

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

NOTA TÉCNICA Nº 01/2013

**MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE
INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS
MULTIRESISTENTES.**

Brasília, 17 de abril de 2013



Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Diretor-Presidente

Dirceu Brás Aparecido Barbano

Diretores

Jaime César de Moura Oliveira

José Agenor Álvares da Silva

Adjuntos de Diretor

Luiz Roberto da Silva Klassmann

Luciana Shimizu Takara

Neilton Araújo de Oliveira

Doriane Patrícia Ferraz de Souza

Chefe de Gabinete

Vera Maria Borralho Bacelar

Gerência Geral de Tecnologia em Serviços de Saúde - GGTES

Diana Carmem Almeida Nunes de Oliveira

Gerência de Vigilância e Monitoramento em Serviços de Saúde - GVIMS/GGTES

Magda Machado de Miranda Costa

Equipe técnica:

André Anderson Carvalho

Ana Clara ribeiro Bello dos Santos

Fabiana Cristina Sousa

Heiko Thereza Santana

Helen Norat Siqueira

Suzie Marie Gomes

Elaboração:

Câmara Técnica de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde

Membros:

Afonso Luis Barth

Alexandre Prehn Zavascki

Ana Cristina Gales

Ana Paula D'AlincourtCarvalho Assef

Anna Sara S. Levin

Elizabeth de Andrade Marques

Flávia Rossi

Jorge Luiz Mello Sampaio

Márcio de Oliveira Silva

Maria Goreth Matos de Andrade Barberino

Marise Dutra Asensi

Paula Virgínia MichelinToledo

Ricardo Ariel Zimmerman

Simone Aranha Nouer

1. INTRODUÇÃO

A resistência a carbapenêmicos em enterobactérias é um grave problema de saúde pública de âmbito mundial, particularmente pela elevada mortalidade e pelo reduzido número de opções terapêuticas^{1; 2}. Algumas publicações evidenciam taxas de mortalidade em 30 dias em 40% a 50%^{3; 4}. Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos (doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem) a produção de carbapenemases, seja por sua eficiência hidrolítica, pela sua codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis como plasmídios e transposons, ou pela sua rápida disseminação em âmbito mundial, tem o impacto mais significativo na saúde humana.

As carbapenemases são usualmente capazes de hidrolizar não só carbapenêmicos, mas também os demais beta-lactâmicos, como cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos⁵. Três grandes classes de carbapenemases são encontradas atualmente em enterobactérias no mundo inteiro: as metalo-betalactamases, sendo os tipos IMP, VIM e NDM as mais frequentemente detectadas em enterobactérias; as OXA-carbapenemases, sendo a mais frequente em enterobactérias a OXA-48; e as carbapenemases do tipo KPC. Indiscutivelmente, do ponto de vista epidemiológico são de extrema relevância as carbapenemases do tipo KPC e as do tipo NDM, pois ambas apresentaram rápida e ampla disseminação mundial após suas descrições iniciais.

Desde a descrição inicial de KPC no Brasil⁶, várias publicações tem demonstrado a sua disseminação em todo o Brasil, e sua presença em diversos gêneros e espécies bacterianas^{7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19}, inclusive bacilos Gram-negativos não fermentadores^{20; 21}. A disseminação de enterobactérias produtoras de KPC é um grave problema clínico e epidemiológico em diversas instituições de saúde brasileiras.

Casos esporádicos de *K. pneumoniae* produtoras da metalo-betalactamase IMP-1 também foram reportados^{22; 23}. Até a data da elaboração deste documento, não há relatos da detecção de enzimas do tipo OXA-48 no Brasil.

A NDM foi identificada pela primeira vez em 2008²⁴ e desde então tem sido amplamente descrita em enterobactérias causando infecções esporádicas e surtos principalmente no subcontinente Indiano²⁵. Poucos casos de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de NDM foram descritos na América Latina^{26; 27} e até o momento esta carbapenemase não tinha sido detectada em nosso país.

Recentemente foram detectados casos de microrganismos produtores de NDM-1 no estado do Rio Grande do Sul, na cidade de Porto Alegre. O gene *bla*_{NDM-1} foi identificado em *Providencia rettgeri* e *Enterobacter cloacae*.

A detecção desses casos aponta uma oportunidade para controle da disseminação desse tipo de mecanismo de resistência no Brasil. Esse controle só poderá ser alcançado com um grande esforço multidisciplinar, que inclui, além de outras medidas, detecção precoce de pacientes colonizados, implementação de precauções de contato e de tratamento adequado.

É fundamental que todos os serviços de saúde e laboratórios no Brasil utilizem os mesmos procedimentos e critérios interpretativos para a detecção de carbapenemases.

2. CRITÉRIOS NACIONAIS DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu os critérios diagnósticos e os indicadores nacionais adotados no sistema de monitoramento de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS). Os critérios diagnósticos e os indicadores de IRAS estão disponíveis no endereço eletrônico <http://bit.ly/KdgMER>.

3. COMUNICAÇÃO DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE

A Comissão/Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH/SCIH) do estabelecimento de saúde tem suas atribuições definidas pela Portaria nº 2.616, de 12 de maio de 1998, que inclui a implantação de um Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares. Dentre as atribuições, está a comunicação dos indicadores aos demais entes que compõem a organização nacional de prevenção e controle das IRAS, realizada por meio dos formulários eletrônicos, conforme orientações descritas no Manual dos Indicadores Nacionais de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.

4. MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE POR MICRORGANISMOS MULTIRRESISTENTES

A participação do laboratório é fundamental para a detecção oportuna de surtos infecciosos, de modo que oriente a adoção de medidas de prevenção e controle da disseminação.

Uma vez detectado um microrganismo multirresistente a comunicação deverá ser realizada imediatamente aos responsáveis pela tomada de decisão no âmbito do serviço de saúde, em geral ao profissional assistente e à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) que deverá adotar as medidas de prevenção e controle e às Coordenações de Controle de Infecção Hospitalar do Estado (CECIH), Município (CMCIH), Distrito Federal e à Anvisa.

Para a notificação desse agravo deve-se utilizar a ferramenta eletrônica, disponível no portal eletrônico da Anvisa pelo endereço:

http://formsus.datasus.gov.br/site/formulario.php?id_aplicacao=8934

O acesso às informações da notificação está permitido somente às CECIH, que efetivaram o Cadastramento Nacional junto à Anvisa. As CECIH também são responsáveis pela guarda e confidencialidade dos dados comunicados.

A(s) cepa(s) envolvida(s) no caso ou agregado de casos ou surto, em que haja suspeita de produção de carbapenemase, deverá(ão) ser enviada(s) ao Laboratório Central de Saúde Pública do estado para confirmação e análise molecular.

Os gestores do serviço de saúde e do laboratório possuem papéis determinantes sobre as medidas técnicas e administrativas de prevenção e controle das infecções no ambiente hospitalar, devendo direcionar os esforços, juntamente aos demais trabalhadores de saúde, para garantir a identificação precoce, a correta precaução padrão e a limpeza do ambiente.

A. Medidas específicas de prevenção e controle

Para a prevenção e o controle da disseminação/propagação do agente infeccioso é recomendado:

- Enfatizar a importância da higienização das mãos para todos os profissionais de saúde, visitantes e acompanhantes (*Segurança do paciente em serviços de saúde: Higienização das Mãos*: <http://bit.ly/10w5XDF>);
- Disponibilizar continuamente insumos para a correta higienização das mãos, conforme a RDC nº 42/2010;
- Disponibilizar continuamente Equipamento de Proteção Individual (luvas e aventais) para o manejo do paciente e suas secreções, além da correta paramentação para lidar com o ambiente em torno do paciente, colonizado ou infectado (ANVISA, 2010);

- A dedicação ao cuidado com o paciente (colonizado ou infectado) portador de agente produtor de carbapenemase deve, preferencialmente, ser por um corpo profissional exclusivo;
- Disponibilizar equipamentos e utensílios para o uso individual do paciente (estetoscópio, esfigmomanômetro, termômetro, talheres, copos e outros);
- Reforçar a aplicação de precauções de contato, em adição às precauções-padrão para profissionais de saúde, visitantes e acompanhantes, quando do isolamento de microrganismos de importância epidemiológica definida, ou, de forma empírica, para pacientes sob risco de colonização pelos mesmos, até obtenção de resultados de testes de vigilância microbiológica;
- Estabelecer uma área de isolamento do paciente ou coorte exclusiva para paciente colonizados/infectados pelo mesmo microrganismo multirresistente, bem como a identificar a condição de isolamento, inclusive no prontuário e portas de acesso;
- Avaliar a necessidade de implementar medidas de coorte em relação a profissionais de saúde e pacientes;
- Avaliar a necessidade de implantar coleta de culturas de vigilância, de acordo com o perfil epidemiológico da instituição;
- Considerar, de acordo com o momento epidemiológico da instituição e de sua capacidade, a adoção de política de descolonização para pacientes portadores de enterobactérias produtoras de carbapenemases. Esta medida auxiliar inclui a administração tópica e oral de agentes não absorvíveis com potencial ação *in vitro* contra isolados de enterobactérias resistentes ao carbapenêmicos;
- Enfatizar as medidas gerais de prevenção de IRAS no manuseio de dispositivos invasivos (*Manual de Orientações para Prevenção de Infecção Primária de Corrente Sanguínea*: <http://bit.ly/16wOFtF> e do Trato Respiratório: <http://bit.ly/x5O9f7>);
- Enfatizar as medidas gerais de higiene do ambiente (*Segurança do paciente em serviços de saúde: Limpeza e Desinfecção de Superfícies*: <http://bit.ly/XdVE7U>);
- Aplicar, durante o transporte intra-institucional e inter-institucional, as medidas de precauções de contato, em adição às precauções-

padrão, para os profissionais que entram em contato direto com o paciente, incluindo o reforço nas medidas de higiene do ambiente;

- Comunicar, no caso de transferência intra-institucional e inter-institucional, se o paciente é infectado ou colonizado por microrganismos multirresistentes;

- Não se recomenda a interrupção da assistência em serviços de saúde como medida a ser adotada de forma sistemática no controle de microrganismos multirresistentes. As medidas sanitárias que conduzam à interrupção da assistência em serviços de saúde devem ser avaliadas criteriosamente, em conjunto com as autoridades locais e entre os níveis de gestão do sistema de saúde;

- Manter o sistema de vigilância epidemiológica das Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) que permita o monitoramento de patógenos multirresistentes, em parceria com o laboratório de microbiologia;

- Fortalecer a política institucional de uso racional de antimicrobianos. Para este fim, deve-se lançar mão de algumas práticas recomendadas na literatura, tais como:

- Quando possível, implementar restrição preferencial de uso de certas classes de antimicrobianos potencialmente associadas à maior risco seleção de resistência, como as fluoroquinolonas, as cefalosporinas de terceira geração e os carbapenêmicos. Essa medida pode ser adotada, por exemplo, por meio da necessidade de preenchimento de formulário especial para uso desses agentes;
- Estreitamento de espectro do tratamento antimicrobiano quando da posse dos resultados de antibiogramas;
- Observação do conceito de “prazo mínimo eficaz” para definição de tempo de tratamento das síndromes infecciosas;
- Promoção de uso “heterogêneo” de diferentes classes de antimicrobianos, evitando prescrições excessivamente “monótonas” dos mesmos agentes;
- Promoção de prescrições de posologias mais recentes, baseadas em conceitos de PK/PD e enfatizando a importância das doses de ataque de antimicrobianos hidrofílicos (p.ex: b-lactâmicos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos e polimixinas) em pacientes criticamente enfermos.

B. Orientação Terapêutica

B1. Terapia Empírica:

A terapêutica para infecções por enterobactérias multirresistentes se baseia na utilização de Polimixina B ou Polimixina E (Colistina) em associação com um (1) ou mais dos antimicrobianos listados abaixo:

- Aminoglicosídeos (gentamicina ou amikacina)
- Carbapenêmicos (meropenem ou doripenem)
- Tigeciclina

Sempre usar associações de dois ou três antimicrobianos, sendo um deles a Polimixina B ou a Polimixina E (colistina). Deve-se evitar a utilização de monoterapias pelo risco de rápido desenvolvimento de resistência.

A escolha do(s) fármaco(s) de associação com Polimixina B ou E deve se basear, preferencialmente, no perfil de susceptibilidade esperado aos referidos medicamentos das enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos detectadas no seu hospital ou, na ausência de dados locais, na sua região. Deve-se considerar igualmente o local de infecção e a penetração esperada do antimicrobiano na escolha da droga a ser utilizada na combinação.

B2: Após a determinação do perfil de sensibilidade

Após a liberação do perfil de sensibilidade deve-se adequar o uso dos medicamentos. Sempre que possível, manter no mínimo 2 (dois) fármacos com sensibilidade comprovada *in vitro*. Não havendo sensibilidade a uma segunda droga (suscetibilidade apenas à Polimixina B ou E), recomenda-se manter a terapia combinada de Polimixina B ou E com Carbapenêmicos (Meropenem ou Doripenem) ou Tigeciclina, na tentativa de ocorrência de sinergismo entre elas.

Sugere-se além da determinação das CIMs para uma das Polimixinas (B ou E), que também sejam determinadas as CIMs de Tigeciclina e Carbapenêmicos (Meropenem), bem como a consultoria de um infectologista (ou Comissão de Controle de Infecção Hospitalar) para a determinação da terapia combinada com base na interpretação do

antibiograma / CIM e quadro clínico do paciente.

No caso de resistência às Polimixinas (concentrações inibitórias mínimas [CIMs] > 2 mg/L), recomenda-se a associação de dois ou três dos antimicrobianos sugeridos para a combinação.

Alguns autores tem preconizado a associação da fosfomicina intravenosa com outros antimicrobianos para o tratamento das infecções por enterobactérias produtoras de carbapenemases, particularmente quando há também resistência às polimixinas. O seu uso terapêutico deve ser subsidiado por teste de sensibilidade com determinação da concentração inibitória mínima (CIM), por diluição em ágar ou gradiente em ágar. Devem utilizados os critérios do EUCAST, segundo os quais são sensíveis enterobactérias com CIM igual ou menor que 32 mg/l e resistentes aquelas com CIM igual ou maior que 64 mg/l. O método da disco-difusão só poderá ser utilizado para interpretação dos testes de sensibilidade nos casos de infecção do trato urinário por *Escherichia coli*.

Esse antimicrobiano na sua forma intravenosa ainda não tem registro na ANVISA. Caso seja avaliada a sua necessidade pelos serviços de saúde, sua importação deve seguir o preconizado pela Lei 9782/99 http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L9782.htm e RDC ANVISA 28/2008 <http://www.brasilsus.com.br/legislacoes/rdc/13642-28.html>.

C. Critérios interpretativos para avaliação da sensibilidade de enterobactérias

Em todos os testes de sensibilidade aos antimicrobianos (TSA) de enterobactérias devem ser utilizadas as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* do ano vigente, com as modificações detalhadas na Tabela 1. Visando deixar claro para o médico assistente os critérios utilizados para interpretação dos testes de sensibilidade, sempre que forem utilizados os critérios interpretativos preconizados neste documento, incluir a seguinte nota no laudo: “Para a interpretação dos testes de sensibilidade foram utilizados os critérios preconizados na Nota Técnica da ANVISA Nº. 01/2013.”

Tabela 1 – Critérios interpretativos a serem utilizados em substituição/complementação àqueles definidos nos documentos do CLSI para testes de sensibilidade de enterobactérias

Antimicrobiano	Concentração Inibitória Mínima			Disco-Difusão			
	Sensível (µg/mL)	Intermediário (µg/mL)	Resistente (µg/mL)	Potência do	Sensível (mm)	Intermediário (mm)	Resistente (mm)

				Disco (µg)			
Aztreonam	≤ 1	2-4	≥ 8	30	≥ 24	21-23	≤ 20
Cefepima	≤ 1	2 – 4	≥ 8	30	≥ 24	21 - 23	≤ 20
Ceftazidima^A	≤ 1	2 – 4	≥ 8	10 ^A	≥ 22 ^A	19-21 ^A	≤ 18 ^A
Ertapenem	≤ 0,5	1	≥ 2	10	≥ 25	22 - 24	≤ 21
Colistina ou Polimixina B	≤ 2	-	≥ 4	- ^B	-	-	-
Tigeciclina	≤ 1	2	≥ 4	15	≥ 18 ^C	15 – 17 ^C	≤ 14 ^C

- A. A concentração do disco difere daquele usualmente comercializada pela maioria dos fabricantes.
- B. O método de Kirby-Bauer (disco-difusão) não é adequado para a avaliação da susceptibilidade às polimixinas.
- C. Os critérios interpretativos para tigeciclina, quando testada pelo método de Kirby-Bauer, estão disponíveis apenas para *E. coli*. Para outras espécies bacterianas, deve ser determinada a concentração inibitória mínima. A tigeciclina tem atividade reduzida contra enterobactérias dos gêneros *Morganella*, *Providencia* e *Proteus*.

C1. Determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIMs):

Considerando as dificuldades no tratamento das infecções por enterobactérias não sensíveis aos carbapenêmicos, a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) para imipenem, meropenem, tigeciclina, polimixina B ou colistina por método não automatizado é mandatória para guiar o tratamento. A continuidade do tratamento iniciado empiricamente com polimixinas deve ser subsidiado por determinação da CIM, pois em algumas instituições no Brasil a taxa de resistência às polimixinas, em enterobactérias produtoras de KPC, é superior a 9%.

Para tigeciclina os critérios interpretativos estão disponíveis apenas para *Escherichia coli*; portanto seu uso também deve ser guiado por determinação da CIM por método não automatizado.

C2. Triagem de enterobactérias produtoras de carbapenemases

Ao realizar TSA de enterobactérias isoladas de pacientes hospitalizados, o laboratório deverá testar simultaneamente ertapenem, imipenem e meropenem. Caso seja utilizado sistema de automação com painel sem ertapenem este antimicrobiano deverá ser testado por disco-difusão para auxiliar na liberação dos resultados.

Caso o isolado seja sensível aos três carbapenêmicos (ertapenem, imipenem, meropenem), o resultado poderá ser liberado como tal, quanto a esse grupo de

antimicrobianos, sem testes adicionais, ou seja, não é necessário pesquisar carbapenemases.

Para triagem de produtores de carbapenemase em isolados do Grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*) deverão ser considerados apenas os resultados de imipenem e meropenem, enquanto para isolados NÃO pertencentes ao Grupo CESP o ertapenem também deverá ser utilizado.

Isolados com diâmetro de halo de inibição ≤ 22 mm ou com CIM ≥ 2 µg/mL para imipenem e/ou meropenem, e isolados com diâmetro do halo de inibição ≤ 24 mm, ou CIM ≥ 1 µg/mL para ertapenem deverão ser testados, de modo suplementar, com discos de meropenem e imipenem com e sem adição de EDTA, cloxacilina (CLOXA) e ácido fenilborônico (AFB).

C3. Utilização do teste de Hodge modificado, potenciadores e inibidores para detecção de carbapenemases

O teste de Hodge modificado, amplamente utilizado em laboratórios de diagnóstico microbiológico em todo o Brasil, apresenta baixa sensibilidade para detecção de NDM ($\leq 50\%$); portanto, até que mais evidências científicas sejam acumuladas este teste não deve ser utilizado para detecção de carbapenemases, em particular NDM^{28; 29}.

A detecção fenotípica de carbapenemases deve ser baseada no uso de bloqueadores enzimáticos. As metalo-betalactamases, a exemplo daquelas do tipo NDM, apresentam dois íons de zinco em seu sítio catalítico; portanto a sua detecção baseia-se no uso de substâncias que atuem como quelantes desses íons. Várias substâncias tem essa propriedade; entretanto uma das mais utilizadas é o ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)⁵.

As KPCs são inibidas pelo ácido fenilborônico (AFB), mas não ocorre potenciação quando é adicionada a cloxacilina. As AmpCs plasmidiais são inibidas pelo ácido fenilborônico, mas ocorre potenciação quando é adicionada a cloxacilina (CLOXA)^{30; 31}.

C4. Preparo dos discos com AFB, CLOXA ou EDTA:

É essencial que os discos com e sem adição de soluções sejam do mesmo lote e fabricante. O modo mais prático de preparar os discos é depositá-los sobre a face interna de uma tampa de placa de Petri estéril e a seguir dispensar 10 µL de solução de EDTA, AFB ou CLOXA (Ver item 5.5). Deixar evaporar o excesso de umidade por cerca de 20 minutos. Carbapenêmicos degradam com a presença de umidade; portanto a estocagem dos discos já adicionados das soluções é desaconselhável. Recomendamos a preparação dos discos no mesmo dia do uso. Ver item 5.6 para controle de qualidade.

C5. Testes com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemases

Preparar suspensão bacteriana com turbidez equivalente ao padrão 0.5 da escala de McFarland em salina 0,9% estéril. Umedecer o swab na suspensão, eliminar o excesso e espalhar homogeneamente a suspensão bacteriana sobre a superfície do ágar Mueller-Hinton em placa 15 x 150 mm. Após evaporação do excesso de umidade aplicar os discos conforme Figura 1. Incubar por 18 a 24 horas a 36 ± 1 °C em ar ambiente. Os testes fenotípicos consistem em uma triagem. Apenas os testes moleculares, como PCR com iniciadores específicos e sequenciamento são confirmatórios.

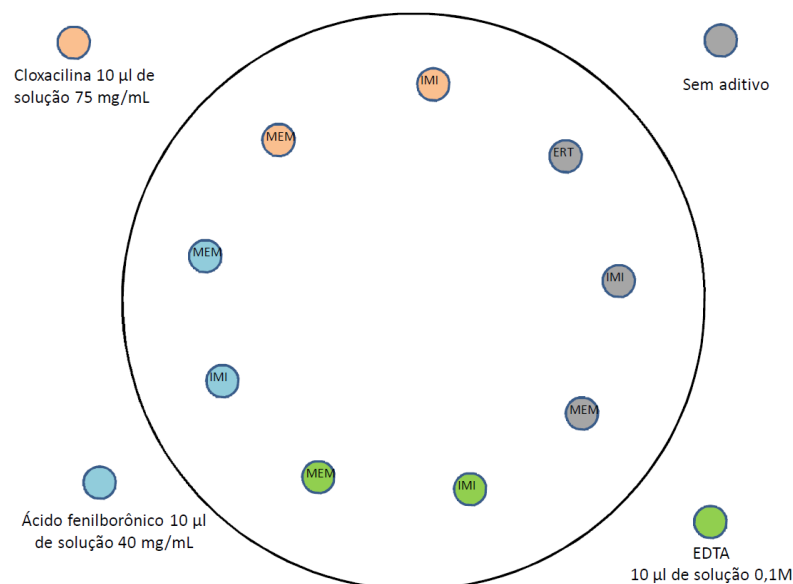


Figura 1- Esquema para aplicação de discos de antimicrobianos para detecção de carbapenemases.

ERT – ertapenem; MEM – meropenem; IMP – imipenem.

C6. Interpretação dos Testes com inibidores e potenciador para detecção de carbapenemases

A interpretação depende da espécie bacteriana. O motivo da estratificação dos critérios interpretativos para detecção de carbapenemases é devido à ocorrência de falsa positividade quando do uso do AFB para detecção de KPC no grupo CESP.

Isolados NÃO pertencentes ao grupo CESP:

Isolados com diferença de diâmetro ≥ 5 mm (Figura 2) para o carbapenêmico (imipenem ou meropenem) com EDTA em relação ao carbapenêmico sem EDTA deverão ser considerados potenciais produtores de metalo-betalactamase (IMP, VIM, NDM). Este achado preliminar deverá ser prontamente reportado ao SCIH e ao médico assistente.

Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm apenas com AFB, para qualquer um dos substratos (imipenem ou meropenem), deverão ser considerados produtores de KPC. A definição de necessidade de envio para o laboratório de referência ficará a critério das vigilâncias estaduais.

Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição ≥ 5 mm com AFB e CLOXA, para qualquer um dos substratos, deverão ser considerados produtores de AmpC plasmidial e deficientes em porinas.

Isolados com diferença de diâmetro de halo de inibição <5 mm com AFB, CLOXA e EDTA podem ser mutantes deficientes em porinas ou produtores de OXA-48.

Os resultados dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos devem ser liberados de acordo com os critérios interpretativos descritos na Tabela 1, sem alteração das categorias, mas sempre acompanhados de uma das observações detalhadas na legenda da Figura 2.

Grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Providencia* spp., *Morganella morganii* e *Hafnia alvei*):

Para triagem de produtores de carbapenemase em isolados do Grupo CESP deverão ser considerados apenas os resultados para imipenem e meropenem (Figura 2). Isolados com diferença ≥ 5 mm entre o diâmetro do halo de inibição com disco de carbapenêmico (imipenem ou meropenem) adicionado de EDTA e diâmetro do halo de inibição do disco de carbapenêmico sem EDTA deverão ser considerados potenciais produtores de metalo-betalactamase (IMP, VIM, NDM). Este achado preliminar

deverá ser prontamente reportado ao SCIH e ao médico assistente, e o isolado deverá ser encaminhado ao laboratório de referência mais próximo para confirmação por método molecular.

Isolados intermediários ou resistentes para imipenem e/ou meropenem e negativos para o teste de triagem podem ser produtores de outras carbapenemase (KPC ou OXA-48) ou mutantes deficientes em porinas⁵. Em função da ocorrência de resultados falsamente positivos utilizando-se o ácido fenilborônico (AFB) para triagem de produtores de KPC no grupo CESP, recomenda-se que a detecção dos genes que codificam essas seja feita apenas por técnicas de biologia molecular.

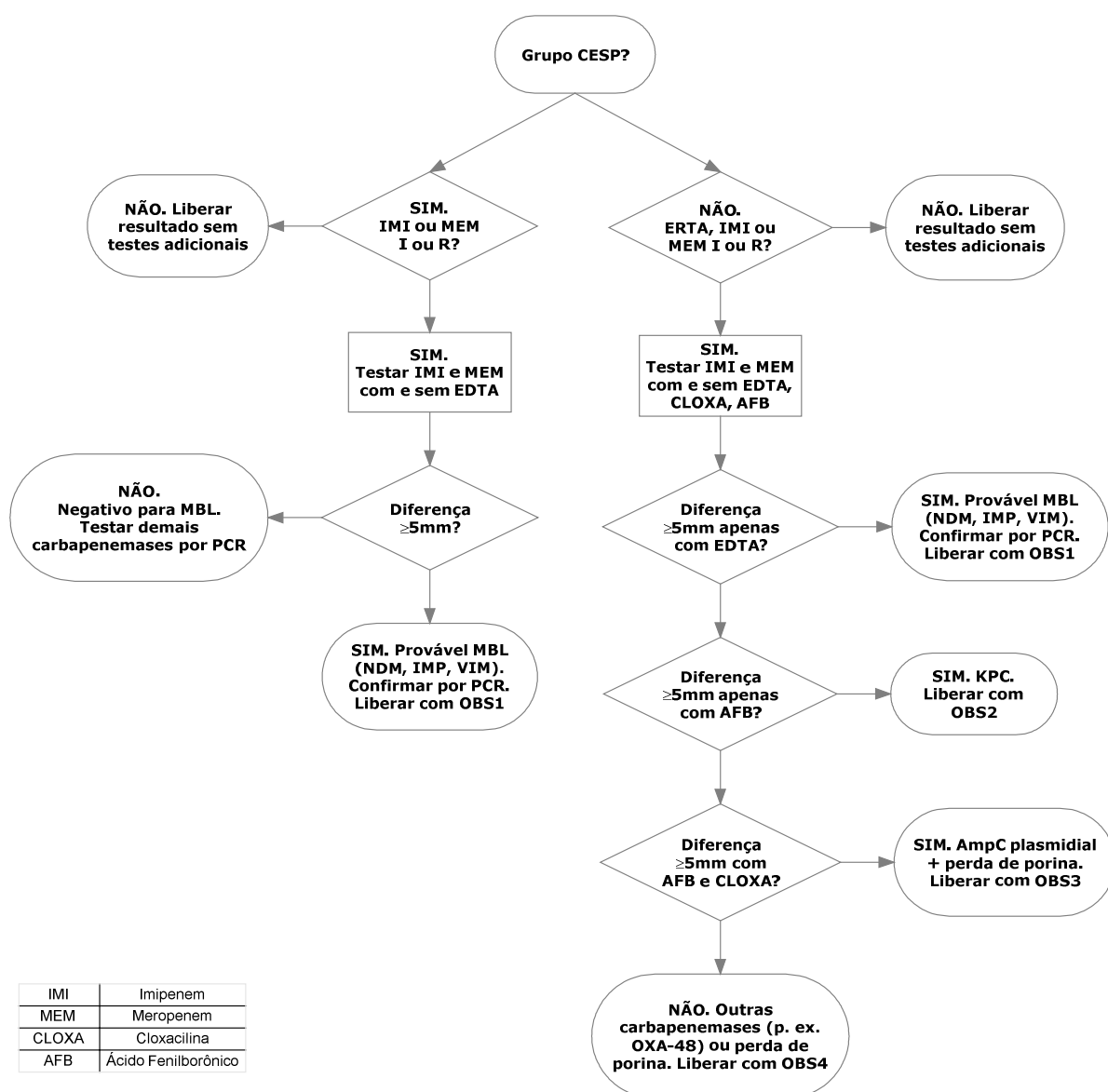


Figura 2- Fluxograma para detecção de carbapenemases no laboratório clínico.

Obs1: Em função da positividade do teste fenotípico para (MBL) metalo-betalactamase (bloqueio enzimático com EDTA) será realizada PCR para *bla_{NDM}*.

Obs2- A detecção de KPC foi realizada por bloqueio enzimático com ácido fenilborônico, método com especificidade superior a 99%. A confirmação por PCR poderá ser realizada mediante solicitação específica ou envio a laboratório de referência.

Obs3: A detecção de AmpC plasmidial foi realizada por bloqueio enzimático com ácido fenilborônico e potenciação com cloxacilina. A expressão de AmpC plasmidial, quando associada à perda de porinas pode causar resistência aos carbapenêmicos.

Obs4- Nas enterobactérias não pertencentes ao grupo CESP, a negatividade dos testes fenotípicos para KPC, metalo-betalactamases e AmpC, mas resistência a carbapenêmicos podem indicar a presença da carbapenemase OXA-48 ou perda de porinas.

5. DETECÇÃO DE COLONIZAÇÃO POR ENTEROBACTÉRIAS RESISTENTES AOS CARBAPENÊMICOS

5.1 Tipo de amostra clínica e coleta

As amostras a serem utilizadas para avaliação de colonização por enterobactérias produtoras de carbapenemases são: material coletado com swab retal ou fezes.

Para coleta com swab retal utilizar swab com meio de transporte de Amies, Cary-Blair ou Stuart. Umedecer a ponta em água destilada estéril. Encostar o swab no esfíncter anal e aguardar alguns segundos para o relaxamento. Introduzir o swab cerca de 4 cm, girá-lo sobre seu próprio eixo por duas vezes, remove-lo e introduzi-lo no meio de transporte.

5.2 Transporte da amostra ao laboratório

Amostras de fezes ou retal devem ser coletadas em swab com meio de transporte (Stuart, Amies ou Cary-Blair) e enviadas ao laboratório o mais rápido possível, apesar de enterobactérias apresentarem estabilidade mínima de 4 h em temperatura ambiente e 72 horas sob refrigeração (2 a 8°C) nesses meios de transporte³².

5.3 Semeadura

No laboratório de bacteriologia as amostras deverão ser inoculadas em meio líquido (caldo BHI ou caldo TSB) contendo 0,25 µg/ml de ertapenem e 100 µg/ml de ampicilina (a adição de ampicilina visa minimizar o crescimento de *Enterococcus* spp.). Alternativamente adicionar um disco de ertapenem (10 µg) a 10 ml de caldo imediatamente antes do uso. A seguir as culturas devem ser incubadas por 12 a 18 horas a 36 ±1 °C antes do repique para meio sólido. Subcultivar em ágar MacConkey por esgotamento e a seguir aplicar sobre a superfície do meio já semeado discos de ertapenem no início e no final das estrias. Alternativamente subcultivar a cultura bacteriana em ágar cromogênico comercialmente disponível para a detecção de ESBL (betalactamase de espectro ampliado), pois apresenta maior sensibilidade para detecção de carbapenemases, exceto OXA-48³³. Incubar por 18 a 24 horas a 36 ±1 °C em ar ambiente.

5.4 Leitura das placas:

Identificar por testes fenotípicos e realizar teste de sensibilidade das colônias com morfologias distintas, que estejam dentro de um halo com diâmetro igual ou menor que 27 mm ao redor do disco de ertapenem³⁴. Caso seja utilizado o meio cromogênico realizar testes fenotípicos e teste de sensibilidade das colônias com morfologias distintas. Testar e interpretar conforme itens 5 e 6.

5.5. Preparo de soluções:

A. Solução de ácido fenilborônico 40 mg/ml* (AFB)

- Ácido fenilborônico ----- 240 mg
- DMSO ----- 3 ml
- Água grau reagente estéril ----- 3 ml
- Estabilidade e conservação: 3 meses a -20°C;

*Esta recomendação tem o dobro da concentração originalmente descrita, de modo a padronizar o volume de 10 µl para todas as soluções a serem adicionadas aos discos³⁵.

A esterilização por filtração (0,22 µm) é opcional. por filtração

B. Solução de EDTA 0,1 M³⁶

- EDTA ----- 1,86 g

- Água grau reagente ----- 40 mL
- Agitar até completa dissolução do EDTA, elevando o pH para $7,5 \pm 0,1$ com NaOH 5M
 - A solução de NaOH 5M pode ser preparada dissolvendo-se 20 g de hidróxido de sódio em água grau reagente, até completar o volume total, em temperatura ambiente, de 100 ml.
- Ajustar o volume da solução de EDTA para 50 ml
- Distribuir em alíquotas de 1 a 2 ml
- Esterilizar em autoclave por 10 min a 121 °C
- Estabilidade e conservação: temperatura ambiente (15 a 25°C) por 1 ano. Não refrigerar ou congelar, pois pode haver precipitação da solução.

C. Solução de Cloxacilina (CLOXA)

- Cloxacilina sal sódico monohidratado ----- 750 mg
- Água grau reagente ----- 10 ml
- Esterilizar por filtração 0,22 μ m
- Estabilidade e conservação: 3 meses a -20°C;

5.6. Controle de qualidade dos discos com inibidores ou potenciador

Para controle de qualidade dos discos, testar semanalmente as cepas listadas na Tabela 2, que serão depositadas no INCQS. Tão logo os números de depósito estejam disponíveis, a tabela será atualizada.

Tabela 2 – Diferença entre diâmetros de halos de inibição para imipenem e meropenem não suplementados e suplementados com EDTA, CLOXA ou AFB (mm)

	AFB	EDTA	CLOXA
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0 a 1	0 a 1	0 a 1
<i>K. pneumoniae</i> BR-1 ²³	0 a 1	> 4	0 a 1
<i>K. pneumoniae</i> KPC-2 ⁶	≥ 5	0 a 1	0 a 1
<i>E. coli</i> CMY-2 ³⁷	≥ 5	0 a 1	≥ 5

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ¹ NORDMANN, P.; CORNAGLIA, G. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a call for action! **Clin Microbiol Infect**, v. 18, n. 5, p. 411-2, May 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22507108>>.
- ² NORDMANN, P. et al. The emerging NDM carbapenemases. **Trends Microbiol**, v. 19, n. 12, p. 588-95, Dec 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078325>>.
- ³ NAVARRO-SAN FRANCISCO, C. et al. Bacteraemia due to OXA-48-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*: a major clinical challenge. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 2, p. E72-9, Feb 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23231088>>.
- ⁴ TUMBARELLO, M. et al. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae*: importance of combination therapy. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 7, p. 943-50, Oct 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22752516>>.
- ⁵ QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, Jul 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17630334>>.
- ⁶ MONTEIRO, J. et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, Jan 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19015350>>.
- ⁷ PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, Jun 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19332672>>.
- ⁸ PEIRANO, G. et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 2, p. 265-8, Feb 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19028717>>.
- ⁹ ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **Int J Antimicrob Agents**, v. 34, n. 3, p. 286-8, Sep 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19406624>>.
- ¹⁰ D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A. P. et al. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 68, n. 3, p. 337-8, Nov 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20850249>>.
- ¹¹ ZAVASCKI, A. P. et al. KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: a widespread threat in waiting? **Int J Infect Dis**, v. 14, n. 6, p. e539-40, Jun 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19889563>>.
- ¹² BEIRAO, E. M. et al. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 1, p. 69-73, Jan-Feb 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21412593>>.

- 13 SEKI, L. M. et al. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 2, p. 274-7, Jun 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21397425>>.
- 14 CABRAL, A. B. et al. Multidrug resistance genes, including *bla*(KPC) and *bla*(CTX)-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 45, n. 5, p. 572-8, Oct 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23152339>>.
- 15 FEHLBERG, L. C. et al. Emergence of *Klebsiella pneumoniae*-producing KPC-2 carbapenemase in Paraiba, Northeastern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 16, n. 6, p. 577-80, Nov 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23158264>>.
- 16 NICOLETTI, A. G. et al. Clonal complex 258, the most frequently found multilocus sequence type complex in KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in Brazilian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 8, p. 4563-4; author reply 4565, Aug 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22826287>>.
- 17 RAMOS, P. I. et al. Pyrosequencing-based analysis reveals a novel capsular gene cluster in a KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate identified in Brazil. **BMC Microbiol**, v. 12, p. 173, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22882772>>.
- 18 PEREIRA, P. S. et al. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11 (ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**, v. 68, n. 2, p. 312-6, Feb 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070735>>.
- 19 RIBEIRO, V. B. et al. Detection of *bla*KPC-2 in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 11, p. 2776-7, Nov 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22850690>>.
- 20 ALMEIDA, A. C. et al. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 4, p. 2205-6, Apr 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22290946>>.
- 21 JACOME, P. R. et al. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 56, n. 9, p. 4990, Sep 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22751532>>.
- 22 PENTEADO, A. P. et al. Dissemination of *bla*(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene *dfr*23. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 63, n. 1, p. 87-91, Jan 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18990526>>.
- 23 LINCOPAN, N. et al. Enterobacteria producing extended-spectrum beta-lactamases and IMP-1 metallo-beta-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **J Med Microbiol**, v. 55, n. Pt 11, p. 1611-3, Nov 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17030928>>.
- 24 YONG, D. 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**, v. 53, n. 12, p. 5046-54, Dec 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19770275>>.
- 25 JOHNSON, A. P.; WOODFORD, N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. **J Med Microbiol**, v. 62, n. Pt 4, p. 499-513, Apr 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23329317>>.
- 26 ESCOBAR PEREZ, J. A. et al. Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Neonatal Unit in Colombia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 57, n. 4, p. 1957-60, Apr 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23357776>>.
- 27 PASTERAN, F. et al. Emergence of NDM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* in Guatemala. **J Antimicrob Chemother**, v. 67, n. 7, p. 1795-7, Jul 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22461309>>.
- 28 GIRLICH, D.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Value of the modified Hodge test for detection of emerging carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol**, v. 50, n. 2, p. 477-9, Feb 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22116154>>.
- 29 CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. CLSI document M100-S23. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute 2013.
- 30 GISKE, C. G. et al. A sensitive and specific phenotypic assay for detection of metallo-beta-lactamases and KPC in *Klebsiella pneumoniae* with the use of meropenem disks supplemented with aminophenylboronic acid, dipicolinic acid and cloxacillin. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 4, p. 552-6, Apr 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20597925>>.
- 31 TSAKRIS, A. et al. A simple phenotypic method for the differentiation of metallo-beta-lactamases and class A KPC carbapenemases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 8, p. 1664-71, Aug 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20542902>>.
- 32 EDERER, G. M.; CHRISTIAN, D. L. Evaluation of bacteriological transport systems. **Am J Med Technol**, v. 41, n. 8, p. 299-306, Aug 1975. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239597>>.
- 33 CARRER, A.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Use of ChromID extended-spectrum beta-lactamase medium for detecting carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 5, p. 1913-4, May 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20237104>>.
- 34 LOLANS, K. et al. Direct ertapenem disk screening method for identification of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in surveillance swab specimens. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 3, p. 836-41, Mar 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20071553>>.
- 35 PITOUT, J. D. et al. Detection of AmpC beta-lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. **Clin**

- Microbiol Infect**, v. 16, n. 2, p. 165-70, Feb 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19456838>>.
- 36 NORDMANN, P. et al. How to detect NDM-1 producers. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 718-21, Feb 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21123531>>.
- 37 PAVEZ, M. et al. Emergence of carbapenem-resistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC beta-lactamase in Brazil. **J Med Microbiol**, v. 57, n. Pt 12, p. 1590-2, Dec 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19018036>>.
- 38 FALAGAS, M.E; KARAGEORGOPOULOS, D.E.; NORDMANN, P. Therapeutic options for infections with Enterobacteriaceae producing carbapenem-hydrolyzing enzymes. **Future Microbiol**. 2011 Jun;6(6):653-66. doi: 10.2217/fmb.11.49.
- 39 LIVERMORE, D.M; WARNER M, MUSHTAQ S, DOUMITH M, ZHANG J, WOODFORD N. What remains against carbapenem-resistant Enterobacteriaceae? Evaluation of chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, fosfomycin, minocycline, nitrofurantoin, temocillin and tigecycline. **Int J Antimicrob Agents**. 2011 May;37(5):415-9. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.01.012.
- 40 SOULI, M.; GALANI, I.; BOUKOVALAS, S.; GOURGOULIS, M.G.; CHRYSSOULI, Z; KANELAKOPOULOU, K.; PANAGEA, T.; GIAMARELLOU, H. In vitro interactions of antimicrobial combinations with fosfomycin against KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* and protection of resistance development. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011 May;55(5):2395-7. doi: 10.1128/AAC.01086-10. Epub 2011 Feb 14.
- 41 GIAMARELLOU, H.; POULAKOU, G.; Multidrug-resistant Gram-negative infections: what are the treatment options? **Drugs**. 2009 Oct 1;69(14):1879-901. doi: 10.2165/11315690-000000000-00000. Review.
- 42 ENDIMIANI, A.; PATEL, G.; HUJER, K.M.; SWAMINATHAN, M.; PEREZ, F.; RICE, L.B.; JACOBS, M.R.; BONOMO, R.A. In vitro activity of fosfomycin against blaKPC-containing *Klebsiella pneumoniae* isolates, including those non susceptible to tigecycline and/or colistin. **Antimicrob Agents Chemother**. 2010 Jan;54(1):526-9. doi:10.1128/AAC.01235-09.
- 43 ANVISA. Alerta N. 01/2011. Detecção de metalobetalactamases do tipo NDM em dois isolados de *Klebsiella pneumoniae* na Guatemala. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2011.
- 44 ANVISA. Nota Técnica N. 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. [Online] 25 de Out. de 2010. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/6c8f7b8047457811857ed53fbc4c6735/nota25-10-2010.pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 26 de Dez. de 2012. 2010 a.>

- ⁴⁵ ANVISA. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N. 42. Dispõe sobre a obrigatoriedade de disponibilização de preparação alcoólica para fricção antiséptica das mãos, pelos serviços de saúde do país e dá outras providências. Brasília, DF : Diário Oficial da União de 26 de out. de 2010.
- ⁴⁶ ANVISA. Comunicado de Risco nº 002, de 26 de dezembro de 2013 Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM, na região das Américas, Brasília, DF, 2012.
- ⁴⁷ PAHO/OMS. Alerta epidemiológica: transmisión de bacterias multirresistentes tipo NDM en servicios de atención de salud. Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS). [Online] 19 de Dez de 2012. Disponível em http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=19619&Itemid=. Acesso em: 26 de Dez. de 2012.
- ⁴⁸ PAHO/OMS.Precauciones de control de infecciones en brotes de bacterias productoras de carbapenemasas. prevención y control de infecciones en la atención de la salud. [Impressa]. s.l. : Panamericana de la Salud (OPS)/Organización Mundial de la Salud (OMS), Ago. de 2012.