

Teresa Moreira dos Reis

ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTES AOS CARBAPENEMOS NO CENTRO HOSPITALAR UNIVERSITÁRIO DE COIMBRA: EMERGÊNCIA DE CARBAPENEMASES

Dissertação de Mestrado de Ciências Farmacêuticas, orientada pela Professora Doutora Gabriela Silva, apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.

Junho de 2017



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Teresa Moreira dos Reis

Estudo Epidemiológico de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes aos
Carbapenemos no Centro Hospitalar Universitário de Coimbra:
Emergência de Carbapenemases

Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, realizada sob orientação da Professora Doutora Gabriela Silva.

Junho 2017

Ao Tiago

Aos Meus Pais

Ao Rui

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Gabriela Silva, do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, o meu agradecimento sincero por me ter proporcionado a oportunidade de realizar este trabalho, pelo forte incentivo à sua concretização, pela orientação técnico-científica e pela disponibilidade e tempo generosamente despendidos, desde o início até à revisão do presente estudo.

Ao Dr. Henrique Oliveira, Responsável pelo Laboratório de Microbiologia do Serviço de Patologia Clínica do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra agradeço o apoio que deu ao meu trabalho, a compreensão que demonstrou pela necessidade da sua realização e a sua amizade.

Aos meus amigos que se mostraram interessados e solícitos em apoiar-me e que sempre tiveram uma palavra de ânimo.

A todos um **MUITO OBRIGADA!**

RESUMO

O aparecimento contínuo de infecções devido a bactérias resistentes a múltiplos antibióticos é um grave problema de saúde pública. *Klebsiella pneumoniae* (KP) tem vindo a adquirir vários genes de resistência, incluindo aqueles que codificam carbapenemases como *bla_{KPC}*, e tem-se disseminado globalmente. KP produtores de carbapenemases são, na maioria das vezes, resistentes a múltiplas classes de antibióticos além de β -lactâmicos, que incluem tetraciclina, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Não existe tratamento ideal para aquelas infecções, mas, paradoxalmente, a inclusão de um ou mais carbapenemos faz parte das opções terapêuticas.

O principal objetivo deste estudo foi avaliar a evolução da resistência aos carbapenemos em KP isoladas no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Assim, entre 1 de Janeiro de 2012 e 31 de Dezembro de 2016, foram recolhidos os dados de 6219 isolados de KP de 6219 pacientes do CHUC. Os antibióticos estudados (amoxicilina/ácido clavulânico, piperacilina/tazobactam, cefuroxime, cefotaxime, ceftazidima, amicacina, gentamicina, tobramicina, ciprofloxacina, levofloxacina, meropenem, ertapenem) mostraram-se menos efectivos ao longo dos anos. Também se verificou que 15 isolados em 2012, 28 em 2013, 88 em 2014, 195 em 2015 e 195 em 2016 eram resistentes ou apresentavam susceptibilidade diminuída aos carbapenemos. Entre Outubro de 2015 e Dezembro de 2016, a detecção fenotípica de carbapenemases foi realizada com Rapidec CARBA NP[®] (BioMérieux) em 294 isolados resistentes aos carbapenemos: 268 foram positivos; 21 foram negativos e 5 foram inconclusivos. A partir de Fevereiro de 2016, todos os resultados positivos de CarbaNP foram confirmados genotipicamente para as carbapenemases KPC, VIM, NDM e OXA-48 com equipamentos BD MAX[®]. De 166 isolados CarbaNP positivos, 165 eram portadores de *bla_{KPC}* e um de *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}*. A resistência à colistina foi observada em isolados resistentes ao carbapenemo: 4,1% (8/195) em 2015 e 8,2% (8/195) em 2016. Normalmente, esses isolados eram resistentes a todas as classes de antibióticos o que origina questões preocupantes.

Em geral, este estudo realça a importância da implementação do rastreio de carbapenemases em isolados de pacientes internados no hospital ou em admissão hospitalar, a fim de controlar a disseminação dos elementos de resistência antimicrobiana.

Palavras chave: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenemos; carbapenemases; KPC; Portugal

ABSTRACT

The continuous emergence of infections due to multidrug resistant bacteria is a serious public health problem. *Klebsiella pneumoniae* (KP), has been acquiring resistance genes, including those encode carbapenemases such as *bla*_{KPC}, and is disseminated worldwide. Many carbapenemase-producing KP are resistant to multiple antibiotic classes beyond β -lactams, including tetracyclines, aminoglycosides and fluoroquinolones. The optimal treatment, if any, for infections due to these strains is unclear but, paradoxically the inclusion of one or more carbapenems seems to be a therapeutic option.

The main objective of this work was to evaluate the resistance to carbapenems of KP isolated in the Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). Between January 1st, 2012 and December 31th, 2016 data of 6219 KP isolates from 6219 patients were collected at CHUC, a tertiary care hospital. The antibiotics studied (amoxicilin/clavulanic acid; piperacilin /tazobactan; cefuroxime; cefotaxime; ceftazidime; ampicillin; gentamicin; tobramycin; ciprofloxacin; levofloxacin; meropenem; ertapenem) showed to be less effective along the years. Also it was verified that 15 isolates in 2012, 28 in 2013, 88 in 2014, 195 in 2015 and 195 in 2016 were resistant or showed reduced susceptibility to carbapenems. Between October 2015 and December 2016 carbapenemase phenotypic detection was performed with Rapidec CARBA NP[®] (BioMérieux) in 294 carbapenem resistant isolates: 268 were positive; 21 were negative and 5 were inconclusive. From February 2016, all CarbaNP positive results were genotypically confirmed for KPC, VIM, NDM and OXA-48 carbapenemases with BD MAX[®] equipment. Of 166 positive Rapidec CarbaNP isolates, 165 harbored KPC and one harbored KPC and VIM. Resistance to colistin was observed in carbapenem resistant isolates: 4,1% (8/195) in 2015 and 8,2% (8/195) in 2016. Usually those isolates were resistant to all antibiotic classes, which is becoming a worrisome issue.

Overall this study highlights the importance of implementation of carbapenemase gene screening in isolates from inpatients or on admission to hospital in order to control the dissemination of these antimicrobial resistance elements.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; carbapenems; carbapenemases; KPC; Portugal

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	1
1. <i>Klebsiella pneumoniae</i> - PATÓGENO NOSOCOMIAL	2
2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA.....	3
3. CARBAPENEMASES	5
3.1. CARBAPENEMOS.....	5
3.2. CLASSIFICAÇÃO DAS CARBAPENEMASES.....	6
3.3. EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> PRODUTORA DE CARBAPENEMASES	8
4. CONTROLO DE INFECÇÕES.....	10
II. OBJECTIVOS.....	11
III. MATERIAIS E MÉTODOS	13
I. RECOLHA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	13
I.1. MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	14
2. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	16
2.1. VITEK-2 [®] (BioMérieux).....	17
2.2. MICROSCAN [®] (Siemens)	17
2.3. MÉTODO MANUAL E-TEST	17
3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE β -LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)	18
3.1. VITEK 2 [®] (BioMérieux).....	18
3.2. MicroScan Walkaway [®] (Siemens)	18
3.3. MÉTODO MANUAL.....	18
4. DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES: PESQUISAS FENOTÍPICA E GENOTÍPICA	19
4.1. Rapidec Carba NP [®] (BioMérieux): PESQUISA FENOTÍPICA.....	19
4.2. BD MAX [®] (Quilaban): PESQUISA GENOTÍPICA.....	20
4.3. GenXpert [®] (WERFEN): PESQUISA GENOTÍPICA.....	20
5. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE KPC.....	21

III.RESULTADOS.....	23
1. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	23
2. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DO CHUC.....	24
2.1. ANO 2012.....	24
2.2. ANO 2013.....	25
2.3. ANO 2014.....	26
2.4. ANO 2015.....	27
2.5. ANO 2016.....	27
3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> e β -LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBL).....	28
4. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NÃO β -lactâmicos NOS ISOLADOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i> RESISTENTES À CEFTAZIDIMA, ENTRE 2012 E 2016	28
5. ESTUDO DOS ISOLADOS COM SUSCEPTIBILIDADE DIMINUIDA A CARBAPENEMOS.....	29
5.1 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENEMOS EM <i>Klebsiella pneumoniae</i> , ENTRE 2012 E 2016	29
5.2. SUSCEPTIBILIDADE DOS ANTIBIÓTICOS NOS ISOLADOS COM SUSCEPTIBILIDADE DIMINUÍDA OU RESISTENTES AO ERTAPENEM.....	30
6. PESQUISA DE CARBAPENEMASES.....	31
IV. DISCUSSÃO	33
1. ORIGEM E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE <i>Klebsiella pneumoniae</i>	33
2. DETECÇÃO DE β -LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs).....	35
3. CARBAPENEMASES	35
3.1. OXA-48	37
4. AUMENTO DE CARBAPENEMASES: E AGORA?	37
V. CONCLUSÃO.....	41
BIBLIOGRAFIA.....	43
ANEXO I	55

INDÍCE DE TABELAS

Tabela 1: Resistência (%) aos antibióticos não β -lactâmicos nos isolados de <i>K.pneumoniae</i> resistentes à ceftazidima	28
Tabela 2: Antibiogramas de isolados clínicos de <i>K.pneumoniae</i> resistentes aos carbapenemos e sensíveis a outros grupos de antibióticos.....	31

INDÍCE DE FIGURAS

Figura 1: <i>Klebsiella pneumoniae</i> . Percentagem (%) de isolados invasivos com resistência aos carbapenemos por país; EU/EEA, 2015 ¹¹	3
Figura 2: Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo; meropenemo; ertapenemo e doripenemo (Adaptado de Zhanel et al., 2007).....	5
Figura 3: a, equipamento Vitek 2 [®] BioMérieux; b, exemplo de carta de identificação; c, Rack com carta de identificação e tubo com suspensão bacteriana	14
Figura 4: a, colónias bacterianas, são colocadas no poço da placa metálica juntamente com a matriz; b, VitekMS [®] BioMérieux; c, imagem ilustrativa do que se passa no interior do equipamento Vitek MS [®] (figuras gentilmente cedidas por BioMérieux, Portugal).....	15
Figura 5: Equipamento MicroScan [®] (Siemens) e respectivas galerias de identificação e antibiograma.16	
Figura 6: Fotografias de uma estirpe produtora de ESBL: pesquisa fenotípica.	19
Figura 7: Rapidec CarbaNP [®] BioMérieux.....	19
Figura 8: Equipamento Gene Xpert [®] Werfen e cartucho Xpert-Carba-R [®]	21
Figura 9: Número de doentes e isolados por ano: 2012; 2013; 2014; 2015 e 2016.....	23
Figura 10: Distribuição das estirpes estudadas por produtos	24
Figura 11: Perfil de antibióticos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> no ano de 2012. Relativamente ao item β lactamase de largo espectro a percentagem de sensibilidade corresponde a Negativa e de resistente a Positiva.....	25
Figura 12 Susceptibilidade (%) aos antibióticos dos isolados de <i>K.pneumoniae</i> , no ano de 2013.....	26
Figura 13: Susceptibilidade (%) aos antibióticos dos isolados de <i>K.pneumoniae</i> , no ano de 2014.....	26
Figura 14: Perfil de antibióticos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> (N=1449) no ano de 2015. Relativamente ao item β - lactamases de largo espectro a % de sensibilidade corresponde a Negativa e % de resistente a Positiva.....	27
Figura 15: Percentagem (%) das estirpes de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL em 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016.....	28
Figura 16: Evolução da resistência aos Carbapenemos entre 2012 e 2016	29
Figura 17: Distribuição, do N ^o de KP produtoras de carbapenemas em 2016, por serviço do CHUC	29
Figura 18 Resistência (%) aos antibióticos dos isolados de KP com susceptibilidade intermédia e resistentes ao ertapenemo nos anos de 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016.	30

ABREVIATURAS

AMC – Amoxicilina/ácido clavulânico

ATM – Aztreonamo

CAZ – Ceftazidima

CDC – Center of Disease Control

CHC – Centro Hospitalar de Coimbra

CHLN – Centro Hospitalar de Lisboa Norte

CHUC - Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra

CLA – Ácido Clavulânico

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI – Concentração mínima inibitória

CTX – Cefotaxime

DGS – Direcção Geral de Saúde

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EARSS – European Antimicrobial Resistance Surveillance Network

ECDC – European Centre of Disease Control

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetracético

E-Test – Epsilon Test

ESBL – β -lactamases de espectro alargado

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

FEP – Cefipime

FOX – Cefoxitina

GIM – German Imipenemase

HP – Hospital Pediátrico

HSC – Hospital Psiquiátrico Sobral Cid

HUC – Hospitais da Universidade de Coimbra

IMP – Imipenemase

INC – Incompatibilidade

KP – *Klebsiella pneumoniae*

KPC – *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

MALDI-TOF – Matrix Assited Laser Desorption Ionization Time-of-flight

MBB – Maternidade Bissaya Barreto

MH – Muller Hinton

MLST – Multi-locus sequence typing
NDM – New Delhi metallo- β -lactamase
ml – mililitro
OMS – Organização Mundial de Saúde
OMPs – Porinas
ONU – Nações Unidas
OXA – Oxacilin hydrolysing β -lactamases
ORL – Otorrinolanrigologia
PBP – Penicilin binding protein
PCR – Polimerase Chain Reaction
PIP – Piperacilina
PFGE – Pulsed-Field Gel Electrophoresis
SPM – São Paulo Imipenemase
ST – Sequence typing
T – Temperatura
VIM – Verona Imipenemase
 μ g – micrograma
 μ l – microlitro

I. INTRODUÇÃO

Pela primeira vez, em 21 de Setembro de 2016, numa reunião de alto nível convocada pelo Presidente da Assembleia Geral das Nações Unidas (ONU), H.E. Peter Thomson, os Chefes de Estado comprometeram-se a adoptar uma abordagem ampla e coordenada para discutir as causas profundas da resistência aos antibióticos em vários sectores, especialmente nas áreas da saúde humana, da saúde animal e da agricultura: ¹

"A resistência antimicrobiana ameaça a realização dos Objectivos de Desenvolvimento Sustentável e exige uma resposta global. Os Estados-Membros acordaram hoje numa declaração política forte que constitua uma boa base para a comunidade internacional avançar. Nenhum país, sector ou organização pode abordar este assunto sozinho."¹ (*Thomson, H.E.*; Presidente da Assembleia Geral da ONU)

"A resistência antimicrobiana representa uma ameaça fundamental para a saúde humana, desenvolvimento e segurança. Os compromissos assumidos hoje devem agora traduzir-se em acções rápidas, eficazes e salvadoras em todos os sectores da saúde humana, animal e ambiental. Estamos ficando sem tempo"¹ (*Margaret Chan*, Directora Geral da OMS)

"A resistência aos antimicrobianos é um problema não apenas dos nossos hospitais, mas das nossas terras e da nossa alimentação. A agricultura deve assumir a sua parte de responsabilidade, tanto pelo uso de antimicrobianos de forma mais responsável quanto pela redução da necessidade de usá-los, através de uma boa higiene na fazenda."¹ (*José Graziano da Silva*, Director Geral da *Food and Agriculture Organization of the United Nations*)

A resistência a antibióticos tem surgido como um problema emergente de saúde pública, em todo o mundo, uma vez que a velocidade de desenvolvimento e a introdução no mercado de novos fármacos têm sido superados pela emergência dos mecanismos de resistência bacterianos.²

Em Maio de 2015 a Organização Mundial de Saúde (OMS) elaborou o “*Global Action Plan on Antimicrobial Resistance*” que consiste em cinco objectivos fundamentais:

- (1) melhorar a sensibilização e compreensão da resistência antimicrobiana;
- (2) fortalecer o conhecimento através da vigilância e da investigação;
- (3) reduzir a incidência de infecção;
- (4) otimizar a utilização de agentes antimicrobianos;
- (5) assegurar a sustentabilidade.³

Em muitos países, os antibióticos podem ser comprados em mercados, lojas, farmácias ou através da Internet sem receita médica ou envolvimento de um profissional de saúde. Antibióticos para usos humano e veterinário, de baixa qualidade são generalizados e, muitas vezes, contêm baixas concentrações do princípio activo, estimulando o aparecimento de microrganismos resistentes. As leis para garantir que os medicamentos são de qualidade, seguros, eficazes e acessíveis para aqueles que deles necessitam devem ser decretadas e aplicadas por igual, em todo o Mundo.³

As infecções nosocomiais são uma importante fonte de morbidade e mortalidade dos doentes hospitalares. O aumento das infecções adquiridas com agentes patogénicos multirresistentes representa um grave problema em doentes hospitalizados. Têm sido citados vários factores para aquisição de uma infecção hospitalar, tais como a presença de condições subjacentes (diabetes, doença renal ou doença oncológica), longos períodos de hospitalização, procedimentos cirúrgicos, prévia antibioterapia e presença de cateteres invasivos.⁴

***Klebsiella pneumoniae* - PATÓGENO NOSOCOMIAL**

Klebsiella pneumoniae faz parte do microbiota humano, sendo comensal da nasofaringe e do tracto gastrointestinal.⁵

A maioria das infecções nosocomiais, no que respeita a bactérias Gram-negativo, é causada por *K. pneumoniae* (KP) e está associada ao prolongado uso de antibióticos de largo espectro e a longos períodos de hospitalização.⁶ Até há pouco tempo, *Escherichia coli* era a principal responsável por estas infecções, mas a KP tem vindo a ganhar cada vez mais relevo. Em ambiente hospitalar, as principais fontes para transmissão de KP são o aparelho gastrointestinal dos doentes e as mãos do pessoal clínico,⁵ o que permite que se dissemine rapidamente entre doentes.

A patogenicidade deste microrganismo advém, não só do meio ambiente propício ao seu desenvolvimento, como também, dos seus factores de virulência: a cápsula polissacárida

que KP forma e protege a bactéria da fagocitose dos polimorfonucleares e as propriedades adesivas mediadas por fimbrias e/ou adesinas que lhe permitem aderir às células epiteliais.⁵

As infecções por KP estão maioritariamente associadas aos cuidados de saúde: infecções urinárias, por vezes relacionadas com uso prolongado de sonda vesical; infecções respiratórias, também devidas ao uso do ventilador, septicémias e infecções de feridas operatórias.⁷

KP é intrinsecamente resistente aos antibióticos: penicilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, devido à produção de uma β -lactamase de classe A cromossómica. As β -lactamases do tipo SHV são muito comuns em KP, como a SHV1/2, que hidrolisam as penicilinas e algumas cefalosporinas de 1ª geração, e as de espectro alargado (“extended spectrum β -lactamase” - ESBL) cujo espectro hidrolítico se estende a cefalosporinas de 2ª e 3ª e por vezes de 4ª geração e monobactamos.^{8:9}

Ao longo do tempo KP tem adquirido resistência às diferentes classes de antibióticos, principalmente por transferência horizontal de elementos genéticos móveis como plasmídeos. Em 1982, foi identificada a primeira ESBL, na Alemanha, num surto hospitalar. Desde essa altura foram já identificadas mais de 200 variantes de ESBL, algumas das quais estão presentes na maioria dos países do Mundo.¹⁰ Com o progressivo aumento de bactérias produtoras de ESBL, os carbapenemos passaram a ser o grupo disponível para tratar estas infecções. Rapidamente apareceram estirpes produtoras de carbapenemases que neste momento, e segundo os relatórios da OMS e do *European Centre of Disease Control* (ECDC), estão presentes a nível mundial.^{10:11} (Figura 1)



Figura 1: *Klebsiella pneumoniae*. Percentagem (%) de isolados invasivos com resistência aos carbapenemos por país; EU/EEA, 2015¹¹

2. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

As bactérias Gram-negativo podem ter diferentes mecanismos de resistência que actuam sobre a mesma ou diferentes classes de antibióticos: (i) alteração da permeabilidade da

membrana externa por diminuição ou alteração da conformação de porinas (“Outer membrane porin”- OMPs); (ii) bombas de efluxo que diminuem a acumulação intracelular do antibiótico; (iii) mutações que alteram o local activo de ligação (iv) genes que codificam enzimas, como as β -lactamases, que destroem o antibiótico.¹²

i- Alteração da permeabilidade da membrana externa

A membrana externa das bactérias Gram-negativo é uma barreira de protecção destes microrganismos mas que não compromete as trocas de nutrientes necessárias à sua sobrevivência. Aquela é constituída por uma bicamada lipídica com proteínas que formam um poro -as porinas- (OMPs) para passagem de compostos hidrofílicos. As alterações da permeabilidade desta barreira têm um grande impacto na susceptibilidade dos microrganismos aos antibióticos.¹³ As porinas são a via de passagem através da membrana externa de pequenas moléculas de antibióticos hidrofílicos como os β -lactâmicos, as tetraciclinas, o cloranfenicol e as quinolonas.¹³ A perda de porinas ou alterações na sua funcionalidade torna os microrganismos resistentes a estes antibióticos.

Em KP, as porinas OmpK35 e OmpK36 têm um papel fundamental na entrada de antibióticos e consequente destruição destas bactérias. A sua expressão depende das condições ambientais, como por exemplo a osmolaridade do meio.¹⁴ A expressão dos genes que codificam as principais porinas da KP pode ser comprometida por mutações que causam alterações na estrutura proteica, terminação prematura da translação ou disrupção do gene, tendo como alvo frequente os carbapenemos, principalmente o ertapenemo.^{15;16}

ii- Bombas de efluxo

As bombas de efluxo conseguem expelir diferentes antibióticos e substratos com várias especificidades (dependo do tipo de bomba), e levam à diminuição da concentração intracelular de antibiótico.¹⁷

As bombas de efluxo mais conhecidas em KP são as AcrAB e OqxAB e quando sobre-expressas são apontadas como responsáveis pelo aumento das concentrações mínimas inibitórias (CMI) de diferentes antibióticos.^{17;18;19}

iii- Mutações que alteram o local activo de ligação do antibiótico

Relativamente à parede celular da célula bacteriana, podemos referir como exemplo os β -lactâmicos que se ligam irreversivelmente às D-D-carboxitranspeptidases (Penicillin-Binding Proteins- PBPs), impedindo a formação de pontes interpeptídicas entre cadeias peptídicas

vizinhas do peptidoglicano em crescimento. Assim, mutações nos genes produtores de PBPs ou recombinações homólogas entre genes de PBPs, que não alterem a função das proteínas ou a síntese de novos PBPs sem grande afinidade para os β -lactâmicos conferem às estirpes resistência a estes antibióticos.^{20;21}

iv. Genes que codificam enzimas que destroem o antibiótico

A produção de enzimas capazes de inativarem as moléculas antibióticas é um dos mecanismos de acção mais frequente e constantemente renovado pois, sempre que aparece um novo antibiótico surge também uma nova enzima para o destruir. Assim, “emergem” as carbapenemases, capazes de destruir os carbapenemos, antibióticos de último recurso, utilizados em infecções graves por microrganismos Gram-negativo produtores de ESBL.²²

3. CARBAPENEMASES

As carbapenemases são conhecidas desde a introdução do imipenemo na terapêutica hospitalar, nos anos 80, embora estas enzimas derivassem, principalmente de *Bacillus cereus*, *Bacteroides fragilis* e *Stenotrophomonas maltophilia*.²³ Estas enzimas hidrolisam as penicilinas, todas as cefalosporinas, os monobactamos, os carbapenemos e não são inibidas pelos inibidores das β -lactamases, o que deixa poucas opções terapêuticas.²⁴

3.1. CARBAPENEMOS

Os carbapenemos são antibióticos β -lactâmicos de largo espectro, exercendo actividade em bactérias Gram-positivo e Gram-negativo.²⁴ (Figura 2) São indicados para a utilização em infecções graves por agentes multirresistentes. Representam em muitos casos a última alternativa terapêutica, pelo que devem ser preservados e utilizados apenas em situações seleccionadas em que outros fármacos não são eficazes, sob pena de favorecer a proliferação de estirpes resistentes a todos os antibióticos disponíveis.²⁵

Os carbapenemos diferem das penicilinas no anel que contem uma dupla ligação entre o carbono 2 e 3, e o átomo de enxofre que é substituído por um carbono, na posição 1.²⁶

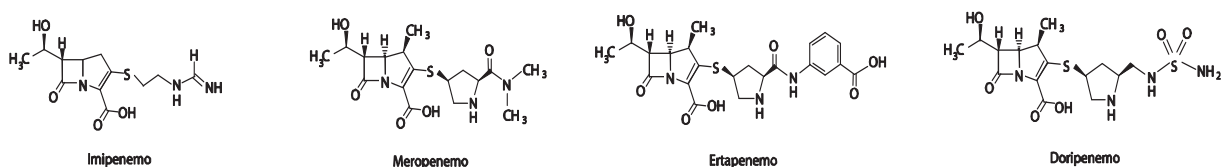


Figura 2: Estrutura química dos carbapenemos: imipenemo; meropenemo; ertapenemo e doripenemo (Adaptado de Zhanel et al, 2007).

O primeiro carbapenemo a ser descoberto foi a tienamicina, nos anos setenta, produzido a partir do microrganismo *Streptomyces cattleya*.²⁷ A instabilidade desta molécula levou ao desenvolvimento de um novo derivado, o imipenemo. Contudo, este antibiótico é sujeito à degradação enzimática da dehidropeptidase (DHP-I) renal e para ser usado na prática clínica tem que ser administrado em conjunto com a cilastatina, que é uma molécula inibidora daquela enzima. A acção da cilastatina estende-se também, à prevenção da nefrotoxicidade provocada pelo imipenemo, quando administrado em monoterapia.^{26;27}

O meropenemo surgiu depois, tendo a vantagem de não ser degradado pela DHP-I e ser uma molécula mais estável. Mas, tanto o imipenemo como o meropenemo têm tempos de semivida curtos, exigindo múltiplas administrações diárias.²⁶ O ertapenemo foi desenvolvido de modo a ter tempos de semivida mais longos o que resulta numa única administração diária. No entanto é uma molécula mais instável em presença de estirpes produtoras de ESBL.²⁸

Os carbapenemos, sendo β -lactâmicos, não se difundem facilmente através da membrana externa bacteriana, tendo que entrar nas bactérias Gram-negativo, através de proteínas existentes na membrana externa: as porinas. Após atravessarem o espaço periplasmático, os carbapenemos acetilam as PBPs inibindo a formação do peptidoglicano.²⁷

O uso de carbapenemos está indicado no tratamento de infecções graves como pneumonia nosocomial, infecções urinárias complicadas, infecções intra-abdominais complicadas e neutropenia febril.^{28;29} Estes antibióticos, sendo quase o último recurso, só deveriam ser utilizados em presença de estirpes produtoras de ESBL, associada à resistência de outras classes de antibióticos como as quinolonas e os aminoglicosídeos. O seu uso indiscriminado e a falta de políticas restritivas de vigilância aos antibióticos levaram a que a resistência aos carbapenemos, principalmente por produção de carbapenemases, seja um problema mundial.^{30;23;10}

3.2. CLASSIFICAÇÃO DAS CARBAPENEMASES

As carbapenemases são enzimas que inibem a maioria dos β -lactâmicos e encontram-se, fundamentalmente em *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa*.³¹

A classificação das β -lactamases pode ser funcional ou genética: classificações de Bush e de Ambler, respectivamente.^{31;32} A classificação mais simples baseia-se na sequência nucleotídica, em que as β -lactamases se dividem em quatro classes moleculares: A; B, C e D (classificação de Ambler).³³

As carbapenemases dividem-se em dois grupos de acordo com o seu centro activo: serina carbapenemases que pertencem às classes A e D e metalo- β -lactamases que pertencem à classe B (classificação de Bush).³²

3.2.1. Classe A

Esta classe inclui as enzimas dos grupos KPC, IMI, SME, NMC e GES que têm serina no seu centro activo e são inibidas pelo ácido borónico.^{34;33} São resistentes aos carbapenemos a vários níveis, desde a susceptibilidade diminuída até à completa resistência. As SME, NMC e IMI são normalmente, enzimas cromossómicas, a primeira encontrada em *Serratia marcescens*, e as outras, esporadicamente, detectadas em *Enterobacter cloacae*. As enzimas GES são encontradas nos integrões e plasmídeos em *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa*. As KPC também se localizam, normalmente em elementos móveis, como plasmídeos, integrões e transposões, sendo prevalentes em KP e outras Enterobactérias.^{33;32;35}

3.2.2. Classe B

As metalo- β -lactamases (MBL) incluem as famílias das β -lactamases VIM, IMP, SPM e NDM, têm zinco no seu centro activo e são inibidas pelo EDTA. Além dos carbapenemos, as MBL hidrolisam a maioria dos β -lactâmicos com excepção dos monobactâmicos, cujo representante é o aztreonamo.³³

A primeira MBL foi identificada no Japão, em 1990, a partir de uma estirpe de *P.aeruginosa* e denominou-se como IMP-I.³⁶ Na Europa, em 1997, foi identificada a VIM-I, também numa estirpe de *P.aeruginosa*.³⁷

Actualmente as MBL são responsáveis por surtos de resistência aos carbapenemos, em *K. pneumoniae* e outras Enterobactérias, *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.³⁸ Mais recentemente, em 2008, foi identificada a primeira enzima NDM-I, num isolado de *K. pneumoniae* de um doente oriundo da Índia e que tinha várias co-morbilidades.^{39;40} Esta enzima encontra-se amplamente disseminada em Enterobactérias na Ásia.⁴¹

3.2.3. Classe D

As carbapenemases OXA são encontradas maioritariamente em *A. baumannii*. A primeira β -lactamase OXA com actividade hidrolítica para os carbapenemos, foi descrita em *A. baumannii*, em 1993.⁴²

As β -lactamases OXA-48 hidrolisam as penicilinas e os carbapenemos mas não as cefalosporinas de 3ª geração.⁴³ Como muitas estirpes produtoras de OXA-48, exibem susceptibilidade às cefalosporinas de espectro alargado e apenas diminuição da susceptibilidade aos carbapenemos o seu reconhecimento fenotípico e detecção podem tornar-se desafiantes

e passar despercebidos.⁴⁴ O gene OXA-48 é relativamente pouco comum, e na maioria das vezes está localizado num único plasmídeo, que entretanto se disseminou por diferentes espécies de Enterobactérias.⁴⁵

Em Istambul, em 2001, a partir da urina de um doente queimado, foi isolada a primeira KP produtora de OXA-48 que apresentava resistência a todos os β -lactâmicos e carbapenemos. Esta KP, embora fosse resistente às cefalosporinas de 3ª geração, apresentava baixas CMI.⁴⁶ Surtos de Enterobactérias produtoras de OXA-48 têm sido descritos na Turquia, na Tunísia, no Senegal e mais recentemente, em países da Europa nomeadamente em França⁴⁷ e em Espanha^{48;49}. Na Colômbia, em Fevereiro de 2015, apareceu o primeiro caso de uma estirpe de *K. oxytoca* produtora de OXA-48.⁵⁰

3.3. EPIDEMIOLOGIA GLOBAL DE *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORA DE CARBAPENEMASES

A primeira KP produtora de carbapenemases (KPC) foi descoberta, em 1996, nos EUA e desde então têm-se disseminado por todos os continentes, embora a exacta epidemiologia da sua expansão varie com a sua localização geográfica. Na maioria das vezes, restam como opções terapêuticas a colistina, a tigeciclina e um aminoglicosídeo, embora haja casos onde se verifica uma pan-resistência, não havendo qualquer antibiótico disponível *in vitro*.⁵¹

No Canadá em 2008 foi anunciada a primeira KP-KPC.⁵²

Na América Latina, nomeadamente na Colômbia, as enzimas KPC são endémicas nas Enterobactérias, e foi em 2005 que, em dois isolados de dois doentes diferentes, que não tinham saído do país, se identificou KP com *bla*_{KPC-2} (ST258 e ST512).^{53; 54} Na Argentina, em 2006, apareceu o primeiro isolado produtor de KPC-2. O programa de vigilância detectou casos esporádicos em 2008, e a partir de meados de 2009 registou uma disseminação abrupta de um clone de KP: ST258.⁵⁵ Actualmente, no Brasil, KP-KPC-2 é endémica, estando também, descritos isolados recolhidos dos esgotos hospitalares.⁵⁶

Na Índia, os primeiros microrganismos identificados com KPC foram *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* de doentes envolvidos em ensaios clínicos, entre 2002 e 2006. Mas neste país, as carbapenemases mais prevalentes são as metalo- β -lactamases NDM, seguidas de OXA-48.⁴⁰

Na China, em 2004, o primeiro isolado foi identificado num doente internado na unidade de cuidados intensivos de um hospital da Província de Zhejiang. Passado pouco tempo, uma grande variedade de Enterobactérias KPC positivas foi identificada no Este da China. A

carbapenemase KPC-2 é a preponderante neste país e o clone dominante é o ST11 que é relacionado com o ST258.⁵⁷

Na Austrália e Nova Zelândia existem <1% de Enterobactérias produtoras de KPC. Os casos esporádicos apareceram em doentes que tinham viajado para zonas endémicas de KP-KPC. O primeiro isolado da Austrália foi de um doente que tinha estado de férias na Grécia, assim como, o primeiro isolado da Nova Zelândia foi de um doente que veio repatriado de um hospital chinês.⁵⁸

Na Europa quase todos os países reportam KP-KPC.⁵⁹ No Reino Unido, há relato da primeira KP-KPC em 2007. Demonstrou-se que em 2008 e 2009 predominava a KP ST258 em doentes (13 isolados) que tinham viajado para a Grécia, Chipre e Israel. Este padrão mudou consideravelmente e registou-se um aumento abrupto de isolados (216 em 2010 e 368 em 2011) com um padrão diferente,⁶⁰ resultado de uma transmissão horizontal dos plasmídeos IncFIIK, relacionados com o plasmídeo Israelita pKpQIL entre KP e outras Enterobactérias. Muitos destes isolados mantiveram-se susceptíveis às quinolonas e aos aminoglicosídeos, contrastando com o genótipo ST258 que tem um perfil de resistência característico (normalmente só sensível à colistina, à tigeciclina e à gentamicina).⁵¹

Os primeiros isolados KP KPC positivos relacionados com a Grécia foram identificados, em 2007, em França e na Suécia, em dois doentes que tinham sido previamente hospitalizados em território Grego e em Heraklion, na ilha de Creta. Nos dois anos seguintes registaram-se vários surtos em diferentes hospitais gregos e aquela estirpe acabou por se disseminar por todas as unidades de saúde, incluindo as de cuidados continuados. Em 2014 a Grécia registou 62,3% de KP resistentes aos carbapenemos.^{61; 62; 63}

Em França, em 2005, o primeiro isolado clínico de KP KPC-2 é proveniente da urina e do sangue de um doente que três meses antes tinha estado internado num hospital de Nova Iorque.^{64;65} Em 2008 identificam-se KP KPC-2 em isolados de exsudados de feridas de um doente transferido da Grécia. Em 2009 é publicado o primeiro caso “nativo” de *E. coli* ST131 produtora de KPC-2 e CTX-M-15.⁶⁶ Em 2012, em França, estabeleceram o programa de vigilância epidemiológica e foram identificados 19 casos de KP KPC-2 e KPC-3.⁵¹

Em 2008, em Itália identifica-se a primeira KP KPC-3 num doente com infecção intrabdominal complicada. O determinante genético estava localizado no transposição Tn4401, que foi descrito nos isolados ST258, em Israel. As KP KPC-3 espalharam-se rapidamente por todo o país como reportado pelo sistema de vigilância EARS-Net, que mostra que a resistência aos carbapenemos aumentou de 1-2% em 2009 para 30% em 2011.^{67; 68}

Em Espanha, em 2009, um homem de 66 anos foi o primeiro dos oito casos colonizados

com KP KPC-3, dos quais sete eram ST384 e o outro ST388.⁶⁹ Num estudo realizado em Espanha, em 2013, entre Fevereiro e Maio, foram recolhidos 282 isolados de KP não sensíveis aos carbapenemos, de 83 hospitais. Verificou-se que 83,3% das KP eram produtoras de OXA-48 e apenas 1% de KPC.⁷⁰

Em Portugal aparece a primeira publicação, em 2012, relatando uma estirpe de *E.coli* KPC-2 isolada a partir da água de um rio.⁷¹ Entre Novembro de 2009 e Junho de 2011 recolheram-se do Centro Hospitalar Lisboa Norte, 41 isolados clínicos de KP, *K. oxytoca*, *Enterobacter aerogenes*, *E. coli* e *Citrobacter freundii*, sendo que todos eram produtores de uma carbapenemase KPC-3.⁷² Em 2013, houve um surto de 18 KP KPC-3 nos Hospitais da Universidade de Coimbra.⁷³

4. CONTROLO DE INFECCÕES

Klebsiella pneumoniae tornou-se um problema emergente e foi reconhecida como a causa principal de infecções adquiridas no Hospital. A sua crescente resistência aos carbapenemos e o conseqüente insucesso no tratamento de infecções nosocomiais torna-a um alvo preocupante. É premente a necessidade de um controlo de infecções eficaz para prevenir o aparecimento de novos casos de doentes colonizados/infectados.⁷⁴

Algumas estirpes deste microrganismo têm uma clara tendência para se disseminar nas instituições de saúde e exibem uma capacidade particular de causar surtos nosocomiais. A transmissão cruzada através das mãos do pessoal da saúde ou de reservatórios ambientais parece ser importante na disseminação nosocomial das estirpes de KP tanto em situações epidémicas como endémicas.⁷⁵ No entanto, também está descrito um surto causado por alimentos contaminados, sugerindo a transmissão através da cadeia alimentar.⁷⁶

"Colonização" define-se como a localização de bactérias no intestino, na pele, no nariz, na garganta ou em qualquer outra parte do corpo de um ser humano ou animal. Quando em pacientes hospitalares, a palavra colonização refere-se a portadores de bactérias patogénicas que não apresentam sinais nem sintomas de infecção.⁷⁷

Nos Estados Unidos da América, o "Centers for Disease Control and Prevention" (CDC) recomenda que seja efectuado o rastreio de doentes relativamente à colonização com microrganismos não susceptíveis aos carbapenemos, sempre que seja reconhecida uma estirpe de Enterobactéria resistente a carbapenemos, num hospital.⁷⁸

Em 2013, a "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing" (EUCAST) publicou uma lista de medidas para prevenção e controlo de infecções por microrganismos Gram negativo multirresistentes que se dividem em cinco categorias: medidas de higiene das mãos; rastreio dos novos pacientes; precauções de contacto; limpeza do ambiente hospitalar e vigilância antimicrobiana.⁷⁵

II. OBJECTIVOS

Sendo *Klebsiella pneumoniae* um patógeno nosocomial cujas alternativas terapêuticas, por vezes, se tornam escassas devido ao aumento de resistência aos carbapenemos, é imperativo entender a sua epidemiologia hospitalar local bem como os mecanismos associados a esta resistência. Este estudo é determinante para que os organismos de vigilância possam actuar activa e preventivamente. Nesse sentido colheram-se os dados relativos aos isolados de KP do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC), com o objectivo geral de se entender a evolução da resistência em KP e, em particular, aos carbapenemos neste Centro Hospitalar Terciário. Os objectivos específicos são:

1. Avaliar a susceptibilidade de isolados clínicos de KP entre 2012 e 2016;
2. Estudar a evolução da resistência aos antibióticos nos últimos cinco anos, em particular aos carbapenemos;
3. Pesquisar a presença de genes que codificam as carbapenemases: KPC; NDM; IMP; VIM e OXA-48 nos isolados clínicos de KP com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

I. RECOLHA DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*

Para a realização deste trabalho, foram recolhidos os dados de 6219 isolados de KP colhidas de 6219 doentes entre 1 de Janeiro de 2012 e 31 de Dezembro de 2016. As amostras foram colhidas de doentes internados nas diferentes enfermarias do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. O CHUC tem 1808 camas, distribuídas por seis pólos diferentes: 1271, Hospital da Universidade de Coimbra (HUC); 222, Centro Hospitalar de Coimbra (CHC); 116, Hospital Pediátrico (HP); 90, Maternidade Bissaya Barreto (MBB); 81, Maternidade Daniel de Matos (MDM) e 28, Hospital Psiquiátrico Sobral Cid (HSC).

Até Novembro de 2014 existiam dois laboratórios de microbiologia: um nos CHC que estudava os produtos provenientes dos CHC; HP; HSC e MBB e outro nos HUC que estudava as amostras dos doentes dos HUC e MDM. A partir daquela data houve fusão dos laboratórios de microbiologia e passaram a tratar-se todos os produtos no laboratório de microbiologia dos HUC.

A identificação e os estudos de susceptibilidade aos diferentes antimicrobianos foram realizados pelos sistemas automatizados “MicroScan WalkAway” (Dade Behring) nos CHC até Novembro de 2014, e “Vitek 2” e “Vitek MS” (BioMérieux) nos HUC, seguindo as instruções do fabricante.

Os produtos biológicos, a partir dos quais se recolheram os isolados, foram: secreções brônquicas; sangue; líquidos biológicos; cateteres e drenos; urina e exsudados purulentos.

1.1. MÉTODOS UTILIZADOS NA IDENTIFICAÇÃO DE *Klebsiella pneumoniae*

1.1.1. Vitek 2® BioMérieux

O VITEK 2 é um sistema automatizado de microbiologia que utiliza tecnologia baseada no crescimento bacteriano. São utilizadas “cartas” com reagentes colorimétricos que são incubadas com as bactérias, e os resultados interpretados automaticamente. (Figura 3)

O procedimento foi o seguinte: utilizou-se uma zaragatoa e suspendeu-se um número suficiente de colónias de uma cultura pura em 3,0 mL de solução aquosa de NaCl 0,45% e pH entre 4,5 e 7,0; num tubo de plástico transparente de 12 x 75 mm (Poliestireno) até se obter uma densidade semelhante à da suspensão de 0,5 da escala de McFarland, com a ajuda do densitómetro, DensiChek® (BioMérieux).

As “cartas” de identificação têm 64 poços, cada um com um substrato diferente. Os substratos servem para testar as várias actividades metabólicas tais como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibitórias. As “cartas” de identificação e o tubo de ensaio com a suspensão de microrganismos são colocados numa “rack” que é introduzida no equipamento e transportada para uma câmara onde é submetida a vácuo. Depois, a suspensão com o microrganismo é forçada a passar através do tubo de transferência e enche os poços da carta de identificação. As cartas são incubadas a 35,5° C +/- 1° C. A cada 15 minutos são lidas num sistema óptico a três comprimentos de onda diferentes e, em seguida, retornam à incubadora até à leitura seguinte. Os dados são recolhidos em intervalos de 15 minutos e os cálculos são feitos mediante a comparação dos resultados das reacções com a base de dados do equipamento cuja

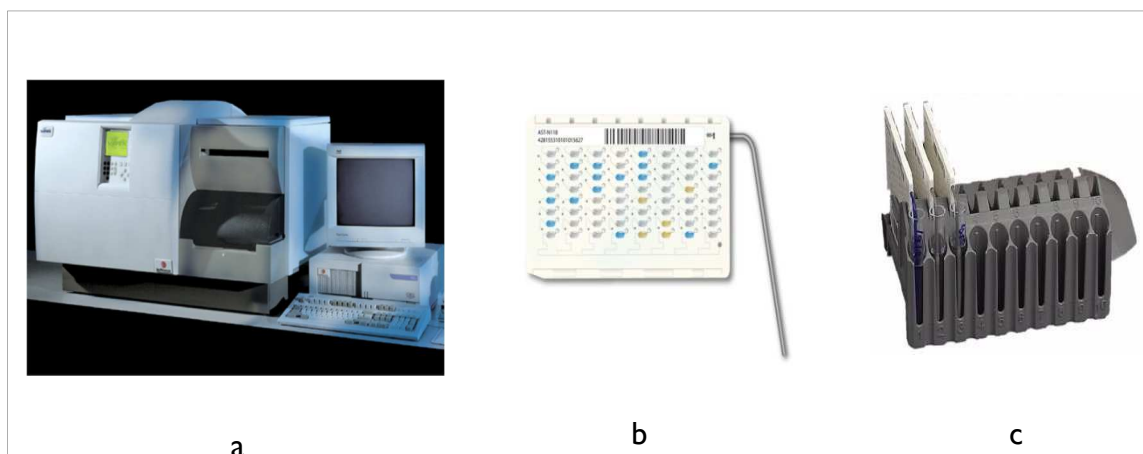


Figura 3: a, equipamento Vitek 2® BioMérieux; b, exemplo de carta de identificação; c, Rack com carta de identificação e tubo com suspensão bacteriana

interpretação leva à identificação do microrganismo.⁷⁹ (Figura 3)

1.1.2. VITEKMS® BioMérieux

A tecnologia “Matrix-Assisted Desorption/Ionization” (MALDI) “Time-Of-Flight Analysis” (TOF) baseia-se na espectrometria de massa (MS) que é uma técnica analítica para determinar (classificar e contar) a composição elementar de uma amostra ou molécula. O princípio da MS consiste em ionizar compostos químicos para gerar moléculas carregadas e para medir sua relação massa/carga. Estas características moleculares funcionam como uma “impressão digital” e podem ser utilizadas para identificação bacteriana rápida a partir de colónias bacterianas isoladas.

A tecnologia MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight) usada pelo VITEK® MS (BioMérieux) examina os padrões de proteínas detectadas directamente de bactérias intactas. A amostra a ser analisada é misturada com uma matriz (α -Cyano-4-hydroxy cinnamic acid and Acetonitrile) e é aplicada numa placa de metal e irradiada com um laser. A matriz absorve a luz laser e juntamente com a amostra são vaporizadas, ganhando uma carga eléctrica (ionização). Os campos electromagnéticos do equipamento MS guiam os iões pelo “tubo” do espectrómetro de massa e o tempo de voo separa-os de acordo com a sua relação massa/carga gerando picos, quando passam no detector. Estes são depois comparados com os perfis existentes na base de dados para se identificar o microrganismo. (Figura 4)

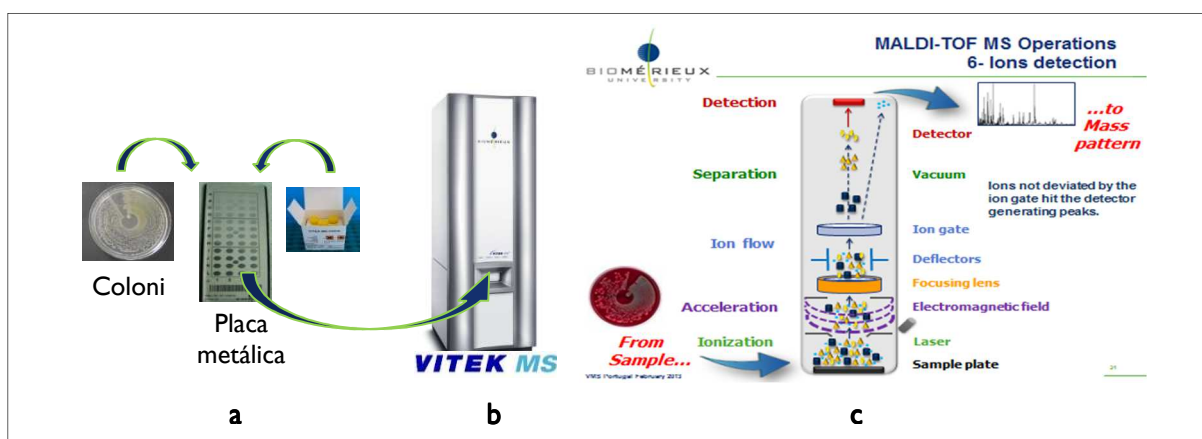


Figura 4: a, colónias bacterianas, são colocadas no poço da placa metálica juntamente com a matriz; b, VitekMS® BioMérieux; c, imagem ilustrativa do que se passa no interior do equipamento Vitek MS® (figuras gentilmente cedidas por BioMérieux, Portugal)

O procedimento consistiu em: com uma ansa colocou-se uma colónia num dos poços da lâmina e adicionou-se 1 µl de matriz. Deixou-se secar até cristalizar. Depois, colocou-se a lâmina no equipamento e obteve-se a identificação do microrganismo ao fim de 20 minutos.

1.1.3. MicroScan Walkaway® (Siemens)

O MicroScan Walkaway® (Siemens) é um equipamento automatizado, que incuba automaticamente a suspensão bacteriana por um período de tempo entre 18 a 24h podendo re-incubar até às 48h. Adiciona reagentes e executa a leitura dos painéis. Identifica os microrganismos e realiza os respectivos testes de susceptibilidade a partir de uma suspensão prévia. Este sistema consiste em painéis de 96 poços, impregnados com a série bioquímica (cerca de 30 substratos) para a identificação bacteriana e os agentes antimicrobianos com suas respectivas diluições para a susceptibilidade antimicrobiana com concentração inibitória mínima. Contém cerca de 20 antibióticos por painel. Apresenta uma dupla metodologia de leitura: a metodologia colorimétrica (espectrofotómetro modificado com seis comprimentos de onda e fibras ópticas) que é utilizada para a leitura dos painéis cromogénicos convencionais e painéis rápidos cromogénicos e a metodologia fluorimétrica que é usada para a leitura dos painéis rápidos fluorogénicos. O equipamento tem acoplado um computador capaz de armazenar todos os registos dos pacientes e respectivas identificações de microrganismos e antibiogramas. (Figura 5)

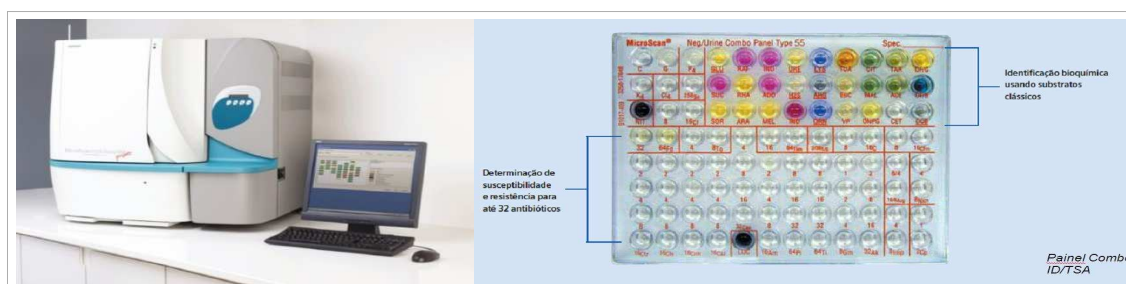


Figura 5: Equipamento MicroScan® (Siemens) e respectivas galerias de identificação e antibiograma.

2. DETERMINAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*

Os isolados clínicos de KP foram testados para determinar a sua susceptibilidade aos antimicrobianos nos equipamentos automáticos “MicroScan WalkAway” e “Vitek 2”. Os antibióticos testados por rotina foram: ampicilina; amoxicilina/ác.clavulânico; piperacilina/tazobactam; cefuroxime; ceftazidima; cefotaxime; meropenemo; ertapenemo; imipenemo; ampicacina; gentamicina; tobramicina; ciprofloxacina; levofloxacina e trimetoprim/sulfametoxazol (cotrimoxazol). A interpretação dos resultados até Dezembro de 2013 foi feita segundo os critérios do “Clinical Laboratory Standards Institute” (CLSI)⁸⁰ e a partir de Janeiro de 2014 pelo EUCAST.⁸¹

Quando surgiram os primeiros isolados resistentes aos carbapenemos, e sempre que o

resultado do método automático suscitou dúvidas, fez-se a confirmação pelo método manual recorrendo a tiras de E-teste. Este método também foi sempre utilizado para determinação da CMI) da tigeciclina.

2.1. VITEK-2[®] (BioMérieux)

O procedimento utilizado para a determinação da susceptibilidade aos antimicrobianos é o mesmo que foi descrito para a identificação de microrganismos. O que varia é a carta que, embora tenha os mesmos 64 poços, tem 3 a 4 poços com diferentes concentrações para cada antibiótico e um poço que serve de controlo positivo. Os antibióticos estão liofilizados e são reidratados quando a suspensão de microrganismo é aspirada para o interior da carta. Para medir o crescimento do microrganismo são utilizados sistemas ópticos que recorrem à luz visível. Estas ópticas de transmissão baseiam-se numa leitura de luz inicial de um poço antes do crescimento significativo ter começado. Amostras periódicas de transmitância de luz do mesmo poço medem o crescimento do microrganismo pela quantidade de luz que é impedida de passar pelo poço.

A “carta” de susceptibilidade VITEK baseia-se na técnica de concentração inibitória mínima de microdiluição com concentrações equivalentes ao método padrão. Os cálculos das CMIs são feitos com base nas características de crescimento observadas. O VITEK 2 compara a distância entre os valores observados e os esperados para cada classe de CMI, partindo de dados compilados de um grande número de microrganismos (Método de MI está ligado a uma identificação de um microrganismo para determinar uma interpretação de categoria em Sensível (S); Intermédio (I) e Resistente (R).⁸²

2.2. MICROSCAN[®] (Siemens)

Método descrito previamente (ver 1.2.3.).

2.3. MÉTODO MANUAL E-TEST

A metodologia de E-test consiste na aplicação de tiras de plástico (tiras de E-test: AB bioMérieux, Solna, Suécia), impregnadas de antibiótico segundo um determinado gradiente de concentração, em placas de gelose de Mueller Hinton (BioMérieux, França), previamente inoculadas com suspensão bacteriana de 0,5 McFarland. Um dos lados da tira contem a escala de CMI ($\mu\text{g/ml}$) correspondente ao gradiente de concentração de antibiótico presente no

verso da tira. As concentrações variam, dependendo do antibiótico testado, entre 0,002 a 32 µg/ml e 0,016 a 256 µg/ml. Após incubação a 37°C durante 18-24 horas, observa-se, ou não, uma zona de inibição do crescimento bacteriano, de forma elíptica. A concentração mínima inibitória é lida na intercepção do vértice da elipse com a tira de E-Teste.

3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE β-LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)

3.1. VITEK 2® (BioMérieux)

Da carta de antibiograma de bacilos Gram-Negativo do Vitek2 fazem parte seis poços que contêm respectivamente: cefepime, 1,0 µg/ml; cefotaxime, 0,5 µg/ml e ceftazidime 0,5 µg/ml, e combinados com ácido clavulânico (10; 4 e 4 µg/ml, respectivamente). O crescimento em cada um dos poços é avaliado quantitativamente pelo leitor óptico. A diminuição de crescimento no poço com ácido clavulânico relativamente ao poço só com uma cefalosporina é indicativo de produção de β-lactamases de largo espectro (ESBL) e o resultado é interpretado e validado pelo *software* Advanced Expert System (AES) do Vitek.⁸³

3.2. MicroScan Walkaway® (Siemens)

Do painel MicroScan ESBL Plus fazem parte os seguintes agentes antimicrobianos (intervalos de concentração em µg/ml): cefotaxima, 0,5-128; cefotaxima/clavulanato, 0,125/4-16/4; ceftazidima, 0,5-128; ceftazidima/clavulanato, 0,125/4-16/4. A diferença nos poços de crescimento entre as cefalosporinas e as cefalosporinas com o ácido clavulânico é lida e interpretada pelo *software* do equipamento.

3.3. MÉTODO MANUAL

O método utilizado consistiu na pesquisa de sinergismo entre o ácido clavulânico (CLA) e a ceftazidima (CAZ), o cefepime (FEP), a cefoxitina (FOX), o cefotaxime (CTX) e o aztreonamo (AZT), usando-se a técnica de Kirby-Bauer, em que se inoculou uma placa de Mueller Hinton (MH), com uma suspensão bacteriana com turvação idêntica à de 0,5 McFarland, colocaram-se o disco de amoxicilina/ácido clavulânico (20/10µg) no centro da placa e os outros cinco discos de antibióticos, CAZ (30µg); FEP (30µg); FOX (30µg); CTX (30µg) e a AZT (30µg); a uma distância entre 15 a 20 mm do disco com ácido clavulânico.⁸⁴ Após incubação a 37°C, durante 18-24 horas, verificou-se se houve um aumento (maior ou igual a

5mm), extensão ou deformação das zonas inibitórias das cefalosporinas e AZT, induzido pelo CLA, o que indica produção de ESBL.⁸⁴ Em paralelo com este método fez-se também a pesquisa fenotípica de ESBL com tiras de E-teste em que de um lado têm impregnado uma cefalosporina de 3ª geração (TZ ou CT) e do outro, uma cefalosporina com CLA (TZL ou CTL). Uma diferença de CMI ≥ 8 entre os dois ou a presença de “zonas fantasma” e deformações da elipse são sugestivos de presença de ESBL. (Figura 6)

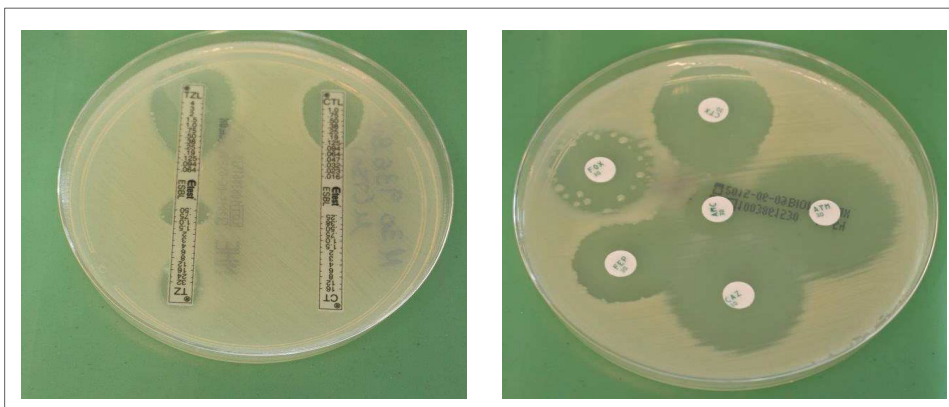


Figura 6: Fotografias de uma estirpe produtora de ESBL: pesquisa fenotípica.

4. DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES: PESQUISAS FENOTÍPICA E GENOTÍPICA

4.1. Rapidec Carba NP® (BioMérieux): PESQUISA FENOTÍPICA

É um teste rápido cujo princípio se baseia na detecção da hidrólise do anel beta-lactâmico do imipenemo e que se visualiza pela mudança de cor do indicador, vermelho de fenol. Distingue produtores de carbapenemases de outros mecanismos associados à resistência dos carbapenemos e é capaz de detectar metalo-beta-lactamases (IMP; VIM e NDM); KPC e OXA-48.⁸⁵

O teste foi realizado conforme recomendado pelo fabricante. Distribuíram-se 100ul de Suspensão API® (BioMérieux) em cada um dos três poços da galeria (Figura 7): poço a com solução vermelho de fenol; poço b com controlo de turvação e poço c com tampão de lise. Deixou-se entre 4 a 10 min à temperatura ambiente. A partir de placas de ágar Tripticase soja (BioMérieux) incubadas a 37°C, durante 18 a 24h, colheram-se para o poço c colónias bacterianas suficientes até que a turvação dos poços c e b se iguallassem. Incubou-se durante 30min à temperatura ambiente e depois transferiram-se 25ul do poço c para os

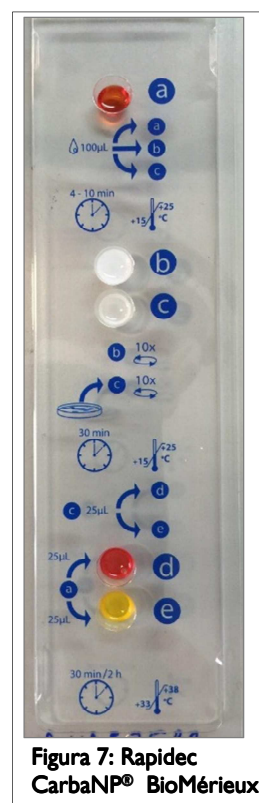


Figura 7: Rapidec CarbaNP® BioMérieux

poços **d** (poço controlo) e **e** (poço com imipenemo) e 25ul do poço **a** para os poços **d** e **e**. A galeria foi incubada a 37 ° C durante 30min, e fez-se a primeira leitura. Se o resultado, ao fim daquele tempo, foi negativo voltou-se a incubar até perfazer 2h e leu-se novamente. Um teste positivo corresponde à cor amarela ou laranja, enquanto a cor vermelha indica um resultado negativo.^{85;86}

4.2. BD MAX[®] (Quilaban): PESQUISA GENOTÍPICA

O BD MAX CRE[®] Assay é um ensaio que detecta três genes de resistência aos carbapenemos (*bla*_{KPC}; *bla*_{OXA-48}; *bla*_{NDM}) encontrados predominantemente em Enterobactérias. O sistema BD MAX[®] automatiza a extracção de amostras, amplificação e detecção, usando PCR em tempo real.

Fez-se uma suspensão bacteriana de 0,5 McFarland, pipetaram-se 25 µl para o tubo tampão de amostra BD MAX[®] CRE e agitou-se no vórtex. O tubo tampão de amostra é colocado no equipamento BD MAX[®] e ocorrem os seguintes procedimentos automatizados: as células bacterianas são lisadas a alta temperatura, o DNA é extraído com a ajuda de esferas magnéticas e os ácidos nucleicos ligados são lavados e eluídos por calor no Tampão de Eluição. Então, uma alíquota do DNA eluído é adicionada aos reagentes de PCR que contêm os *primers* para os genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48} e *bla*_{NDM}. Os alvos amplificados são detectados com sondas de hidrólise marcadas com fluoróforos distintos. A amplificação, detecção e interpretação dos sinais são feitas automaticamente pelo equipamento. O ensaio inclui, também, um Controlo de Processamento de Amostras que está presente no tubo de extracção. Aquele sofre a extracção, concentração e amplificação; etapas que servem para monitorizar a presença de substâncias inibidoras, bem como a ineficiência do processo devido a falhas do instrumento ou reagente.

4.3. GenXpert[®] (WERFEN): PESQUISA GENOTÍPICA

O Xpert Carba-R Assay da Cepheid, executado no equipamento GeneXpert[®] consiste num teste diagnóstico *in vitro* qualitativo concebido para a detecção e diferenciação rápida das sequências dos genes *bla*_{KPC}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{NDM}, *bla*_{VIM} e *bla*_{IMP-I} associados à não susceptibilidade a carbapenemos em bactérias Gram-negativo. O GeneXpert (GX) automatiza e integra a preparação de amostras, a extracção e amplificação de ácidos nucleicos e a detecção da sequência-alvo em amostras simples ou complexas, utilizando ensaios de PCR em tempo real. Tem acoplado, um computador e *software* para a execução de testes e visualização

dos resultados. Para realização da técnica, o GX requer a utilização de cartuchos descartáveis, de utilização única, que contêm os reagentes de PCR onde decorre esse processo. Dado que os cartuchos são independentes, é minimizada a contaminação cruzada entre amostras. O ensaio Xpert Carba-R Assay inclui os *primers* para a detecção de sequências de genes *bla_{KPC}*, *bla_{OXA-48}*, *bla_{NDM}*, *bla_{VIM}* e *bla_{IMP-1}*, bem como um controlo de processamento da amostra (CPS) para controlo do processamento adequado da bactéria alvo e para indicar a presença de inibidor(es) na reacção PCR.

Para realização do teste seguiram-se as indicações do fabricante. Colheu-se uma colónia da estirpe a estudar, previamente semeada num meio de agar e incubada a 37°C durante 18 a 24h e fez-se uma suspensão de 0,5 Macfarland em água bidestilada ou soro fisiológico. Pipetaram-se 25 µl daquela suspensão para o “reagente de amostra”, fornecido pelo “kit” e agitou-se 10s no vórtex. Desta, com uma “pipeta de Pasteur”, fornecida pelo “kit”, pipetaram-se 1,7 ml de solução para o cartucho de reacção que se colocou no equipamento. Ao fim de, aproximadamente, 50 min visualizou-se o resultado no computador do equipamento. (Figura8)



Figura 8: Equipamento Gene Xpert[®] Werfen e cartuxo Xpert-Carba-R[®]

5. DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE KPC

Em isolados em que se suspeitou de produção de KPC, procedeu-se à sua caracterização molecular, recorrendo a colaboradores da Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra.⁷³

Sucintamente, o DNA foi extraído pelo método de ebulição e *bla_{KPC}* amplificado por PCR com *primers* específicos. Após amplificação, os produtos amplificados foram purificados para serem sequenciados. A sequenciação foi feita na StabVida (Caparica, Portugal). As sequências nucleotídicas foram analisadas e comparadas com as existentes na base de dados BLAST.

Os ensaios de conjugação foram feitos nas KP produtoras de KPC. Todas as KP KPC foram utilizadas como estirpes dadoras e a *E.coli*J53 (resistente à azida de sódio) como célula

receptora. Os plasmídeos extraíram-se das células bacterianas usando o Qiagen plasmid Midi Purification kit (Qiagen, Portugal) e o método Kado & Liu method.⁷³ Os grupos de incompatibilidade (Inc) foram identificados de acordo com o protocolo “PCR-based replicon typing” (PRBT).

Para se conhecer a clonalidade das estirpes usaram-se as técnicas “pulsed-field gel electrophoresis” (PFGE) e “multi-locus sequence typing” (MLST).

O estudo encontra-se publicado⁷³ e colocou-se no anexo I.

III.RESULTADOS

I. ORIGEM DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae*

Entre 2012 e 2016 foram recolhidos os dados relativos ao número de doentes com infecções por KP, no Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra. Estudou-se um isolado por doente de um total de 6219 doentes: 1061 em 2012; 1062 em 2013; 1149 em 2014; 1441 em 2015 e 1506 em 2016. (Figura 9)

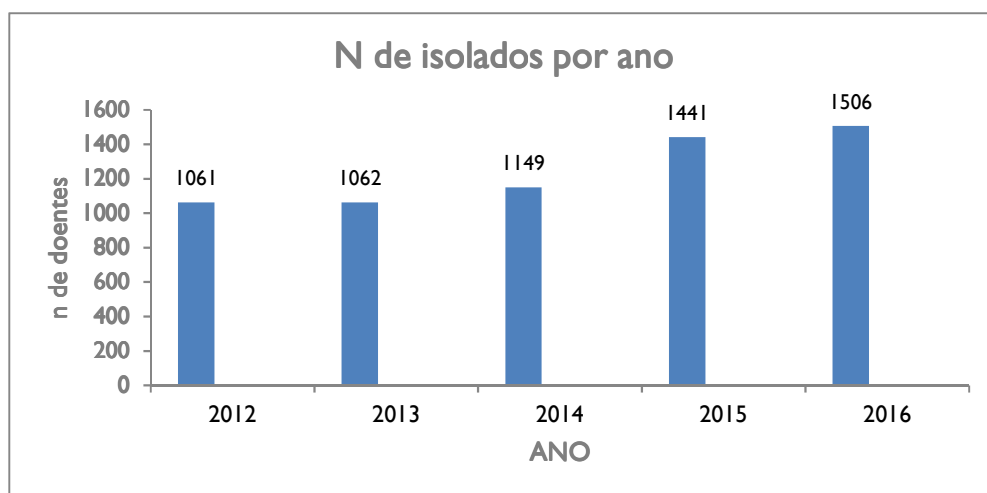


Figura 9: Número de doentes e isolados por ano: 2012; 2013; 2014; 2015 e 2016

Do total de doentes, 51,7% eram do sexo feminino. Observou-se que 7,4% dos doentes tinham idades entre os 0 e os 25 anos; 12,7% entre os 26 e os 50 anos; 36,6% entre 51 e os 75 anos e 43,2%, mais de 75 anos de idade.

Relativamente à distribuição por serviços verificou-se que os isolados eram provenientes

RESULTADOS

de: 31,1% Urgência; 29,7 % Unidades Médicas (Medicina Interna; H. dia Oncologia; Hematologia; Nefrologia; Cardiologia; Pneumologia; Dermatologia; Endocrinologia; Imunoalergologia; Infeciosas; Neurologia; Psiquiatria); 22,5% Unidades Cirúrgicas (Cirurgia Geral; Cirurgia Vascular; Cirurgia Plástica; Unidade de Queimados; Cirurgia Maxilo-Facial; Neurocirurgia; Unidade de Transplantes Renais; Unidade de Transplantes Hepáticos; Cirurgia Cardiotorácica); 10,9% Unidades Médico-Cirúrgicas (Ginecologia/Obstetrícia; ORL; Gastroenterologia; Ortopedia; Urologia); 5,8% Hospital Pediátrico.

Todos os produtos estudados eram de origem hospitalar e isolaram-se KP a partir de: 59% de urinas; 16% de secreções brônquicas (expectorações; lavados bronco-alveolares e aspirados brônquicos); 10% de hemoculturas; 9% de exsudados purulentos (exsudados de feridas cirúrgicas e não cirúrgicas; pús de abscesso, aspirados de feridas); 4% de líquidos biológicos (líquido peritoneal, bÍlis, líquido pleural, líquido sinovial); 2% de outros produtos (pontas de cateter, drenos, tubos endo-traqueais, próteses). (Figura 10)

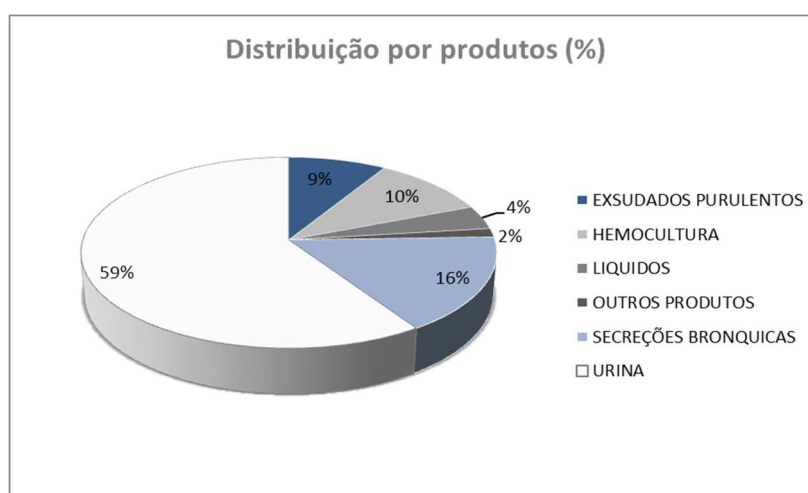


Figura 10: Distribuição das estirpes estudadas por produtos

2. PERFIS DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DOS ISOLADOS CLÍNICOS DOS CHUC

2.1. ANO 2012

Em 2012 estudaram-se 1061 isolados clínicos de KP. Os perfis de antibiogramas foram obtidos através dos equipamentos Vitek2 (bioMérieux®) e MicroScan Walkaway (Beckman Coulter®).

Os antibióticos mais eficazes foram os carbapenemos: meropenemo, imipenemo e ertapenemo com as respectivas sensibilidades 99,3%; 99,7%; 98,7%. Em números absolutos observaram-se 4 (0,4%) isolados com susceptibilidade intermédia ao ertapenemo e sensíveis

ao imipenemo e meropenemo e 10 (0,9%) isolados resistentes ao ertapenemo dos quais três eram também resistentes aos outros carbapenemos, três mostraram susceptibilidade diminuída ao meropenemo e os restantes quatro eram sensíveis. Ainda relativamente aos β -lactâmicos a piperacilina/tazobactam continua a ser uma preferência terapêutica no CHUC apesar de apresentar uma sensibilidade de 70,6%. No que diz respeito às cefalosporinas de 3ª geração, em 2012, o cefotaxime e a ceftazidima apresentaram sensibilidades de 59,4% e 57,8% sendo que 40,3% das KP eram produtoras de β -lactamases de espectro alargado.

A amicacina foi o aminoglicosídeo mais eficaz, seguido da gentamicina e da tobramicina.

Quanto às quinolonas, a levofloxacina (66,3%) mostrou ser mais activa que a ciprofloxacina (52,7%). O cotrimoxazol mostrou uma susceptibilidade de 56,8%. Segundo os dados recolhidos do Vitek2® , 40,3% das estirpes eram produtoras de ESBL. (Figura 11)

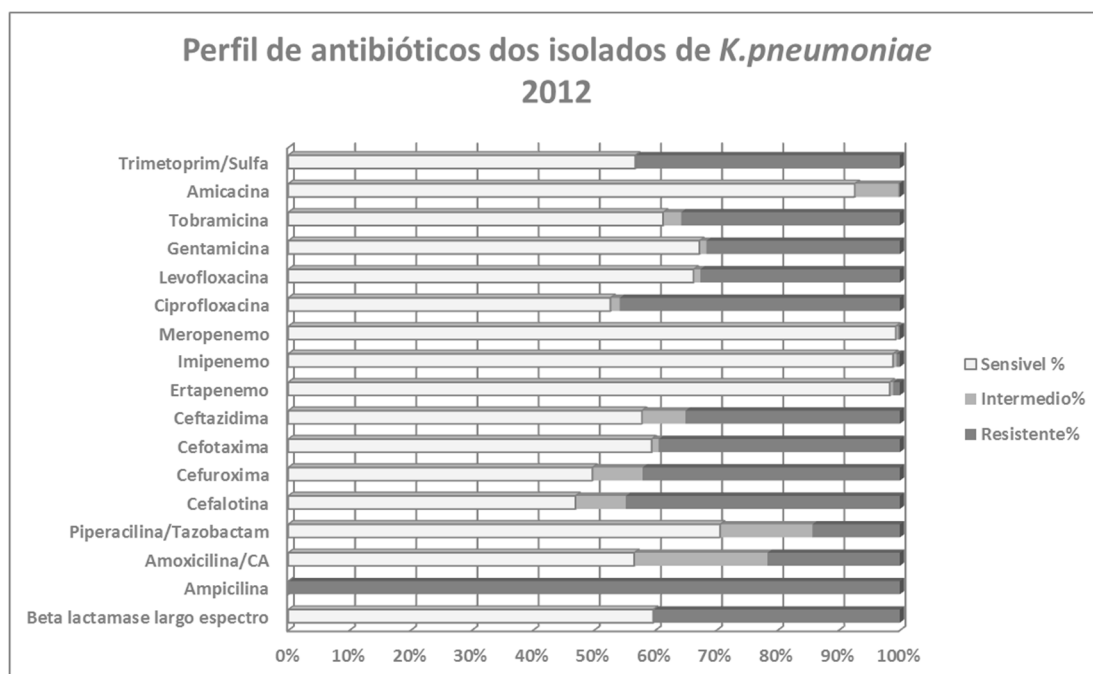


Figura 11: Perfil de antibióticos dos isolados de *K. pneumoniae* no ano de 2012. Relativamente ao item β lactamase de largo espectro a percentagem de sensibilidade corresponde a Negativa e de resistente a Positiva.

2.2. ANO 2013

No ano de 2013 estudaram-se 1062 isolados de KP de 1062 doentes.

Comparativamente com o ano de 2012 o perfil de susceptibilidade dos antibióticos β -lactâmicos: amoxicilina/ac.clavulânico, piperacilina/tazobactam, cefuroxime, ceftazidima, cefotaxime e carbapenemos manteve-se, muito semelhante. Os aminoglicosídeos também não apresentaram diferenças significativas nos seus perfis de susceptibilidade assim como as fluoroquinolonas estudadas. A resistência ao cotrimoxazol aumentou ligeiramente para 46,8%. Em números absolutos a resistência aos carbapenemos aumentou para 27 isolados resistentes

ao ertapenemo, 13 resistentes ao imipenemo e 16 ao meropenemo, o que ditou o alerta para a possibilidade de haver, nos HUC, estirpes produtoras de carbapenemases. (Figura 12)

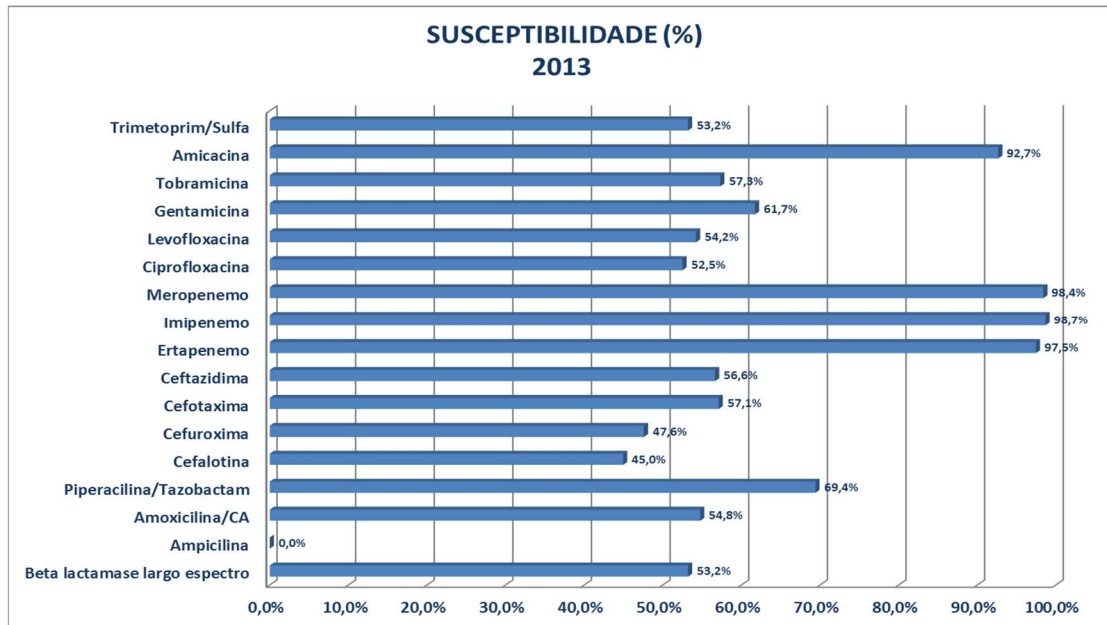


Figura 12: Susceptibilidade (%) aos antibióticos dos isolados de *K.pneumoniae*, no ano de 2013

2.3. ANO 2014

Em 2014 estudaram-se 1149 isolados de 1149 doentes. Neste ano registou-se um aumento de resistência em todos os antibióticos estudados como podemos verificar comparando a Figura 12 com a Figura 13. (Figura 13)

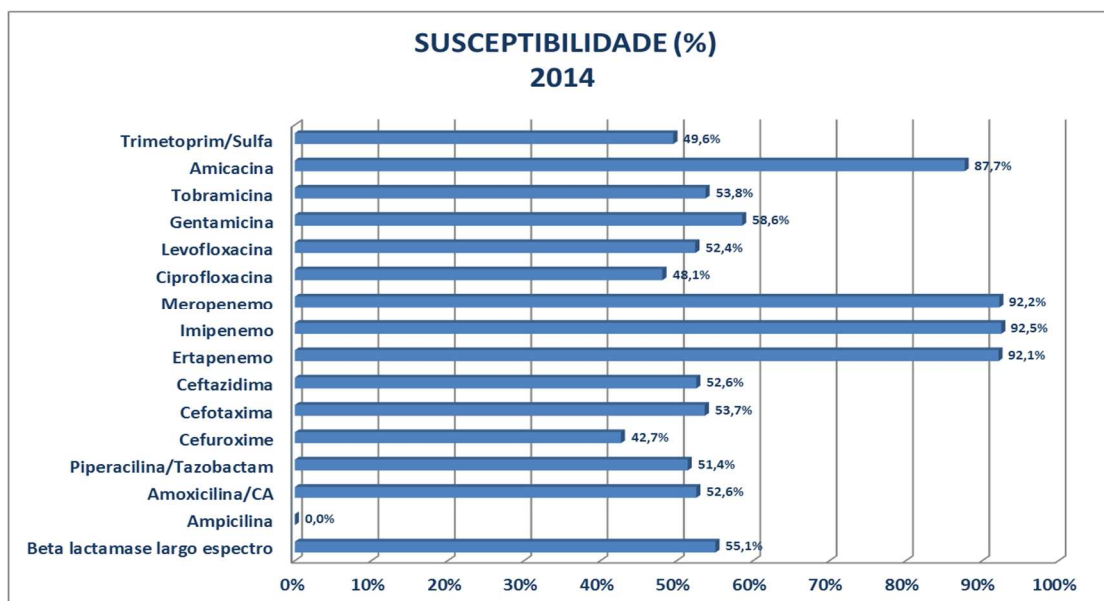


Figura 13: Susceptibilidade (%) aos antibióticos dos isolados de *K.pneumoniae*, no ano de 2014

2.4. ANO 2015

Em 2015 estudaram-se 1449 isolados de 1449 doentes.

O cenário do aumento das resistências em todos os antibióticos estudados manteve-se em 2015 e o aumento da resistência aos carbapenemos foi evidente (0,9% em 2012; 2,2% em 2013; 8% em 2014; 13,1% em 2015). (Figura 14) No final de 2015, nas estirpes com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos, começou-se a fazer o teste RAPIDEC® CarbaNP (BioMérieux) para avaliar a produção de carbapenemases, no sentido de dar uma resposta rápida ao clínico e de se proceder às medidas de prevenção adequadas.

Devido ao perfil de resistência das estirpes produtoras de carbapenemases, passaram-se a estudar também a colistina e a tigeciclina. Observou-se que 183 (95,8%) isolados foram susceptíveis à colistina e 8 isolados (4,2%) foram resistentes. O número de estirpes testadas para a tigeciclina foi de apenas 37 e destas, 33 (86,8%) mostraram ser susceptíveis.

Relativamente à percentagem de estirpes produtoras de ESBL, observou-se que veio a diminuir a partir de 2013 com 46,8%; 45% em 2014 e 41,2% em 2015.

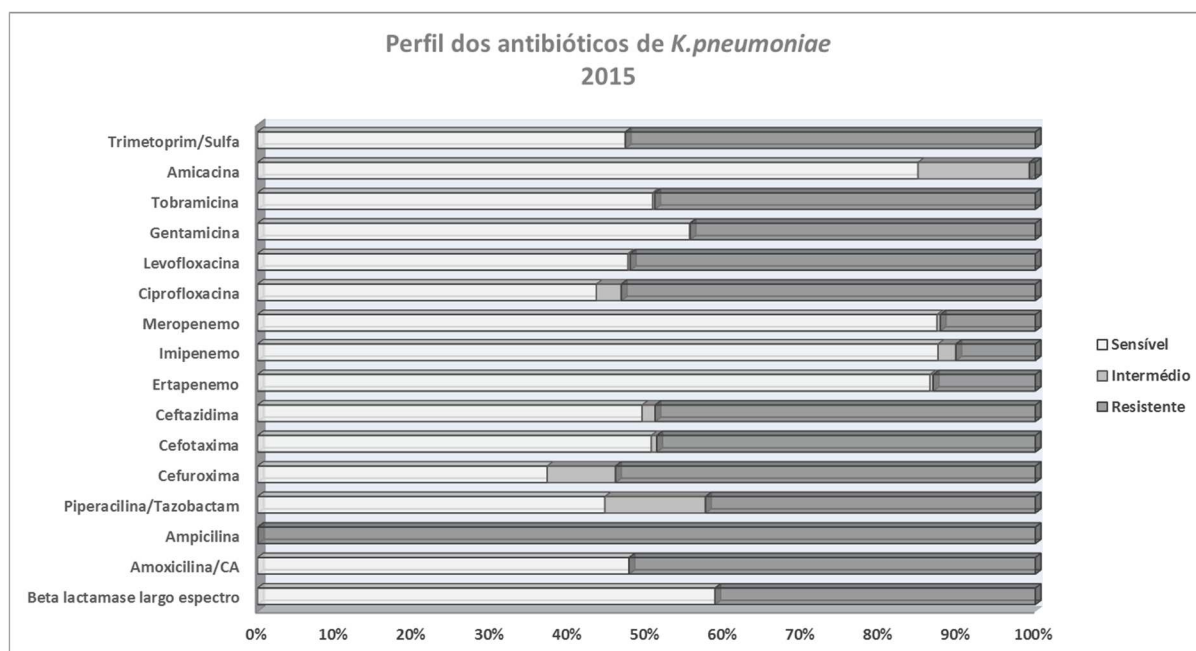


Figura 14: Perfil de antibióticos dos isolados de *K. pneumoniae* (N=1449) no ano de 2015. Relativamente ao item β -lactamases de largo espectro a % de sensibilidade corresponde a Negativa e % de resistente a Positiva.

2.5. ANO 2016

Em 2016, as resistências aos antibióticos são sobreponíveis às de 2015.

3. *Klebsiella pneumoniae* e β -LACTAMASES DE ESPECTRO ALARGADO (ESBL)

Pela análise dos dados constatou-se que as estirpes produtoras de ESBL aumentaram entre 2012 e 2013 e foram diminuindo, a partir de 2013 até 2016: 40,3% em 2012; 46,8% em 2013; 45% em 2014, 41,2% em 2015 e 36% em 2016. Observou-se que a diminuição de estirpes produtoras de ESBL se verificou, em paralelo com o aumento de estirpes produtoras de carbapenemases. Os resultados apresentados são do equipamento Vitek2® (BioMérieux). Naqueles casos, puseram-se em dúvida os resultados do método automático mas, sempre que se fez a pesquisa fenotípica de ESBL, por método manual, esta foi inconclusiva. (Figura 15)

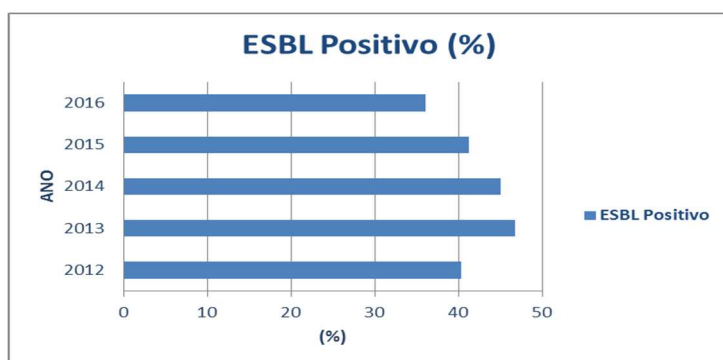


Figura 15: Percentagem (%) das estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016

4. RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS NÃO β -lactâmicos NOS ISOLADOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES À CEFTAZIDIMA, ENTRE 2012 E 2016

Fez-se uma análise, entre 2012 e 2016, para avaliar o comportamento das estirpes resistentes à ceftazidima (considerando-a como representante das cefalosporinas de terceira geração) relativamente às outras classes de antibióticos não β -lactâmicos (aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfonamidas). Verificou-se que a taxa de resistência é muito elevada excepto para a amicacina. (Tabela 1)

Tabela 1: Resistência (%) aos antibióticos não β -lactâmicos nos isolados de *K.pneumoniae* resistentes à ceftazidima

	2012	2013	2014	2015	2016
Amicacina	0,7	0,3	0,9	1,4	1,1
Tobramicina	76,3	81,5	88,9	91,6	87,3
Gentamicina	69,1	75,9	81,2	84,5	74,1
Ciprofloxacina	88,2	85,9	87,8	91,3	89,2
Levofloxacina	66,5	86,8	87,1	90,1	87,3
Cotrimoxazol	85,2	87,4	93,2	94,5	88,1
ESBL +	95,4	98,2	93,1	79,5	74,2

5. ESTUDO DOS ISOLADOS COM SUSCEPTIBILIDADE DIMINUIDA A CARBAPENEMOS

5.1 EVOLUÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS CARBAPENEMOS EM *Klebsiella pneumoniae*, ENTRE 2012 E 2016

O número de estirpes KP resistentes ao ertapenemo aumentou entre 2012 e 2015 e manteve-se em 2016: 0,9% em 2012; 2,2% em 2013; 8% em 2014; 13,1% em 2015; 13% em 2016. O mesmo se verificou com os outros carbapenemos estudados. A evolução das resistências aos carbapenemos, no CHUC, de 2012 a 2016 está representada na Figura 16.

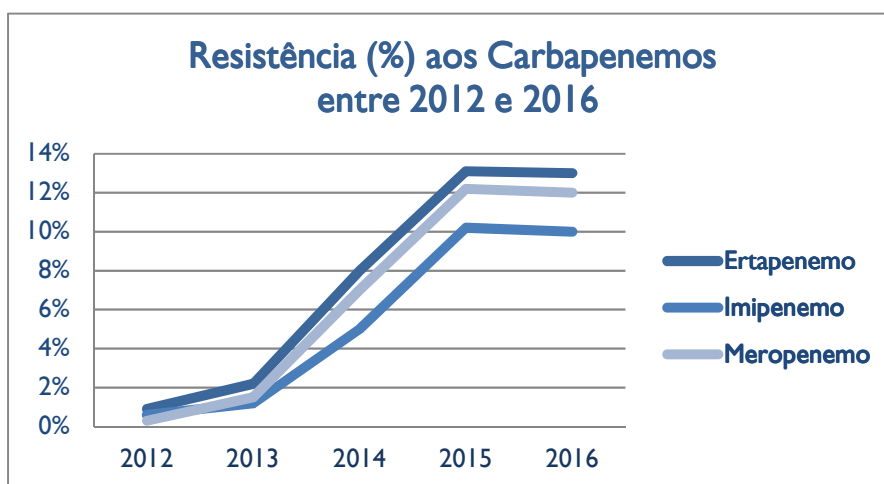


Figura 16: Evolução da resistência aos Carbapenemos entre 2012 e 2016

No ano de 2016 as KP produtoras de carbapenemases estão distribuídas pela maioria dos serviços do CHUC. (Figura 17)

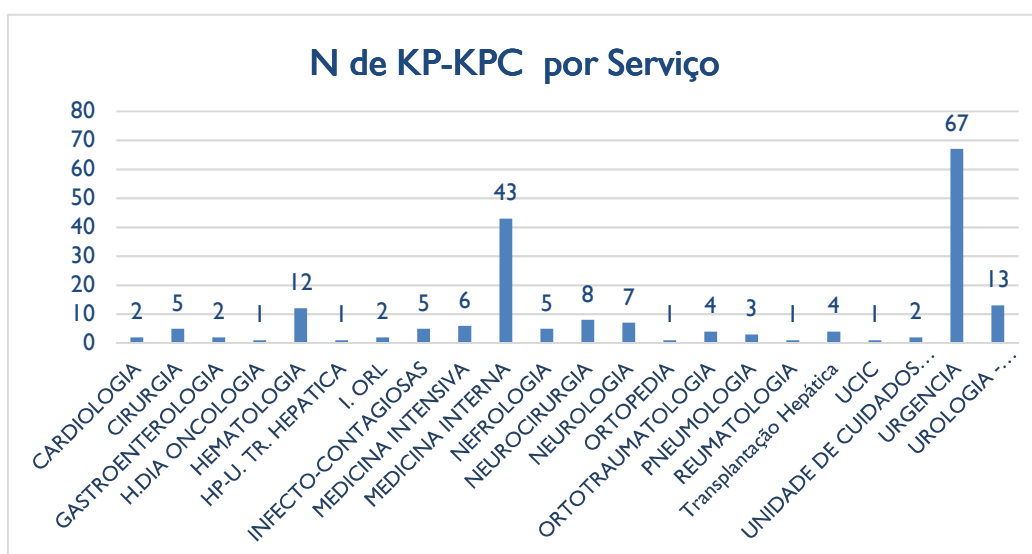


Figura 17: Distribuição, do Nº de KP produtoras de carbapenemases em 2016, por serviço do CHUC

5.2. SUSCEPTIBILIDADE DOS ANTIBIÓTICOS NOS ISOLADOS COM SUSCEPTIBILIDADE DIMINUÍDA OU RESISTENTES AO ERTAPENEMO

Os isolados com susceptibilidade diminuída ou resistentes aos carbapenemos são, normalmente, resistentes aos outros grupos de antibióticos. (Figura 18)

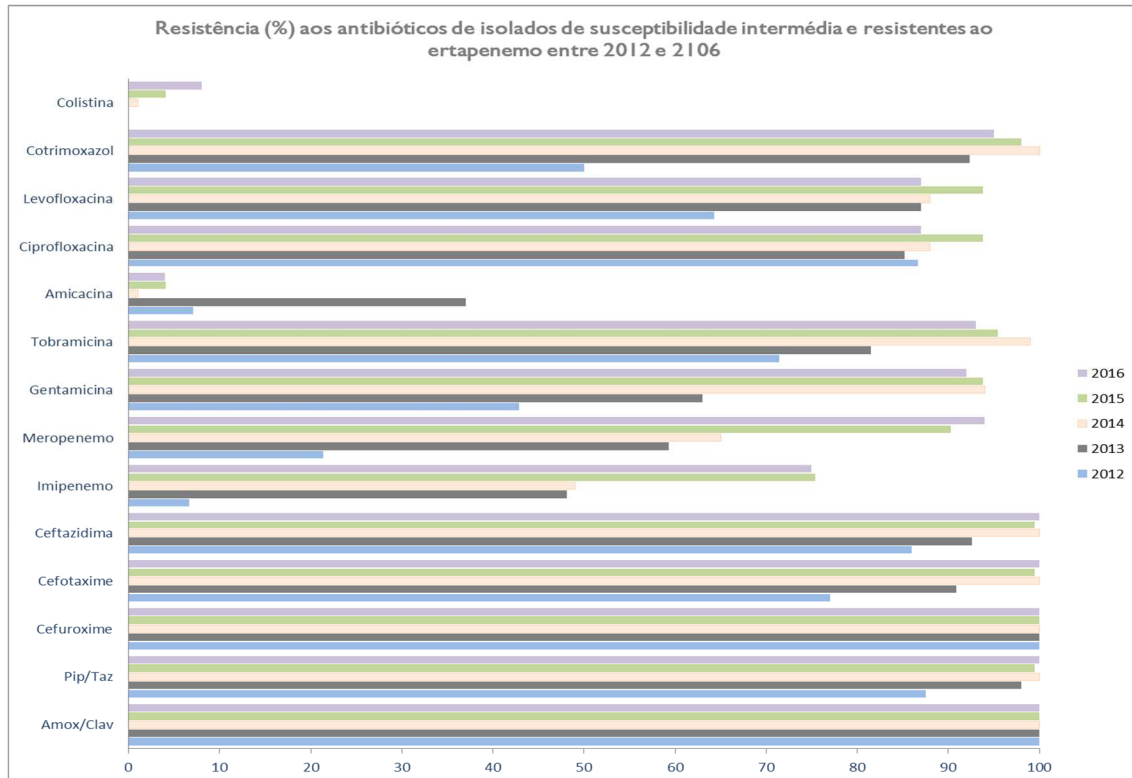


Figura 18: Resistência (%) aos antibióticos dos isolados de KP com susceptibilidade intermédia e resistentes ao ertapenemo nos anos de 2012, 2013, 2014, 2015 e 2016.

A percentagem de resistências apresentada no gráfico corresponde a um número absoluto de isolados de 15; 28; 88; 195 e 195 respectivamente, nos anos de 2012; 2013; 2014; 2015 e 2016.

De ressaltar que a baixa resistência à amicacina corresponde a um “perfil” de susceptibilidade intermédio de 35,7% em 2012; 59,3% em 2013; 76% em 2014; 83,1% em 2015 e 83% em 2016.

Destaca-se também a resistência à colistina que em 2015 foi de 4,1% (n=8/195) e em 2016 de 8,2% (n=16/195).

Observou-se que, excepcionalmente, alguns dos isolados resistentes aos carbapenemos, são susceptíveis às quinolonas, às cefalosporinas de 3ª geração e/ou ao cotrimoxazol, fugindo ao perfil hospitalar de multirresistência do CHUC, como se demonstra na tabela seguinte. (Tabela 2)

Tabela 2: Antibiogramas de isolados clínicos de *K.pneumoniae* resistentes aos carbapenemos e sensíveis a outros grupos de antibióticos.

ANO	Idade	Sexo	Serviço	Produtos	EP	IP	MP	CAZ	CIP	LV	GN	AM	SXT	ESBL
2015	6A	M	HP-UCI	L. PERIT.	R	R	R	R	R	S	S	S	R	ESBL n
2015	89A	F	URGENCIA	URINA	R	R	R	R	R	R	S	S	R	ESBL n
2015	90A	F	URGENCIA	URINA	R	R	R	R	R	R	S	S	R	ESBL n
2015	27A	M	TRANSP. RENAL	URINA	R	R	R	R	R	R	S	S	R	ESBL p
2015	86A	F	URGENCIA	URINA	R	R	R	R	R	R	S	S	R	ESBL p
2015	85A	M	ORTOTRAU.	URINA	R	S	S	R	R	R	S	S	R	ESBL p
2015	76A	M	URGENCIA	URINA	R	S	S	R	R	R	S	S	R	ESBL p
2015	93A	F	URGENCIA	URINA	R	R	R	S	R	R	R	I	R	ESBL p
2015	99A	M	M.INTERNA	EXPECT.	R	R	R	R	R	R	S	S	S	ESBL n
2016	97A	F	M.INTERNA	A. BRQ.	R	R	R	R	S	S	S	S	S	ESBL p
2016	52A	M	TRANSP. RENAL	P.CAT.VAS.	R	I	I	S	S	S	S	S	S	ESBL n
2016	88A	M	URGENCIA	URINA	R	R	R	R	R	R	S	S	S	ESBL n
2016	77A	M	UCIC	P.CAT.VASC	R	R	R	R	S	S	S	S	S	ESBL p
2016	97A	F	URGENCIA	URINA	R	I	R	R	R	R	S	S	S	ESBL n
2016	88A	F	M.INTERNA	EXPECT.	R	I	R	R	R	R	S	S	S	ESBL n
2016	69A	M	CARDIOLOGIA A	URINA	R	R	R	R	S	S	S	S	S	ESBL n
2016	71A	M	NEUROC.	A. BRQ.	R	I	R	R	S	S	S	S	S	ESBL n
2016	81A	M	INFEC.	HEMOC.	R	I	R	R	R	R	S	S	S	ESBL n

*HP, Hospital Pediátrico; TRANSP. RENAL, Urologia-Transplantes Renais; ORTOTRAU, Ortopneumatologia; UCIC, Unidade Cuidados Intermédios Coronários; L. Perit., Líquido Peritoneal; P.CAT.VAS., Ponta de catéter vascular; EP, ertapenemo; IP, imipenemo; MP, meropenemo; CAZ, ceftazidima; CIP, ciprofloxacina; LV, levofloxacina; GN, gentamicina; AM, amicacina; SXT, cotrimoxazol; ESBL, β-lactamase de espectro alargado; ESBL n, Estirpes não produtoras de ESBL; ESBL p, Estirpes produtoras de ESBL; R, resistente; S, sensível; I, intermédio.

6. PESQUISA DE CARBAPENEMASES

Em 2013, a resistência ao ertapenemo aumentou relativamente a 2012 (Figura 16, secção 5.1). Assim, os 27 isolados foram caracterizados a nível molecular na Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para a avaliar a existência de KP portadoras de *bla*_{KPC}. Destes, 18 eram portadores da carbapenamase KPC-3.⁷³ Pesquisou-se também o potencial de transferência do gene KPC através de ensaios de conjugação e identificou-se o tipo de plasmídeo. Neste estudo identificaram-se quatro grupos de incompatibilidade de plasmídeos, sendo o replicão IncF o mais prevalente (56%), seguido do IncN (7,4%), IncHII (3,7%) e IncHI2 (3,7%). Os 18 isolados KPC-3 foram positivos para o plasmídeo IncF que foi transferido de todos os isolados, por conjugação para a *E. coli* J53 e confirmado pelo antibiograma e PCR.

Também se estudaram 16 KP-KPC e 4 KP não produtores de KPC quanto à clonalidade recorrendo às técnicas de “pulsed field gel electrophoresis” (PFGE) e “multilocus sequence typing” (MLST). Neste trabalho, a análise de PFGE revelou três grupos de isolados produtores de KPC enquanto todos os não-KPC eram únicos. A análise MLST dos produtores de KPC

identificou-os como ST15 ou ST348 (“Sequence type”- ST). Nos isolados não-KPC identificou-se também o ST15 além do ST11 (ver publicação em ANEXO I).

A identificação da KPC neste hospital alertou para a necessidade de se proceder à detecção de carbapenemases. A detecção fenotípica das carbapenemases no hospital fez-se, a partir de Outubro de 2015, utilizando o “kit” RAPIDEC CARBA NP[®] (CarbaNP)(BioMérieux) em estirpes com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos. Entre aquela data e 31 de Dezembro de 2016 foram feitas 294 pesquisas de carbapenemases em estirpes de KP com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos. Destas obtiveram-se 268 resultados positivos; 21 negativos e 5 inconclusivos.

A partir de Fevereiro de 2016, em todas as estirpes cujo resultado do teste rápido para pesquisa de carbapenemases foi positivo, fez-se a pesquisa dos genes VIM, NDM; KPC e OXA-48 no equipamento BD MAX[®] (Quilaban). De 166 resultados CarbaNP positivos observou-se que: 165 eram produtores de KPC e um de KPC e VIM; de 5 resultados CarbaNP negativos, 100% (n=5) foram negativos na pesquisa genética por PCR e dos 5 resultados inconclusivos, um era produtor de KPC e nos outros quatro a pesquisa genética, por PCR, foi negativa.

Em Agosto de 2016, perante um resultado negativo do CarbaNP, de uma estirpe de *Escherichia coli* resistente ao ertapenemo e com os CMI's do meropenemo e do imipenemo, embora susceptíveis, mais altos que o normal, fez-se pesquisa genética de carbapenemases no equipamento BD-MAX[®]. O resultado foi positivo para OXA-48. Para comprovação, testou-se a mesma estirpe em outro aparelho, GeneXpert[®] (Werfen), que confirmou o resultado.

Em Outubro de 2016 iniciou-se a pesquisa genética a todos os isolados resistentes a pelo menos um carbapenemo.

IV. DISCUSSÃO

I. ORIGEM E PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS AGENTES ANTIMICROBIANOS DE *Klebsiella pneumoniae*

Entre 30 países europeus com maior consumo de antibióticos, na comunidade, Portugal, em 2012, estava em nono lugar.⁶ Embora os números apresentados neste trabalho sejam preocupantes, os antibióticos consumidos a nível hospitalar, quantitativamente, representam uma pequena parte do total nacional comparando com o consumo do ambulatório.⁶ É de salientar que a maioria de KP isoladas, e consideradas neste estudo, foram provenientes da Urgência. Alguns doentes podem ter adquirido KP neste hospital, no serviço de Urgência, ou já terem estado hospitalizados no CHUC. Outros chegam de outros hospitais ou instituições de saúde, provavelmente já medicados e muitos vêm também de residências para idosos ou de unidades de cuidados continuados onde estariam colonizados com estirpes multirresistentes.^{87;88} O facto do serviço de Urgência ter a maior percentagem de isolados KP é preocupante, sugerindo que algumas estirpes multirresistentes e resistentes a carbapenemos podem entrar no hospital por esta via, e que deveria fazer-se um rastreio na admissão ao hospital para avaliar os doentes colonizados.

Em 2012 a percentagem de resistência às cefalosporinas de terceira geração, cefotaxime e ceftazidima, foi de aproximadamente 40% a par com as KP produtoras de ESBL (59,7%). Na Holanda fez-se um estudo sobre a relação entre a resistência às cefalosporinas de terceira geração e a produção de ESBL e presença de AmpC e concluiu-se que embora a produção de ESBL, nomeadamente de CTX-M, fosse a principal responsável por aquela resistência, a

produção de AmpC tinha também um papel muito significativo.⁸⁹ Num trabalho realizado com estirpes de KP dos HUC, em 2011, confirmou-se que 68% eram produtoras de CTX-M-15.⁹⁰ No nosso país, entre 2007 e 2014, a taxa de resistência às cefalosporinas de terceira geração, em KP, subiu de 16,5% para 40,9%.⁶ No CHUC também se verificou a mesma tendência de aumento de resistência à ceftazidima: 35,1% em 2012; 41% em 2013; 46% em 2014; 48% em 2015 e 45% em 2016. Na Europa em geral e noutros países como a Colômbia e os Estados Unidos tem-se também constatado esta crescente resistência.^{91; 92; 93}

A resistência concomitante entre cefalosporinas de 3^a geração; fluoroquinolonas e aminoglicosídeos é outro resultado preocupante, também descrito nos vários relatórios do ECDC e da Direcção Geral de Saúde (DGS)^{11;6} e justificado pelo uso abusivo de fluoroquinolonas em ambulatório, na maioria das vezes prescritas empiricamente, para o tratamento de infecções urinárias não complicadas.^{94; 95}

O relatório do ECDC de 2012 mostra que a Grécia apresenta uma resistência de 60,5% aos carbapenemos, seguido da Itália com 28,8%, que pode ser justificada pela tendência crescente de KP produtoras de ESBL e resistentes aos outros grupos de antibióticos e que levou ao uso frequente de carbapenemos.⁶⁸ A percentagem de susceptibilidade diminuída aos carbapenemos, em 2012, no CHUC, foi de 0,9% o que ainda estava muito aquém daqueles valores e mais aproximado dos países nórdicos.^{96;97} Na Grécia e na Itália, nesta altura, a produção de KP KPC já era a grande responsável pela resistência aos carbapenemos.

No CHUC a resistência aos carbapenemos foi-se estabelecendo, lentamente, até 2015, ano em que há um aumento abrupto e em que se verificaram 13,1% de estirpes resistentes ao ertapenemo. A par desta resistência aos carbapenemos apareceram, também 16 estirpes resistentes à colistina em 2016. Até há pouco tempo, a resistência às polimixinas era descrita como sendo mediada unicamente por alterações cromossómicas. Na China, em Novembro de 2015, foi identificado, em *E.coli*, isolada de um porco, o primeiro gene plasmídico, *mcr-1*, que codifica resistência à colistina.⁹⁸ Em França, em 2014 houve um surto de KP OXA-48 resistente à colistina, mas nenhuma era produtora de MCR-1.⁹⁹ Um estudo belga, em 2016, mostrou que este plasmídeo se encontra disseminado em estirpes de *E.coli* enterotoxigénicas de animais de quinta, por toda a Europa.¹⁰⁰ Nos Estados Unidos o primeiro isolado de um doente com o gene MCR-1 surgiu em Maio de 2016.

Até à data, em Portugal ainda não foi reportado oficialmente um isolado clínico produtor de MCR-1/2. Os isolados deste estudo resistentes à colistina serão estudados a nível molecular num futuro próximo, uma vez que não era o principal objectivo deste trabalho.

2. DETECÇÃO DE β -LACTAMASES DE LARGO ESPECTRO (ESBLs)

A produção de ESBLs, ao longo do estudo, aumentou de 2012 para 2013 e foi diminuindo até 2016.

Os dados do Vitek2, relativos à produção de ESBL, em 2016, maioria deles negativos (64% ESBL n), suscitam dúvidas visto que, em 2012 e 2013, as estirpes resistentes aos carbapenemos dos HUC apresentavam os genes CTX-M-15, SHV-tipo e TEM-tipo como demonstrado nos trabalhos de Novais *et al.* e Vubil *et al.*^{15,73} Também em 41 estirpes recolhidas no Centro Hospitalar de Lisboa Norte (CHLN) pelo menos uma β -lactamase de espectro restrito TEM-I (88%) e SHV-I (65%) foi encontrada associada à carbapenemase KPC-3 em todos os isolados e as ESBLs foram identificadas em 17,1% dos isolados, nomeadamente: a SHV-35 e a CTX-M-15.⁷² Mas, já um trabalho publicado em 2006, mostrava que o Vitek 2 tinha dificuldade em detectar ESBL quando co-produzidas com KPC.¹⁰¹

Sempre que se fez o estudo fenotípico de ESBL, pelo método manual, em estirpes com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos, cujo resultado no Vitek2 era negativo, o resultado foi inconclusivo. O estudo de Birgy *et al.* refere a dificuldade em identificar fenotipicamente as ESBL quando associadas a carbapenemases. Assim, mostram um método em que numa placa de MH impregnada com cloxacilina (que inibe a produção de AmpC), e barrada com uma estirpe de KP KPC-2 e CTX-M-15, dispõe os discos de aztreonamo (ATM); amoxicilina/ácido clavulânico (AMC) e ceftazima (CAZ) que por sua vez são impregnados com 20 μ l de ácido fenilborónico. O aumento da zona de inibição entre os discos ATM e AMC e AMC e CAZ sugere a presença de ESBL.¹⁰² Num outro trabalho, Poulou *et al.* propõem a modificação do teste de detecção fenotípica de ESBL indicado pelo CLSI e mostram que aquelas alterações conseguem identificar um maior número de estirpes produtoras de ESBL quando em presença de outros mecanismos de resistência.¹⁰³

Há sem dúvida limitações no Vitek na detecção de ESBL quando em presença de estirpes produtoras de carbapenemases (comunicação da BioMérieux). Assim, seria importante fazer a pesquisa de ESBL por modificação do método manual e/ou por PCR para perceber se a diminuição de estirpes produtoras de ESBL se deve ao facto de ter sido introduzida uma nova estirpe e/ou aquisição de novos mecanismos de resistência.

3. CARBAPENEMASES

Nos CHUC, a maioria das KP resistentes ou com susceptibilidade diminuída aos carbapenemos é produtora de KPC. Mas, em 2012, quando se caracterizaram 15

Enterobactérias, 10 das quais KP, resistentes ao ertapenemo, de isolados de doentes dos HUC nenhuma delas mostrou ser portadora dos genes responsáveis pela produção de carbapenemases. Verificou-se que aquelas eram portadoras de ESBL, nomeadamente de CTX-M-15, e que a resistência ao ertapenemo estava associada a alterações das porinas OmpK36.¹⁵ Manageiro *et. al.* publicaram um trabalho em 2015, que mostrou que das 165 Enterobactérias isoladas de vários hospitais, não sensíveis ao ertapenemo, apenas 30 eram portadoras de KPC-3; 4 de GES-5 e 1 de VIM-2.¹⁰⁴ Sugerem que as restantes 130 estirpes tenham outros mecanismos de resistência, como diminuição da permeabilidade da membrana externa ou hiperprodução de AmpC tal como foi mostrado no estudo de 2012, de isolados do nosso hospital.^{104;15} Já em 2013, no estudo de Vubil *et al.* os 18 isolados dos HUC resistentes ao ertapenemo e com susceptibilidade diminuída ao imipenemo eram produtores de carbapenemases KPC-3.⁷³ Também, num trabalho realizado em 41 (KP=29) estirpes recolhidas de doentes do CHLN, entre 2009 e 2011, com resistência ou reduzida susceptibilidade aos carbapenemos foi detectado o gene *bla*_{KPC-3} na maioria dos isolados.⁷²

Relativamente ao local genético onde se encontra o gene *bla*_{KPC-3}, o IncF é frequentemente detectado em Enterobactérias e tem sido associado à disseminação de genes clinicamente importantes como os que codificam para a CTX-M-15 e KPC.¹⁰⁵ No CHUC, o plasmídeo do tipo IncF foi também associado ao gene de KPC-3.⁷³

Em 2015, em Portugal, identificaram o plasmídeo IncF em diferentes espécies sugerindo que a disseminação do gene *bla*_{KPC-3} seja devida à transferência horizontal mais do que clonal.¹⁰⁴ Iguamente, no estudo de Calisto *et al.*¹² todos os isolados recolhidos no CHLN possuíam plasmídeos inseridos em diferentes grupos de incompatibilidade, dos quais o predominante foi o IncF (85%) verificando-se também a existência de outros grupos IncFIA (15%), IncA/C (10%), IncFIC (20%), IncHII (20%) e IncHI2 (15%).⁷²

Nos HUC, as estirpes estudadas em 2013 apresentaram diferentes ST: o ST348, apenas reportado em África¹⁰⁶ e neste hospital até à data e o ST15 associado à disseminação de KPC em Portugal, e já referido associado a KP resistentes ao ertapenemo devido a modificações da porina OMPK36 e não à produção de carbapenemases.^{104;15}

O ST348 foi apenas identificado a partir de isolados produtores de carbapenemases e o ST15 a partir de estirpes produtoras e não produtoras de carbapenemases. KP-KPC ST15 foi detectado pela primeira vez em Janeiro de 2013, enquanto ST348 apareceu em Outubro e Novembro que coincidiu com um aumento acentuado de isolados produtores de KPC-3. É possível que o clone ST15 resistente já estivesse a circular no hospital e ter adquirido um plasmídeo IncF portador do gene KPC-3, enquanto o novo clone ST348 portador de *bla*_{KPC-3}

possa ter sido importado para o hospital ou tenha obtido o gene de ST15 por transferência horizontal. A caracterização adicional do ambiente genético de *bla_{KPC-3}* pode esclarecer esta hipótese. Além disso, sendo os HUC um hospital central que recebe doentes de outros hospitais e de diferentes distritos torna-se fácil a introdução de uma nova estirpe produtora de KPC-3. Curiosamente, em Lisboa, foi recentemente isolado a partir de um animal, KP ST348 não produtor de KPC (comunicação pessoal; não publicado), o que mostra a extensa disseminação de estes clones a outro nível e a complexidade da disseminação da resistência por elementos genéticos móveis.

3.1. OXA-48

Alguns estudos mostram que o RAPIDEC CARBA NP apresenta falsos negativos quando em presença de estirpes produtoras de OXA-48.^{86;107;108;109} Assim tornou-se importante fazer sempre a pesquisa genética quando em presença de estirpes com susceptibilidade diminuída ou resistentes aos carbapenemos. Em Espanha há uma grande prevalência de OXA-48 cujos CMI dos carbapenemos são baixos.⁴⁸ Perante uma pesquisa fenotípica negativa, facilmente pode passar despercebida uma estirpe produtora de OXA-48.

No CHUC, o equipamento BD MAX[®] (Quilaban) detectou a presença de OXA-48 num único isolado de 2015, tendo sido uma situação pontual e que não levou à disseminação desta carbapenemase neste hospital.

4. AUMENTO DE CARBAPENEMASES: E AGORA?

Qual a terapêutica antibiótica a instituir nos doentes infectados com KP resistentes aos carbapenemos e aos outros grupos de antibióticos é uma pergunta frequente e de difícil resposta.

O gene responsável pela carbapenemase KPC, *bla_{KPC}*, reside, frequentemente, num grande plasmídeo que confere resistência não apenas aos carbapenemos, mas também às cefalosporinas de espectro alargado, ao aztreonamo, às fluoroquinolonas e aos aminoglicosídeos. Como resultado, o tratamento de infecções causadas por KP produtoras de KPC fica, muitas vezes, restrito a antibióticos (como por exemplo, polimixinas, tigeciclina e fosfomicina) com deficiências farmacocinéticas significativas (e graves hepato e nefrototoxicidades) e eficácia clínica limitada no tratamento de infecções graves, especialmente quando usados em monoterapia. Assim, a terapêutica combinada tornou-se um padrão de tratamento destas infecções.¹¹⁰ Existem relatos cujas taxas de sobrevivência são muito maiores

em comparação com as de doentes que receberam regimes de monoterapia, em bacteriemias.¹¹¹

Em Janeiro de 2017 a carta de antibióticos que se utiliza para bacilos gram-negativo passou a contemplar a fosfomicina. Ainda sem dados concretos do laboratório constatou-se que, por vezes, *in vitro*, as estirpes multirresistentes são susceptíveis à fosfomicina. A fosfomicina é uma molécula hidrofílica e de baixo peso molecular e que por isso se difunde facilmente nos tecidos.¹¹² Defende-se que a terapêutica conjunta de meropenemo e fosfomicina possa ser eficaz em casos de KP-KPC em infecções urinárias, bacteriemias, infecções pulmonares e osteomielites.^{112; 113}

O trabalho de Oliva *et al.* comparou dois grupos de doentes com isolados KP-KPC: o grupo A em que administraram terapêutica dupla de ertapenemo e meropenemo e o grupo B em que fizeram antibioterapia tripla; ertapenemo, meropenemo e colistina. Embora os doentes do grupo B tivessem uma resposta clínica mais precoce do que os do grupo A, não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos quanto à resposta precoce à terapêutica e mortalidade aos 60 dias. Em paralelo foram realizados estudos em 28 estirpes de KP-KPC (16 do grupo A, 12 do grupo B). As CMI's 50/90 tanto de meropenemo como de ertapenemo foram de 128 e 256 µg/mL, respectivamente, pelo método de diluição. No grupo A a actividade bactericida do ertapenemo e do meropenemo foi observada em 12/16 (75%) às 8 h e aumentou para 14/16 (87,5%) às 24 h, enquanto no grupo B a combinação tripla mostrou uma actividade bactericida mais rápida. Este efeito foi confirmado mesmo quando foram testadas concentrações sub-inibitórias dos antibióticos. Além disso, a combinação tripla em todas as concentrações testadas foi bactericida às 24 h. Neste trabalho concluíram que dos pontos de vista clínico e microbiológico a terapêutica tripla tem melhores resultados.¹¹⁴

Também, Tumbarello *et al.* concluíram que a terapêutica tripla meropenemo, tigeciclina e colistina estava associada a uma taxa de mortalidade mais baixa do que um regime de monoterapia.¹¹¹

Quando se fala em regime de monoterapia com colistina há que ter presente a dose necessária para atingir os níveis acima da CMI. É preciso uma dose de carga pois caso contrário poderão ser necessários 3 dias para atingir os níveis terapêuticos.¹¹⁵

Numa revisão recente da literatura que inclui 298 doentes infectados com estirpes de KP-KPC e maioritariamente com bacteriemia, o tratamento combinado com dois dos seguintes fármacos activos, colistina, tigeciclina, gentamicina ou carbapenemos (se CMI ≤ 4 µg/ml) foi superior em relação à monoterapia enquanto, as taxas de mortalidade com colistina em monoterapia foram semelhantes às taxas de mortalidade com tratamento inadequado.¹¹²

Relativamente às estirpes estudadas no CHUC, o perfil antibiótico das KP-KPC mostra que a maioria dos carbapenemos apresenta CMI ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ e resistência à gentamicina. Seguindo a sugestão anterior poder-se-ia administrar a terapêutica combinada de colistina com tigeciclina, dependendo do local da infecção.

Dados recentes avaliaram o tratamento de KP-KPC com dois carbapenemos que incluía o ertapenemo e o meropenemo ou o doripenemo, a chamada terapêutica *kamikase*. Dos carbapenemos disponíveis, o ertapenemo é o mais facilmente hidrolisado pelas enzimas KPC. A actividade bactericida sinérgica foi mostrada *in vitro* quando ertapenemo é administrado em combinação com meropenemo ou doripenemo. O mecanismo proposto de sinergia consiste na administração, do ertapenemo, para que as enzimas carbapenemases sejam consumidas, com um segundo carbapenemo, permitindo que este, mais activo, seja eficaz contra o microrganismo produtor de carbapenemases.¹¹⁶ Esta terapêutica com dois carbapenemos também foi descrita com sucesso, por Giamarellou *et al.*, no tratamento de três doentes com KP-KPC-2 panresistentes cujas CMIs dos carbapenemos eram ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$: administravam 1g de ertapenemo (em 24h) e passado 1h administravam 1 ou 2 g de meropenemo ou 2 g de doripenemo (8h em 8h).¹¹⁷

A resistência à colistina passou a ser uma das maiores preocupações actualmente, uma vez que este é o último antibiótico da última “linha” terapêutica.

Num trabalho em que foram testadas 10 combinações antimicrobianas em 13 KP-KPC resistentes à colistina, apenas a combinação colistina e rifampicina exibiu actividade sinérgica contra todas aquelas. A actividade inibitória sinérgica foi observada em 5/13 estirpes com colistina e gentamicina, meropenemo e gentamicina, colistina e meropenemo, colistina e imipenemo, colistina e tigeciclina, e em 3/13 estirpes com imipenemo e gentamicina. Não se observou sinergia com tigeciclina e meropenemo, tigeciclina e imipenemo ou tigeciclina e gentamicina. Observou-se que a gentamicina em monoterapia foi bactericida em KP-KPC em concentrações clinicamente atingíveis, o que pode ser explicado pelas recomendações do seu uso na erradicação gastrointestinal de KP-KPC, em portadores. No entanto, a utilidade clínica das combinações colistina e gentamicina, deve ser ponderada devido à utilização conjunta de dois agentes nefrotóxicos.¹¹⁰

No estudo já previamente descrito, os resultados com terapêutica tripla de meropenemo, ertapenemo e colistina em estirpes KP-KPC, com CMIs de colistina ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$, mostraram ser eficazes.¹¹⁴

Num outro trabalho que estudou *in vitro*, o efeito sinérgico das combinações: colistina com rifampicina; colistina com meropenemo e colistina com tigeciclina a primeira mostrou ser

eficaz em todas as estirpes KP-KPC resistentes à colistina (n=8); a segunda em 3 dos 8 isolados e a terceira em 75% (6/8). Demonstrou-se ainda que a junção de tigeciclina à combinação colistina e rifampicina prolonga o efeito bacteriostático. Como a utilização na prática clínica, de colistina e rifampicina tem sido controversa, resta perceber quais as mais-valias de se juntar a tigeciclina.¹¹⁸

Está descrito por Ceccarelli *et al.*, um caso de um doente ventilado com múltiplas comorbidades após neurocirurgia a quem, após cerca de 40 dias de internamento foi isolada uma KP-KPC resistente aos carbapenemos (ertapenemo, meropenemo e doripenemo), à colistina, à fosfomicina e à amicacina. Após diferentes abordagens terapêuticas com colistina, rifampicina e meropenemo durante 6 dias e colistina e fosfomicina por 5 dias a febre persistiu, a procalcitonina subiu para 140 ng/ml e o doente entrou em falência multiorgânica. No 52º dia mudaram a terapêutica para ertapenemo e doripenemo e ao fim de 4 dias o doente ficou apirético.¹¹⁹ Neste caso a terapêutica dupla com carbapenemo foi muito eficaz mas cada caso é diferente e as CMLs dos antibióticos do perfil de resistência do CHUC são muito elevadas e a decisão sobre qual a combinação que vai resultar em cada caso é ingrata. Além disso, o doripenemo não faz parte do formulário hospitalar.

V. CONCLUSÃO

As infecções por microrganismos multirresistentes são um desafio terapêutico, muitas vezes difícil de ultrapassar. Por esse motivo, a detecção, na unidade de saúde, de bactérias que apresentem aquela resistência deve obrigar a tomar medidas rigorosas de isolamento e rastreio, com o objectivo de impedir a sua transmissão.¹²⁰ Simultaneamente obriga à reanálise do uso de antibióticos para reduzir a pressão de selecção.

Para melhorar as medidas de prevenção e controlo de infecção hospitalar, o estudo genético das estirpes resistentes aos antibióticos é fundamental, no sentido de saber se se está em presença de um clone ou de vários, se o gene é facilmente disseminável e onde está localizado.

BIBLIOGRAFIA

1. PRESS RELEASE: High-Level Meeting on Antimicrobial Resistance - General Assembly of the United Nations. <http://www.un.org/pga/71/2016/09/21/press-release-hl-meeting-on-antimicrobial-resistance/>. Accessed May 24, 2017.
2. Gould IM. Coping with antibiotic resistance: the impending crisis. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:S1-S2. doi:10.1016/S0924-8579(10)00497-8.
3. *GLOBAL ACTION PLAN ON ANTIMICROBIAL RESISTANCE*. http://www.wpro.who.int/entity/drug_resistance/resources/global_action_plan_eng.pdf. Accessed May 24, 2017.
4. Von Wintersdorff CJH, Penders J, Van Niekerk JM, et al. Dissemination of antimicrobial resistance in microbial ecosystems through horizontal gene transfer. *Front Microbiol*. 2016;7(FEB). doi:10.3389/fmicb.2016.00173.
5. Podschun R, Ullmann U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(4):589-603. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9767057>. Accessed March 14, 2017.
6. Portugal. Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos em números. Programa de Prevenção e Controlo de Infeções e de Resistência aos Antimicrobianos. DIREÇÃO-GERAL DA SAÚDE, LISBOA Novembro de 2014. 2016:53. <https://www.dgs.pt/em-destaque/portugal-controlo-da-infecao-e-resistencia-aos-antimicrobianos-em-numeros-2015.aspx>.
7. Decré D, Verdet C, Emirian A, et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol*. 2011;49(8):3012-3014. doi:10.1128/JCM.00676-11.
8. Lee YH, Cho B, Bae IK, Chang CL, Jeong SH. *Klebsiella pneumoniae* strains carrying the chromosomal SHV-11 beta-lactamase gene produce the plasmid-mediated SHV-12 extended-spectrum beta-lactamase more frequently than those carrying the chromosomal SHV-1 beta-lactamase gene. *J Antimicrob Chemother*. 2006;57(6):1259-1261. doi:10.1093/jac/dkl115.
9. Paterson DL, Hujer KM, Hujer AM, et al. Extended-Spectrum beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type beta-Lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(11):3554-3560. doi:10.1128/AAC.47.11.3554-3560.2003.

10. World Health Organization. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance 2014*; 2014. doi:9789241564748.
11. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe 2014. Annual Report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)*; 2015. doi:10.2900/39777.
12. Calisto F. Emergência de Carbapenemases em *Klebsiella pneumoniae*: o desafio de bactérias multirresistentes e virulentas. 2011.
<http://repositorio.ul.pt/handle/10451/6311>.
13. Delcour AH. Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *Biochem Biophys Acta*. 2009;1794(5):808-816. doi:10.1016/j.bbapap.2008.11.005.
14. Hernandez-Alles S, Albert S, Alvarez D, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology*. 1999;149(145):51-673.
15. Novais Â, Rodrigues C, Branquinho R, et al. Spread of an OmpK36-modified ST15 *Klebsiella pneumoniae* variant during an outbreak involving multiple carbapenem-resistant Enterobacteriaceae species and clones. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(11):3057-3063. doi:10.1007/s10096-012-1665-z.
16. Doménech-Sánchez A, Martínez-Martínez L, Hernández-Allés S, et al. Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2003;47(10):3332-3335. doi:10.1128/AAC.47.10.3332-3335.2003.
17. Sun J, Deng Z, Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.090.
18. Srinivasan VB, Singh BB, Priyadarshi N, Chauhan NK, Rajamohan G. Role of novel multidrug efflux pump involved in drug resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2014. doi:10.1371/journal.pone.0096288.
19. Bialek-Davenet S, Lavigne JP, Guyot K, et al. Differential contribution of AcrAB and OqxAB efflux pumps to multidrug resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*. 2015. doi:10.1093/jac/dku340.
20. Sauvage E, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. 2008;32:234-258. doi:10.1111/j.1574-6976.2008.00105.x.
21. Sauvage E, Terrak M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *antibiotics*. 2016;(Figure 1):1-27. doi:10.3390/antibiotics5010012.

22. Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
23. Walsh TR. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36:S8-S14. doi:10.1016/S0924-8579(10)70004-2.
24. Bush K. Carbapenemases: Partners in crime. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(1):7-16. doi:10.1016/j.jgar.2013.01.005.
25. Jary F, Kaiser JD, Henon T, et al. Appropriate use of carbapenems in the Besan on university hospital. *Med Mal Infect*. 2012;42(10):510-516. doi:10.1016/j.medmal.2012.07.004.
26. Zhanel GG, Wiebe R, Dilay L, et al. Comparative Review of the Carbapenems Drugs. *Drugs*. 2007;67(7):1027-1052. doi:10.2165/00003495-200767070-00006.
27. Papp-Wallace KM, Endimiani A, Taracila MA, Bonomo RA. Carbapenems: Past, present, and future. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011. doi:10.1128/AAC.00296-11.
28. Breilh D, Texier-Maugein J, Allaouchiche B, Saux M-C, Boselli E. Carbapenems. *J Chemother*. 2013;25(1):1-17. doi:10.1179/1973947812Y.0000000032.
29. Alfandari S. Carbapenems and febrile neutropenia. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23:212-213. doi:10.1016/j.cmi.2016.12.016.
30. Theuretzbacher U. Global antibacterial resistance: The never-ending story. *J Glob Antimicrob Resist*. 2013;1(2):63-69. doi:10.1016/j.jgar.2013.03.010.
31. Diene SM, Rolain JM. Carbapenemase genes and genetic platforms in Gram-negative bacilli: Enterobacteriaceae, Pseudomonas and Acinetobacter species. *Clin Microbiol Infect*. 2014;20(9):831-838. doi:10.1111/1469-0691.12655.
32. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(3):969-976. doi:10.1128/AAC.01009-09.
33. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: The versatile beta-lactamases. *Clin Microbiol Rev*. 2007;20(3):440-458. doi:10.1128/CMR.00001-07.
34. Poirel L, Pitout JD, Nordmann P. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol*. 2007;2(5):501-512. doi:10.2217/17460913.2.5.501.
35. Robilotti E, Deresinski S. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. *F1000Prime Rep*. 2014;6(80):80. doi:10.12703/P6-80.
36. Watanabe M, Iyobe S, Inoue M, Mitsuhashi S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1991;35(1):147-151. doi:10.1128/AAC.35.1.147.
37. Lauretti L, Riccio ML, Mazzariol A, et al. Cloning and characterization of blaVIM, a new

integron-borne metallo-beta-lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999;43(7):1584-1590.

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=89328&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

38. Cornaglia G, Giamarellou H, Rossolini GM, et al. Metallo- β -lactamases: a last frontier for β -lactams? *Lancet Infect Dis.* 2011;11(5):381-393. doi:10.1016/S1473-3099(11)70056-1.
39. Yong D, Toleman MA, Giske CG, 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):5046-5054. doi:10.1128/AAC.00774-09.
40. Kumarasamy MPhil KK, Krishnan P, Toleman MA, et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect Dis.* 2010;10:597-602. doi:10.1016/S1473-3099(10)70143-2.
41. Nordmann P, Poirel L, Walsh TR, Livermore DM. The emerging NDM carbapenemases. *Trends Microbiol.* 2011;19(12):588-595. doi:10.1016/j.tim.2011.09.005.
42. Evans BA, Amyes SGB. OXA β -lactamases. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27(2):241-263. doi:10.1128/CMR.00117-13.
43. Potron A, Kalpoe J, Poirel L, Nordmann P. European dissemination of a single OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* clone. *Clin Microbiol Infect.* 2011;17:E24-E26. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03669.x.
44. Poirel L, Potron A, Nordmann P. OXA-48-like carbapenemases: the phantom menace. *J Antimicrob Chemother.* 2012;67(7):1597-1606. doi:10.1093/jac/dks121.
45. Poirel L, Bonnin RA, Nordmann P. Genetic Features of the Widespread Plasmid Coding for the Carbapenemase OXA-48. doi:10.1128/AAC.05289-11.
46. Laurent P, Héritier C, Toün V, Nordmann P. Emergence of Oxacillinase-Mediated Resistance to Imipenem in *Klebs. pneu.* *Antimicrob Agents Chemother.* 2004;48(1):15-22. doi:10.1128/AAC.48.1.15.
47. Cuzon G, Ouanich J, Gondret R, Naas T, Nordmann P. Outbreak of OXA-48-Positive Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates in France. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(5):2420-2423. doi:10.1128/AAC.01452-10.
48. Pitart C, Solé M, Roca I, Fàbrega A, Vila J, Marco F. First outbreak of a plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing OXA-48 beta-lactamase in *Klebsiella pneumoniae* in Spain.

- Antimicrob Agents Chemother.* 2011;55(9):4398-4401. doi:10.1128/AAC.00329-11.
49. Oteo J, Hernandez JM, Espasa M, et al. Emergence of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* and the novel carbapenemases OXA-244 and OXA-245 in Spain. *J Antimicrob Chemother.* 2013;68(2):317-321. doi:10.1093/jac/dks383.
 50. Vanegas JM, Ospina WP, Felipe Higuera-Gutiérrez L, Natalia Jiménez J. First reported case of an OXA-48-producing isolate from a Colombian patient. *Integr Med Res.* 2016;6:67-68. doi:10.1016/j.jgar.2016.04.001.
 51. Munoz-Price LS, Poirel L, Bonomo RA, et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. *Lancet Infect Dis.* 2013;13(9):785-796. doi:10.1016/S1473-3099(13)70190-7.
 52. Pillai DR, Melano R, Rawte P, et al. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase, Canada. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(5):827-829. doi:10.3201/eid1505.081536.
 53. Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First detection of the plasmid-mediated class a carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006;50(8):2880-2882. doi:10.1128/AAC.00186-06.
 54. Cuzon G, Naas T, Correa A, Quinn JP, Villegas MV, Nordmann P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. *Int J Antimicrob Agents.* 2013;42(1):59-62. doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.04.002.
 55. Pasteran FG, Otaegui L, Guerriero L, et al. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1178-1180.
 56. Chagas TPG, Seki LM, da Silva DM, Asensi MD. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. *J Hosp Infect.* 2011;77(3):281. doi:10.1016/j.jhin.2010.10.008.
 57. Wei ZQ, Du XX, Yu YS, Shen P, Chen YG, Li LJ. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. *Antimicrob Agents Chemother.* 2007;51(2):763-765. doi:10.1128/AAC.01053-06.
 58. Chen LF, Anderson DJ, Paterson DL. Overview of the epidemiology and the threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) resistance. *Infect Drug Resist.* 2012;5:133-141. doi:10.2147/IDR.S26613.
 59. Woodford N, Zhang J, Warner M, et al. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(6):1261-1264. doi:10.1093/jac/dkn396.
 60. UK Government Web Archive – The National Archives. Carbapenemase-producing

Enterobacteriaceae in the UK.

<http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714084352/http://www.hpa.org.uk/HPR/archives/2011/news2411.htm>. Published 2011. Accessed April 2, 2017.

61. K Tegmark Wisell, S Hæggman, L Gezelius OT. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden.
<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=3333>. Published 2007. Accessed April 2, 2017.
62. Maltezou HC, Giakkoupi P, Maragos A, et al. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J Infect*. 2009;58(3):213-219. doi:10.1016/j.jinf.2009.01.010.
63. Souli M, Galani I, Antoniadou A, et al. An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Clin Infect Dis*. 2010;50(3):364-373. doi:10.1086/649865.
64. Naas T, Nordmann P, Vedel G, Poyart C. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France [3]. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49(10):4423-4424. doi:10.1128/AAC.49.10.4423-4424.2005.
65. Dortet L, Radu I, Gautier V, Blot F, Chachaty E, Arlet G. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. *J Antimicrob Chemother*. 2007;61(2):455-457.
doi:10.1093/jac/dkm455.
66. Petrella S, Ziental-Gelus N, Mayer C, Renard M, Jarlier V, Sougakoff W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely broad-spectrum class A beta-lactamase KPC-2 identified in an *Escherichia coli* strain and an *Enterobacter cloacae* strain isolated from the same patient in France. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008;52(10):3725-3736. doi:10.1128/AAC.00163-08.
67. Fontana C, Favaro M, Sarmati L, et al. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. *BMC Res Notes*. 2010;3(1):40. doi:10.1186/1756-0500-3-40.
68. ECDC. *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe*; 2012.
69. Curiao T, Morosini MI, Ruiz-Garbajosa P, et al. Emergence of blaKPC-3-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(8):1608-1614.
doi:10.1093/jac/dkq174.
70. Oteo J, Ortega A, Bartolomé R, et al. Prospective multicenter study of carbapenemase-

- producing Enterobacteriaceae from 83 hospitals in Spain reveals high in vitro susceptibility to colistin and meropenem. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;59(6):3406-3412. doi:10.1128/AAC.00086-15.
71. Poirel L, Barbosa-Vasconcelos A, Simões RR, Da Costa PM, Liu W, Nordmann P. Environmental KPC-producing *Escherichia coli* isolates in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56(3):1662-1663. doi:10.1128/AAC.05850-11.
 72. Calisto FAG. RPDI-VOL-8-N-3. *Rev Port Doenças Infecç.* 2012;8(3).
 73. VUBIL D, FIGUEIREDO R, REIS T, CANHA C, BOAVENTURA L, DA SILVA GJ. Outbreak of KPC-3-producing ST15 and ST348 *Klebsiella pneumoniae* in a Portuguese hospital. *Epidemiol Infect.* 2016:1-5. doi:10.1017/S0950268816002442.
 74. WHO Antimicrobial resistance. *WHO.* 2016.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/>. Accessed June 1, 2017.
 75. Tacconelli E, Cataldo MA, Dancer SJ, et al. ESCMID guidelines for the management of the infection control measures to reduce transmission of multidrug-resistant Gram-negative bacteria in hospitalized patients. *Clin Microbiol Infect.* 2014;20(s1):1-55. doi:10.1111/1469-0691.12427.
 76. Calbo E, Freixas N, Xercavins M, et al. Foodborne Nosocomial Outbreak of SHV1 and CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Epidemiology and Control. Clin Infect Dis.* 2011;52(6):743-749. doi:10.1093/cid/ciq238.
 77. Wilson APR, Livermore DM, Otter JA, et al. Prevention and control of multi-drug-resistant Gram-negative bacteria: recommendations from a Joint Working Party. *J Hosp Infect.* 2016;92:1-44. doi:10.1016/j.jhin.2015.08.007.
 78. Centers for Disease Control and Prevention. Tracking mcr -1 Antibiotic/Antimicrobial Resistance. <https://www.cdc.gov/drugresistance/tracking-mcr1.html>. Published 2016. Accessed April 2, 2017.
 79. Pincus DH. *MICROBIAL IDENTIFICATION USING THE BIOMÉRIEUX VITEK® 2 SYSTEM VITEK 2 and VITEK 2 XL.* www.pda.org/bookstore. Accessed May 18, 2017.
 80. Alder J, Franklin R. Cockerill; Jean B. Patel; Maria M.; Patricia A. Bradford; Michael N. Dudley; George M. Eliopoulos; Dwight J. Hardy ; David W. Hecht; Janet A. Hindler; Mair Powell ; Path Jana; M. Swenson Richard; B. Thomson Jr. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement.* Vol 33.; 2013.
 81. EUCAST. *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing Breakpoint Tables for Interpretation of MICs and Zone Diameters;* 2017.

- http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_7.1_Breakpoint_Tables.pdf. Accessed May 22, 2017.
82. *SUBSTANTIAL EQUIVALENCE DETERMINATION DECISION SUMMARY ASSAY ONLY TEMPLATE*. https://www.accessdata.fda.gov/cdrh_docs/reviews/K072038.pdf. Accessed May 18, 2017.
 83. Spanu T, Sanguinetti M, Tumbarello M, et al. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. *J Clin Microbiol*. 2006;44(9):3257-3262. doi:10.1128/JCM.00433-06.
 84. Paterson DL, Bonomo RA. Extended-Spectrum beta-Lactamases: a Clinical Update. *Clin Microbiol Rev*. 2005;18(4):657-686. doi:10.1128/CMR.18.4.657.
 85. Nordmann P, Poirel L, Dortet L. Rapid Detection of Carbapenemase- producing Enterobacteriaceae. doi:10.3201/eid1809.120355.
 86. Garg A, Garg J, Upadhyay GC, Agarwal A, Bhattacharjee A. Evaluation of the Rapidec Carba NP Test Kit for Detection of Carbapenemase-Producing Gram-Negative Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7870-7872. doi:10.1128/AAC.01783-15.
 87. Manageiro V, Ferreira E, Almeida J, Barbosa S, Simões C. *Molecular Survey of 2109 Carbapenem Resistance Enterobacteriaceae Isolates from Portuguese Hospitals: Co-Production of Carbapenemase KPC-3 and the Efflux Pump OqxAB*; 2014. http://repositorio.insa.pt/bitstream/10400.18/2967/1/abstract_ECCMID2014_KPC_VM.pdf. Accessed June 13, 2017.
 88. Gonçalves D. Escherichia coli e *Klebsiella pneumoniae*, das ESBLs às Carbapenemases, colonização fecal e infeção. Influência da população idosa numa região do Norte de Portugal. 2013. doi:10.1017/CBO9781107415324.004.
 89. Voets GM, Platteel TN, Fluit AC, et al. Population Distribution of Beta-Lactamase Conferring Resistance to Third-Generation Cephalosporins in Human Clinical Enterobacteriaceae in The Netherlands. *PLoS One*. 2012;7(12). doi:10.1371/journal.pone.0052102.
 90. Calhau V, Boaventura L, Ribeiro G, Mendonça N, da Silva GJ. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* isolated from renal transplanted patients: virulence markers, extended-spectrum β -lactamases, and genetic relatedness. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2014;79(3):393-395. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.031.
 91. Leal AL, Cortés JA, Arias G, et al. [Emergence of resistance to third generation

- cephalosporins by Enterobacteriaceae causing community-onset urinary tract infections in hospitals in Colombia]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2013;31(5):298-303. doi:10.1016/j.eimc.2012.04.007.
92. Patterson JE. Multidrug-resistant gram-negative pathogens: multiple approaches and measures for prevention. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2006;27(9):889-892. doi:10.1086/507436.
 93. European Centre for Disease Prevention and Control. *Antimicrobial Resistance Surveillance in Europe*; 2016.
 94. Pallo-Zimmerman LM, Byron JK, Graves TK. Fluoroquinolones: then and now. *Compend Contin Educ Vet*. 2010;32(July):E1-9; quiz E9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20957609>.
 95. Chen YH, Ko WC, Hsueh PR. The role of fluoroquinolones in the management of urinary tract infections in areas with high rates of fluoroquinolone-resistant uropathogens. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012;31(8):1699-1704. doi:10.1007/s10096-011-1457-x.
 96. Magiorakos AP, Suetens C, Monnet DL, et al. The rise of carbapenem resistance in Europe: just the tip of the iceberg? *Antimicrob Resist Infect Control*. 2013;2(1):6. doi:10.1186/2047-2994-2-6.
 97. OECD. *Health at a Glance: Europe 2012*. Vol 2008.; 2012. doi:10.1787/9789264183896-en.
 98. Liu Y-Y, Wang Y, Walsh TR, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(2):161-168. doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7.
 99. Jayol A, Poirel L, Dortet L, Nordmann P. National survey of colistin resistance among carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and outbreak caused by colistin-resistant OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae*, France, 2014. *Eurosurveillance*. 2016. doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.37.30339.
 100. Malhotra-Kumar S, Xavier BB, Das AJ, Lammens C, Butaye P, Goossens H. Colistin resistance gene mcr-I harboured on a multidrug resistant plasmid. *Lancet Infect Dis*. 2016;16(3):283-284. doi:10.1016/S1473-3099(16)00012-8.
 101. Thomson KS, Moland ESMT. Comparison of Phoenix and Vitek 2 ESBL Confirmatory Tests Against *E. coli* and *Klebsiella* Isolates with Well-characterized b-lactamases. 2006. <https://www.bd.com/ds/technicalCenter/whitepapers/lr222404.pdf>. Accessed April 2, 2017.

102. Birgy A, Bidet P, Genel N, et al. Phenotypic screening of carbapenemases and associated β -lactamases in carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(4):1295-1302. doi:10.1128/JCM.06131-11.
103. Poulou A, Grivakou E, Vrioni G, et al. Modified CLSI extended-spectrum β -lactamase (ESBL) confirmatory test for phenotypic detection of ESBLs among *Enterobacteriaceae* producing various β -lactamases. *J Clin Microbiol*. 2014;52(5):1483-1489. doi:10.1128/JCM.03361-13.
104. Manageiro V, Ferreira E, Almeida J, et al. Predominance of KPC-3 in a survey for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Portugal. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(6):3588-3592. doi:10.1128/AAC.05065-14.
105. Coelho A, González-López JJ, Miró E, et al. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;36(1):73-78. doi:10.1016/j.ijantimicag.2010.03.005.
106. Mshana SE, Hain T, Domann E, Lyamuya EF, Chakraborty T, Imirzalioglu C. Predominance of *Klebsiella pneumoniae* ST14 carrying CTX-M-15 causing neonatal sepsis in Tanzania. *BMC Infect Dis*. 2013;13:466. doi:10.1186/1471-2334-13-466.
107. Pasteran F, Tijet N, Melano RG, Corso A. Simplified Protocol for Carba NP Test for Enhanced Detection of Carbapenemase Producers Directly from Bacterial Cultures. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3908-3911. doi:10.1128/JCM.02032-15.
108. Osterblad M, Hakanen AJ, Jalava J. Evaluation of the Carba NP test for carbapenemase detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(12):7553-7556. doi:10.1128/AAC.02761-13.
109. Hombach M, von Gunten B, Castelberg C, Bloemberg G V. Evaluation of the Rapidec Carba NP Test for Detection of Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. *J Clin Microbiol*. 2015;53(12):3828-3833. doi:10.1128/JCM.02327-15.
110. Tascini C, Tagliaferri E, Giani T, et al. Synergistic activity of colistin plus rifampin against colistin-resistant kpc-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2013;57(8):3990-3993. doi:10.1128/AAC.00179-13.
111. Tumbarello M, Viale P, Viscoli C, et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: Importance of combination therapy. *Clin Infect Dis*. 2012;55(7):943-950. doi:10.1093/cid/cis588.
112. Ilias Karaiskos & Helen Giamarellou. Multidrug-resistant and extensively drug-resistant Gram-negative pathogens: current and emerging therapeutic approaches. *Expert Opin*

- Pharmacother.* 2014. doi:10.1517/14656566.2014.914172.
113. Dinh A. How to use fosfomycin in the MDR era? In: *Meet the Expert*. ECCMID; 2017. <http://www.eccmidlive.org/#resources/how-to-use-fosfomycin-in-the-mdr-era>. Accessed June 13, 2017.
114. Oliva A, Scorzoloni L, Castaldi D, et al. Double-carbapenem regimen, alone or in combination with colistin, in the treatment of infections caused by carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* (CR-Kp). *J Infect.* 2016;5:1-4. doi:10.1016/j.jinf.2016.10.002.
115. Paul M, Carmeli Y, Durante-Mangoni E, et al. Combination therapy for carbapenem-resistant Gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 2014. doi:10.1093/jac/dku168.
116. Cprek JB, Gallagher JC. Ertapenem-Containing Double-Carbapenem Therapy for Treatment of Infections Caused by Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60(1):669-673. doi:10.1128/AAC.01569-15.
117. Giamarellou H, Galani L, Baziaka F, Karaiskos I. Effectiveness of a double-carbapenem regimen for infections in humans due to carbapenemase-producing pandrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(5):2388-2390. doi:10.1128/AAC.02399-12.
118. Gaibani P, Lombardo D, Lewis RE, et al. In vitro activity and post-antibiotic effects of colistin in combination with other antimicrobials against colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates. *J Antimicrob Chemother.* 2014;69(7):1856-1865. doi:10.1093/jac/dku065.
119. Ceccarelli G, Falcone M, Giordano A, et al. Successful ertapenem-doripenem combination treatment of bacteremic ventilator-associated pneumonia due to colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2013;57(6):2900-2901. doi:10.1128/AAC.00188-13.
120. Nordmann P. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: Overview of a major public health challenge. *Med Mal Infect.* 2014. doi:10.1016/j.medmal.2013.11.007.

ANEXO I