTC	287pb	Chen <i>et al.</i> , 2011

### 3.3.3 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção das ESBLs

Todos isolados de *Enterobacter spp* foram submetidos a metodologia de PCR, para detecção das enzimas ESBLs.

Para investigar a presença destes genes, se estão relacionados à resistência aos carbapenêmicos, foi realizada a técnica de PCR com primers (iniciadores) específicos para cada gene, como demonstra a tabela 8 a seguir.

**Tabela 8 -** Primers utilizados para identificação das ESBLs

Mecanismo de resistência	Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho Amplicon	Referência
ESBL	<i>bla<sub>TEM 164</sub></i>	TCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGA ACGCTCACCGGCTCCAGATTTAT	420pb	Biendo, et al., 2008
ESBL	<i>bla<sub>CTX-M-2</sub></i>	GCTCTAGAATTATTGCATCAGAAACCGTG CGGAATTCATGATGACTCAGAGCATTGG	893pb	Jeong, et al., 2007
ESBL	<i>bla<sub>SHV</sub></i>	TGCTTTGTTAATTCCGGGCCAA ATGCGTTATATTCGCCTGTG	730pb	Biendo, et al., 2008

### 3.3.4 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção da oxacilinase OXA-48

Todos isolados de *Enterobacter spp* foram submetidos a metodologia de PCR, para detecção da enzima oxacilinase OXA-48.

Para investigar a presença deste gene, se estão relacionados à resistência aos carbapenêmicos, foi realizada a técnica de PCR com primers (iniciadores) específicos para cada gene, como demonstra a tabela 9 a seguir.

**Tabela 9 -** Primer utilizado para identificação da Oxacilinase OXA-48 da Classe D

Mecanismo de resistência	Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho Amplicon	Referência
Oxacilinase	<i>bla<sub>oxa-48</sub></i>	GTAACAATGCTTGGTTCG TGTTTTTGGTGGCATCGA	177pb	Monteiro <i>et al.</i> , 2012.

### 3.3.5 Reação de cadeia da polimerase (PCR) para detecção da Bomba de Efluxo (AcrART)

Para detecção da bomba de efluxo, foi realizada a reação de cadeia de polimerase (PCR) para detecção dos genes: *acrA*, com os primers específicos demonstrado na Tabela 10, conforme estudo de Perez et al., 2007.

**Tabela 10** - Primers utilizados para identificação dos genes AcrART - Bomba de Efluxo

Mecanismo de resistência	Gene	Sequência dos iniciadores (5'-3')	Tamanho Amplicon	Referência
Bomba de efluxo	AcrART	GATTATGATTCTGCCTTGGCCG CAATGCGACCGCTGATAGGGG	130pb	Perez et al, 2007

### 3.3.6 Sequenciamento dos produtos amplificados

Após a identificação do gene através da PCR, pelo menos um dos produtos gerados para cada reação foi submetido a uma nova reação de PCR, com os oligonucleotídeos iniciadores de interesse para sequenciamento do gene e o gene amplificado foi submetido a uma purificação pelo kit GFX<sup>TM</sup> PCR DNA and Gel Band Purification (Ge healthcare) conforme instruções do fabricante. A quantificação do DNA foi estimada através de uma corrida de eletroforese em um gel de agarose a 2% utilizando o peso Low DNA Mass Ladder (Invitrogen) e depois enviado para sequenciamento.

O sequenciamento do DNA a partir dos produtos de PCR foi realizado utilizando o MegaBACE 1000, um sistema de análise de DNA de 96 capilares com a

tecnologia GE Healthcare. As reações de sequenciamento foram realizadas de acordo com o protocolo para o MegaBACE 1000, utilizando o DYEnamic ET Dye Terminator Kit (com Thermo Sequenase™ II DNA Polimerase) código US81090. As sequências foram analisadas pelo software Sequence Analyser utilizando o Base Caller Cimarron 3.12. A sequência genética foi comparada com banco de dados disponível na internet (BLAST – <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

### **3.3.7 Técnica de Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE)**

As bactérias estudadas no presente trabalho foram repicadas em meio ágar sangue de carneiro 5% (AS) e incubadas por 18 às 24h, em temperatura de  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Três a cinco colônias foram transferidas para tubos contendo 3 mL de caldo Tryptic Soy Broth e incubados a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ , *overnight*.

Após a incubação, o material foi posteriormente incubados cerca de 2 mL do caldo com crescimento bacteriano foram transferidos aos microtubos, previamente pesados e identificados. Os microtubos foram centrifugados por 20 minutos a 11.000 rpm. O sobrenadante desprezado e, em seguida, o sedimento foi lavado três vezes com 1mL de solução fisiológica estéril. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo pesado em balança analítica. A massa bacteriana foi calculada e, em seguida, adicionamos um volume adequado de solução de EDTA 25mM pH8, 0, obtendo uma suspensão bacteriana de concentração final de  $100\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

Para o preparo dos blocos de agarose os blocos de DNA foram obtidos pela mistura de  $225\mu\text{L}$  de tampão TEN (Tris 100mM, pH7,5; EDTA 100mM; NaCl 150mM) acrescidos de  $25\mu\text{L}$  da suspensão bacteriana ajustada a uma concentração

de 100µg/µL. Posteriormente a suspensão foi homogeneizada e colocada em banho-maria a 56 C, em seguida, foram adicionadas 30 mL de Lisozima a 20 mg/mL. Depois de preparada a suspensão adicionamos 250µL de agarose *low melting* (Bio-Rad) a 2%, em tampão 0,5XTBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M). Estas misturas foram adicionadas em moldes específicos (Bio-Rad) e refrigeradas (4°C) por 10 minutos.

Na etapa de extração do DNA bacteriano, os blocos de agarose foram removidos dos moldes e incubados em 2mL de tampão EC (Tris 6mM, pH7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01M; Sarcosil 0,5%, Deoxicolato 0,2%) por 5 horas a 37°C, sob agitação suave. Após este período, o tampão foi retirado e logo em seguida acrescentado 2,0mL de tampão CHEF-TE (Tris 0,1M, pH7, 5; EDTA 0,1M). Após esta etapa foi realizada uma lavagem com este último tampão e, em seguida, os blocos foram deixados em temperatura ambiente, sob agitação suave, por 30 minutos. Após o tempo estipulado retiramos o Tampão CHEF-TE, logo após adicionamos 2 mL do tampão ES (EDTA 0,4M, pH9, 3; Sarcosil 1,0%) até cobrir todos os blocos e adicionamos em seguida 100µL de proteinase K (InVitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, 92008) e incubamos a 50 °C overnight. Após este período de incubação, os blocos foram lavados cinco vezes com 2,0mL de tampão CHEF-TE, em intervalos de uma hora sob leve agitação. Após a última lavagem, os blocos foram guardados a 4°C.

Antes de realizar o tratamento enzimático, os blocos de agarose foram lavados cinco vezes com tampão DNS (Tris 0,1M, pH 8,0; Cloreto de magnésio 5mM), em intervalos de uma hora entre as lavagens, com incubações de uma hora. Assim, iniciou-se a etapa de restrição enzimática, onde adicionamos o tampão da enzima

juntamente com a enzima de restrição XbaI FastDigest® (InVitrogen) por amostra e incubamos por 10 minutos em 37° C segundo fabricante.

Para finalizar, preparamos o gel de agarose a 1% (em TBE 0,5X). A eletroforese foi realizada no sistema CHEF-DRII (Bio-Rad, Richmond, CA, USA) e o tampão de corrida utilizado foi o TBE 0, 5X, preparado em 2 litros acrescido de 200µL de tiouréa 0,5M (Silbert et al., 2003). Os padrões de variação da corrente elétrica (*switch time*) foram estabelecidos de acordo com o microrganismo estudado. Para o *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*, as condições de corrida foram de 5 a 60 segundos (*switch time* inicial-final), 6 V/cm (corrente elétrica) e período de corrida de 23 horas. Após a eletroforese, o gel foi corado com solução de brometo de etídio (1µg/mL) por 40 minutos, descorados em água destilada por mais 40 minutos e fotografados sob luz ultravioleta.

A matriz de similaridade entre as amostras foi inferida a partir das imagens dos géis obtidas pelo PFGE, usando o programa Bionumerics versão 7.1 (Applied Maths) com o método Dice e uma tolerância de posição 1%, e posteriormente foi construída um dendograma pelo método UPGMA.

### **3.3.8 Análise de Proteína da Membrana Externa**

Células bacterianas de *Enterobacter* spp, crescidas *overnight* foram subcultivadas em 45ml de caldo BHI e mantidas sob agitação a uma temperatura de 37°C. Após incubação de 24 horas, essas células foram submetidas a uma centrifugação de 5.000 rpm por 20 minutos e posteriormente suspensas em 5 mL de Tris-HCl 30mM, ph 8.0. Após a suspensão das células as mesmas foram centrifugadas a 5.000 rpm por 20 minutos e re-suspensas em tampão de fosfato

sódico (PBS) a 10mM pH 7.0 acrescido com inibidor de protease fluoreto de fenilmetil-sulfonila (PMSF) a 1mM. As células foram sonicadas em gelo por 3 ciclos de 1 minuto cada, com intervalos de 1 minuto de resfriamento entre cada ciclo com o auxílio de um sonicador, e seus restos celulares foram removidos por meio de centrifugação a 4.300 rpm por 15 minutos a 4°C, ou pelo tempo necessário para o sobrenadante tornar-se límpido. O sobrenadante foi transferido para tubos de ultracentrifuga contendo 7ml PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM e centrifugado a 30.000 rpm (Ultracentrifuga Beckmann – L8 70M, USA) por 120 minutos para a coleta das frações de membrana. O *pellet* resultante foi ressuspensionado com 150µl da solução tampão PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM. 100µl deste volume foi tratado, com 800µl de sarcosil 2% e incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Após centrifugação de 15.000 rpm durante 60 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensionado com 50µl de solução tampão PBS a 10mM pH 7.0 acrescido de PMSF a 1mM e mantido sobre refrigeração a 4°C por 24 horas para solubilização das proteínas. Posteriormente foi estocado a -20°C para posterior análise por SDS-PAGE.

As proteínas foram quantificadas pela metodologia de Bradford com o auxílio do reagente de Bradford (BioAgency Laboratórios) por espectrofotometria a 595nm (GeneQuant Pro, GE) e posteriormente tratadas com ácido beta-mercapto-etanol na proporção de 2µl de ácido beta-mercapto-etanol para 10µl de proteína. Essas proteínas foram levadas à fervura por 5 minutos com o tampão da amostra (Tris-HCl 0,5M, SDS 10%, Glicerina 20% e Azul de bromofenol 0,01%).

As proteínas estudadas foram aplicadas em géis de poliacrilamida previamente fabricados de 12,5% (Ge Healthcare) em uma concentração de 20ng. A corrida

eletroforética foi realizada no aparelho Multiphor II (GE) a 600 volts, 50 mA e 30 W por aproximadamente 60 minutos. Os pesos moleculares utilizados como marcadores foram: 97,4 KDa (fosforilase B de músculo de ratos), 66,2KDa (albumina sérica bovina), 45KDa (albumina de ovo), 31,0KDa (anidrase carbônica bovina), 21,51KDa (inibidor de tripsina) e 14,4KDa (lisozima).

Como controles foram utilizados à cepa *Enterobacter aerogenes* ATCC13048, segundo Bernet, 2003. Após a eletroforese, o gel foi corado pelo kit PlusOne Silver Staining Kit, Protein (Ge Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante.

### **3.4 Teste Fenotípico**

#### **3.4.1 Diluição em ágar com Inibidor de Bomba de Efluxo CCCP (Carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone) para detecção da atividade da Bomba de Efluxo**

De acordo como os resultados obtidos no dendograma e na PCR da bomba de efluxo AcrABTolC, a atividade da bomba de efluxo de 5 *E. aerogenes* e 5 *E. cloacae* foi analisada por método de diluição em agar dos carbapenêmicos com e sem inibidor de bomba de efluxo. Para analisarmos sua atividade, tivemos que analisar as concentrações inibitórias mínimas (CIM), pois estas são importantes para determinarmos as ações inibitórias mínimas da bomba de efluxo.

Assim, para determinação do CIM, utilizamos a metodologia de diluição em ágar com os antimicrobianos Imipenem, Meropenem e Ertapenem, onde incorporamos concentrações seriadas e logarítmicas dos antimicrobianos estudados (256 µg. mL – 0.125 µg. mL em placas de Petri individuais contendo Ágar Mueller-

Hinton), acrescidos ou não com o inibidor CCCP (Sigma) em três concentrações diferentes 25µg/mL, 50µg/mL e 100µg/mL <sup>(130)</sup>.

Somente consideramos ativa a bomba de efluxo, quando observamos a redução do CIM do antimicrobiano estudado associado como o inibidor da bomba de efluxo em pelo menos quatro diluições, quando comparada com seu CIM original (sem inibidor) <sup>(130)</sup>.

Todas as análises foram realizadas de acordo com a padronização do CLSI (Diluição em ágar), os isolados foram realizados em triplicata e simultaneamente executado com e sem inibidor de bomba de efluxo para sua validação, comparação e análise de resultados <sup>(131)</sup>.

## **4 Resultados**

---

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Identificação e distribuição de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* nos três hospitais estudados

No período de 2005 a 2011, foram armazenados no banco de cepas do LIM-54, 130 isolados de *Enterobacter spp* de pacientes de dois Hospitais de São Paulo: Hospital das Clínicas-FMUSP, Hospital Geral de Itapeverica da Serra - HGIS e de um Hospital de Londrina, Paraná: Hospital da Universidade de Londrina.

Todas as amostras foram identificadas inicialmente por Rugai Modificado, sendo acrescentado o teste de motilidade, citrato e lisina, e posteriormente por API 20E – Biomerieux (Figura 4 e 5).



**Figura 4** - Foto do API (Biomerieux) para identificação das Enterobactérias Fermentadoras de Glicose, demonstrando *Enterobacter aerogenes*



**Figura 5** - Foto do API (Biomerieux) para identificação das Enterobactérias Fermentadoras de Glicose, demonstrando *Enterobacter cloacae*.

Dos 130 isolados de *Enterobacter spp*, 105 (80,8%) foram identificados como *E. aerogenes* e 25 (19,2%) como *E. cloacae* (Tabela 11).

Dos 105 isolados de *E. aerogenes* 44 (41,9%) apresentaram resistência ao Imipenem, Ertapenem ou Meropenem e dos 25 isolados de *E. cloacae* estudados 8 (32,0%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos (Tabela 11).

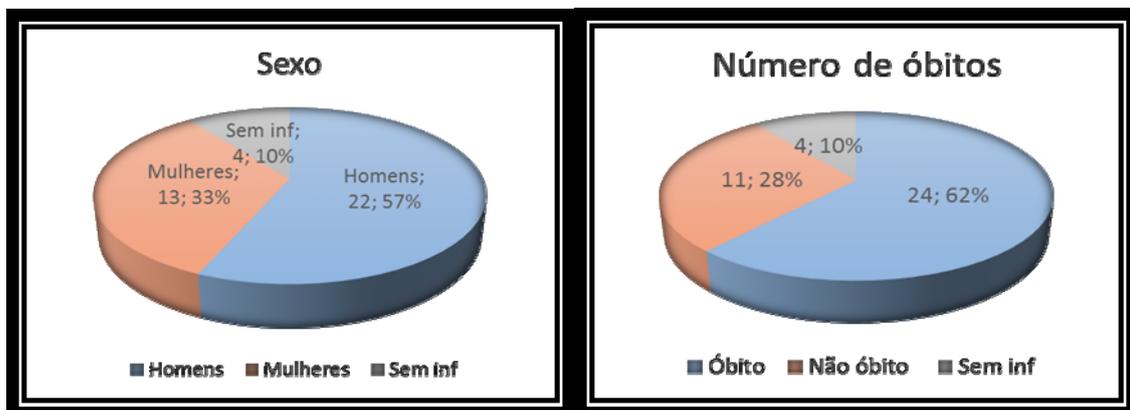
**Tabela 11** - Distribuição dos 130 isolados de *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae* por Hospitais

Hospitais	<i>E. aerogenes</i> N=105		<i>E. cloacae</i> N= 25	
	S*	R*	S*	R*
HC-FMUSP	61	39	15	0
HGIS	0	5	0	0
Londrina	0	0	2	8
<b>Total</b>	61 (58,1%)	44 (41,9%)	17 (68%)	8 (32%)

\*: Sensível aos carbapenêmicos; \*\*: Resistente aos carbapenêmicos

#### 4.2 Perfil dos 39 pacientes infectados por *E.aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do Hospital das Clínicas

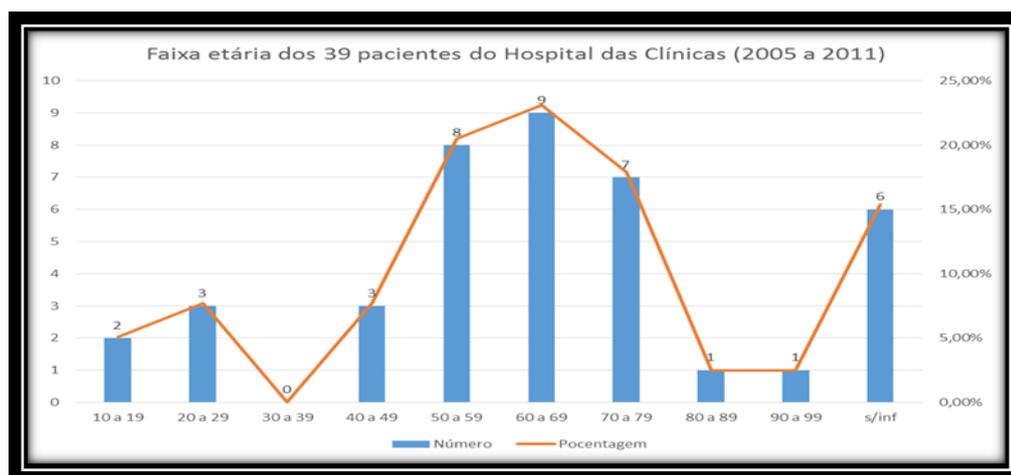
Dos pacientes do HC-FMUSP com infecção por *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos que obtivemos informações adicionais sobre dados demográficos e clínicos, podemos observar que os homens 22 (57%) foram os mais infectados e ou colonizados por este microrganismo e que 24 (62%) evoluíram para óbito, como demonstram os gráficos 1 e 2.



**Gráfico 1** - Distribuição de 39 pacientes do HC infectados por *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos por sexo

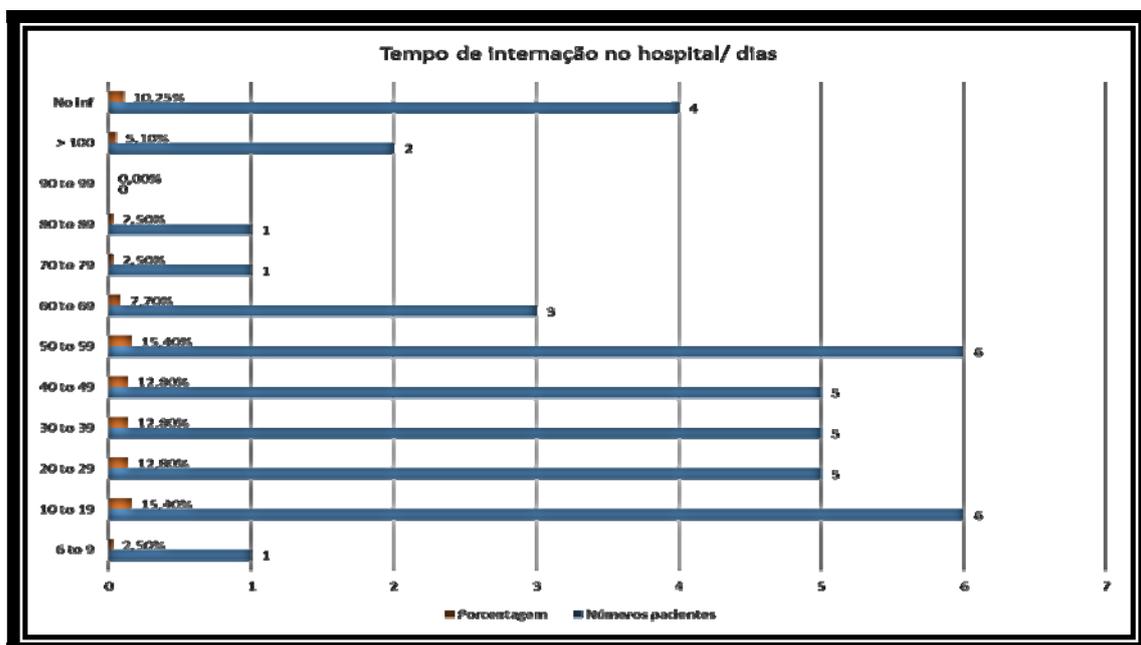
**Gráfico 2** - Distribuição de 39 pacientes do HC infectados por *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos que evoluíram para óbito

A idade dos pacientes variou de 10 a 99 anos, gráfico 3. O tempo de internação para colonização e ou infecção por *E. aerogenes* resistente aos carbapenêmicos variou de menos de 7 dias até mais de 100 dias.



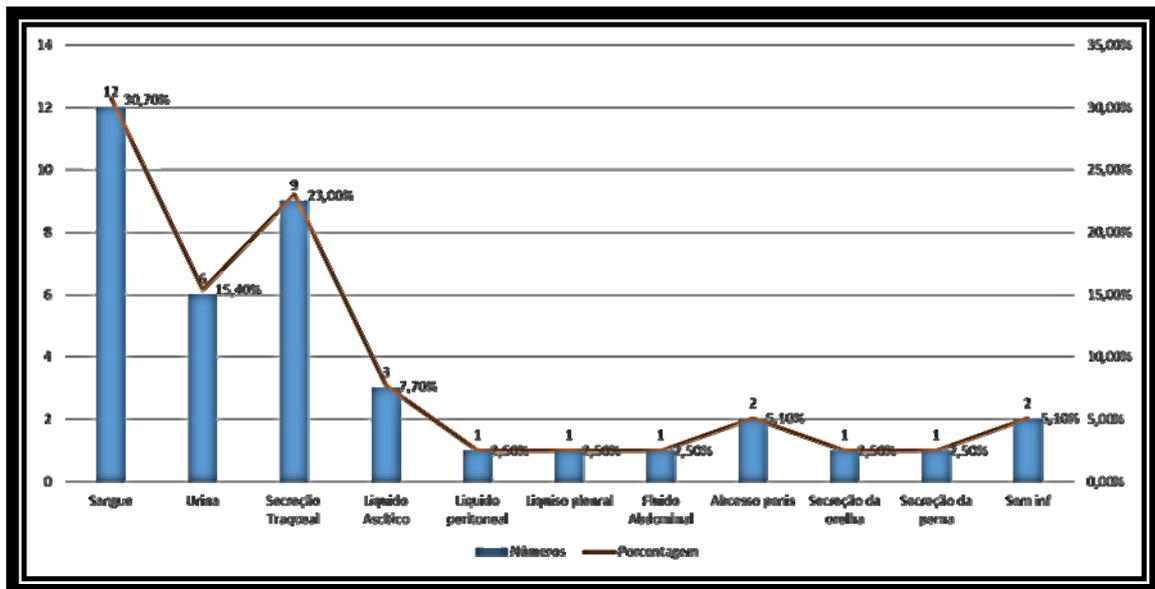
**Gráfico 3 -** Distribuição por faixa etária dos 39 pacientes do HC infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos nos anos de 2005 a 2011

Quando analisamos o tempo de internação, podemos observar que alguns pacientes colonizaram e ou infectaram por *E. aerogenes* resistente aos carbapenêmicos na primeira e segunda semana de internação. Em 6 dias de internação 1 paciente já apresentava infecção por este microrganismo como demonstra gráfico a seguir 4.



**Gráfico 4 -** Distribuição dos dias de internação dos 39 pacientes do HC infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos por tempo

A maior parte dos isolados foram identificados em amostras de sangue. Dos 39 isolados estudados 12 (30,70%) eram provenientes de sangue, seguidos de 9 (23%) de secreção traqueal e 6 (15,4%) de urina, como demonstra gráfico 5.



**Gráfico 5 -** Distribuição dos 39 pacientes do HC, infectados por *E.aerogenes* resistente aos carbapenêmicos segundo tempo de internação

A maioria dos pacientes estavam realizando transplantes de órgãos, ou estavam passando por cirurgias, ou eram pacientes que estavam passando por quimioterapia, ou eram HIV positivo, como demonstra Anexo 1.

### 4.3 Resultados da sensibilidade aos antimicrobianos

#### 4.3.1 Resultados da sensibilidade aos antimicrobianos e CIM 50 e 90 dos 44 isolados de *Enterobacter aerogenes* e dos 8 isolados de *Enterobacter cloacae*

Dos 44 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos 41 (93,2%) apresentaram resistência ao Imipenem, 41 (93,2%) ao Ertapenem, 38 (86,4%) ao Meropenem e 44 (100%) ao Cefepima pelo método de microdiluição em caldo. Todos os isolados foram sensíveis a Polimixina B, Tigeciclina. Em relação a Fosfomicina pelo método de diluição em ágar de todos isolados estudados 43 (97,7%) apresentaram sensibilidade.

Dos oito isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos, 8 (100%) apresentaram resistência ao Imipenem, Ertapenem e Cefepima. Dos isolados estudados 7 (87,5%) apresentaram resistência ao Meropenem e para Tigeciclina, Polimixina B e Fosfomicina os 8 (100%) foram sensíveis (Tabela 12).

**Tabela 12** - Sensibilidade dos antimicrobianos dos 44 isolados de *E. aerogenes* e 8 isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos, pelo método de diluição de acordo com os critérios do CLSI 2012

<i>Antibiótico</i>	<i>E. aerogenes</i> (N = 44)			<i>E. cloacae</i> (N=8)		
	<i>Resistente</i>	<i>I</i>	<i>Sensível</i>	<i>Resistente</i>	<i>I</i>	<i>Sensível</i>
<b>Imipenem</b>	41 (93,2%)	3 (6,8%)	-	8 (100%)	-	-
<b>Meropenem</b>	38 (86,4%)	6 (13,6%)	-	7 (87,5%)	1 (12,5%)	-
<b>Ertapenem</b>	41 (93,2%)	1 (2,3%)	2 (4,5%)	8 (100%)	-	-
<b>Tigeciclina</b>	-	-	44 (100%)	-	-	8 (100%)
<b>Fosfomicina*</b>	-	-	44 (100%)	-	-	8 (100%)
<b>Polimixina B</b>	-	-	44 (100%)	-	-	8 (100%)
<b>Cefepima</b>	44 (100%)	-	-	8 (100%)	-	-

Fosfomicina\*: Diluição em ágar; I: intermediário.

A concentração inibitória mínima (CIM) 50 e 90 dos 44 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos e dos 8 isolados de *E. cloacae* esta descrita na tabela abaixo (Tabela 13).

**Tabela 13** - Concentração inibitória mínima (CIM) 50 e 90 dos antimicrobianos testados nos 44 isolados de *E. aerogenes* e 8 isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos, segundo critério do CLSI-2012

Antibióticos	<i>E.aerogenes</i> (N=44)		<i>E.cloacae</i> (N=8)	
	CIM 50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM 50 ( $\mu\text{g/mL}$ )	CIM 90 ( $\mu\text{g/mL}$ )
<b>Imipenem</b>	8	32	16	64
<b>Meropenem</b>	8	32	16	16
<b>Ertapenem</b>	64	128	64	64
<b>Tigeciclina</b>	0,25	2	1	2
<b>Fosfomicina</b>	16	64	16	32
<b>Polimixina B</b>	1	2	1	2
<b>Cefepima</b>	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$	$\geq 128$

\***Fosfomicina**: diluição em ágar; Imipenem, Meropenem, Ertapenem, Tigeciclina, Polimixina B e Cefepima: microdiluição em caldo.

#### 4.3.2 Análise da sensibilidade pelo sistema automatizado ViTek comparada com a CIM pela microdiluição em caldo

Outro dado importante que analisamos, foram as CIMs dos 39 isolados de *E. aerogenes* obtidas pelo Vitek® (Sistema automatizado) realizado no laboratório Central do HC-FMUSP, nos anos que os pacientes estavam internados e comparamos com os nossos resultados da CIM realizada pelo método de diluição em caldo. Como o estudo em questão para a maioria dos isolados foi retrospectivo, observamos diferentes resultados, quando pontos de cortes foram mudados. Lembrando que no decorrer do estudo tivemos que mudar o ponto de corte de 2009 para 2010.

No ano de 2005 foram analisados 5 (12,8%) *E. aerogenes*, todos pertencentes ao mesmo clone D1 e D3, quando comparamos os resultados levando em consideração os anos que foram liberados (executados), podemos observar que somente 1 isolado foi liberado como intermediário para Imipenem e Meropenem em 2005 pelo Vitek e quando realizado pela microdiluição em caldo em 2010 passou a ser resistente, segundo os pontos de corte proposto pelo CLSI. Embora, os resultados sejam diferentes, a interpretação para o CIM 8 µg/mL para Imipenem e Meropenem em 2005 era considerado como intermediário, nos dias atuais o CIM 8 µg/mL é resistente, como demonstra Tabela 14. O mesmo resultado podemos observar no ano de 2006, onde foram analisados 6 (15,4%) isolados pertencentes a 2 clones diferentes denominados D1 e D2 e A7, A8 e A9.

No ano de 2007, foram analisados 9 (23,15%) isolados de *Enterobacter aerogenes*, todos pertencentes ao mesmo clone A, seus subtipos eram A4, A5, A10, A11 e A12. Neste ano, observamos o mesmo resultado intermediário para Meropenem, mas 2 dos isolados apresentaram resultado sensível pelo sistema ViteK

e resistente pela nossa análise quando em método de microdiluição em caldo. Comparando a análise do resultado do CIM por ano, vemos que em 2007 o CIM 4 µg/mL era sensível e nos dias atuais o CIM 4 µg/mL é considerado como resistente. Atualmente o CIM  $\leq 1$  µg/mL para Meropenem nos direciona que o isolado é sensível de acordo com padronização do CLSI.

No ano de 2008, somente 2 (5,1%) isolados foram analisados, não havendo discordância nos resultados liberados por ambos métodos. Estes pertenciam ao clone A6 e A18.

Em 2009 foram analisados 11 (28,2%) isolados de *E. aerogenes*, estes pertenciam a 3 clones diferentes A3, A13, A14, A15, A16 e A17, clone B2 e F2. Quando observamos os pontos de corte em 2009 CIM igual a  $\leq 4$  µg/mL era sensível para Imipenem, a partir de 2010 o CIM sensível para Imipenem é  $\leq 1$  µg/mL, assim, três isolados foram liberados como sensíveis em 2009 e em nossa análise obtivemos resultados resistentes para o mesmo isolado para o antimicrobiano Imipenem. Ao analisarmos o resultado do Meropenem pelo Vitek, foram observados 2 isolados intermediários e 2 isolados sensíveis que em nossa análise passaram a ser resistentes. No entanto, no ano de 2009 CIM  $\leq 2$  era liberado como sensível e CIM  $\leq 4$  como intermediário, atualmente estes resultados de concentrações inibitórias mínimas são intermediários e resistentes respectivamente.

No ano de 2010, foram analisados 4 (10,25%) isolados de *E. aerogenes*, o qual pertencem a 3 clones diferentes, denominados, clone A1 e A15, B1 e E1. Analisando os dados deste ano, podemos observar uma discrepância nos resultados, para Imipenem, Meropenem e Ertapenem, talvez isto se deva pelo fato de estes

isolados serem analisados no início do ano de 2010 e os pontos de cortes ainda não terem sido trocados no sistema.

No último ano de nossa análise em 2011, somente dois isolados foram estudados. Estes eram dois clones diferentes, clone A2 e F1 e não foi observado mudança de resultados quando analisados os dois métodos.

Assim, neste estudo, podemos observar a importância de determinar pontos de cortes mais específicos para os antimicrobianos carbapenêmicos, embora os resultados tenham sido liberados corretamente nos anos estudados pelo sistema Vitek, podemos perceber que pelo método de microdiluição em caldo todos interpretados pelo CLSI 2010, muitos isolados considerados sensíveis e intermediário eram resistentes e pertenciam ao mesmo clone, dificultando talvez a visualização da ocorrência de um surto em um determinado setor do hospital.



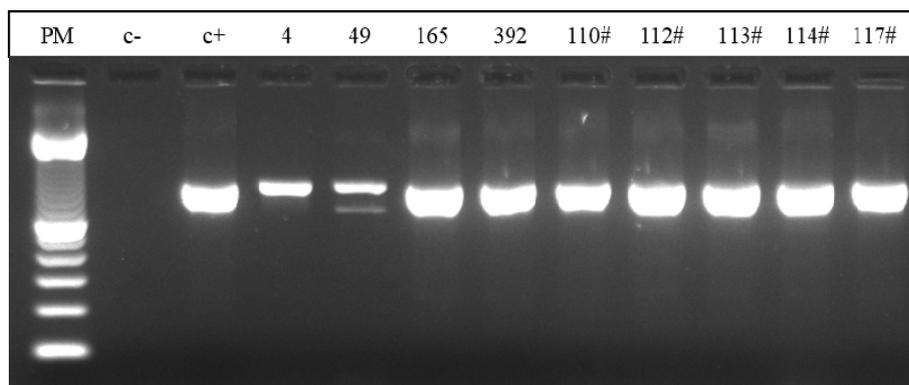
#### 4.4 Testes Moleculares

##### 4.4.1 Resultados dos PCRs para Detecção dos Genes Codificadores das Carbapenemases

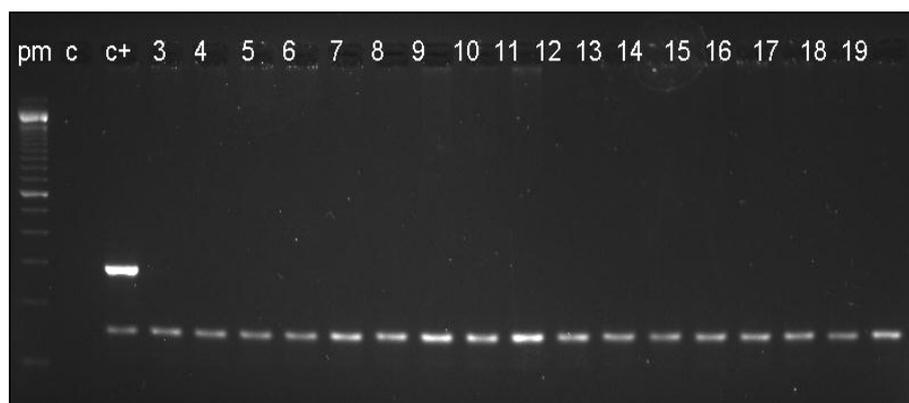
A técnica de PCR evidenciou que 39 (88,6%) dos 44 isolados de *E. aerogenes* continham o gene *bla<sub>KPC</sub>*, os demais genes codificadores de carbapenemase não foram identificados em nenhum isolado. Entre os 8 isolados de *E. cloacae* todos 100%, apresentaram o gene *bla<sub>KPC</sub>*, os demais genes estudados não foram identificados em nenhum isolado conforme Tabela 15 demonstra.

**Tabela 15 -** Identificação dos genes codificadores de carbapenemase pelo método de PCR nos 44 isolados de *E. aerogenes* e nos 8 isolados de *E. cloacae*

Gene	<i>E. aerogenes</i> (N=44)		<i>E. cloacae</i> (N=8)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<b><i>blaKPC*</i></b>	39 (88,6%)	5 (11,36%)	8 (100%)	-
<i>blaNDM</i>	-	44	-	8 (100%)
<i>blaGES</i>	-	44	-	8 (100%)
<i>blaSPM</i>	-	44	-	8 (100%)
<i>blaVIM</i>	-	44	-	8 (100%)
<i>blaGIM</i>	-	44	-	8 (100%)
<i>blaIMP</i>	-	44	-	8 (100%)



**Figura 6** - Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador de *bla*<sub>KPC</sub> (893pb) de isolados de *E. aerogenes*. **PM- Peso Molecular**. Isolado 1. Controle negativo. Isolado 2. Controle positivo



**Figura 7** - Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR *bla*<sub>NDM</sub> (287pb) e 16 **S.PM- Peso Molecular**. Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene NDM

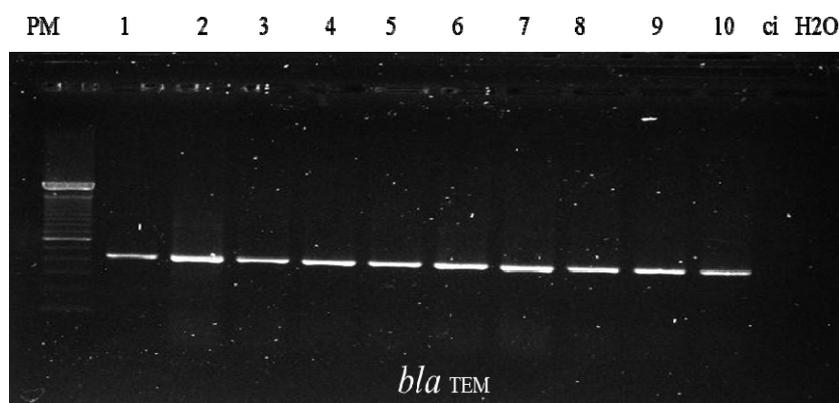
#### 4.4.2 Resultados dos PCRs para Detecção dos Genes Codificadores *bla*<sub>TEM-164</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2 grupo</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>

Dos 44 isolados de *E. aerogenes* analisados 39 (88,6%) apresentaram o gene *bla*<sub>TEM-164</sub>, 41 (93,2%) o gene *bla*<sub>CTX-M-2 grupo</sub> e 44 (100%) não apresentam os genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>.

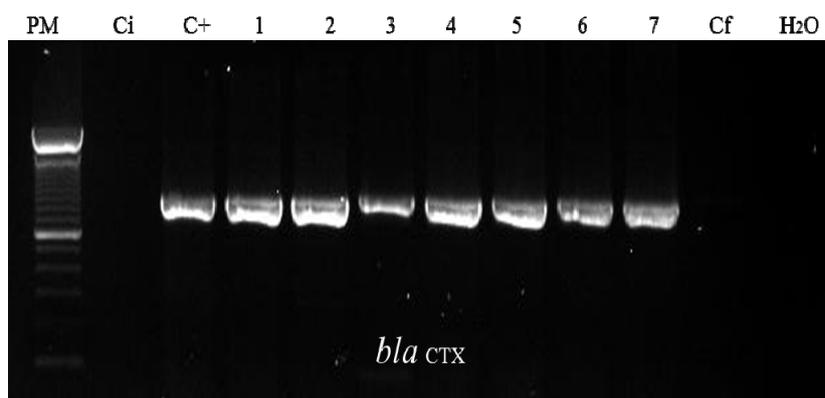
Para os 8 isolados de *E. cloacae* analisados 8 (100%) apresentaram o gene *bla*<sub>TEM-164</sub> e nenhum isolado foi identificado os genes *bla*<sub>CTX-M-2 grupo</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>OXA-48</sub>, como demonstra a tabela 16.

**Tabela 16** - Identificação dos genes codificadores de ESBL e OXA-48 pela técnica de PCR, nos 44 isolados de *E. aerogenes* e nos 8 isolados de *E. cloacae*

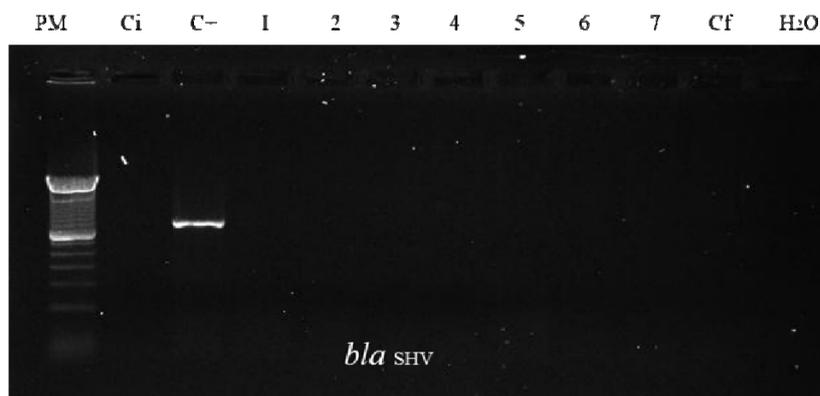
Gene	<i>E. aerogenes</i> (N=44)		<i>E. cloacae</i> (N=8)	
	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
<i>bla</i> <sub>TEM-164</sub>	39 (88,6%)	5 (11,4%)	8 (100%)	-
<i>bla</i> <sub>CTX-M-2</sub>	41 (93,2%)	3 (6,8%)	-	8 (100%)
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	-	44 (100%)	-	8 (100%)
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	-	44 (100%)	-	8 (100%)



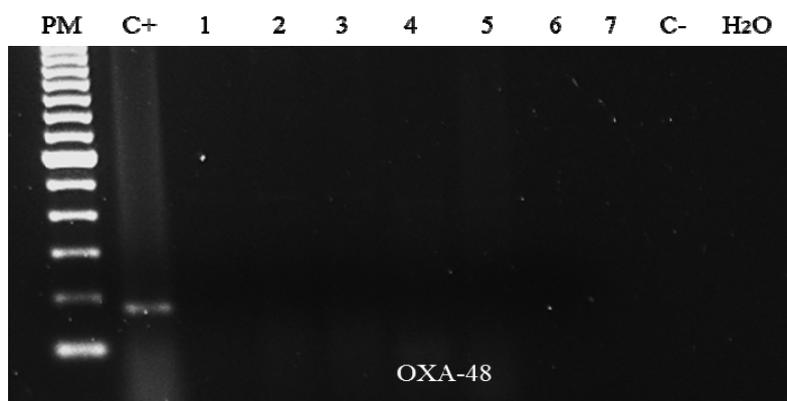
**Figura 8** - Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR *bla*<sub>TEM</sub> (420pb). PM- Peso Molecular. Isolado Ci. Controle negativo. Isolado 1 Controle positivo.



**Figura 9** - Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR *bla<sub>CTX</sub>* (893pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado Ci. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo



**Figura 10** - Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR *bla<sub>SHV</sub>* (730pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado Ci. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo



**Figura 11** - Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR *bla<sub>OXA-48</sub>* (177pb). PM: peso molecular; C+: Controle positivo e C-: Controle negativo

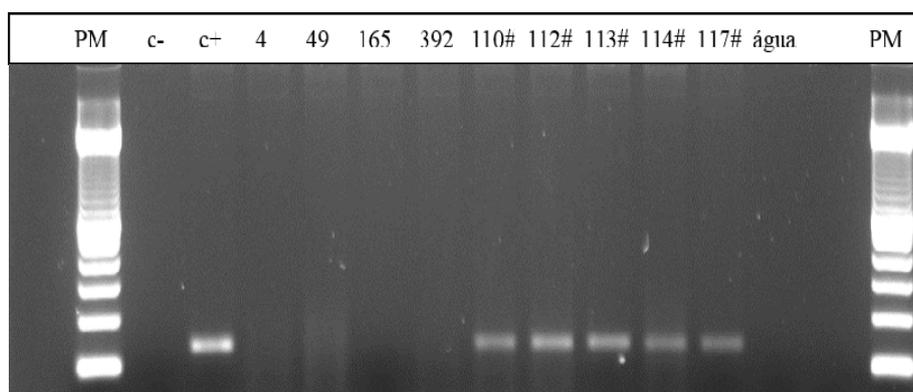
#### 4.4.3 Resultados dos PCRs para Detecção do Gene Codificador da Bomba de Efluxo AcrAB-TolC

O gene codificador da bomba de efluxo AcrAB-TolC, somente foi identificado nos isolados de *Enterobacter cloacae*, como demonstra a Tabela 17. Todos os isolados positivos para bomba de efluxo são resistentes ao Imipenem, Meropenem e Ertapenem com CIMs acima de 8 $\mu$ g/ mL para todos carbapenêmicos estudados.

**Tabela 17 -** Identificação do gene codificador da Bomba de efluxo pela técnica de PCR, nos 44 isolados de *E. aerogenes* e nos 8 isolados de *E. cloacae*

PCR	Gene AcrABTolc	
	<i>E. aerogenes</i>	<i>E. cloacae</i>
Positivos	-	8 (100%)
Negativos	44 (100%)	-

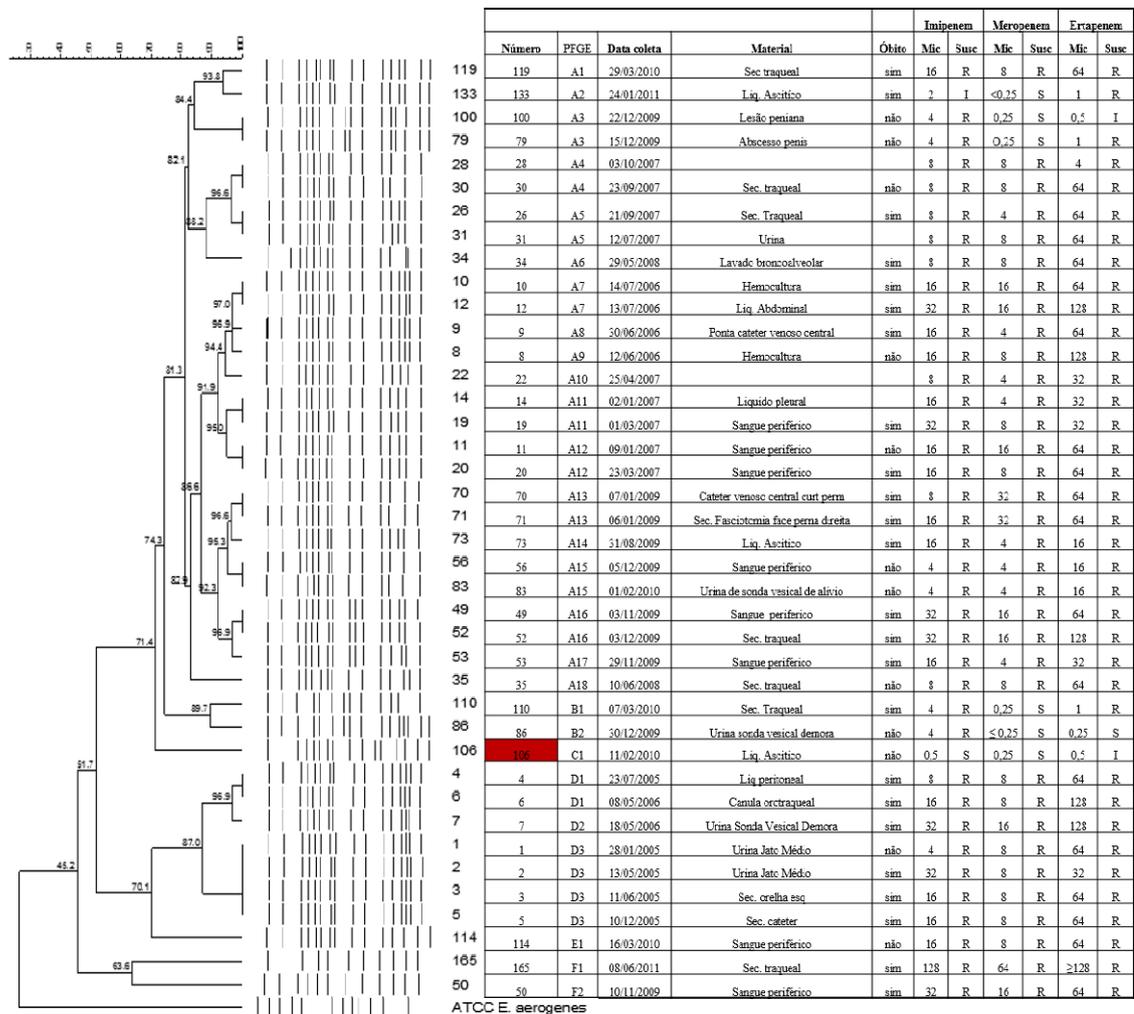
**AcrAB-TolC\*:** todos os isolados positivos foram resistentes aos carbapenêmicos.



**Figura 12 -** Foto de gel de PCR da amplificação do gene codificador do PCR da bomba de efluxo AcrART (130pb). PM: peso molecular; 1: Controle negativo e 2: Controle positivo

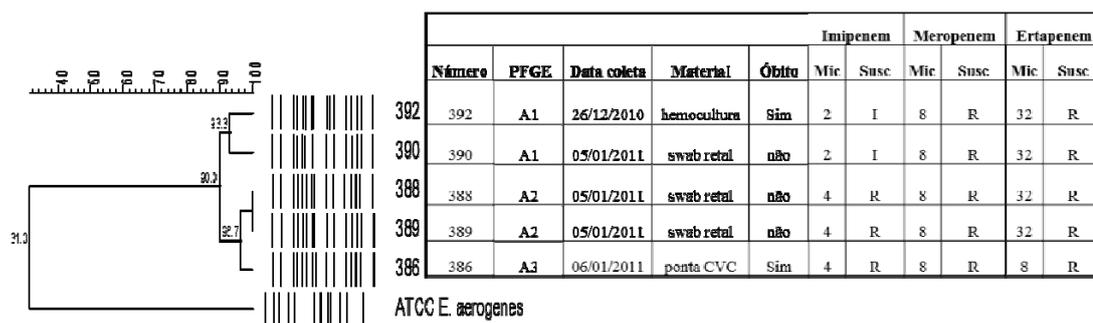
#### 4.4.4 Resultados do Pulsed Field (PFGE).

Os resultados de similaridade genética segundo dados obtidos pelo dendograma demonstrou que dos 39 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do HC-FMUSP, 27 (69,2%) pertenciam a um clone A predominante, onde identificou-se subtipos que variaram de A1 a A 18 no ano de 2006 a 2011. Quando analisados os demais isolados observamos 4 clones diferentes que denominamos clone B, clone D, Clone E e Clone F, como demonstra a Figura 13.



**Figura 13 -** Dendograma dos 39 *Enterobacter aerogenes* do Hospital das Clínicas - FMUSP. Isolado 106 não incluído no trabalho (Sensível)

Quando avaliados os 5 isolados de *E. aerogenes* do Hospital HGIS de São Paulo todos pertenciam a um clone predominante que denominamos como A, que obteve uma variação de subtipo A 1 a A 3.



**Figura 14 -** Dendrograma dos 5 isolados de *Enterobacter aerogenes* do Hospital de Itapeperica da Serra

Quando analisamos os 8 isolados de *E. cloacae* provenientes do Hospital Universitário de Londrina, identificamos 2 clones diferentes A e B, dos quais o clone A demonstra predominância, apresentando subtipos de A1 a A3.

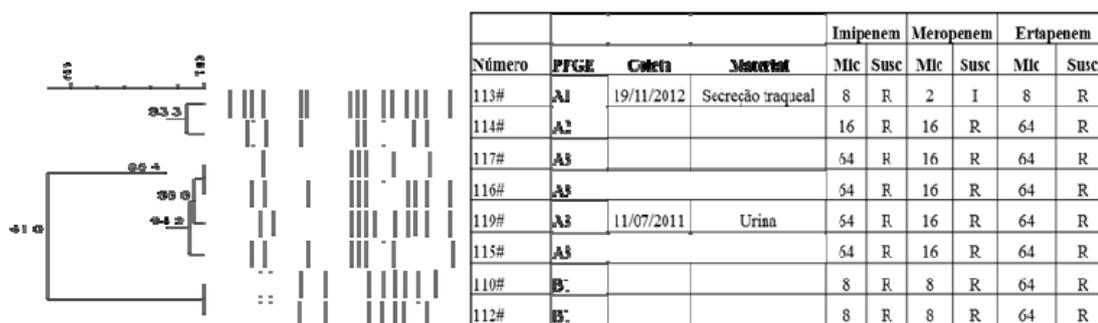


Figura 15 - Dendrograma dos 8 isolados de *Enterobacter cloacae* do Hospital de Londrina

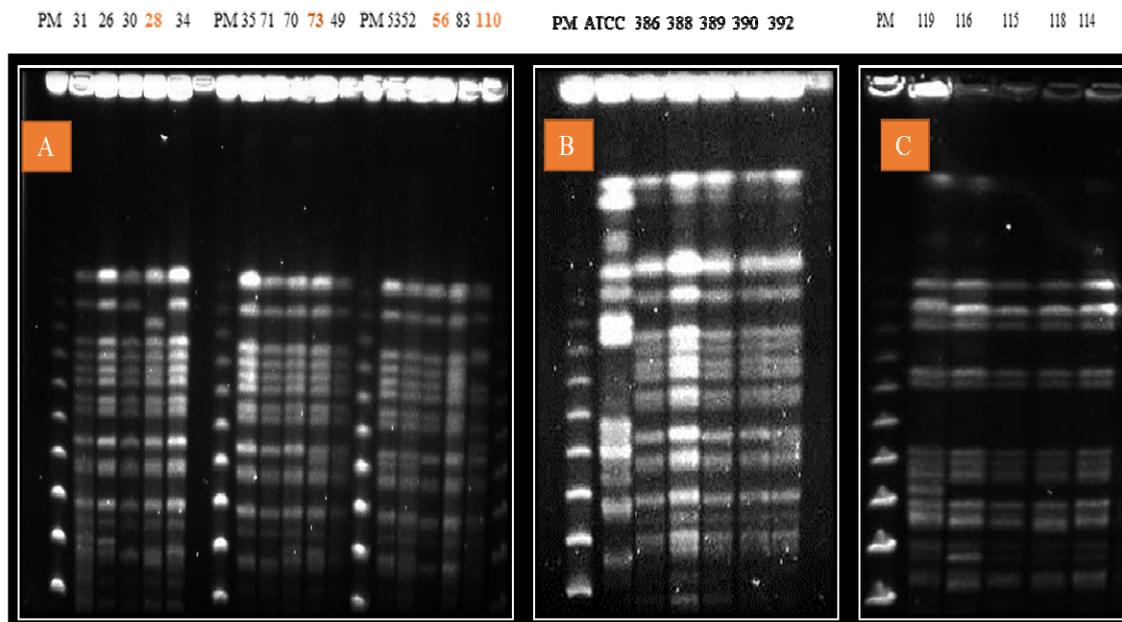


Figura 16 - Foto de gel de eletroforese em campo pulsado de isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos dos 3 Hospitais analisados. A) *E. aerogenes* Hospital das Clinicas; B) *E. aerogenes* de HGIS e C) *E. cloacae* de Londrina. Enzima de restrição utilizada XbaI fast

#### 4.4.5 Resultados da análise das Proteínas de Membrana Externa

Os isolados foram analisados de acordo com a intensidade das proteínas de interesse. Para os isolados de *Enterobacter aerogenes* estudamos as proteínas de peso Omp F 39 kDa, OMP C (42 kDa) e 35-36kDa, com sua presença ou ausência em determinada amostra, quando comparada com a cepa controle ATCC *E. aerogenes* 13048.

Dos 44 isolados de *E. aerogenes* 22 (50%) foram analisadas as proteínas de membrana com pesos 39 kDa, 42 kDa, consideradas responsáveis pela resistência aos antimicrobianos Imipenem, Meropenem e Cefepima, conforme estudo elaborado por Yigit e Tenover em 2002. A mesma autora no ano 2013 analisou deficiência de Omp35 e 36 em isolados resistentes a Imipenem associado com expressão de bomba de efluxo e comenta sua contribuição adaptativa de isolados de *E.aerogenes* resistentes ao Imipenem durante tratamento e que em suas análises seus isolados eram resistentes a Ertapenem, sendo assim, foram analisadas estas proteínas em nosso estudo (Figura 16).

Dos 22 isolados de *E. aerogenes*, 17 (77,3%) foram analisadas suas proteínas de membrana e para facilitar a análise dividimos os resultados de SDS em 7 grupos que obtiveram características diferentes.

Foi observado que o grupo 1, isolados 10 e 12 (Clone A7), somente apresentaram diminuição na proteína 35-36 kDa, seus CIMs para Imipenem foram 16-32 µg/mL, para Meropenem 16 µg/mL, Ertapenem 64-128 µg/mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/mL.

O grupo 2, isolados 20(A12), 7(D2), 2(D3), 5(D3) e 26(A5), apresentaram pouca diminuição na proteína 39kDa (+++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++)

e nenhuma diminuição na proteína 42 kDa. Seus CIMs para Imipenem foram 8-32 µg/mL, Meropenem 4-16 µg/mL, Ertapenem 32-128 µg/mL e Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL.

No grupo 3 o isolado número 14 (A11), apresentou ausência de proteína 39 kDa e diminuição (++) da proteína 35 e 36 kDa. Seu CIM para Imipenem foi 16 µg/mL, Meropenem 4 µg/mL, Ertapenem 32 µg/mL e Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL.

Já o grupo que designamos 4, analisamos 2 isolados, número 73 (A14) e 56 (A15) que apresentaram diminuição (++) nas três proteínas estudadas. Seus CIMs para Imipenem foram 4-16 µg/mL, Meropenem 4 µg/mL, Ertapenem 16 µg/mL e Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL.

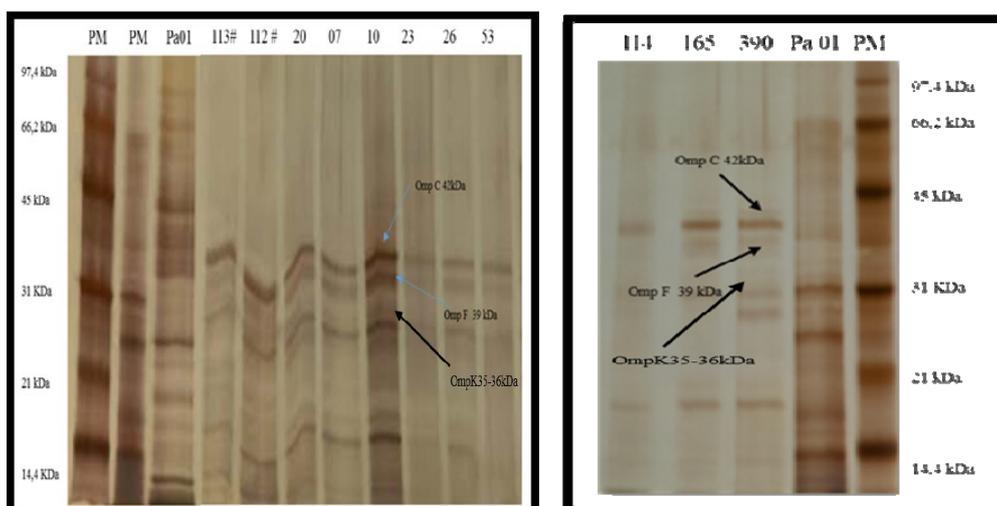
No grupo 5 o isolado número 165 (F1), apresentou diminuição da proteína (+++) 42 kDa, diminuição (++) da proteína 39kDa e ausência da 35 e 36 kDa. Seu CIM para Imipenem foi 128 µg/mL, Meropenem 64 µg/mL, Ertapenem  $\geq$ 128 µg/mL e Cefepima 32 µg/mL.

O Grupo 6, composto pelos isolado 53 (A17), apresentou pouca diminuição da proteína (+++) 42 kDa, diminuição (+) da proteína 39kDa e diminuição (++) da proteína 35 e 36 kDa. Seu CIM para Imipenem foi 16 µg/mL, Meropenem 4 µg/mL, Ertapenem 32 µg/mL e Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL.

Quando analisamos o Grupo 7, isolados 22(A10), 71 (A13), 49 (A16), 114 (E1) e 50 (F2), observamos pouca diminuição da proteína (+++) 42 kDa, ausência da proteína 39kDa e diminuição (++) da proteína 35 e 36 kDa. Seus CIMs para Imipenem foram de 8-32 µg/mL, Meropenem 4-32 µg/mL, Ertapenem 32-64 µg/mL e Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL.

Dos 5 (100%) isolados de *E.aerogenes* do HGIS analisados pelo SDS para identificação da diminuição, presença ou ausência das proteínas de membrana externa, foi observado que no subtipo A3 ocorreu uma pequena diminuição (+++) da proteína 42 kDa, diminuição na proteína de peso 39 kDa (+) e diminuição na proteína 35-36 kDa (++) . Seu CIM para Imipenem foi 4 µg/mL, Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 8 µg/mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/mL. Os subtipos A1 e A2 do HGIS, não apresentaram diminuição da proteína 42 kDa, diminuição na proteína 39 kDa (+) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . Seus CIMs para Imipenem foram 2-4 µg/mL, Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 32µg/mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/mL.

Dos 5 (62,5%) isolados de *E. cloacae* analisados, todos apresentaram pequena diminuição da proteína 42kDa (+++) e em relação a proteína de tamanho 39kDa todos apresentaram alta diminuição da proteína (+) e ausência de 35-36 kDa. Seus CIMs para Imipenem foram 8-64 µg/mL, Meropenem 2-16 µg/mL, Ertapenem 8 a 64 µg/mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/mL, como demonstra figura e tabela 18 a seguir.



**Figura 17 -** Foto de SDS, proteínas de membrana externa de isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos. PM. Proteínas de peso molecular conhecidas: 97, 4 kDa, 66,2 kDa, 45 kDa, 31 kDa, 21 kDa e 14,4 kDa

**Tabela 18 -** Correlação do perfil de SDS de proteínas da membrana externa, gene *bla*KPC, *bla*TEM e *bla*CTX e bomba de efluxo AcrART de 22 *Enterobacter aerogenes* e 5 *Enterobacter cloacae*

Grupo -SDS	N°	PFGE	Hospital	Data coleta	T. Internação	Imipenem		Meropenem		Ertapenem		Cefepime		PCR				SDS			Atividade da Bomba de Efluxo CCCP
						Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	<i>bla</i> KPC	<i>bla</i> CTX-M2	<i>bla</i> TEM164	acrART	42 kDa	39 kDa	35 e 36 kDa	
Grupo 1	10	A7	HC	14/07/2006	45 dias	16	R	16	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
	12	A7	HC	13/07/2006	40 dias	32	R	16	R	128	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
Grupo 2	20	A12	HC	23/03/2007	37 dias	16	R	8	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
	7	D2	HC	18/05/2006	33 dias	32	R	16	R	128	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
	2	D3	HC	13/05/2005	65 dias	32	R	8	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
	5	D3	HC	10/12/2005	59 dias	16	R	8	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	
	26	A5	HC	21/09/2007	10 dias	8	R	4	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+++	++	Ativa p/ IMI, MER e ERT
Grupo 3	14	A11	HC	02/01/2007	-	16	R	4	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	Ausente	++	
Grupo 4	73	A14	HC	31/08/2009	51 dias	16	R	4	R	16	R	>128	R	+	+	+	-	+++	++	++	
	56	A15	HC	05/12/2009	51 dias	4	R	4	R	16	R	>128	R	+	+	+	-	+++	++	++	
Grupo 5	165	F1	HC	08/06/2011	10 dias	128	R	64	R	≥128	R	32	R	+	-	+	-	+++	++	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e ERT
Grupo 6	53	A17	HC	29/11/2009	16 dias	16	R	4	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	
Grupo 7	22	A10	HC	25/04/2007	-	8	R	4	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	Ausente	++	
	71	A13	HC	06/01/2009	53 dias	16	R	32	R	64	R	>128	R	+	-	+	-	+++	Ausente	++	
	49	A16	HC	03/11/2009	13 dias	32	R	16	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	Ausente	++	Ativa p/ IMI, MER e ERT
	114	E1	HC	16/03/2010	80 dias	16	R	8	R	64	R	>128	R	+	+	+	-	+++	Ausente	++	
	50	F2	HC	10/11/2008	48 dias	32	R	16	R	64	R	>128	R	+	-	-	-	+++	Ausente	++	
	386	A3	HGIS	06/01/2011	-	4	R	8	R	8	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	
	388	A2	HGIS	05/01/2011	-	4	R	8	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	
	389	A2	HGIS	05/01/2011	-	4	R	8	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	
	390	A1	HGIS	05/01/2011	-	2	I	8	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	
	392	A1	HGIS	26/12/2010	-	2	I	8	R	32	R	>128	R	+	+	+	-	+++	+	++	Ativa p/ IMI, MER e ERT
	110#	B1	Londina		-	8	R	8	R	64	R	>128	R	+	-	+	+	+++	+	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e ERT
	112#	B1	Londina		-	8	R	8	R	64	R	>128	R	+	-	+	+	+++	+	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e ERT
	113#	A1	Londina	19/11/2012	-	8	R	2	I	8	R	>128	R	+	-	+	+	+++	+	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e não ativa p/ERT
	114#	A2	Londina		-	16	R	16	R	64	R	>128	R	+	-	+	+	+++	+	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e não ativa p/ERT
	117#	A3	Londina		-	64	R	16	R	64	R	>128	R	+	-	+	+	+++	+	Ausente	Ativa p/ IMI, MER e não ativa p/ERT

## 4.5 Estudo Fenotípico

### 4.5.1 Resultados do Inibidor de Bomba de Efluxo CCCP

Foram analisados a atividade da bomba de efluxo para 5 isolados de *E.aerogenes* e 5 isolados de *E. cloacae*, nestes últimos foram confirmadas a presença da bomba de efluxo AcrABTolc pelo PCR. Realizamos 3 concentrações de inibidor de bomba de efluxo CCCP diferentes e para analisarmos os efeitos destas, as concentrações utilizadas foram: 25, 50 e 100 µg/mL.

Todos os isolados de *E.aerogenes* analisados apresentaram atividade de bomba de efluxo, sua melhor concentração para todos os carbapenêmicos, foi 50 µg/mL. Quando analisamos os *E. cloacae*, podemos observar que sua melhor concentração foi de 100 µg/mL, todos isolados demonstraram atividade para Meropenem e Imipenem e somente três isolados demonstraram atividade da bomba de efluxo quando em presença do Ertapenem.

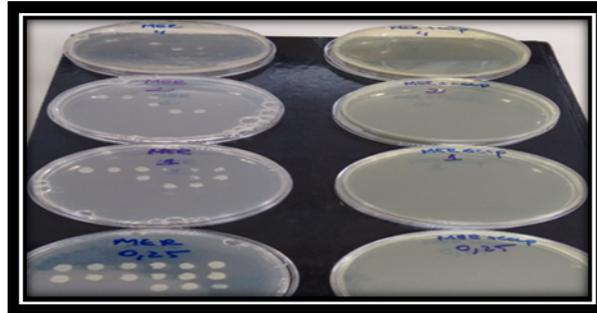
Mas, Yang em 2011, analisou 355 isolados de *Enterobacter cloacae* em seu estudo e descreveram que os inibidores de bomba de efluxo CCCP e PAβN são ativos contra bombas RND em bactérias Gram-negativas incluindo: *Campylobacter spp.*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae* e *P. aeruginosa*.

Mas, comentam neste estudo, que concentrações altas parecem ter efeitos tóxicos que acabam matando as bactérias, assim em seu estudo ele usa para CCCP 12,5 µg/mL, onde conclui que em seus isolados mostraram CIM reduzidos de Ertapenem na presença do CCCP por efeito direto da bomba e não quando influenciado pelo crescimento bacteriano <sup>(5)</sup>.

Em nossa análise este efeito tóxico parece não ter sido demonstrado, pois em todas concentrações ocorreu crescimento bacteriano, mas a concentração de 50 e 100µg/mL parecem ter sido as mais adequadas, para ambos isolados estudados. Sendo, assim toda redução de CIM em quatro concentrações, consideramos como presença de atividade da bomba de efluxo neste estudo, como demonstra Tabela 19.

**Tabela 19 -** Resultados da atividade de bomba de efluxo utilizando o inibidor CCCP para os três carbapenêmicos: Imipenem, Meropenem e Ertapenem

Imipenem								
		Diluição em caldo	Diluição em ágar					
			25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
Isolados	Microrganismo	Mic Imipenem	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP
110	<i>E. cloacae</i>	8	-	-	8	2	4	≤ 0,125
112	<i>E. cloacae</i>	8	-	-	8	1	8	≤ 0,125
113	<i>E. cloacae</i>	8	-	-	8	1	4	≤ 0,125
114	<i>E. cloacae</i>	16	-	-	8	8	8	≤ 0,125
117	<i>E. cloacae</i>	64	-	-	32	16	32	≤ 0,125
4	<i>E. aerogenes</i>	8	-	-	8	≤ 0,125	8	≤ 0,125
49	<i>E. aerogenes</i>	32	-	-	32	≤ 0,125	16	≤ 0,125
26	<i>E. aerogenes</i>	8	-	-	8	≤ 0,125	8	≤ 0,125
165	<i>E. aerogenes</i>	128	-	-	64	≤ 0,125	64	≤ 0,125
392	<i>E. aerogenes</i>	2	-	-	2	0,25	2	≤ 0,125
Meropenem								
		Diluição em caldo	Diluição em ágar					
			25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
Isolados	Microrganismo	Mic Meropenem	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP
110	<i>E. cloacae</i>	8	4	2	4	2	4	≤ 0,125
112	<i>E. cloacae</i>	8	4	4	4	2	4	≤ 0,125
113	<i>E. cloacae</i>	2	2	2	2	1	2	≤ 0,125
114	<i>E. cloacae</i>	16	8	2	8	2	8	≤ 0,125
117	<i>E. cloacae</i>	16	8	8	8	2	16	≤ 0,125
4	<i>E. aerogenes</i>	4	4	0,25	4	≤ 0,125	4	≤ 0,125
49	<i>E. aerogenes</i>	16	8	1	8	≤ 0,125	4	≤ 0,125
26	<i>E. aerogenes</i>	4	4	2	4	≤ 0,125	4	≤ 0,125
165	<i>E. aerogenes</i>	64	64	2	32	≤ 0,125	32	≤ 0,125
392	<i>E. aerogenes</i>	8	8	0,25	8	1	8	≤ 0,125
Ertapenem								
		Diluição em caldo	Diluição em ágar					
			25 µg/mL		50 µg/mL		100 µg/mL	
Isolados	Microrganismo	Mic Ertapenem	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	c/CCCP
110	<i>E. cloacae</i>	64	16	16	-	-	16	8
112	<i>E. cloacae</i>	64	16	8	-	-	16	8
113	<i>E. cloacae</i>	8	8	0,5	-	-	8	≤ 0,125
114	<i>E. cloacae</i>	64	32	16	-	-	32	≤ 0,125
117	<i>E. cloacae</i>	64	32	16	-	-	32	≤ 0,125
4	<i>E. aerogenes</i>	64	32	≤ 0,125	-	-	-	-
49	<i>E. aerogenes</i>	64	32	≤ 0,125	-	-	-	-
26	<i>E. aerogenes</i>	64	64	2	-	-	-	-
165	<i>E. aerogenes</i>	≥128	256	2	-	-	-	-
392	<i>E. aerogenes</i>	32	32	4	-	-	-	-



**Figura 18 -** Foto dos meios Mueller-Hinton em concentrações diferentes de Meropenem com e sem inibidor CCCP, demonstrando a atividade da mesma

#### **4.6 Resultados dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* com todos mecanismos de resistencia encontrados**

Quando analisamos todos mecanismos como carbapenemases, presença de gene ESBL, proteínas de membrana, bomba de efluxo e atividade de bomba de efluxo, observamos que dos 39 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do Hospital das Clínicas, 27 (69,2%) pertenciam a um clone A predominante, onde identificou-se subtipos que variaram de A1 a A18 no ano de 2006 a 2011. Quando analisados os demais isolados observamos 4 clones diferentes que denominamos clone B, clone D, Clone E e Clone F. O clone C era um isolado sensível que tiramos da casuística, como demonstra Tabela 20.

No ano de 2005, 5 (12,8%) isolados de *E. aerogenes* do Hospital das Clínicas foram analisados. Neste ano foi observado a predominância do clone D, subtipos D1 e D3. Seus CIMs para Imipenem foram de 4 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , Meropenem 8  $\mu\text{g/mL}$ , Ertapenem 32-64  $\mu\text{g/mL}$ , Cefepima >128  $\mu\text{g/mL}$ , Amicacina 32-64  $\mu\text{g/mL}$  e Ciprofloxacina 16  $\mu\text{g/mL}$ . Todos apresentavam o gene *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX</sub> e *bla*<sub>TEM</sub> e foi

observado diminuição das proteínas 39 kDa (+++) e proteína 35-36 kDa (++) . Somente o isolado 4 (D1) foi analisado a atividade de bomba de efluxo com o inibidor CCCP e este apresentou diminuição significativa nos CIMs para os antimicrobianos Imipenem, Ertapenem e Meropenem na presença do inibidor CCCP.

No ano de 2006, 6 (15,4%) isolados foram analisados, neste ano foram observados dois clones diferentes, a predominância do subtipo D1 e D2 (Maio de 2006) e subtipo A8 e A9 (Junho de 2006) e A7 (Julho de 2006). Seus CIMs para Imipenem foram de 16 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , Meropenem 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , Ertapenem 64-128  $\mu\text{g/mL}$ , Cefepima >128  $\mu\text{g/mL}$ , Amicacina 32-64  $\mu\text{g/mL}$  e Ciprofloxacina 8-16  $\mu\text{g/mL}$ . Todos apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*. Foi observado diminuição das proteínas 39 kDa (+++) e proteína 35-36 kDa (++) , nos isolados clones D e para os subtipos A7 somente diminuição na proteína 35-36 kDa (++) .

Nove (23%) isolados foram analisados no ano de 2007, subtipos A4, A5, A10, A11 e A12. Seus CIMs para Imipenem foram de 8 a 32  $\mu\text{g/mL}$ , Meropenem 4-16  $\mu\text{g/mL}$ , Ertapenem 4-64  $\mu\text{g/mL}$ , Cefepima >128, Amicacina 32-64  $\mu\text{g/mL}$  e Ciprofloxacina 2-32  $\mu\text{g/mL}$ . Todos apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*. Foi observado nos subtipos A5 e A12 diminuição das proteínas 39 kDa (+++) e proteína 35-36 kDa (++) . Nos isolados subtipos A10 e A11 foi observado a ausência da proteína 39kDa e diminuição na proteína 35-36 kDa (++) . Somente o isolado 26 (A5) foi analisado a atividade da bomba de efluxo e este apresentou diminuição significativa nas CIMs para os antimicrobianos Imipenem, Ertapenem e Meropenem na presença do inibidor CCCP.

No ano de 2008, somente 2 (5,1%) isolados foram identificados e pertenciam aos subtipos A6 e A18. Suas CIMs foram para Imipenem 8  $\mu\text{g/mL}$ , Meropenem 8

μg/mL, Ertapenem 64 μg/mL, Cefepima >128, Amicacina 64 μg/mL e Ciprofloxacina 8 μg/mL. Todos apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>*. As proteínas de membrana extrema desses isolados não foram avaliadas.

Em 2009, 11(28,2%) isolados foram analisados, neste ano foram observados 3 clones diferentes o clone A (A3, A13, A14, A15, A16 e A17), o clone B12 e o clone F2. Suas CIMs para Imipenem foram de 4-32 μg/mL, Meropenem ≤0,25-32 μg/mL, Ertapenem 0,25-128 μg/mL, Cefepima >128, Amicacina 2-128 μg/mL e Ciprofloxacina 2-32 μg/mL. Destes, 8 apresentaram *bla<sub>KPC</sub>* positivo, 8 apresentaram *bla<sub>CTX</sub>* e 10 *bla<sub>TEM</sub>*. Os isolados A3, A13, B2 e F2 apresentaram resultados diferentes dos genes estudados. E quando observado os subtipos A13, A16, A50, estes tiveram diminuição das proteínas 42 kDa (+++), ausência da 39 kDa e diminuição da proteína 35-36 kDa (++). Nos subtipos A14 e A15 foi observada diminuição das proteínas 42 kDa (+++), diminuição das proteínas 39 kDa (++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++)). E o subtipo A17 foi observado diminuição das proteínas 42 kDa (+++), diminuição das proteínas 39 kDa (+) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++)). Somente o isolado 49 (A16) demonstrou atividade de bomba de efluxo com o inibidor CCCP e este apresentou diminuição significativa nas CIMs para os antimicrobianos Imipenem, Ertapenem e Meropenem na presença do inibidor.

Em 2010, 4 (10,25%) isolados foram identificados pertencentes a 3 clones diferentes: o clone A (A1 e A15) e subtipos, B1 e E1. Suas CIMs para Imipenem foram de 4-16 μg/mL, Meropenem 0,25-8 μg/mL, Ertapenem 1-64 μg/mL, Cefepima >128, Amicacina 4-128 μg/mL e Ciprofloxacina 32-64 μg/mL. Destes, 3 eram *bla<sub>KPC</sub>* positivo, 3 eram *bla<sub>CTX</sub>* e 3 *bla<sub>TEM</sub>*. Os isolados A1 e B1, apresentaram resultados diferentes dos genes estudados. Somente o clone E1 foi escolhido para a analisado as

proteínas de membrana externa, este apresentou diminuição da proteína 42 kDa (+++), ausência da 39 kDa e diminuição da proteína 35-36 kDa (++)).

E em 2011, foram identificados 2 (5,1%) clones diferentes A2 e F1. O subtipo A2 era do início de janeiro de 2011 e o F1 era de junho. Estes isolados apresentaram muita diferença em relação ao outro. O isolado A2 apresentou CIM para Imipenem de 2 µg/mL (Intermediário), Meropenem <0,25 µg/mL (Sensível), Ertapenem 1 µg/mL (Resistente), Cefepima >128, Amicacina 4 µg/mL (Sensível) e Ciprofloxacina 32 µg/mL, não apresentou o gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>* e foi positivo para *bla<sub>CTX</sub>*. O isolado F1 apresentou CIM para Imipenem de 128 µg/mL, Meropenem 64 µg/mL, Ertapenem ≥128 µg/mL, Cefepima 32, não apresentou o gene *bla<sub>CTX</sub>* e eram *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM</sub>* positivos. Somente o clone E1 foi escolhido para a análise das proteínas de membrana externa, este apresentou diminuição da proteína 42 kDa (+++), diminuição da proteína 39 kDa (++) e ausência da 35-36 kDa, como também foi observado a atividade da bomba de efluxo para os três carbapenêmicos estudados.

Nos 5 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do HGIS estudados, foi observada a predominância de um único clone denominado A, seus subtipos foram A1 a A3. Em dezembro de 2010 foi identificado o subtipo A1 e em janeiro de 2011 foi encontrado o mesmo subtipo apresentando as mesmas características. Estes isolados apresentaram CIM para Imipenem de 2 µg/mL (intermediário), Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 32 µg/mL e Cefepima >128 µg/mL e apresentaram positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX</sub>*. Na análise de proteína de membrana foi observado, diminuição da proteína de 39 kDa (+) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++)). Somente o isolado 392 (A1) demonstrou a atividade de bomba de efluxo com o inibidor CCCP e este apresentou diminuição

significativa nas CIMs para os antimicrobianos Imipenem, Ertapenem e Meropenem na presença do inibidor CCCP.

No ano de 2011, foram identificados 2 subtipos A2 nos isolados de HGIS. Estes isolados apresentaram CIM para Imipenem de 4µg/mL (Intermediario), Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 32 µg/mL, Cefepima  $\geq$ 128 µg/mL e apresentaram positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX</sub>*. Na análise de proteína de membrana foi observada diminuição da proteína de 39 kDa (+) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . O subtipo A3 com CIM para Imipenem de 4 µg/mL (Intermediario), Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 8 µg/mL, Cefepima >128 e apresentou positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e *bla<sub>CTX</sub>* e na análise de proteína de membrana foi observada diminuição da proteína de 42 kDa (+++), diminuição da proteína de 39 kDa (+) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) .

Quando analisamos os 8 isolados de *E. cloacae*, observamos 2 clones diferentes o clone A e o clone B. O clone A era o mais predominate com subtipos de A1 a A3. O único isolado A1 apresentou CIM para Imipenem de 8µg/mL, Meropenem 2 µg/mL (Intermediário), Ertapenem 8 µg/mL, Cefepima >128 e positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e o gene *AcrART* para bomba de efluxo. Na análise de proteína de membrana foi observada diminuição da proteína de 42 kDa (++) , diminuição da 39 kDa (+++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . Este isolado 113#, apresentou diminuição significativa nas CIMs para os antimicrobianos Imipenem e Meropenem na presença do inibidor da bomba de efluxo, para o antimicrobiano Ertapenem não foi observado atividade.

O único isolado A2, apresentou CIM para Imipenem de 16µg/mL, Meropenem 16µg/mL, Ertapenem 64µg/mL, Cefepima >128 e positividade para os

genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e o gene *AcrART* para bomba de efluxo. Na análise de proteína de membrana não foi observado a diminuição da proteína de 42 kDa (++) , teve diminuição da proteína de 39 kDa (+++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . Este isolado 114#, apresentou diminuição significativa nas CIMs para os antimicrobianos Imipenem e Meropenem na presença do inibidor, para o antimicrobiano Ertapenem não foi observado atividade.

No Hospital de Londrina, 4 isolados apresentavam o mesmo subtipo A3, estes apresentaram, CIM para Imipenem de 64 µg/mL, Meropenem 16 µg/mL, Ertapenem 64 µg/mL, Cefepima >128 e positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e o gene *AcrART* para bomba de efluxo. Na análise de proteína de membrana não foi observado a diminuição da proteína de 42 kDa (++) , teve diminuição da proteína de 39 kDa (+++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . Apenas o isolado 117# (A3) foi analisado a atividade de bomba de efluxo com o inibidor CCCP e este apresentou diminuição significativa nos CIMs para os antimicrobianos Imipenem e Meropenem na presença do inibidor, para o antimicrobiano Ertapenem não foi observado.

Dois isolados de *E. cloacae*, pertenciam ao clone B1, estes apresentaram, CIM para Imipenem de 8 µg/mL, Meropenem 8 µg/mL, Ertapenem 64 µg/mL, Cefepima >128 e positividade para os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>* e o gene *AcrART* para bomba de efluxo. Não foram analisadas as proteínas de membrana. Os isolados 112# e 110# apresentaram diminuição significativa nos CIMs para os antimicrobianos Imipenem, Meropenem e Ertapenem na presença do inibidor CCCP, como demonstra Tabela 20.

**Tabela 20 - Resultados dos 39 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do HC-FMUSP distribuído por ano**

N.	PFGE	Data coleta	Material	Óbito	Imipenem		Meropenem		Ertapenem		Cefepime		Amicacina		Ciprofloxacina		PCR					SDS		
					Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	KPC	CTX	TEM	SHV	acrART	42 kDa
4	D1	23/07/2005	Liq peritoneal	sim	8	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-			
1	D3	28/01/2005	Urina Jato Médio	não	4	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-			
2	D3	13/05/2005	Urina Jato Médio	sim	32	R	8	R	32	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
3	D3	11/06/2005	Sec. orelha esq	sim	16	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-			
5	D3	10/12/2005	Sec. cateter	sim	16	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	16	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
2006																								
10	A7	14/07/2006	Hemocultura	sim	16	R	16	R	64	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
12	A7	13/07/2006	Liq. Abdominal	sim	32	R	16	R	128	R	>128	R	64	R	8	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
9	A8	30/06/2006	Ponta cateter venoso central	sim	16	R	4	R	64	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-			
8	A9	12/06/2006	Hemocultura	não	16	R	8	R	128	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-			
6	D1	08/05/2006	Canula orotraqueal	sim	16	R	8	R	128	R	>128	R	32	I	8	R	+	+	+	-	-			
7	D2	18/05/2006	Urina Sonda Vesical Demora	sim	32	R	16	R	128	R	>128	R	32	I	8	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
2007																								
28	A4	03/10/2007			8	R	8	R	4	R	>128	R	32	I	2	R	+	+	+	-	-			
30	A4	23/09/2007	Sec. traqueal	não	8	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	8	R	+	+	+	-	-			
26	A5	21/09/2007	Sec. Traqueal	sim	8	R	4	R	64	R	>128	R	-	-	2	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
31	A5	12/07/2007	Urina		8	R	8	R	64	R	>128	R	-	-	8	R	+	+	+	-	-			
22	A10	25/04/2007			8	R	4	R	32	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-	+++	Ausente	++
14	A11	02/01/2007	Liquido pleural		16	R	4	R	32	R	>128	R	64	R	16	R	+	+	+	-	-	+++	Ausente	++
19	A11	01/03/2007	Sangue periférico	sim	32	R	8	R	32	R	>128	R	64	R	8	R	+	+	+	-	-			
11	A12	09/01/2007	Sangue periférico	não	16	R	16	R	64	R	>128	R	64	R	32	R	+	+	+	-	-			
20	A12	23/03/2007	Sangue periférico	sim	16	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	8	R	+	+	+	-	-	+++	+++	++
2008																								
34	A6	29/05/2008	Lavado broncoalveolar	sim	8	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	8	R	+	+	+	-	-			
35	A18	10/06/2008	Sec. traqueal	não	8	R	8	R	64	R	>128	R	-	-	-	-	+	+	+	-	-			
2009																								
100	A3	22/12/2009	Lesão peniana	não	4	R	0,25	S	0,5	I	>128	R	32	I	2	S	-	+	+	-	-			
79	A3	15/12/2009	Abscesso penis	não	4	R	0,25	S	1	R	>128	R	-	-	16	R	-	+	+	-	-			
70	A13	07/01/2009	Cateter venoso central curt perm	sim	8	R	32	R	64	R	>128	R	-	-	-	-	+	-	+	-	-			
71	A13	06/01/2009	Sec. Fasciotomia face perna direita	sim	16	R	32	R	64	R	>128	R	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+++	Ausente	++
73	A14	31/08/2009	Liq. Ascitico	sim	16	R	4	R	16	R	>128	R	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	++	++
56	A15	05/12/2009	Sangue periférico	não	4	R	4	R	16	R	>128	R	2	S	-	-	+	+	+	-	-	+++	++	++
49	A16	03/11/2009	Sangue periférico	sim	32	R	16	R	64	R	>128	R	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	Ausente	++
52	A16	03/12/2009	Sec. traqueal	sim	32	R	16	R	128	R	>128	R	-	-	-	-	+	+	+	-	-			
53	A17	29/11/2009	Sangue periférico	sim	16	R	4	R	32	R	>128	R	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+++	+	++
86	B2	30/12/2009	Urina sonda vesical demora	não	4	R	≤0,25	S	0,25	S	>128	R	64	R	32	R	-	+	+	-	-			
50	F2	10/11/2009	Sangue periférico	sim	32	R	16	R	64	R	>128	R	128	R	16	R	+	-	-	-	-	+++	Ausente	++
2010																								
119	A1	29/03/2010	Sec traqueal	sim	16	R	8	R	64	R	>128	R	4	S	64	R	+	+	-	-	-			
83	A15	01/02/2010	Urina de sonda vesical de alivio	não	4	R	4	R	16	R	>128	R	4	S	64	R	+	+	+	-	-			
110	B1	07/03/2010	Sec. Traqueal	sim	4	R	0,25	S	1	R	>128	R	128	R	32	R	-	-	+	-	-			
106	C1	11/02/2010	Liq. Ascitico	não	0,5	S	0,25	S	0,5	I	>128	R	64	R	4	R	-	+	+	-	-			
114	E1	16/03/2010	Sangue periférico	não	16	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	64	R	+	+	+	-	-	+++	Ausente	++
2011																								
133	A2	24/01/2011	Liq. Ascitico	sim	2	I	<0,25	S	1	R	>128	R	4	S	32	R	-	+	-	-	-			++
165	F1	08/06/2011	Sec. traqueal	sim	128	R	64	R	≥128	R	>128	R	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+++	++	Ausente

## **5 Discussão**

---

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo, 130 isolados de *Enterobacter* spp. de dois hospitais de São Paulo e de um hospital de Londrina identificados nos anos de 2005 a 2011 foram avaliados. Destes 105 (80,8%) foram identificados como *E. aerogenes* e 25 (19,2%) como *E. cloacae* e a resistência aos carbapenêmicos foi demonstrada respectivamente em 44 (41,9%) e 8 (32%) isolados.

No total de 105 isolados de *E. aerogenes*, 39 isolados resistentes aos carbapenêmicos foram identificados no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e 5 no Hospital de Itapeverica da Serra em São Paulo. Dos 25 isolados de *E. cloacae*, 8 isolados eram resistentes aos carbapenêmicos e foram identificados no Hospital Universitário da Universidade de Londrina, no Paraná.

Somente foram analisados dados referentes aos 39 pacientes do HC-FMUSP com infecção e ou colonização por *E. aerogenes*. Todos os isolados estudados eram multirresistentes sensíveis somente a Polimixina B, Tigeciclina e Fosfomicina. Houve predomínio do sexo masculino 22 (57%), 24 (62%) dos pacientes evoluíram para óbito e 39 (100%) dos isolados estudados eram multirresistentes. Quando analisadas as amostras clínicas, foi observado que o sítio mais frequente foi sangue 12 (31,7%), seguido de secreção traqueal 9 (23,0%) e de urina 6 (15,4%). A maioria destes pacientes foi submetida a procedimentos cirúrgicos, transplantes de órgãos e receberam algum tratamento quimioterápico ou eram HIV positivos.

Estudos demonstram assim como na presente casuística que *Enterobacter* spp. é um agente frequente de infecção de corrente sanguínea em particular em pacientes

cirúrgicos, oncológicos e transplantados. Com mortalidade que varia de 30% a mais de 60%<sup>(6, 19, 99)</sup>.

Um estudo realizado pelo Hospital Universitário Evangélico de Curitiba no período de janeiro de 2013 a setembro de 2013 teve resultados semelhantes. Os autores analisaram 16 isolados de *E. aerogenes* positivos para o gene *bla<sub>KPC</sub>* com similaridade de 95%, quando analisado seu perfil genético pelo dendograma. Os homens foram os mais acometidos 9 (56,2%), a idade média foi de 56 anos e a mortalidade foi de 62,5%<sup>(132)</sup>.

Outro estudo no ano de 2004 e 2006 nos Estados Unidos analisou 33 *Enterobacter* spp. (*E. cloacae*, *E. aerogenes* e *E. gergoviae*) KPC-2 positivos que pertenciam a 3 clones distintos, a maioria dos isolados eram provenientes de sangue, seguido de urina e secreções respiratórias e a mortalidade dos pacientes foi de 33%. Os pacientes eram na maioria imunocomprometidos, tinham passado por vários procedimentos invasivos e a infecção por estes micro-organismos foi associada com o aumento da mortalidade<sup>(6)</sup>.

Outro estudo interessante foi conduzido em julho de 1994 a março de 1995 na Bélgica. Foram estudados 34 pacientes infectados por *E. aerogenes* multirresistentes sendo que 2 isolados eram resistentes a Imipenem com CIM de 32µg/mL. Destes, 34 pacientes 15 (44%) desenvolveram infecção, dos quais 15 (100%) foram tratados com Imipenem e Gentamicina e 13 (38%) evoluíram para óbito durante a hospitalização. Os pacientes com isolados resistentes ao Imipenem tinham sido submetidos a procedimentos cirúrgicos e ou transplante de fígado<sup>(19)</sup>. Resultados semelhantes foram descritos em 2013, em um estudo realizado por Bodro, M. et al; na Espanha que avaliou bacteremia por micro-organismos multirresistentes e

descreveu casos de bacteremia por *Enterobacter* spp. produtores de ESBLs em transplantes de órgãos sólidos. Este estudo relatou infecção em transplantes de rim, fígado e coração<sup>(133)</sup>. Assim como em nosso estudo alguns isolados de *E. aerogenes* KPC positivos e produtores de ESBL foram identificados em pacientes transplantados de rim e fígado.

Dos 44 isolados de *E. aerogenes* que apresentaram resistência aos carbapenêmicos em nosso estudo, 41 (93,2%) foram resistentes ao Imipenem, 38 (86,4%) ao Meropenem e 41 (93,2%) ao Ertapenem. As CIMs para Imipenem variaram de 2 a 128µg/mL, para Meropenem 4 a 64µg/mL e para Ertapenem 1 a  $\geq 128$  µg/mL. Todos os 8 (100%) isolados de *E. cloacae* foram resistentes aos carbapenêmicos Imipenem e Ertapenem e 7 (87,5%) apresentaram resistência a Meropenem. Os CIMs para Imipenem variaram de 8 a 64 µg/mL, para Meropenem 2 a 16 µg/mL e para Ertapenem 8 a 64 µg/mL. Dados da literatura mostram que essa diferença do perfil de sensibilidade do *Enterobacter* spp. aos carbapenêmicos pode ocorrer e está associado a alteração de proteínas da membrana externa, como as porinas OMP35 e OMP36, e ou expressão de bomba de efluxo<sup>(26, 116)</sup>.

Cem por cento dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* apresentaram resistência a Cefepima com CIMs que variaram de 32 a 128µg/mL. E dos 44 isolados de *E. aerogenes* 17 (38,6%) eram resistentes a Amicacina, 9 (20,4%) eram intermediários, 7 (15,9%) eram sensíveis e 11 (25%) não foram analisados, suas CIMs variaram de 2 a 128 µg/mL. Para o antimicrobiano Ciprofloxacina, os 44 isolados obtiveram os seguintes resultados: 34 (77,2%) foram resistentes, 1(2,27%) sensível e 9 (20,45%) não foram analisados e suas CIMs variaram de 2 a 64 µg/mL.

Os antimicrobianos Amicacina e Ciprofloxacina não foram analisados para os isolados de *E. cloacae*.

Todos os isolados de *E. aerogenes* (N=44) e *E. cloacae* (N=8) resistentes aos carbapenêmicos do presente estudo, apresentaram 100% de sensibilidade a Tigeciclina e Polimixina B e para o antimicrobiano Fosfomicina 43 (97,7%) e 100% respectivamente. Esses resultados mostram excelente atividade *in vitro* desses antimicrobianos contra as amostras estudadas.

No ano de 2000 a 2005, Castanheira et al, analisaram em um estudo SENTRY (Antimicrobial Surveillance program collected *Enterobacteriaceae* isolates from medical centers located in North America, Latin America, and Europe) 50.881 enterobacterias, das quais 261 isolados, ou seja, 0,5% apresentaram diminuição de sensibilidade ao Imipenem ou Meropenem CIM  $\geq 2\mu\text{g/mL}$ . Destes 261 isolados 24 (9,2%) eram *Enterobacter* spp., com CIM 50 e CIM 90 de:  $4\mu\text{g/mL}$  e  $>8\mu\text{g/mL}$  para Imipenem,  $8\mu\text{g/mL}$  e  $>8\mu\text{g/mL}$  para Meropenem,  $>8\mu\text{g/mL}$  e  $>16\mu\text{g/mL}$  Ertapenem,  $>16\mu\text{g/mL}$  e  $>16\mu\text{g/mL}$  para Cefepima, Polimixina B  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  e  $\leq 1\mu\text{g/mL}$  e Tigeciclina  $0,25\mu\text{g/mL}$  e  $0,5\mu\text{g/mL}$  <sup>(134)</sup>. Esses achados mostram a excelente atividade *in vitro* da Polimixina B e Tigeciclina contra isolados de *Enterobacter* spp., dados similares aos da nossa casuística.

Assim, podemos observar que quando avaliamos os resultados SENTRY, de um período anterior ao nosso estudo (5 anos antes), já havia resistência destes microorganismos aos carbapenêmicos em países da América Latina, América do Norte e Europa. A presença de *bla*<sub>KPC</sub> foi identificada em 03 isolados de *E. cloacae* distintos geneticamente e 10 isolados carregavam IMP-1 e 2 VIM-1 todos estes isolados eram de Istanbul. As CIMs 50 e CIMs 90 dos isolados do presente estudo são mais altas

comparadas com os de 2000 a 2005 do estudo SENTRY. Entretanto, não houve diferença na sensibilidade a Tigeciclina e Polimixina B.

Outro estudo mais recente conduzido nos anos de 2011 a 2014, realizado na Índia, avaliou 130 isolados de *Enterobacter* spp dos quais 70 (53,84%) apresentaram resistência ao Imipenem. Destes 48 (68,57%) apresentaram CIM para Imipenem e Meropenem de 32 a 64 µg/mL e 22 (31,4%) CIM 8 µg/mL. Nesse estudo dos 12 isolados de *E.aerogenes* resistentes 4 apresentaram o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, 2 o gene *bla<sub>VIM-6</sub>* e 6 o gene NDM-1. Dos 32 *E. cloacae* resistentes encontrados, 10 apresentaram o gene *bla<sub>VIM-2</sub>*, 8 o gene *bla<sub>VIM-6</sub>* e 13 o gene NDM-1. A maioria dos isolados era de amostra de 22 (31,4%) urina, 21(30%) sangue, seguido de 18 (25,7%) de secreção purulenta e todos isolados eram sensíveis a colistina com CIM < 0,5µg/mL. Quando comparamos como o nosso estudo, podemos observar isolados com CIM 64µg/mL para Imipenem e Meropenem, resultados que não encontramos em nosso estudo. Somente 1 isolado do ano de 2011, apresentou CIM 128 µg/mL para Imipenem, 64 µg/mL para Meropenem e ≥128 µg/mL para Ertapenem. Este isolado era distinto geneticamente comparado com os outros isolados, o qual foi denominado clone F1 (135).

Vários estudos na última década avaliaram a sensibilidade *in vitro* de isolados de *Enterobacter* spp. a várias classes de antibióticos. No ano de 2001 a 2004 foi realizado outro estudo SENTRY com 4.693 isolados de *Enterobacter* spp que observou 83,3 % de sensibilidade para Polimixina B CIM 50 (1µg/mL) e CIM 90 (>8µg/mL), 99,4% isolados estudados eram sensíveis ao Imipenem (136).

Em 2004 a 2010 o T.E.S.T. (Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial), analisou a sensibilidade da Tigeciclina, Imipenem, Meropenem, entre outros, em

16.232 isolados de Gram-negativos coletados em 12 países da América Latina (Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, El Salvador, Guatemala, Honduras, Jamaica, México, Nicarágua, Panamá e Venezuela). Dos 2.804 *Enterobacter* spp estudados 96% eram sensíveis a Tigeciclina (Interpretação segundo FDA-US Federal Drug Administration), suas CIMs 50 e CIMs 90 eram 0,5 µg/mL e 2 µg/mL. Em relação ao Meropenem dos 2.311 isolados analisados 3,8% eram resistentes e a diminuição de sensibilidade foi observada em todos os países da América Latina estudados. Para o Imipenem dos 493 isolados analisados 1,4% eram resistentes, a diminuição da sensibilidade foi observada nos isolados do Brasil, Argentina e Colômbia <sup>(137)</sup>.

A sensibilidade *in vitro* de isolados de *Enterobacter* spp a Tigeciclina e Fosfomicina vem sendo descrita por vários autores, pela possibilidade terapêutica do uso desse antimicrobiano no tratamento de infecções por esse agente. Estudo *SENTRY* no ano de 2006 a 2012 avaliou 2.996 *Enterobacter* spp que apresentaram CIM 50 e 90 de 0,25µg/mL e 1 µg/mL para Tigeciclina apresentando sensibilidade de 98,6% <sup>(138)</sup>. Em 2011, Livermore et al., no Reino Unido (Londres), analisaram 20 isolados de *Enterobacter* spp, destes 10 eram sensíveis (CIM ≤1µg/ml) a Tigeciclina, 5 (CIM 2µg/ml) intermediário e 5 (≥ 2µg/ml) eram resistentes <sup>(139)</sup>. Outro estudo no ano de 2008, na Grécia, avaliou a sensibilidade à Fosfomicina de Gram-negativos isolados de foco não urinário e demonstrou que dos 32 isolados de *Enterobacter* spp, 22 (68,8%) foram sensíveis a Fosfomicina e 5 (15,6%) foram intermediários <sup>(140)</sup>. Lu, et al., avaliaram 960 isolados no ano de 2008 do hospital Universitário de Taiwan, dos quais 100 isolados eram *E. cloacae* e demonstraram que 85% dos isolados foram sensíveis a Fosfomicina pelo corte do CLSI (*E. coli* em urina ≤64 µg/ml) e 72% pelo corte do EUCAST (*E. coli* ≤32ug/ml) <sup>(141)</sup>.

No presente estudo, não houve diferença dos resultados de sensibilidade a Fosfomicina, Tigeciclina e Polimixina B dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos, quando comparados os pontos de corte do FDA, CLSI e do EUCAST, todos os isolados foram sensíveis.

Os resultados da sensibilidade *in vitro* da Tigeciclina, Fosfomicina e Polimixina B do presente estudo são promissores. Vale ressaltar, que apesar dos ótimos resultados *in vitro*, a farmacocinética e farmacodinâmica da Tigeciclina e da Fosfomicina e a escassa experiência clínica em infecções graves em especial de corrente sanguínea, ainda são empecilhos para o uso rotineiro desses antimicrobianos no tratamento de infecções sistêmicas e alguns países já observaram a diminuição de sensibilidade a estes antimicrobianos. Entretanto, o uso dessas drogas como terapia combinada no tratamento de infecções graves por Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos pode ser uma estratégia a ser testada no futuro<sup>(29, 142)</sup>.

Referente aos genes das enzimas responsáveis por hidrolisar os carbapenêmicos, em nosso estudo, foram encontrados em todos isolados de *E. cloacae* e 39 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos o gene *bla<sub>KPC</sub>*, a única carbapenemase encontrada na nossa casuística. Os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos em isolados de *Enterobacter spp.* são pouco estudados e KPC até o momento é a carbapenemase mais frequentemente descrita.

O programa MYSTIC no ano de 1999-2005 analisou 51 enterobactérias com diminuição da sensibilidade de Imipenem e Meropenem que apresentavam CIM ( $\geq 2\mu\text{g/mL}$ ), 4 *Enterobacter spp.*, destes, 3 eram *E. cloacae* e 1 *E. gergoviae*, todos apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*<sup>(55)</sup>.

Em 2001 a 2003, nos Estados Unidos, foram analisados 351 isolados de *Enterobacter* spp, destes 111 eram resistentes à Ceftazidima, dos quais apenas 1 *E. aerogenes* carregava o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> (2003) e 1 *E. cloacae* o gene *bla*<sub>KPC-3</sub> (2001), foi realizada agar diluição para Imipenem, Meropenem e Ertapenem e os CIMs foram respectivamente: para *E. aerogenes* 16 µg/mL, 8 µg/mL e 8 µg/mL e para *E. cloacae* 4 µg/mL, 4 µg/mL e 8 µg/mL <sup>(105)</sup>.

Nos anos de 2006 a 2009, Zhang et al., avaliaram 89 Enterobacterias (7 *E. cloacae* e 6 *E. aerogenes*) resistentes aos carbapenêmicos em 7 hospitais de 4 cidades da China. Dos 7 isolados de *E. cloacae*, 4 apresentaram o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, 1 apresentou gene *bla*<sub>KPC-2</sub> e *bla*<sub>IMP-4</sub>, 1 apresentou *bla*<sub>KPC-2</sub> e deficiência de porina, 1 *bla*<sub>IMP-1</sub> e deficiência de porina e todos os 6 *E. aerogenes* apresentam o gene KPC-2 <sup>(143)</sup>.

Em 2007, outro estudo chinês demonstrou que 4 pacientes que estavam na UTI e um paciente fora da UTI foram infectados por *E. cloacae*, todos isolados apresentavam CIM >32µg/ mL para Imipenem e eram positivos para KPC e EBSLs (*bla*<sub>TEM-1</sub>, *bla*<sub>SHV-12</sub> e *bla*<sub>CTX-M-14</sub>) <sup>(103)</sup>.

Estudo SENTRY de 2000 a 2004 avaliou 37. 557 enterobactérias dos quais 5.206 eram *Enterobacter* spp, destes 57 (1%) dos isolados apresentavam CIM elevada de 2 a >8ug/ml para Imipenem e Meropenem, dos quais 18 *E. cloacae*, apresentaram positividade para o genes que hidrolisam carbapenens, 4 apresentaram *bla*<sub>KPC-2/3</sub>, e 11 isolados *bla*<sub>IMP-1</sub>, 2 *bla*<sub>VIM-1</sub> e 1 *bla*<sub>NMC-A</sub> <sup>(144)</sup>.

Outro estudo conduzido em um hospital chinês por Dai et al. (2013) avaliou 986 isolados de *E. cloacae*. Trinta e cinco isolados foram resistentes aos carbapenêmicos, *bla*<sub>KPC-2</sub> foi identificada em apenas 3 (8.6%) isolados, *bla*<sub>IMP-8</sub> em 5

(14.3%), *bla*<sub>IMP-26</sub> 1 (2.9%) e *bla*<sub>NDM-1</sub> em 1 (2,9%) dos isolados. Em um isolado foi detectada a coexistência de *bla*<sub>IMP-26</sub> e *bla*<sub>NDM-1</sub>. Os isolados resistentes aos carbapenêmicos eram policlonais<sup>(145)</sup>.

Apesar do aumento da resistência do *Enterobacter* spp. aos carbapenêmicos, dados brasileiros são escassos. No Brasil, no ano de 2009 a 2011, o laboratório de Pesquisa de Infecção Hospitalar no Instituto Oswaldo Cruz (Rio de Janeiro), analisou 387 Enterobacterias não *Klebsiella* resistentes a pelo menos um dos carbapenêmicos (Imipenem, Meropenem e Ertapenem) identificadas em 9 estados do Brasil (Espírito Santo -ES, Minas Gerais-MG, Rio de Janeiro – RJ, Brasília – DF, Goiás – GO, Pernambuco –PE, Alagoas – AL, Ceará –CE e Bahia – BA. A distribuição do gene *bla*<sub>KPC-2</sub> para as espécies de *E. aerogenes* foram dos 121, 38 (31,4%) e para *E. cloacae* dos 100, 17 (17%), e apresentavam uma grande diversidade clonal. Foi observado também que os isolados apresentavam diminuição na sensibilidade a Tigeciclina e a Polimixina B, tanto em isolados de *E. aerogenes* como *E. cloacae* e apresentavam resistência a gentamicina e a Amicacina. Os isolados de *E. aerogenes* também apresentavam *bla*<sub>TEM-141</sub> e *bla*<sub>CTX-M-8, 59, 15 e 97</sub> e *bla*<sub>SHV 120</sub>, e os isolados de *E. cloacae* apresentavam o gene *bla*<sub>TEM-141</sub>, *bla*<sub>CTX-M-8,9 e 15</sub> e *bla*<sub>SHV-2a</sub><sup>(101)</sup>.

No Rio Grande do Sul, no ano de 2007 e 2008 foram analisados isolados de *E. cloacae bla*<sub>KPC-2</sub> positivos em dois pacientes internados em diferentes cidades, essas amostras apresentavam CIM >32µg/mL para a Imipenem e CIM 4µg/mL. Os autores não avaliaram a clonalidade desses isolados e segundo suas análises estes a Polimixina B demonstravam boa atividade contra esses isolados<sup>(79)</sup>.

Em outro estudo, elaborado por Andrade et al., foram analisados 64 isolados resistentes aos carbapenêmicos, destes 5 isolados eram *E. cloacae* KPC- positivos,

todos do Rio Grande do Sul do ano de 2007, 2008 e 2009. Esses isolados também apresentaram outras  $\beta$ -lactamases como *bla*<sub>OXA-9</sub>, *bla*<sub>TEM-1</sub>, sendo encontrado dois clones, entretanto, outros mecanismos de resistência não foram estudados. Os autores alertam sobre a disseminação de elementos genéticos de KPC em nosso continente, não só nesta espécie como também em outras bactérias Gram negativas, possivelmente esta troca de elementos genéticos estão associados com isolados de *K. pneumoniae* <sup>(76)</sup>.

Outro estudo mencionado anteriormente identificou em todos os isolados de *E. aerogenes* do Hospital Evangélico de Curitiba no ano de 2013, o gene *bla*<sub>KPC-2</sub> <sup>(132)</sup>. Os estudos citados identificaram KPC como o mecanismo de resistência em isolados de Enterobacter resistente aos carbapenêmicos em diferentes hospitais do Brasil. Os isolados estudados eram multirresistentes. Esses achados reforçam a importância do presente estudo que é o primeiro estudo nacional que avalia mecanismo de resistência aos carbapenêmicos de amostras de *E. aerogenes* e *E. cloacae* provenientes de diferentes centros e demonstra que a presença de carbapenemase não foi o único mecanismo de resistência.

No nosso estudo foram identificados 5 clones diferentes, denominados A, B, D, E e F, nos 39 isolados de *E. aerogenes* do Hospital das Clínicas da FMUSP no ano de 2005 a 2011. Foi observado a predominância do clone A, com subtipos que variaram de A1 a A18, estes eram do ano de 2006 a 2011, seus CIMs para Imipenem foram 2 a 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Meropenem  $\leq 0,25$  a 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , Ertapenem de 0,5 a 128  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e Cefepima  $\geq 128$   $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Em 4 subtipos A1, A2, A3 e A13, os genes encontrados eram distintos. O A1 apresentava o gene *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, A2

apresentava *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, A3 apresentava *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub> e A13 *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub>, e os outros subtipos apresentavam *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM-164</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

Foram identificados 2 subtipos B1 e B2 do clone B, estes eram de dezembro de 2009 a março de 2010, suas CIMs para Imipenem foram 4 µg/ mL, Meropenem ≤0,25 a 0,25 µg/ mL, Ertapenem de 0,25 a 1 µg/ mL e Cefepima ≥128 µg/ mL. No B1 foi identificada a presença do *bla*<sub>TEM-164</sub> e no B2 *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub>.

Já entre os isolados pertencentes ao Clone D, foram observados 3 subtipos D1, D2 e D3, estes eram de janeiro de 2005 a maio de 2006, suas CIMs para Imipenem foram 4 a 32 µg/ mL, Meropenem 8 a 16 µg/ mL, Ertapenem de 32 a 128 µg/ mL e Cefepima ≥128 µg/ mL e todos apresentavam genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub>.

O clone E1, era de março de 2010 e sua CIM para Imipenem foi 16 µg/ mL, Meropenem 8 µg/ mL, Ertapenem de 64 µg/ mL e Cefepima ≥128 µg/ mL e todos apresentavam gene *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub>.

E o clone F1 (junho de 2011) e F2 (novembro de 2009) apresentavam CIM para Imipenem de 32 a 128 µg/ mL, Meropenem 16 a 64 µg/ mL, Ertapenem de 64 a ≥128 µg/ mL e Cefepima 32 a ≥ 128 µg/ mL. Nos isolados pertencentes ao clone F1 foi observado o gene *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>TEM-164</sub> e o subtipo F2 somente o gene *bla*<sub>KPC</sub>.

Nos 5 isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos do Hospital HGIS, foi identificado 1 clone predominante denominado A, com subtipos de A1 a A3. Estes isolados eram de dezembro de 2010 a janeiro de 2011, suas CIMs para Imipenem são 2 a 4µg/ mL, Meropenem 8 µg/ mL, Ertapenem de 8 a 32 µg/ mL e Cefepima ≥128 µg/ mL. Todos apresentavam os genes *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>TEM-164</sub> e *bla*<sub>CTX-M-2</sub>.

Nos isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos do Hospital Universitario de Londrina, identificamos 2 clones A e B. O Clone A apresentou subtipos de A1 a A3 e suas CIMs para Imipenem são 8 a 64 µg/ mL, Meropenem 2 a 16 µg/ mL, Ertapenem de 8 a 64 µg/ mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/ mL. O subtipo B1 apresentou CIM para Imipenem de 8 µg/ mL, Meropenem de 8 µg/ mL, Ertapenem de 64 µg/ mL e Cefepima  $\geq 128$  µg/ mL. Todos apresentavam os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e bomba de efluxo *acrART*.

Assim, nosso estudo demonstra que os isolados de *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos carregavam o gene *bla<sub>KPC</sub>* e de outras enzimas beta-lactamases de amplo espectro estendido *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. Nos isolados de *E. cloacae* resistentes aos carbapenêmicos foi observado a presença dos genes *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*. Além das enzimas beta-lactamases, foram analisados outros mecanismos que podem levar a resistência aos carbapenêmicos como: diminuição ou perda de proteína da membrana externa e bomba de efluxo e sua atividade em frente ao inibidor de bomba de efluxo CCCP.

Assim, dos 44 isolados de *E. aerogenes*, em 22 (50%) foram analisadas as proteínas de membrana com pesos 39 kDa, 42 kDa e 35-36 kDa. Foram observados 7 grupos distintos, que denominamos de Grupo 1 a Grupo 7.

O grupo 1 apresentou somente diminuição da proteína 35-36 kDa (++), estes 2 isolados pertenciam ao subtipo A7, suas CIMs foram 16-32 µg/mL para Imipenem, 16 µg/mL para Meropenem, 64-128 µg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*.

O grupo 2 apresentou diminuição da proteína 39kDa (+++) e 35-36 kDa (++), os isolados pertenciam aos subtipos A12, A5, D2 e D3, suas CIMs foram 8-32

μg/mL para Imipenem, 4-16 μg/mL para Meropenem, 32-128 μg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*. O isolado A5 mostrou atividade de bomba de efluxo para Imipenem, Meropenem e Ertapenem.

O grupo 3 apresentou ausência da proteína 39kDa e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . O isolado pertencia ao subtipo A11 e sua CIM foi de 16 μg/mL para Imipenem, 4 μg/mL para Meropenem, 32 μg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*.

O grupo 4 apresentou diminuição da proteína 42kDa (+++), diminuição da 39kDa (++) e diminuição da proteína 35-36 kDa (++) . Os isolados pertenciam ao subtipo A14 e A15 e suas CIMs foram de 4-16 μg/mL para Imipenem, 4 μg/mL para Meropenem e 16 μg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>CTX-M-2</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*.

O grupo 5 apresentou diminuição das proteínas de 42kDa (+++), 39kDa (++) e ausência da proteína de 35-36 kDa. O isolado pertencia ao grupo F1 e suas CIMs foram de 128 μg/mL para Imipenem, 64 μg/mL para Meropenem e ≥128 μg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>* e neste isolado foi analisado a atividade da bomba de efluxo e este se mostrou ativo para Imipenem, Meropenem e Ertapenem.

O grupo 6 apresentou diminuição da proteína de 42 kDa (+++), 39 kDa (+) e diminuição da proteína de 35-36 kDa (++) . O isolado pertencia ao grupo A17 e sua CIM foi de 16 μg/mL para Imipenem, 4 μg/mL para Meropenem e 32 μg/mL para Ertapenem e apresentavam o gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*.

O grupo 7 dos isolados analisados do HC-FMUSP, apresentou diminuição das proteínas de 42kDa (+++), ausência da proteína de 39kDa e diminuição da

proteína de 35-36 kDa (++)). Os isolados pertenciam aos subtipos A10, A13, A16, E1 e F2, suas CIMs foram 8-32 µg/mL para Imipenem, 4-32 µg/mL para Meropenem, 32-64 µg/mL para Ertapenem. O isolado A13 somente apresentou *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>* e o isolado F2 somente *bla<sub>KPC</sub>*, o restante apresentou os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. Ao analisarmos o isolado A5 observamos atividade de bomba de efluxo para Imipenem, Meropenem e Ertapenem.

Os mecanismos de resistência descritos anteriormente foram analisados em todos os isolados de *E. aerogenes* do Hospital HGIS. Onde os subtipos A2 e A1 apresentaram diminuição da proteína de 39 kDa (+) e diminuição das proteínas de 35-36 kDa (++)), suas CIMs foram de 2-4 µg/mL para Imipenem, 8 µg/mL para Meropenem, 32 µg/mL para Ertapenem. Todos apresentaram os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*. O isolado 392 (A1) demonstrou atividade da bomba de efluxo para Imipenem, Meropenem e Ertapenem. O subtipo A3 apresentou diminuição da proteína de 42 kDa (+++), diminuição da 39kDa (+) e diminuição da proteína de 35-36 kDa (++)), suas CIMs foram 4 para Imipenem, 8 para Meropenem, 8 para Ertapenem, todos apresentaram gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*.

Os isolados de *E. cloacae* de Londrina, subtipos A1, A2 e A3 apresentaram diminuição da proteína de 42 kDa (+++), diminuição da proteína de 39kDa (+) e ausência da proteína de 35-36 kDa, suas CIMs foram 8-64 µg/mL para Imipenem, 2-16 µg/mL para Meropenem, 8-64 µg/mL para Ertapenem. Todos apresentaram gene *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e gene da bomba de efluxo AcrART e foram ativas para Imipenem e Meropenem em presença do inibidor de efluxo CCCP. O grupo B1, apresentou diminuição da proteína 42 kDa (+++), diminuição da 39kDa (+) e ausência da 35-36 kDa, suas CIMs foram 8 µg/mL para Imipenem, 8 µg/mL para Meropenem, 64

µg/mL para Ertapenem, todos apresentaram os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e gene da bomba de efluxo AcrART e foram ativas para Imipenem, Meropenem e Ertapenem em presença do inibidor de efluxo CCCP.

Biendo et al. em 2003 a 2005 analisaram 62 isolados clínicos de *E. aerogenes* resistentes a cefalosporinas de espectro estendido na França, destes 39 (62,7%) eram resistentes ao Imipenem e 23 (37,1%) eram sensíveis ao Imipenem. Foram analisadas amostras de 22 pacientes a maioria homem 12 (54,5%), hospitalizados no período de 7 a 181 dias (média 64,5 dias). O tempo de colonização e infecção foi de 7 a 132 dias (média 46,7 dias). Neste estudo foram analisadas as proteínas da membrana externa e demonstrou de 3 dos 13 isolados resistentes ao Imipenem sem MBL, apresentaram ausência da proteína de 42 kDa e suas CIMs eram >32 µg/mL para Imipenem, dois eram do mesmo clone A (A e A3) o outro clone D. O clone A apresentava *bla<sub>TEM-24</sub>* ou *bla<sub>SHV-12</sub>*, o A3 nenhuma ESBL foi encontrada e o D somente apresentava *bla<sub>SHV-12</sub>*. Os outros 10 isolados apresentaram diminuição da proteína de 42 kDa e suas CIMs eram 8 e 32 µg/mL, destes 1 era clone A com *bla<sub>SHV-5</sub>*, 2 isolados eram clone E com *bla<sub>SHV-12</sub>*, 2 isolados A2 e 3 A1 com *bla<sub>SHV-12</sub>*. Estes eram de amostras de aspirado traqueal, swab retal, sangue e fluido peritoneal <sup>(146)</sup>.

Yigit e Tenover em 2002 na Georgia obtiveram resultados similares avaliando proteínas de membrana externa de isolado *E. aerogenes* resistente aos carbapenêmicos com CIM para Imipenem 16 µg/mL e Meropenem 8 µg/mL, juntamente com um isolado sensível e *E. aerogenes* ATCC 13048. Os autores descreveram duas proteínas de membrana externa distintas OMP-C (42 kDa) e OMP-F (39 kDa) como responsáveis pela resistência desse microrganismo ao Imipenem ao Meropenem e ao Cefepima <sup>(27)</sup>.

Em 2011, Qin et al., na China, analisaram 57 isolados de *E. aerogenes*, destes 12 eram resistentes a cefotaxime, ceftazidime, Ertapenem, Imipenem ou Meropenem e sensíveis a Fosfomicina, Amicacina e Polimixina B. Dos 12, 11 apresentavam *bla*<sub>KPC-2</sub> com CIMs de 16 a 32 µg/mL para Imipenem, CIM de 16-32 µg/mL para Meropenem e CIM de 32-128 µg/mL para Ertapenem, com presença de *bla*<sub>TEM</sub> ou *bla*<sub>SHV</sub> ou *bla*<sub>CTX-M-15</sub>. Foi observado, entretanto, que um dos seus isolados (E4) resistente aos carbapenêmicos com CIM de 4 Imipenem, CIM de 4 Meropenem e CIM 32 para Ertapenem não apresentava nenhum gene de carbapenemase, ESBL e atividade de bomba de efluxo (CCCP). Os autores demonstraram a diminuição da proteína OMP F 39kDa, também detectada no PCR em tempo real. Neste mesmo estudo podemos observar que os CIM 50 e CIM 90 dos 12 isolados resistentes são similares ao nosso estudo, somente a Tigeciclina e Fosfomicina estão diferentes, confirmando a associação entre a diminuição da proteína de membrana externa de 39 kDa com a resistência ao Imipenem e Meropenem em isolados de *Enterobacter* spp (130).

Os nossos isolados de *E. aerogenes* resistentes aos Imipenem apresentavam pouquíssima diminuição da proteína 42kDa (+++) entretanto os isolados apresentaram CIM para Imipenem de 4 a 128 µg/mL com presença de ESBL. Mas, outros isolados (metade dos isolados analisados) com CIM elevados não apresentaram diminuição ou ausência da mesma. Quando analisamos a proteína de 39 kDa, somente dois isolados não apresentaram diminuição ou ausência desta proteína e todos isolados apresentaram resistência ao Imipenem, Meropenem e Cefepima.

Em 2004, Thiolas e Bornet, estudaram duas proteínas da membrana externa OMP35 e OMP36 em isolados de *E. aerogenes* e observaram que a OMP 35 estava relacionada com diminuição da sensibilidade a ceftriaxone e OMP 36 estava relacionada a resistência a Imipenem, Cefepima e cefpirome <sup>(147, 148)</sup>. Em 2005, Thiolas observa a mesma diminuição da porina OMP 36 em isolados resistentes a Imipenem e colistina como também o aumento do componente da bomba de efluxo AcrA em isolados resistentes ao Imipenem <sup>(29)</sup>.

Em 2011, Lavigne et al. demonstraram que após o tratamento de 5 pacientes com Imipenem, ocorreu emergência de isolados resistentes e com sensibilidade intermediária ao Imipenem, e que isolados do mesmo paciente IMI-sensível, IMI-intermediário e IMI-resistente apresentaram 100% de similaridade. Tanto os isolados S/I e R apresentavam *bla*<sub>TEM-24</sub> e enzimas AmpC com diminuição da CIM de Cefotaxima com cloxacilina que confirmou a super produção de AmpC. Nos isolados intermediários foram detectadas tanto alteração da síntese da porina (OMP35e OMP36), como aumento da expressão da bomba de efluxo (AcrA e TolC). Já nos isolados resistentes foram detectadas perda completa de porinas (OMP35 e OMP36), LPS e alteração na super expressão da bomba de efluxo AcrA e TolC <sup>(26)</sup>.

Outro estudo elaborado por Lavigne et al. em 2005 a 2007, avaliou 339 pacientes com infecção por *E. aerogenes*, por um período de 3 meses. Quarenta e um (12%) eram resistentes as cefalosporinas, 17 (5%) dos pacientes receberam Imipenem, dos quais 11 apresentaram aumento da CIM do Imipenem que variou de 4 a 8 µg/ml e 6 desenvolveram resistência ao Imipenem com CIM que variou de 16 a 32 µg/ml. Os isolados com aumento de CIM apresentaram diminuição da expressão

de OMP35/OMP36 e os isolados resistentes que apresentavam ausência de OMP36 e diminuição importante de OMP35 associada à expressão de bomba de efluxo <sup>(116)</sup>.

Em nosso estudo tanto os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* resistentes ao Imipenem demonstraram diminuição da proteína de membrana externa Omp 35 e 36, com CIM que variou de 2 a 128 µg/ml ao Imipenem. Portanto, a resistência aos carbapenêmicos dos isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* não somente está associada com a carbapenemases descritas, como também a outros mecanismos de resistência como perda de porina Omp 35, Omp 36, OMP de 39kDa e de 42 kDa e ou expressão de bomba de efluxo como previamente descrito por outros autores <sup>(115, 116, 147, 148)</sup>. Esses achados reforçam a importância do uso racional de antibiótico e mostram a associação mais uma vez do uso de Imipenem e o desenvolvimento de resistência decorrente da alteração de proteínas da membrana externa e ou expressão de bomba de efluxo.

A capacidade de várias espécies bacterianas de tolerar os antibióticos e outros compostos tóxicos surge, em parte, da atividade de transportadores dependentes de energia. Em bactérias Gram-negativas, muitos desses transportadores formam 'bombas' com multicomponentes que abrangem ambas as membranas interna e externa e são acionados por energia de um componente transportador primário ou secundário. Esta montagem de bomba compreende o canal de membrana externa TolC, o AcrB transportador secundário localizado na membrana interna, e a AcrA periplasmático, que liga estas duas proteínas de membrana <sup>(149)</sup>.

Até o momento a bomba de efluxo que foi identificada em isolados clínicos de *E. aerogenes*, com capacidade de expelir uma variedade de compostos, incluindo os detergentes e agentes antimicrobianos não relacionados estruturalmente, tais como

quinolonas, tetraciclinas e cloranfenicol é a bomba de efluxo denominada AcrAB-TolC <sup>(150)</sup>. Esta bomba é capaz de transportar um conjunto diversificado de compostos com pouca semelhança química, e assim conferir resistência a um largo espectro de antibióticos. Complexos homólogos são encontrados em muitas espécies de Gram-negativos, incluindo em agentes patogênicos de plantas e animais <sup>(149)</sup>.

Estudo realizado por Bornet et al. demonstrou que durante 5 dias de tratamento com Imipenem, isolados clínicos de *E. aerogenes* tinham desenvolvido resistência a este antimicrobiano através de diminuição da síntese de porina em associação com a expressão de bomba de efluxo AcrA <sup>(25, 121)</sup>.

Pérez et al., em 2007, analisaram a bomba de efluxo de um isolado de *E. cloacae* multi-resistente denominado EcDC64, que apresentava alta resistência ao Imipenem >32 e Meropenem >32 e observaram que o sistema de bomba de efluxo AcrAB-Tolc estava envolvido na diminuição da sensibilidade à vários antibióticos, como piperacilina, Aztreonam, oxacilina, Imipenem e Meropenem. Quando analisaram todos os genes das proteínas da bomba de efluxo *acrR*, *acrA*, *acrB* e *tolC*, observaram que estas proteínas eram homólogas a isolados de *E. aerogenes* <sup>(151, 152)</sup>.

A atividade da bomba de efluxo em vários isolados clínicos resistentes tem sido caracterizada pela utilização de diferentes inibidores de bomba de efluxo que competem com o efluxo de antibiótico. O cianeto de carbonilo-m clorofenilhidrazona (CCCP) é muito usado em isolados de *Enterobacter* spp, este funciona como um desacoplador de energia, provocando um colapso da membrana, pois ele está relacionado diretamente com a energia envolvida no processo de efluxo <sup>(153)</sup>.

Nos nossos isolados encontramos somente a bomba AcrART em *E. cloacae*, mas apesar dos isolados de *E. aerogenes* não apresentarem o gene da bomba

AcrART, foi observado à atividade da bomba de efluxo para os antimicrobianos em presença do inibidor CCCP, esta mesma atividade foi observada em isolados de *E. aerogenes* resistentes a carbapenêmicos, com *bla*<sub>KPC-2</sub> e ESBL como já foi mencionado anteriormente em um estudo conduzido por Chines et al. <sup>(130)</sup>. Possivelmente os isolados de *E. aerogenes* apresentam outra bomba ainda não estudada. O primer utilizado em nosso estudo era 96 % similar ao gene da bomba de efluxo de *E. cloacae* (*AefA* (*aefA*) gene, partial cds; *AcrR* (*acrR*) gene, complete cds; and *acr* operon, complete sequence) e o mesmo foi submetido no Pubmed (Nº 1661431).

Em nosso estudo observamos que um isolado F1, apresentou CIM muito elevada e este apresentava diminuição da proteína de membrana externa de 39 kDa e ausência da de 35-36 kDa, além de atividade de bomba de efluxo, e beta-lactamases KPC e ESBL, possivelmente neste isolado outras carbapenemases não analisadas ou super expressão de Amp C podem estar contribuindo para a resistência aos carbapenêmicos.

Também foi observado que pacientes com 10 e 13 dias de internação, já apresentavam isolados de *E.aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos que carreavam *bla*<sub>KPC</sub> e ESBL (*bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>CTX</sub>), diminuição de porinas de membrana e atividade de bomba de efluxo para Imipenem, Meropenem e Ertapenem, o que explica as altas CIMs para os carbapenêmicos encontradas nos nossos isolados.

Portanto os nossos achados mostram a presença de espécies de Enterobacter multirresistentes, com grande capacidade de adaptação ao meio ambiente, com diferentes mecanismos de resistência aos carbapenêmicos: como carbapenemase KPC, ESBL, diminuição ou ausência de porinas e atividade de bomba de efluxo, que

facilitaram a ocorrência de colonização e infecção por estes microrganismos e a disseminação da resistência nos Hospitais estudados.

## **6 Conclusões**

---

## 6 CONCLUSÕES

- ❖ A ocorrência de resistência aos antimicrobianos carbapenêmicos foi alta nos isolados de *E. aerogenes* (41,9%) e *E. cloacae* (32%) deste estudo.
- ❖ Os isolados de *E. aerogenes* apresentaram concentrações inibitórias mínimas que variaram de 2 a 128µg/mL para Imipenem, 4 a 64µg/mL para Meropenem e para Ertapenem 1 a ≥128 µg/mL.
- ❖ Os isolados de *E. cloacae* apresentaram concentrações inibitórias mínimas que variaram de 8 a 64µg/mL para Imipenem, 2 a 16µg/mL para Meropenem e 8 a 64 µg/mL para Ertapenem.
- ❖ Todos os isolados de *E. aerogenes* e *E. cloacae* foram sensíveis a Fosfomicina, Polimixina B e Tigeciclina.
- ❖ Os sítios mais frequentes de identificação destes micro-organismos foram sangue, seguido de secreção traqueal e urina.
- ❖ A mortalidade dos pacientes infectados por estes micro-organismos foi alta.
- ❖ Foi observada associação de mecanismos de resistência nos isolados resistentes aos carbapenêmicos como: presença de carbapenemase KPC, ESBL, impermeabilidade da porina (atividade da bomba de efluxo e ausência ou diminuição da proteína da membrana externa principalmente 35-36kDa e 39 kDa).

- 
- ❖ Os isolados de *E. aerogenes* do Hospital das Clínicas da FMUSP e do Hospital Universitario de Londrina apresentaram mais de um clone com concentrações inibitórias mínimas distintas entre si.
  - ❖ Os isolados resistentes aos carbapenêmicos que apresentavam similaridade > que 80 no dendograma, isto é, subtipos de um mesmo clone, apresentaram genes diferentes e diminuição ou ausência de uma mesma proteína de membrana.
  - ❖ As enzimas KPC e ESBLs estavam presentes em isolados de todos os Hospitais estudados.
  - ❖ Os isolados de *E. aerogenes* apresentaram os genes *bla<sub>KPC</sub>*, *bla<sub>TEM-164</sub>* e *bla<sub>CTX-M-2</sub>*.
  - ❖ Todos os isolados de *E. aerogenes* dos quais analisamos a atividade da Bomba de efluxo apresentaram diminuição significativa do CIM para Imipenem, Meropenem e Ertapenem em presença do inibidor CCCP.
  - ❖ Entre os isolados de *E. aerogenes* não foi observado o gene da bomba de efluxo AcrART, entretanto, todos isolados analisados apresentaram atividade da bomba de efluxo, possivelmente nos indicando a presença de outra bomba de efluxo ainda não identificada.
  - ❖ Os isolados de *E. cloacae* apresentaram os genes AcrART da bomba de efluxo, *bla<sub>KPC</sub>* e *bla<sub>TEM-164</sub>*.

- ❖ Todos os isolados resistentes aos carbapenêmicos neste estudo, apresentaram diminuição da proteína de membrana externa de 35-36 kDa.
  
- ❖ A proteína de membrana externa de 42kDa parece não estar envolvida na resistência aos carbapenêmicos dos isolados da nossa casuística.

## **7 Referências**

---

**REFERÊNCIAS**

1. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico Texto e Atlas Colorido. 5ª ed. São Paulo: Medsi EMeC; 2001.
2. Nordmann P, Dortet L, Poirel L. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm! Trends Mol Med. 2012;18(5):263-72.
3. Chang EP, Chiang DH, Lin ML, Chen TL, Wang FD, Liu CY. Clinical characteristics and predictors of mortality in patients with *Enterobacter aerogenes* bacteremia. J Microbiol Immunol Infect. 2009;42(4):329-35.
4. Tall BD, Grim CJ, Franco AA, Jarvis KG, Hu L, Kothary MH, et al. *Cronobacter* Species (formerly *Enterobacter sakazakii*). In: Morris JG, Potter ME, editors. Foodborne Infections and Intoxications. Fourth Edition. San Diego: Academic Press; 2013. Chapter 16. p. 251-8.
5. Yang FC, Yan JJ, Hung KH, Wu JJ. Characterization of Ertapenem-Resistant *Enterobacter cloacae* in a Taiwanese University Hospital. J Clin Microbiol. 2012;50(2):223-6.
6. Marchaim D, Navon-Venezia S, Schwaber MJ, Carmeli Y. Isolation of Imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52(4):1413-8.
7. De Gheldre Y, Struelens MJ, Glupczynski Y, De Mol P, Maes N, Nonhoff C, et al. National epidemiologic surveys of *Enterobacter aerogenes* in Belgian hospitals from 1996 to 1998. J Clin Microbiol. 2001;39(3):889-96.

8. Pfaller MA, Jones RN, Doern GV, Kugler G, Grp SP. Bacterial pathogens isolated from patients with bloodstream infection: Frequencies of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns from the SENTRY antimicrobial surveillance program (United States and Canada, 1997). *Antimicrob Agents Chemother.* 1998;42(7):1762-70.
9. Bosi C, Davin-Regli A, Bornet C, Mallea M, Pages JM, Bollet C. Most *Enterobacter aerogenes* strains in France belong to a prevalent clone. *J Clin Microbiol.* 1999;37(7):2165-9.
10. Afsharpaiman S, Torkaman M, Saburi A, Farzaampur A, Amirsalari S, Kavehmanesh Z. Trends in incidence of neonatal sepsis and antibiotic susceptibility of causative agents in two neonatal intensive care units in tehran, I.R Iran. *J Clin Neonatol.* 2012;1(3):124-30.
11. Litzow JM, Gill CJ, Mantaring JB, Fox MP, MacLeod WB, Mendoza M, et al. High frequency of multidrug-resistant gram-negative rods in 2 neonatal intensive care units in the Philippines. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2009;30(6):543-9.
12. Jones RN. Microbial etiologies of hospital-acquired bacterial pneumonia and ventilator-associated bacterial pneumonia. *Clin Infect Dis.* 2010;51 Suppl 1:S81-7.
13. Turhan V, Mutluoglu M, Acar A, Hatipoglu M, Onem Y, Uzun G, et al. Increasing incidence of Gram-negative organisms in bacterial agents isolated from diabetic foot ulcers. *J Infect Dev Ctries.* 2013;7(10):707-12.
14. Sader HS, Farrell DJ, Flamm RK, Jones RN. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative organisms isolated from patients hospitalized in Intensive Care Units in United States and European Hospitals (2009–2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;78(4):443-7.

15. Sader HS, Mendes RE, Gales AC, Jones RN, Pfaller MA, Sampaio J. Antimicrobial susceptibility of bacteria isolated from the lower respiratory tract of inpatients with pneumonia in Brazilian hospital - Results from the SENTRY surveillance program, 1997 and 1998: *J Pneumol*. 2001;27(2):59-67. Available from: <http://pesquisa.bvsalud.org/portal/resource/pt/lil-284315>.
16. Fritsche TR, Sader HS, Jones RN. Potency and spectrum of garenoxacin tested against an international collection of skin and soft tissue infection pathogens: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1999–2004). *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;58(1):19-26.
17. Andrade SS, Sader HS, Barth AL, Ribeiro J, Zoccoli C, Pignatari AC, et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacilli Isolated in Brazilian Hospitals Participating in the SENTRY Program (2003-2008). *Braz J Infect Dis*. 2008;12:3-9.
18. Jalaluddin S, Devaster JM, Scheen R, Gerard M, Butzler JP. Molecular epidemiological study of nosocomial *Enterobacter aerogenes* isolates in a Belgian hospital. *J Clin Microbiol*. 1998;36(7):1846-52.
19. DeGheldre Y, Maes N, Rost F, DeRyck R, Clevenbergh P, Vincent JL, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of multidrug-resistant *Enterobacter aerogenes* infections and in vivo emergence of Imipenem resistance. *J Clin Microbiol*. 1997;35(1):152-60.
20. Kang C-I, Chung DR, Ko KS, Peck KR, Song J-H; Korean Network for Study of Infectious Diseases (KONSID). Clinical predictors of *Enterobacter bacteremia* among patients admitted to the ED. *Am J Emerg Med*. 2012;30(1):165-9.
21. Chow JW, Fine MJ, Shlaes DM, Quinn JP, Hooper DC, Johnson MP, et al. *Enterobacter bacteremia* - clinical-features and emergence of antibiotic-resistance during therapy. *Ann Intern Med*. 1991;115(8):585-90.

22. Ye Y, Li JB, Ye Q, Jiang ZJ. Enterobacter bacteremia: Clinical features, risk factors for multiresistance and mortality in a Chinese university hospital. *Infection*. 2006;34(5):252-7.
23. Jeong SH, Lee K, Chong YS, Yum JH, Lee SH, Choi HJ, et al. Characterization of a new integron containing VIM-2, a metallo-beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *J Antimicrob Chemother*. 2003;51(2):397-400.
24. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, Scott G, Livermore DM, Woodford N. Emergence of AcrAB-mediated tigecycline resistance in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* during ciprofloxacin treatment. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35(5):478-81.
25. Bornet C, Chollet R, Mallea M, Chevalier J, Davin-Regli A, Pages JM, et al. Imipenem and expression of multidrug efflux pump in *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003;301(4):985-90.
26. Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Bourg G, Davin-Regli A, et al. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. *Clin Microbiol Infect*. 2012;18(6):539-45.
27. Yigit H, Anderson GJ, Biddle JW, Steward CD, Rasheed JK, Valera LL, et al. Carbapenem resistance in a clinical isolate of *Enterobacter aerogenes* is associated with decreased expression of OmpF and OmpC porin analogs. *Antimicrob Agents Chemother*. 2002;46(12):3817-22.
28. Chevalier J, Mulfinger C, Garnotel E, Nicolas P, Davin-Regli A, Pages JM. Identification and evolution of drug efflux pump in clinical *Enterobacter aerogenes* strains isolated in 1995 and 2003. *Plos One*. 2008;3(9):e3203.

- 
29. Thiolas A, Bollet C, La Scola B, Raoult D, Pages JM. Successive emergence of *Enterobacter aerogenes* strains resistant to Imipenem and colistin in a patient. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(4):1354-8.
30. Pages JM, Amaral L. Mechanisms of drug efflux and strategies to combat them: Challenging the efflux pump of Gram-negative bacteria. *Biochim Biophys Acta - Proteins and Proteomics*. 2009;1794(5):826-33.
31. Harris PNA, Ferguson JK. Antibiotic therapy for inducible AmpC beta-lactamase-producing Gram-negative bacilli: what are the alternatives to carbapenems, quinolones and aminoglycosides? *Int J Antimicrob Agents*. 2012; 40(4):297-305.
32. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-76.
33. Manoharan A, Sugumar M, Kumar A, Jose H, Mathai D, Grp I-ES. Phenotypic & molecular characterization of AmpC beta-lactamases among *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp. & *Enterobacter* spp. from five Indian Medical Centers. *Indian J Med Res*. 2012;135(3):359-64.
34. Tamma PD, Girdwood SCT, Gopaul R, Tekle T, Roberts AA, Harris AD, et al. The use of cefepime for treating AmpC beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Clin Infect Dis*. 2013;57(6):781-8.
35. Mendes RE, Rhomberg PR, Bell JM, Turnidge JD, Sader HS. Doripenem activity tested against a global collection of *Enterobacteriaceae*, including isolates resistant to other extended-spectrum agents. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2009; 63(4):415-25.
36. Pfeifer Y, Cullik A, Witte W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. *Int J Med Microbiol*. 2010;300(6):371-9.

- 
37. Dai W, Sun S, Yang P, Huang S, Zhang X, Zhang L. Characterization of carbapenemases, extended spectrum beta-lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. *Infect Genet Evol.* 2013;14:1-7.
38. Nordmann P. Gram-negative bacteriae with resistance to carbapenems. *M S-Med Sci (Paris).* 2010;26(11):950-9.
39. Xia Y, Liang ZZ, Su XY, Xiong Y. Characterization of carbapenemase genes in Enterobacteriaceae species exhibiting decreased susceptibility to carbapenems in a university hospital in Chongqing, China. *Ann Lab Med.* 2012;32(4):270-5.
40. Gales AC, Azevedo HD, Cereda RF, Girardello R, Xavier DE, Grp I-ADBS. Antimicrobial activity of Doripenem against Gram-negative pathogens: results from INVITA-A-DORI Brazilian Study. *Braz J Infect Dis.* 2011;15(6):513-20.
41. Aschbacher R, Giani T, Corda D, Conte V, Arena F, Paschetto V, et al. Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae during 2011-12 in the Bolzano area (Northern Italy): increasing diversity in a low-endemicity setting. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;77(4):354-6.
42. Guzek A, Tomaszewski D, Rybicki Z, Truszczynski A, Baranski M, Korzeniewski K. Comparison of in vitro efficacy of Ertapenem, Imipenem and Meropenem in the infections caused by the Enterobacteriaceae strains family. *Anaesthesiol Intensive Ther.* 2013;45(2):67-72.
43. Armand-Lefevre L, Angebault C, Barbier F, Hamelet E, Defrance G, Ruppe E, et al. Emergence of Imipenem-Resistant Gram-Negative Bacilli in Intestinal Flora of Intensive Care Patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(3):1488-95.
44. Hunt AC, Gibb AP. Investigation of Enterobacteriaceae isolates found to have a raised Meropenem MIC by Vitek 2. *J Antimicrob Chemother.* 2012; 67(4):1045-6.

- 
45. Pailhories H, Cassisa V, Lamoureux C, Chesnay A, Lebreton C, Lemarie C, et al. Discordance in the minimal inhibitory concentrations of Ertapenem for *Enterobacter cloacae*: Vitek 2 system versus Etest and agar dilution methods. *Int J Infect Dis*. 2014;18:94-6.
46. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2009;22(1):161-82.
47. Perez-Perez FJ, Hanson ND. Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J Clin Microbiol*. 2002;40(6):2153-62.
48. Orientações do EUCAST para a detecção de mecanismos de resistência e resistência específicas de importância clínica e/ou epidemiológica. In: testing. E-ECOas, editor. Versão português, 2015.
49. Al Naiemi N, Murk JL, Savelkoul PHM, Vandembroucke-Grauls CMJ, Debets-Ossenkopp YJ. Extended-spectrum beta-lactamases screening agar with AmpC inhibition. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009;28(8):989-90.
50. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007;2(5):501-12.
51. Tzouvelekis LS, Markogiannakis A, Psychogiou M, Tassios PT, Daikos GL. Carbapenemases in *Klebsiella pneumoniae* and other *Enterobacteriaceae*: an evolving crisis of global dimensions. *Clin Microbiol Rev*. 2012;25(4):682-707.
52. Fernandez-Cuenca F, Rodriguez-Martinez JM, Martinez-Martinez L, Pascual A. In vivo selection of *Enterobacter aerogenes* with reduced susceptibility to Cefepime and carbapenems associated with decreased expression of a 40 kDa outer membrane protein and hyperproduction of AmpC beta-lactamase. *Int J Antimicrob Agents*. 2006;27(6):549-52.

- 
53. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin Microbiol Infect.* 2002;8(6):321-31.
54. Teo JWP, La MV, Krishnan P, Ang B, Jureen R, Lin RTP. Enterobacter cloacae producing an uncommon class A carbapenemase, IMI-1, from Singapore. *J Med Microbiol.* 2013;62:1086-8.
55. Deshpande LM, Rhomberg PR, Sader HS, Jones RN. Emergence of serine carbapenemases (KPC and SME) among clinical strains of Enterobacteriaceae isolated in the United States Medical Centers: Report from the MYSTIC Program (1999-2005). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2006;56(4):367-72.
56. Philippon A, Arlet G. Beta-lactamases of Gram negative bacteria: never-ending clockwork! *Ann Biol Clin (Paris).* 2006;64(1):37-51.
57. Kuai S, Shao H, Huang L, Pei H, Lu Z, Wang W, Liu J. KPC-2 Carbapenemase and DHA-1 AmpC determinants carried on a same plasmid in an Enterobacter aerogen. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 3):367-70.
58. Jaskulski MR, Medeiros BC, Borges JV, Zalewsky R, Fonseca MEC, Marinowic DR, et al. Assessment of extended-spectrum beta-lactamase, KPC carbapenemase and porin resistance mechanisms in clinical samples of Klebsiella pneumoniae and Enterobacter spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(1):76-9.
59. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, Barin J, Darini AL, Zavascki AP, et al. Molecular characterization of Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *J Med Microbiol.* 2013;62(Pt 11):1721-7.
60. Bryant KA, Van Schooneveld TC, Thapa I, Bastola D, Williams LO, Safranek TJ, et al. KPC-4 Is Encoded within a Truncated Tn4401 in an IncL/M Plasmid, pNE1280, Isolated from Enterobacter cloacae and Serratia marcescens. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(1):37-41.

- 
61. Sacha P, Ostas A, Jaworowska J, Wieczorek P, Ojdana D, Ratajczak J, et al. The KPC type beta-lactamases: new enzymes that confer resistance to carbapenems in Gram-negative bacilli. *Folia Histochem Cytobiol.* 2009;47(4):537-43.
62. Cuzon G, Naas T, Nordmann P. KPC carbapenemases: what is at stake in clinical microbiology? *Pathol Biol (Paris).* 2010;58(1):39-45.
63. Mathers AJ, Cox HL, Kitchel B, Bonatti H, Brassinga AKC, Carroll J, et al. Molecular dissection of an outbreak of carbapenem-resistant enterobacteriaceae reveals Intergenous KPC carbapenemase transmission through a promiscuous plasmid. *MBio.* 2011;2(6):e00204-11.
64. Ambretti S, Gaibani P, Berlingeri A, Cordovana M, Tamburini MV, Bua G, et al. Evaluation of phenotypic and genotypic approaches for the detection of class A and class B carbapenemases in Enterobacteriaceae. *Microb Drug Resist.* 2013;19(3):212-5.
65. Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(12):5046-54.
66. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-95.
67. Khan AU, Nordmann P. NDM-1-producing *Enterobacter cloacae* and *Klebsiella pneumoniae* from diabetic foot ulcers in India. *J Med Microbiol.* 2012;61(3):454-6.
68. Carvalho-Assef APDA, Pereira PS, Albano RM, Berião GC, Chagas TPG, Timm LN, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(12):2956-7.

69. Wiskirchen DE, Nordmann P, Crandon JL, Nicolau DP. Efficacy of humanized carbapenem exposures against New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM-1)-producing Enterobacteriaceae in a murine infection model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(8):3936-40.
70. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, Rodriguez CP, Jones RN, Smayevsky J, et al. OXA-163, an OXA-48-Related Class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(6):2546-51.
71. Dimou V, Dhanji H, Pike R, Livermore DM, Woodford N. Characterization of Enterobacteriaceae producing OXA-48-like carbapenemases in the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1660-5.
72. Cremet L, Bourigault C, Lepelletier D, Guillouzouic A, Juvin ME, Reynaud A, et al. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* highlighting the interspecies transferability of the blaOXA-48 gene in the gut flora. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67:1041-3.
73. Potron A, Poirel L, Rondinaud E, Nordmann P. Intercontinental spread of OXA-48 beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae over a 11-year period, 2001 to 2011. *Euro Surveill.* 2013;18(31):pii:20549.
74. Girlich D, Bouihat N, Poirel L, Benouda A, Nordmann P. High rate of faecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase and OXA-48 carbapenemase-producing Enterobacteriaceae at a University hospital in Morocco. *Clin Microbiol Infect.* 2013.
75. Birgy A, Bidet P, Genel N, Doit C, Decre D, Arlet G, et al. Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated beta-Lactamases in Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2012;50(4):1295-302.

76. Andrade LN, Curiao T, Ferreira JC, Longo JM, Climaco EC, Martinez R, et al. Dissemination of bla(KPC-2) by the Spread of Klebsiella pneumoniae Clonal Complex 258 Clones (ST258, ST11, ST437) and Plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among Enterobacteriaceae Species in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(7):3579-83.
77. Adler A, Solter E, Masarwa S, Miller-Roll T, Abu-Libdeh B, Khammash H, et al. Epidemiological and microbiological characteristics of an outbreak caused by OXA-48-producing Enterobacteriaceae in a neonatal intensive care unit in Jerusalem, Israel. *J Clin Microbiol.* 2013;51(9):2926-30.
78. Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol.* 2012;61(9):1270-9.
79. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(9):1503-7.
80. Chen LR, Zhou HW, Cai JC, Zhang R, Chen GX. Detection of plasmid-mediated IMP-1 metallo-beta-lactamase and quinolone resistance determinants in an Ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* isolate. *J Zhejiang Univ Sci B.* 2009; 10(5):348-54.
81. Cai JC, Zhou HW, Chen GX, Zhang R. [Detection of plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in a strain of carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2008;88(2):135-8.
82. Torres E, López-Cerero L, Del Toro MD, Pascual Á. First detection and characterization of an OXA-48-producing *Enterobacter aerogenes* isolate. *Enferm Infecc Microbiol Clín.* 2014;32(7):469-70.

- 
83. Souna D, Amir AS, Bekhoucha SN, Berrazeg M, Drissi M. Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2 beta-lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. *Med Mal Infect.* 2014;44(4):146-52.
84. Rasmussen BA, Bush K, Keeney D, Yang Y, Hare R, O'Gara C, et al. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(9):2080-6.
85. Trevino M, Moldes L, Martinez-Lamas L, Varon C, Regueiro BJ. Carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* and the emergence of metallo-beta-lactamase-producing strains in a third-level hospital (Santiago de Compostela, NW Spain). *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2009;28(10):1253-8.
86. Perilli M, Mezzatesta ML, Falcone M, Pellegrini C, Amicosante G, Venditti M, et al. Class I integron-borne bla(VIM-1) carbapenemase in a strain of *Enterobacter cloacae* responsible for a case of fatal pneumonia. *Microb Drug Resist.* 2008;14(1):45-7.
87. Bogaerts P, Bebrone C, Huang TD, Bouchahrouf W, Degheldre Y, Deplano A, et al. Detection and characterization of VIM-31, a new variant of VIM-2 with Tyr224His and His252Arg mutations, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(6):3283-7.
88. Galani I, Souli M, Koratzanis E, Chryssouli Z, Giamarellou H. Characterisation of a new integron containing VIM-1, metallo-beta-lactamase gene cassette, in a clinical isolate of *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-1 in *E-aerogenes* and *Citrobacter freundii*. *Int J Antimicrob Agents.* 2004;24:S199-S200.

- 
89. Yan JJ, Ko WC, Chuang CL, Wu JJ. Metallo-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae isolates in a university hospital in Taiwan: prevalence of IMP-8 in *Enterobacter cloacae* and first identification of VIM-2 in *Citrobacter freundii*. *J Antimicrob Chemother.* 2002;50(4):503-11.
90. Panopoulou M, Alepopoulou E, Ikonomidis A, Grapsa A, Paspalidou E, Kartali-Ktenidou S. Emergence of VIM-12 in *Enterobacter cloacae*. *J Clin Microbiol.* 2010;48(9):3414-5.
91. Yu YS, Du XX, Zhou ZH, Chen YG, Li LJ. First isolation of bla(IMI-2) in an *Enterobacter cloacae* clinical isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(4):1610-1.
92. Gacar GG, Midilli K, Kolayli F, Ergen K, Gundes S, Hosoglu S, et al. Genetic and enzymatic properties of metallo-beta-lactamase VIM-5 from a clinical isolate of *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(10):4400-3.
93. Falcone M, Mezzatesta ML, Perilli M, Forcella C, Giordano A, Cafiso V, et al. Infections with VIM-1 metallo- $\beta$ -lactamase-producing enterobacter cloacae and their correlation with clinical outcome. *J Clin Microbiol.* 2009;47(11):3514-9.
94. Peleg AY, Franklin C, Bell JM, Spelman DW. Dissemination of the metallo-beta-lactamase gene blaIMP-4 among gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. *Clin Infect Dis.* 2005;41(11):1549-56.
95. Pottumarthy S, Moland ES, Juretschko S, Swanzy SR, Thomson KS, Fritsche TR. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacter cloacae* in North America. *Emerg Infect Dis.* 2003;9(8):999-1002.
96. Radice M, Power P, Gutkind G, Fernandez K, Vay C, Famiglietti A, et al. First class a carbapenemase isolated from enterobacteriaceae in Argentina. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(3):1068-9.

97. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in Ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *J Antimicrob Chemother.* 2009;63(4):659-67.
98. Castanheira M, Sader HS, Jones RN, Debbia E, Picao RC, Gales AC. In71, an *Enterobacter cloacae* blaVIM-1-carrying integron related to In70.2 from Italian *Pseudomonas aeruginosa* isolates: a SENTRY Antimicrobial Surveillance Program report. *Microb Drug Resist.* 2007;13(2):130-4.
99. Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, Gallardo N, Keller N, Moraga M, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing Enterobacteriaceae with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *J Med Microbiol.* 2012;61(Pt 9):1270-9.
100. Seki LM, Pereira PS, de Souza Conceicao M, Souza MJ, Marques EA, Carballido JM, et al. Molecular epidemiology of CTX-M producing Enterobacteriaceae isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. *Braz J Infect Dis.* 2013;17(6):640-6.
101. Tavares CP, Pereira PS, Marques EdA, Faria C, Jr., Araujo Herkenhoff de Souza MdP, de Almeida R, et al. Molecular epidemiology of KPC-2-producing Enterobacteriaceae (non-*Klebsiella pneumoniae*) isolated from Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2015;82(4):326-30.
102. Ahn C, Syed A, Hu F, O'Hara JA, Rivera JI, Doi Y. Microbiological features of KPC-producing *Enterobacter* isolates identified in a U.S. hospital system. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2014;80(2):154-8.
103. Wu Q, Liu Q, Han L, Sun J, Ni Y. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 and ArmA 16S rRNA methylase conferring high-level aminoglycoside resistance in carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae* in China. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2010;66(3):326-8.

- 
104. Marschall J, Tibbetts RJ, Dunne WM, Jr., Frye JG, Fraser VJ, Warren DK. Presence of the KPC carbapenemase gene in Enterobacteriaceae causing bacteremia and its correlation with in vitro carbapenem susceptibility. *J Clin Microbiol.* 2009;47(1):239-41.
105. Bratu S, Landman D, Alam M, Tolentino E, Quale J. Detection of KPC Carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005;49(2):776-8.
106. Szekely E, Damjanova I, Janvari L, Vas KE, Molnar S, Bilca DV, et al. First description of bla(NDM-1), bla(OXA-48), bla(OXA-181) producing Enterobacteriaceae strains in Romania. *Int J Med Microbiol.* 2013;303(8):697-700.
107. Zhou T, Zhang X, Guo M, Ye J, Lu Y, Bao Q, et al. Phenotypic and molecular characteristics of carbapenem-non-susceptible Enterobacteriaceae from a teaching hospital in Wenzhou, southern China. *Jpn J Infect Dis.* 2013;66(2):96-102.
108. Chmelnitsky I, Navon-Venezia S, Strahilevitz J, Carmeli Y. Plasmid-Mediated (qnr)B2 and carbapenemase gene bla(KPC-2) carried on the same plasmid in carbapenem-resistant ciprofloxacin-susceptible *Enterobacter cloacae* isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52(8):2962-5.
109. Qin X, Yang Y, Hu F, Zhu D. Hospital clonal dissemination of *Enterobacter aerogenes* producing carbapenemase KPC-2 in a Chinese teaching hospital. *J Med Microbiol.* 2014;63(Pt 2):222-8.
110. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, Pagano M, Lutz L, Falci DR, et al. Emergence of NDM-1-producing Enterobacteriaceae in Porto Alegre, Brazil. *Int J Infect Dis.* 2014;25:79-81.
111. Chen Z, Li H, Feng J, Li Y, Chen X, Guo X, et al. NDM-1 encoded by a pNDM-BJ01-like plasmid p3SP-NDM in clinical *Enterobacter aerogenes*. *Front Microbiol.* 2015;6:294.

112. Zavascki AP, Machado A, de Oliveira KRP, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents*. 2009;34(3):286-8.
113. Pereira PS, Albano RM, Asensi MD, Carvalho-Assef APD. Draft genome sequences of three NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* species isolated from Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110(4):580-2.
114. Mallea M, Chevalier J, Bornet C, Eyraud A, Davin-Regli A, Bollet C, et al. Porin alteration and active efflux: two in vivo drug resistance strategies used by *Enterobacter aerogenes*. *Microbiology-UK*. 1998;144:3003-9.
115. Pages JM, James CE, Winterhalter M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2008;6(12):893-903.
116. Lavigne JP, Sotto A, Nicolas-Chanoine MH, Bouziges N, Pages JM, Davin-Regli A. An adaptive response of *Enterobacter aerogenes* to Imipenem: regulation of porin balance in clinical isolates. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;41(2):130-6.
117. Lee Y, Choi H, Yum JH, Kang G, Bae IK, Jeong SH, et al. Molecular mechanisms of carbapenem resistance in *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Korea and clinical outcome. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42(3):281-6.
118. Hammami S, Boutiba-Ben Boubaker I, Saidani M, Lakhel E, Ben Hassen A, Kamoun A, et al. Characterization and molecular epidemiology of extended spectrum beta-lactamase producing *Enterobacter cloacae* isolated from a Tunisian Hospital. *Microb Drug Resist*. 2012;18(1):59-65.
119. Tzouveleki LS, Tzelepi E, Kaufmann ME, Mentis F. Consecutive mutations leading to the emergence in-vivo of imipenem resistance in a clinical strain of *Enterobacter aerogenes*. *J Med Microbiol*. 1994;40(6):403-7.

- 
120. Tzouvelekis LS, Tzelepi E, Mentis AF, Vatopoulos AC, Tsakris A. Imipenem resistance in *Enterobacter aerogenes* is associated with depression of chromosomal cephalosporinases and impaired permeability. *Fems Microbiology Letters*. 1992; 95(2-3):195-200.
121. Bornet C, Davin-Regli A, Bosi C, Pages JM, Bollet C. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol*. 2000;38(3):1048-52.
122. Charrel RN, Pages JM, DeMicco P, Mallea M. Prevalence of outer membrane porin alteration in beta-lactam-antibiotic-resistant *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1996;40(12):2854-8.
123. Poole K. Stress responses as determinants of antimicrobial resistance in Gram-negative bacteria. *Trends Microbiol*. 2012;20(5):227-34.
124. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. In: Dougherty TJ, Pucci MJ, editors. *Antibiotic discovery and development*. New Yoek: Springer; 2012. p.349-95.
125. Chollet R, Chevalier J, Bryskier A, Pages JM. The AcrAB-TolC pump is involved in macrolide resistance but not in telithromycin efflux in *Enterobacter aerogenes* and *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(9):3621-4.
126. Perez A, Poza M, Aranda J, Latasa C, Medrano FJ, Tomas M, et al. Effect of transcriptional activators SoxS, RobA, and RamA on expression of multidrug efflux pump AcrAB-TolC in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012;56(12):6256-66.
127. Masi M, Pages JM, Pradel E. Overexpression and purification of the three components of the *Enterobacter aerogenes* AcrA-AcrB-ToIC multidrug efflux pump. *J Chromatogr B-Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2003;786(1-2):197-205.

- 
128. Szabo D, Silveira F, Hujer AM, Bonomo RA, Hujer KM, Marsh JW, et al. Outer membrane protein changes and efflux pump expression together may confer resistance to Ertapenem in *Enterobacter cloacae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2006;50(8):2833-5.
129. Aubron C, Poirel L, Ash RJ, Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*, U.S. rivers. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(2):260-4.
130. Qin X, Yang Y, Hu F, Zhu D. Hospital clonal dissemination of *Enterobacter aerogenes* producing carbapenemase KPC-2 in a Chinese teaching hospital. *J Med Microbiol*. 2014;63:222-8.
131. NCCLS. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbico: Norma Aprovada- Sexta edição. Wayne, Pennsylvania, 2003.
132. Tuon FF, Scharf C, Rocha JL, Cieslinsk J, Becker GN, Arend LN. KPC-producing *Enterobacter aerogenes* infection. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(3):324-7.
133. Bodro M, Sabe N, Tubau F, Llado L, Baliellas C, Roca J, et al. Risk factors and outcomes of bacteremia caused by drug-resistant ESKAPE pathogens in solid-organ transplant recipients. *Transplantation*. 2013;96(9):843-9.
134. Castanheira M, Sader HS, Deshpande LM, Fritsche TR, Jones RN. Antimicrobial activities of tigecycline and other broad-spectrum antimicrobials tested against serine carbapenemase- and metallo-beta-lactamase-producing *enterobactefiaceae*: Report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(2):570-3.
135. Khajuria A, Praharaj AK, Kumar M, Grover N. Carbapenem Resistance among *Enterobacter* Species in a Tertiary Care Hospital in Central India. *Chemother Res Pract*. 2014;2014:972646.

- 
136. Gales AC, Jones RN, Sader HS. Global assessment of the antimicrobial activity of polymyxin B against 54 731 clinical isolates of Gram-negative bacilli: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme (2001-2004). *Clin Microbiol Infect.* 2006;12(4):315-21.
137. Fernandez-Canigia L, Dowzicky MJ. Susceptibility of important Gram-negative pathogens to tigecycline and other antibiotics in Latin America between 2004 and 2010. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 2012;11:29.
138. Sader HS, Flamm RK, Jones RN. Tigecycline activity tested against antimicrobial resistant surveillance subsets of clinical bacteria collected worldwide (2011). *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2013;76(2):217-21.
139. Livermore DM, Warner M, Mushtaq S, Doumith M, Zhang J, Woodford N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomicin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(5):415-9.
140. Samonis G, Maraki S, Rafailidis PI, Kapaskelis A, Kastoris AC, Falagas ME. Antimicrobial susceptibility of Gram-negative nonurinary bacteria to fosfomicin and other antimicrobials. *Future Microbiol.* 2010;5(6):961-70.
141. Lu CL, Liu CY, Huang YT, Liao CH, Teng LJ, Turnidge JD, et al. Antimicrobial susceptibilities of commonly encountered bacterial isolates to fosfomicin determined by agar dilution and disk diffusion methods. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4295-301.
142. Vouillamoz J, Moreillon P, Giddey M, Entenza JM. In vitro activities of tigecycline combined with other antimicrobials against multiresistant Gram-positive and Gram-negative pathogens. *J Antimicrob Chemother.* 2008;61(2):371-4.

143. Zhang R, Cai JC, Zhou HW, Nasu M, Chen GX. Genotypic characterization and in vitro activities of tigecycline and polymyxin B for members of the Enterobacteriaceae with decreased susceptibility to carbapenems. *J Med Microbiol.* 2011;60(Pt 12):1813-9.
144. Deshpande LM, Jones RN, Fritsche TR, Sader HS. Occurrence and characterization of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2000-2004). *Microb Drug Resist.* 2006;12(4):223-30.
145. Dai W, Sun S, Yang P, Huang SF, Zhang XJ, Zhang LP. Characterization of carbapenemases, extended spectrum beta-lactamases and molecular epidemiology of carbapenem-non-susceptible *Enterobacter cloacae* in a Chinese hospital in Chongqing. *Infect Genet Evol.* 2013;14:1-7.
146. Biendo M, Canarelli B, Thomas D, Rousseau F, Hamdad F, Adjide C, et al. Successive emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing and carbapenemase-producing *Enterobacter aerogenes* isolates in a university hospital. *J Clin Microbiol.* 2008;46(3):1037-44.
147. Bornet C, Saint N, Fetnaci L, Dupont M, Davin-Regli A, Bollet C, et al. Omp35, a new *Enterobacter aerogenes* porin involved in selective susceptibility to cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(6):2153-8.
148. Thiolas A, Bornet C, Davin-Regli A, Pages JM, Bollet C. Resistance to imipenem, cefepima, and ceftazidime associated with mutation in Omp36 osmoporin of *Enterobacter aerogenes*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;317(3):851-6.
149. Du D, Wang Z, James NR, Voss JE, Klimont E, Ohene-Agyei T, et al. Structure of the AcrAB-TolC multidrug efflux pump. *Nature.* 2014;509(7501):512-5.

150. Pradel E, Pages JM. The AcrAB-TolC efflux pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002;46(8):2640-3.
151. Perez A, Canle D, Latasa C, Poza M, Beceiro A, Tomas Mdel M, et al. Cloning, nucleotide sequencing, and analysis of the AcrAB-TolC efflux pump of *Enterobacter cloacae* and determination of its involvement in antibiotic resistance in a clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(9):3247-53.
152. Davin-Regli A, Pages JM. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol.* 2015;6:392.
153. Mallea M, Chevalier J, Eyraud A, Pages JM. Inhibitors of antibiotic efflux pump in resistant *Enterobacter aerogenes* strains. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;293(5):1370-3.

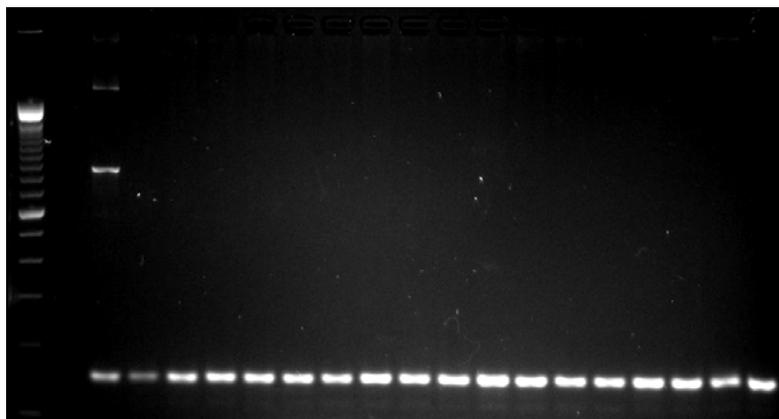
## **7 Anexos**

---

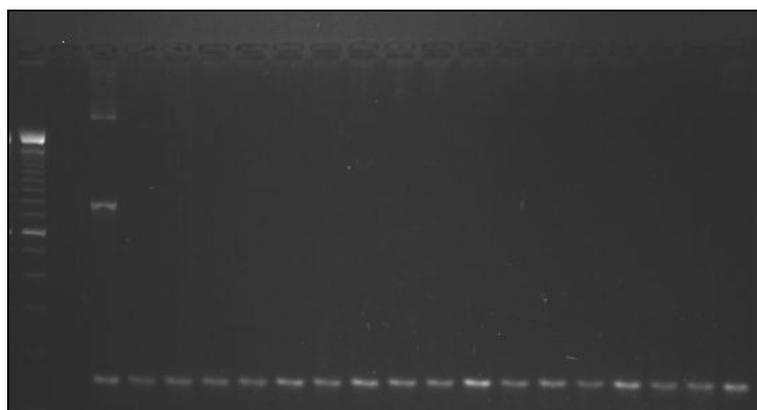
## 7 ANEXOS

Anexo 1 - Informações gerais sobre os 39 pacientes do HC-FMUSP com infecção e ou colonização por *E. enterobacter* resistentes aos carbapenêmicos

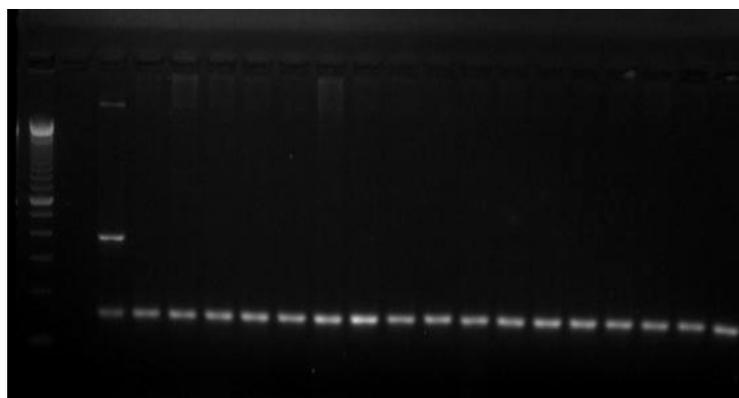
Paciente	Dados adicionais do paciente	Idade	Sexo	Óbito	PFGE	Data coleta	CIM- Microdilução em caldo													
							Imipenem		Meropenem		Ertapenem		Cefepime		Amicacina		Ciprofloxacina			
							Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc	Mic	Susc		
119	Paciente pós-operatório hepatectomia (cirrose hepática e hepatocarcinoma)	63 anos	M	sim	A1	29/03/2010	16	R	8	R	64	R	>128	R	4	S	64	R		
133	Paciente cirrose lista transplante hepático	50 anos	M	sim	A2	24/01/2011	2	I	<0,25	S	1	R	>128	R	4	S	32	R		
100	Paciente sub embolização priapismo	54 anos	M	não	A3	22/12/2009	4	R	0,25	S	0,5	I	>128	R	32	I	2	S		
79	Abscesso penis	54 anos	M	não	A3	15/12/2009	4	R	0,25	S	1	R	>128	R	-	-	16	R		
28					A4	03/10/2007	8	R	8	R	4	R	>128	R	32	I	2	R		
30	UTI- Choque Cardiogênico pós IAM	79 anos	M	não	A4	23/09/2007	8	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	8	R		
26	Transplante de Medula Óssea (Quimioterapia + Imipenem)	44 anos	M	sim	A5	21/09/2007	8	R	4	R	64	R	>128	R	-	-	2	R		
31					A5	12/07/2007	8	R	8	R	64	R	>128	R	-	-	8	R		
34	Paciente HIV agudo - Pancreatite necrohemorrágica	44 anos	M	sim	A6	29/05/2008	8	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	8	R		
10		60 anos	F	sim	A7	14/07/2006	16	R	16	R	64	R	>128	R	64	R	16	R		
12	Cirurgia do tórax	60 anos	F	sim	A7	13/07/2006	32	R	16	R	128	R	>128	R	64	R	8	R		
9	Transplante renal (tratamento imipenem)	71 anos	F	sim	A8	30/06/2006	16	R	4	R	64	R	>128	R	64	R	16	R		
8	Transplante hepático - Cirrose hepático auto-imune	18 anos	F	sim	A9	12/06/2006	16	R	8	R	128	R	>128	R	64	R	16	R		
22					A10	25/04/2007	8	R	4	R	32	R	>128	R	64	R	16	R		
14					A11	02/01/2007	16	R	4	R	32	R	>128	R	64	R	16	R		
19	Operada esofagectomia	74 anos	F	sim	A11	01/03/2007	32	R	8	R	32	R	>128	R	64	R	8	R		
11	Paciente pós-quimioterapia por Leucemia secundária	59 anos	F	não	A12	09/01/2007	16	R	16	R	64	R	>128	R	64	R	32	R		
20	Pós-operatório colecistectomia (Sepse grave - Tratamento Imipenem)	71 anos	F	sim	A12	23/03/2007	16	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	8	R		
70	Paciente Síndrome Antifosfolípido (Hipertensão portal)	45 anos	F	sim	A13	07/01/2009	8	R	32	R	64	R	>128	R	-	-	-	-		
71	Paciente pós-operatório embolectomia de MID (Obstrução arterial aguda)	93 anos	M	sim	A13	06/01/2009	16	R	32	R	64	R	>128	R	-	-	-	-		
73	Paciente pós-operatório de transplante hepático	60 anos	M	sim	A14	31/08/2009	16	R	4	R	16	R	>128	R	-	-	-	-		
56		62 anos	M	não	A15	05/12/2009	4	R	4	R	16	R	>128	R	2	S	-	-		
83	Transplante renal	70 anos	M	não	A15	01/02/2010	4	R	4	R	16	R	>128	R	4	S	64	R		
49	Pós-operatório Transplante hepático	54 anos	M	sim	A16	03/11/2009	32	R	16	R	64	R	>128	R	-	-	-	-		
52	Pós-operatório esofagectomia transmediastinal	79 anos	M	sim	A16	03/12/2009	32	R	16	R	128	R	>128	R	-	-	-	-		
53					A17	29/11/2009	16	R	4	R	32	R	>128	R	-	-	-	-		
35	Paciente pós-operatório tardio gastroduodeno pancrectomia				A18	10/06/2008	8	R	8	R	64	R	>128	R	-	-	-	-		
110	Endocardite choque-septico	60 anos	F	sim	B1	07/03/2010	4	R	0,25	S	1	R	>128	R	128	R	32	R		
86		77 anos	M	não	B2	30/12/2009	4	R	≤0,25	S	0,25	S	>128	R	64	R	32	R		
106		56 anos	M	não	C1	11/02/2010	0,5	S	0,25	S	0,5	I	>128	R	64	R	4	R		
4	Biopsia de abscesso	29 anos	M	sim	D1	23/07/2005	8	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R		
6	Serviço de transplante	29 anos	M	sim	D1	08/05/2006	16	R	8	R	128	R	>128	R	32	I	8	R		
7	Transplante de fígado	67 anos	M	sim	D2	18/05/2006	32	R	16	R	128	R	>128	R	32	I	8	R		
1	Transplante renal	69 anos	F	sim	D3	28/01/2005	4	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R		
2	Transplante fígado	19 anos	F	sim	D3	13/05/2005	32	R	8	R	32	R	>128	R	64	R	16	R		
3	Cardiopatia geral - nefrologia	25 anos	F	sim	D3	11/06/2005	16	R	8	R	64	R	>128	R	64	R	16	R		
5	UTI anestesiologia	81 anos	F	sim	D3	10/12/2005	16	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	16	R		
114	Cirurgia fígado/Transplante hepático/Cirrose Alcoólica	62 anos	M	não	E1	16/03/2010	16	R	8	R	64	R	>128	R	32	I	64	R		
165	Cirurgia de emergência (Hodge positivo)	54 anos	M	sim	F1	08/06/2011	128	R	64	R	≥128	R	32	R	-	-	-	-		
50	Paciente pós-operatório transplante hepático	54 anos	M	sim	F2	10/11/2009	32	R	16	R	64	R	>128	R	128	R	16	R		



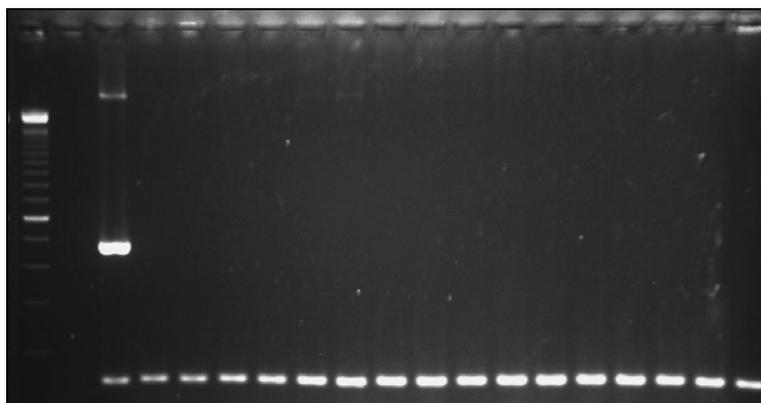
**Anexo 2 -** Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador *bla*<sub>GES</sub> (846pb) e 16 S (150pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene GES



**Anexo 3 -** Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador *bla*<sub>SPM</sub> (798pb) e 16 S (150pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene SPM



**Anexo 4 -** Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador *bla*<sub>VIM</sub> (382pb) e 16 S (150pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene VIM



**Anexo 5 -** Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador *bla*<sub>GIM</sub> (477pb) e 16 S (150pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene GIM



**Anexo 6 -** Foto do gel de PCR da amplificação do gene codificador *bla*<sub>IMP</sub> (188pb). **PM- Peso Molecular.** Isolado C. Controle negativo. Isolado C+ Controle positivo. Isolados 3-19 negativo para o gene IMP