

## TESTES FENOTÍPICOS PARA A DETECÇÃO E DIFERENCIAÇÃO DE CARBAPENEMASES EM Enterobacterales ISOLADAS DE HEMOCULTURAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

HENOTYPIC TESTS FOR DETECTION AND DIFFERENTIATION OF CARBAPENEMASES IN Enterobacterales ISOLATED FROM BLOOD OF CANCER PATIENTS

Aline Correia do Nascimento<sup>1</sup>  
Vitória Talita Reichardt<sup>2</sup>  
Jannaina Ferreira de Melo Vasco<sup>3</sup>  
Luiza Souza Rodrigues<sup>4</sup>

### RESUMO

Pacientes oncológicos são especialmente suscetíveis ao desenvolvimento de infecções bacterianas. Um agravante desta situação é a emergência da resistência bacteriana associada ao esgotamento de recursos farmacológicos no combate a infecções hospitalares. Neste contexto, destaca-se a resistência aos beta-lactâmicos associada à produção de enzimas tipo beta-lactamases pela ordem Enterobacterales, que vem se tornando um problema de saúde pública em todo o mundo. O objetivo do estudo foi detectar e diferenciar por métodos fenotípicos, enzimas do tipo serina e metalo-beta-lactamase em microrganismos da ordem Enterobacterales, isolados de hemoculturas de pacientes oncológicos. Este estudo utilizou microrganismos previamente isolados de hemocultura coletadas durante o período de um ano, a partir de setembro de 2015, identificadas e avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade aos antibióticos carbapenêmicos. Todos os isolados intermediários ou resistentes ao ertapenem, meropenem ou imipenem foram incluídos no estudo e avaliados quanto à possível produção de carbapenemase pelas técnicas mCIM e eCIM. Dos 18 isolados incluídos, 14 estavam viáveis para a realização dos testes. Destes, quatro foram positivos no teste mCIM, sugerindo a produção de carbapenemase pelas bactérias testadas, e nenhuma foi positiva no eCIM, excluindo assim tratar-se de metalo-beta-lactamases. A disseminação dos mecanismos de resistência à classe dos antibióticos carbapenêmicos, especialmente entre os bacilos Gram-negativos, é preocupante, entretanto sua ocorrência é variável entre os serviços de saúde. Este estudo reforça a importância de conhecer a epidemiologia local quanto ao perfil de suscetibilidade dos isolados bacterianos e a investigação dos possíveis mecanismos de resistência, a fim de estabelecer medidas de controle e terapias adequadas ao perfil hospitalar.

**PALAVRAS-CHAVE:** Carbapenemase; Enterobacterales; câncer; beta-lactâmicos.

### ABSTRACT

Cancer patients are especially susceptible to the bacterial infections. An aggravating factor in this situation is the emergence of bacterial resistance associated with the depletion of pharmacological resources to combat these hospital infections. In this context, the resistance to beta-lactams associated with beta-lactamase production by the Enterobacterales, which has become a public health problem worldwide. The aim of the study was to detect and differentiate by phenotypic method serine and metallo-beta-lactamase in Enterobacterales microorganism isolated from blood cultures of cancer patients. This experimental study used bacteria previously isolated from blood culture collected during the period of one year, starting in September 2015, identified and evaluated for the profile of susceptibility to carbapenems. All isolates intermediate or resistant to ertapenem, meropenem or imipenem were included in the study and evaluated for possible carbapenemase production by the mCIM and eCIM techniques. Of the 18 isolates included in the study, 14 were viable for testing. Of these, 4 were positive in the mCIM test, suggesting carbapenemase production, and none of them were positive in eCIM, thus excluding metallo-

<sup>1</sup> Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil.

<sup>2</sup> Graduada em Biomedicina pelo Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil.

<sup>3</sup> Graduada em Biomedicina pela Pontifícia Universidade Católica de Goiás pela PUC-GO; Especialista em microbiologia com ênfase em bacteriologia clínica e micologia clínica pela PUC-PR; Mestrado em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela UFPR; Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente PRPPG-UFPR.

<sup>4</sup> Graduada em Biomedicina pela Universidade de Uberaba; Especialização em Programa de Aprimoramento em Patologia Clínica pelo Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; Mestre em ciências pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP); Doutora em Biotecnologia Aplicada à Saúde da Criança pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

betalactamases. The spread of resistance mechanisms to the class of carbapenem antibiotics, especially among gram-negative bacilli, is worrying; however, their occurrence is variable among health services. This study reinforces the importance of knowing the local epidemiology regarding the susceptibility profile of bacterial isolates and the investigation of possible resistance mechanisms, in order to establish control measures and empirical therapies appropriate to the hospital profile.

**KEY WORDS:** Carbapenemase; Enterobacterales; cancer; beta-lactams.

## INTRODUÇÃO

O câncer é um problema de saúde pública que atinge pessoas em todos os países, sendo responsável por uma taxa de mais de seis milhões de óbitos a cada ano<sup>1:7</sup>. Pacientes oncológicos são um dos grupos mais vulneráveis a desenvolver infecções devido à imunossupressão associada ao tratamento direcionado (cirúrgico, quimioterápicos, radioterápicos e drogas imunomoduladoras e imunossupressoras). Em alguns casos, há também a necessidade de procedimentos invasivos, tais como, utilização de ventilação mecânica e cateter venoso central, que podem funcionar como porta de entrada para microrganismos patogênicos e desencadear quadros infecciosos<sup>2-5</sup>.

A identificação de microrganismos em amostras de sangue através da hemocultura representa um importante recurso diagnóstico em infecções sistêmicas, permitindo não apenas o isolamento e identificação do agente etiológico, como também a investigação de seu perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos<sup>6</sup>. Um dos grupos de microrganismos encontrado com elevada frequência em infecções hospitalares é o da ordem Enterobacterales, bacilos gram-negativos (BGN) anaeróbios facultativos, fermentadores de glicose, presente na microbiota normal do trato gastrointestinal de humanos e outros animais<sup>7,8</sup>.

Uma das grandes preocupações vinculadas às infecções causadas por BGN fermentadores de glicose, é quanto à ocorrência de resistência à classe dos carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem), pois são antibióticos de amplo espectro de ação, pertencentes à classe dos beta-lactâmicos, muito utilizados em infecções hospitalares graves<sup>9-11</sup>.

A resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos resulta de um processo adaptativo das células bacterianas, podendo ser favorecida e selecionada pelo uso irracional e indiscriminado destes fármacos tanto no ambiente hospitalar como na comunidade<sup>12,15</sup>. A célula bacteriana pode se defender da ação de antimicrobianos por meio de diversos mecanismos, incluindo alteração da permeabilidade da membrana plasmática, hiperexpressão

de bombas de efluxo, modificação do sítio alvo de ação do fármaco ou pela produção de enzimas que inativam ou degradam os antimicrobianos <sup>13</sup>.

Bactérias produtoras de carbapenemase são capazes de hidrolisar diferentes tipos de fármacos beta-lactâmicos, incluindo as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos <sup>14</sup>. As carbapenemases são as beta-lactamases com maior potencial de degradação e estão divididas em dois grupos de acordo com a classificação molecular de Ambler (1980) em serinas carbapenemases (classe A) e metalo-betalactamase (classe B) <sup>22,23,27</sup>. Infecções causadas por BGN fermentadores de glicose e produtores dessas enzimas aumentam a mortalidade dos pacientes, devido às poucas alternativas eficazes para tratamento e erradicação da infecção<sup>24</sup>. Dessa forma, torna-se essencial a realização de pesquisas voltadas à detecção de microrganismos produtores de carbapenemases <sup>18, 19</sup>.

O presente trabalho tem por objetivo detectar e diferenciar por testes fenotípicos a produção de enzimas carbapenemases do tipo serina ou metalo-betalactamase (MBL) em microrganismos da ordem Enterobacterales isolados de hemoculturas de pacientes oncológicos.

## MATERIAIS E METODO

Trata-se de um estudo experimental, em continuidade ao estudo de GONÇALVES (2016) e MACHIOSKI (2017). O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner sob o parecer nº1.181.747/2015, com início em setembro de 2015 e duração de um ano. Foram selecionadas bactérias da ordem Enterobacterales, previamente isolados e identificadas por GONÇALVES (2016) e avaliadas quanto ao perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) no estudo realizado por MACHIOSKI (2017). Todos os isolados intermediários ou resistentes ao ertapenem, meropenem e/ou imipenem foram incluídos no estudo e avaliados quanto à possível produção de carbapenemase.

Os microrganismos encontravam-se armazenados em microtubos contendo 1,0 mL de caldo *brain-heart-infusion* (BHI) acrescido de 50 µL de glicerol estéril, e congelados à -20°C no laboratório de microbiologia clínica do Centro Universitário Autônomo do Brasil – UniBrasil. Para o estudo, foram descongelados e uma alíquota 10 µL da bactéria foi transferida para um tubo contendo caldo BHI e incubados por 24 horas à 35 °C (±2°C) em estufa bacteriológica. Após o crescimento microbiano, cada amostra foi repicada em placa de petri com meio de cultura ágar macConkey, e incubadas por mais 24 horas à 35 °C (±2°C). Após

verificar a viabilidade e pureza dos isolados clínicos, estes foram submetidos aos testes fenotípicos.

### TESTES FENOTÍPICOS

A detecção e diferenciação das enzimas do tipo carbapenemase foi realizada pelos testes fenotípicos mCIM (método de inativação de carbapenêmicos modificado) e eCIM (inativação de carbapenêmicos modificado por EDTA) <sup>25,20</sup>. Os testes foram realizados conforme descrito no *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI), bem como sua interpretação <sup>17,20</sup>. Foram utilizados como cepas controle a *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922 que é sensível aos carbapenêmicos, *Klebsiella pneumoniae* produtora de enzima NDM (controle positivo para o teste mCIM e eCIM), e *K. pneumoniae* produtora de KPC (controle positivo para o teste mCIM e negativo para o eCIM).

#### mCIM

Para o teste fenotípico mCIM foram utilizados microtubos contendo 2 mL de caldo *brain-heart infusion* (BHI) aos quais foi adicionado 1 µL da bactéria a ser testada. Com o auxílio de uma pinça estéril foi acrescentado um disco de meropenem (10µg) ao microtubo e, em seguida, os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 35°C (±2°C) durante 4 horas <sup>20</sup>. Faltando 30 minutos para o término da incubação, foi preparada uma suspensão bacteriana com a cepa *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, em solução fisiológica estéril (0,85%) na escala 0,5 de McFarland e, então, semeada em placa de petri contendo o meio de cultura ágar mueller-hinton. Após o tempo de incubação, o disco de meropenem foi retirado do caldo e pressionado contra a borda interna do microtubo para retirar o excesso de BHI e, em seguida, foi transferido para a superfície do ágar mueller-hinton já inoculado com a bactéria *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922. A placa foi incubada por 18-24 horas à 35°C (±2°C) para posterior leitura e interpretação dos resultados (zona de inibição)<sup>17,20</sup>.

#### INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO mCIM

Os testes com zona de inibição entre 6 mm e 15 mm na superfície do ágar mueller-hinton inoculado com *E. coli* ATCC<sup>®</sup> 25922, foram interpretados como sendo produtores de carbapenemase, ou seja, o meropenem presente no disco foi hidrolisado pelo microrganismo junto com o qual foi incubado em meio BHI (microrganismo teste). Zonas de inibição ≥ 19 mm foram considerados negativas para a produção de carbapenemase <sup>25</sup>.

### eCIM

As cepas positivas no teste mCIM foram então testadas no eCIM, para diferenciar qual tipo de carbapenemase foi produzida<sup>17,20</sup>.

O teste eCIM segue o mesmo processo de preparo do teste mCIM, porém, foi acrescentado 20 µL de EDTA 0,5 M ao tubo contendo caldo BHI (2 mL) ao qual foram inoculados o microrganismo e o disco contendo meropenem (10 µg). A interpretação foi realizada após 18-24 horas de incubação à 35°C (±2°C). O teste mCIM foi repetido em paralelo ao teste eCIM, para determinar qual tipo de carbapenemase foi produzida pelo isolado através da comparações dos dois ensaios.

### INTERPRETAÇÃO DO RESULTADO eCIM

Para cada microrganismo testado, foi realizada a leitura das zonas de inibição formadas (mm) no mCIM e no eCIM. Em seguida, foram subtraído o valor obtido no eCIM do valor do mCIM (mCIM – eCIM). Dessa subtração, os resultados  $\geq 5$  mm de diâmetro foram classificados como produtores de MBL, e os resultados  $\leq 4$  mm foram caracterizados como produtores de serina carbapenemase<sup>17,20</sup>.

### RESULTADO E DISCUSSÃO

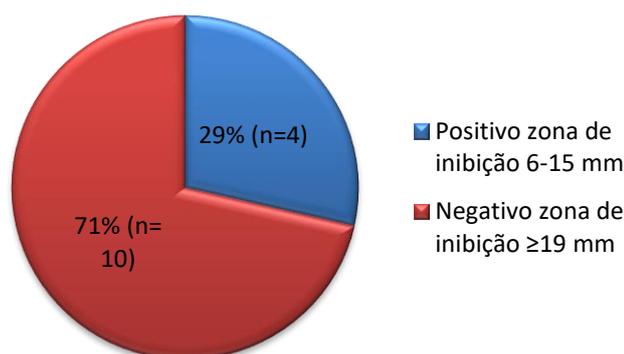
Foram incluídos no estudo 18 BGN fermentadores de glicose previamente isolados, identificados e avaliados quanto ao perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos. Seis *K. pneumoniae*, seis *E. coli*, um *Enterobacter cloacae*, dois *Enterobacter aerogenes*, uma *Serratia marcescens*, uma *Serratia liquefaciens* e um *Proteus mirabilis*. Entretanto, após o descongelamento dos microrganismos, quatro deles não estavam viáveis; um isolado de cada uma das espécies descritas a seguir: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. liquefaciens*, *P. mirabilis*.

No resultado do teste mCIM (gráfico 1), quatro (29%) microrganismos apresentaram formação de halos entre 6-15 mm, indicando produção de carbapenemase, pois o meropenem do disco foi hidrolisado pelo microrganismo avaliado e não houve inibição ou apresentou inibição limitada da *E. coli* ATCC® 25922, que é sensível aos carbapenêmicos. Após a realização do mCIM, os quatros microrganismos produtores de carbapenemase foram repetidos e submetidos ao eCIM para diferenciar entre a produção de serina e MBL.

A produção de carbapenemase é um importante mecanismo bacteriano de resistência aos antibióticos carbapenêmicos, que age hidrolisando o anel beta-lactâmico pela quebra da ligação amida, fazendo com que o antibiótico perca a capacidade de inibir a síntese da parede celular bacteriana <sup>28,29</sup>.

Os demais dez (71%) microrganismos apresentaram halos  $\geq 19$  mm no mCIM, indicando ausência de produção de carbapenemase. Desta forma, a resistência aos carbapenêmicos não foi comprovada como sendo através de atividade enzimática de enzimas do tipo carbapenemases. No entanto, sabe-se que outros mecanismos poderiam justificar a ocorrência dessa resistência, tais como: perda de porinas, produção de bomba de efluxo ou por hiperexpressão de enzimas beta-lactamases de espectro ampliado <sup>21</sup>.

**Gráfico 1.** Distribuição dos casos positivos e negativos para a pesquisa fenotípica de carbapenemase (mCIM) em Enterobacterales isoladas de hemocultura de pacientes oncológicos.



Fonte: o autor, 2020.

Entre os quatro microrganismos produtores de carbapenemase no teste mCIM, todos foram positivos para a presença de enzima tipo serina e pertencentes a espécie *K. pneumoniae*.

Em comparação com a literatura, no estudo de Lacerda *et al.* (2018), 28 isolados de enterobactérias sendo 18 *E. coli*, 8 *K. pneumoniae* e 2 *Pantoea agglomerans* foram submetidos ao teste mCIM e, 64,28% (18/28) foram positivas para carbapenemases, distribuídas entre nove *E. coli*, sete *K. pneumoniae* e duas *P. agglomerans*. Diferente do nosso estudo, a espécie predominante foi a *E. coli* e houve uma maior frequência de microrganismos produtores de carbapenemase.

SIQUEIRA *et al.*, em 2016, analisou 29 isolados, onde 14 (39%) deles foram detectados como produtores de carbapenemase, enquanto que no estudo de RIBEIRO (2013), 345 isolados clínicos foram avaliados, apenas 14 (4%) foram produtores de enzima carbapenemase, sendo identificados em isolados de *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, *S. marcescens* e *K. georgiana*. Todos

estes estudos demonstram a variabilidade na detecção de microrganismos produtores de carbapenemase em diferentes períodos, regiões do país e centros médicos.

PIERCE *et al.*, 2017, demonstraram que o teste mCIM foi capaz de detectar a produção de carbapenemase por 91 dos 92 isolados previamente caracterizados como portadores de genes de carbapenemases, reforçando a boa sensibilidade e especificidade do método na pesquisa fenotípica de produção destas enzimas.

Segundo documentos do CLSI, o método mCIM demonstra sensibilidade e especificidade > 99% para detecção de carbapenemases do tipo KPC, NDM, VIM, IMP, IMI, SPM, SME e OXA entre os isolados de Enterobacterales, e o eCIM sensibilidade > 95% e especificidade > 92% para diferenciação de MBL (NDM, VIM e IMP) do grupo das serina carbapenemases (KPC, OXA e SME). Entretanto, vale ressaltar que os testes moleculares, baseados na amplificação e sequenciamento de genes alvos produtores de carbapenemases são utilizados como padrão ouro<sup>31</sup>. Por esta razão, estudos futuros são necessários para comprovar que os isolados incluídos no estudo se confirmam como produtores ou não de carbapenemase, bem como resultados obtidos nos testes fenotípicos.

A disseminação dos mecanismos de resistência à classe dos antibióticos carbapenêmicos, especialmente entre os BGN fermentadores de glicose é preocupante, e esta pesquisa reforça a importância da detecção e a investigação do mecanismo de resistência da enzima carbapenemase, a fim de estabelecer medidas de controle, prevenção e terapias antimicrobianas adequadas para pacientes oncológicos. A detecção e prevenção de microrganismos multirresistentes minimiza sua disseminação, reduzindo os casos de infecção hospitalar e a eficácia das intervenções com antimicrobianos<sup>25</sup>.

## CONCLUSÃO

A pesquisa de isolados clínicos produtores de carbapenemase pelos métodos fenotípicos mCIM e eCIM permitiu a identificação de quatro microrganismos produtores de serina carbapenemase em uma coleção de 14 isolados de Enterobacterales resistentes ou intermediários aos carbapenêmicos no antibiograma (disco-difusão) recuperados de hemoculturas de pacientes oncológicos em um período de um ano. Este estudo reforça a importância de conhecer a epidemiologia local quanto ao perfil de suscetibilidade dos isolados bacterianos e de seus mecanismos de resistência, que pode ter impacto na escolha da terapia empírica e nas medidas de controle de infecção.

## REFERENCIA

- 1- THULER, L. C. S. ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: Inca, 2011, p. 7.
- 2- OLIVEIRA, M. M; MALTAI, D. C; GUAUCHE, H; MOURA, M; AZEVEDO, G. Estimativa de pessoas com diagnóstico de câncer no Brasil: dados da Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. Rev bras epidemiol. 2015; 18 (2): 146-157.
- 3- LEITE, M. A. C; NOGUEIRA, D. A; TERRA, F. S. Avaliação da autoestima em pacientes oncológicos submetidos a tratamento quimioterápico. Revista Latino-Americana de Enfermagem, nov.-dez. 2015; 23 (6): 1082-9.
- 4- SIQUEIRA-BATISTA, R; GOMES, A.P; CALIXTO-LIMA, L; VITORINO, R.R; PEREZ M. C. A; MENDONÇA, E. G; et al. Sepse: atualidades e perspectivas. Rev Bras Ter Intensiva. 2011; 23 (2): 207-216.
- 5- SNYDMAN, DAVID R.. Infecções Nosocomiais e Iatrogênicas. In: Schaechter, Moselio; Engleberg, N. Cary; Eisenstein, Barry I.; MEDOFF, Gerald. Microbiologia Mecanismos das Doenças Infecciosas. ed.3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S.A., 2002, c. 72, p. 589.
- 6- GUILARDE, A. O; TURCHI M. D; MARTELLI, C. M. T ; ET AL. Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. Rev Assoc Med Bras 2007; 53(1): 34-8.
- 7- ALVES, L. N. S; OLIVEIRA, C. R; SILVA L. A. P; GERVÁSIO, S. M. D; ALVES , S. R. Hemoculturas: estuda da prevalência dos microrganismos e o perfil de sensibilidade dos antibióticos utilizados em unidade de terapia intensiva. São José dos campos – SP, 2012.
- 8- LAVAGNOLI, S. L; BASSETTI, B. R.; KAISER, T. D. L.; KUTZ ,K.M.; CERUTTI C.J.R. Fatores associados à aquisição de Enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, Rev. Latino-Am. Enfermagem Artigo Original 2017;25:e2935.
- 9- VIEGAS, D. M; SOARES, V. M. Prevalência de carbapenemases em enterobactérias com sensibilidade diminuída aos carbapenêmicos isoladas em um hospital de referência terciária. J. Bras. Patol. Med. Lab. 54 (2): 95-98.
- 10- PAGÈS, J. M; JAMES, C. E; WINTERHALTER, M. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. Nat Rev Microbiol. 2008 .
- 11- DEL FRANCO, M.; PAONE, L.; NOVATI, R.; GIACOMAZZI, C. G.; BAGATTINI, M.; GALOTTO, C. et al. Molecular epidemiology of carbapenem resistant Enterobacteriaceae in Valle d’Aosta region, Italy, shows the emergence of KPC- 2 producing K. pneumoniae clonal complex 101 (ST101 and ST1789). BMC Microbiol. [Internet]. 2015.

- 12- TALLY, F. P., Estratégias para o Combate às Infecções Bacterianas. In: Schaechter, Moselio; Engleberg, N. Cary; Eisenstein, Barry I.; Medoff, Gerald. Microbiologia Mecanismos das Doenças Infecciosas. ed.3ª. Rio de Janeiro: Guanabara Koogans S.A., 2002, c. 30, p. 248.
- 13- ANDRADE, L. N; DARINI, A. L. C., Mecanismos de resistência bacteriana aos antibióticos. Curso Básico de Antimicrobianos Divisão de MI – CM – FMRP-USP.
- 14- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L., Microbiologia. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 894 p, 2006.
- 15- BARBOSA L. A; LATINI, R. O. Resistência bacteriana decorrente do uso abusivo de antibióticos. Centro Universitário Metodista Izabela Hendrix – Campus Praça da Liberdade.
- 16- Y, Y.E ; LIJUAN, X.U, YANPING H. A. N; CHEN, Z. H. E; CAILIN, L.; E MING, L. Mecanismo para resistência a carbapenemas de isolados clínicos de Enterobacteriaceae.. Departamento de Laboratório Clínico. República Popular da China, 19 de outubro de 2017.
- 17- MANUAL DE ANTIBIOGRAMA. Laborclin Produtos para Laboratórios Ltda. Revista 14, 06-2018. p 31, 43.
- 18- DJ ROSSI, RECHENCHOSKI DZ, VIVAN ACP, et al. Evolution da resistência de Klebsiella pneumoniae no Hospital Universitário de Londrina no período de 2000 a 2011. Semina CiencBiol Saúde. 2015; 36 (1): 267-74.
- 19- PAPPA-WALLACE PM, ENDIMANI A, TARACILA MA, BONOMO RA. Carbapenems: Past, Present and Future. Antimicrob Agents Chemother. 2011 Nov; 55(11): 4943-4960.
- 20- CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. Documento: M100-ED 29, Jan 2019.
- 21- UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO. FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO. Carbapenêmicos (beta-lactâmicos). Curso Básico de Antibiograma. São Paulo, p. 3-4.
- 22- PASCHOAL, R. P. S; NOVAS, S. M. C. M., PICÃO, R. C., Cronologia da emergência global de carbapenemases em bacilos gram-negativos. Saber Digital, [S.l.], v. 10, n. 2, p. 43-61, fev. 2018. ISSN 1982-8373.
- 23- AMBLER, R. P., The structure of  $\beta$ -lactamase. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, v.289, p.321-331, 1980.

- 24- ABRANTES, J. A., NOGUEIRA, J. M. R., Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. Revista Brasileira de Análises Clínicas – RBAC. 2017; 49(3):240-4.
- 25- PIERCE V. M. et al. Modified Carbapenem Inactivation Method for Phenotypic Detection of Carbapenemase Production among Enterobacteriaceae. Journal of Clinical Microbiology, v. 55, n. 8, p. 2321-2333, Apr. 2017. Disponível em: [shttps://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381609](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28381609). Acesso em: 21 jun. 2019. DOI TO1128/JCM.00193-13.
- 26- RODRIGUES, K. C. S., Estudo da influência do ph e da temperatura na produção de ácido clavulânico por *Streptomyces clavuligerus* em biorreator convencional. Universidade federal de são joão del-rei programa de pós-graduação em tecnologias para o desenvolvimento sustentável, 2015. pag 19-20.
- 27- SANTANA, R. C; Antibióticos beta-lactâmicos. Curso Básico de Antimicrobianos Divisão de MI – CM – FMRP-USP. pag 3.
- 28- WALSH, T.R. The emergence and implications of metallo- $\beta$ lactamases in Gram-negative bacteria. Clin. Microbiol. Infect., v.11, suppl.6, p.2-9, 2005b.
- 29- ABRANTES, J.A; NOGUEIRA, J.M.R. Utilização de testes fenotípicos para a pesquisa de carbapenemases em enterobactérias: uma ferramenta para orientação clínica. ENSP/Fiocruz – Rio de Janeiro 2017.
- 30- GONÇALVES, B; Incidência de Enterobactérias produtoras de beta lactamase de espectro ampliado isoladas de hemoculturas. Unibrasil – 2016.
- 31- MACHIOSKI, K; Perfil de suscetibilidade aos carbapenêmicos em cepas isoladas de hemocultura de pacientes atendidos em hospital oncológico de Curitiba. Unibrasil – 2017.
- 32- LACERDA, L. L; SILVA, R. S; PAIVA, M. C., Detecção de carbapenemases por métodos fenotípicos em isolados clínicos de Enterobactérias. UFSJ -2018.
- 33- RIOS. V. M.; ALMEIDA. M. T. G., Carbapenemases: Um Problema em Evolução. São José do Rio Preto, Set, 2015.
- 34- SIQUEIRA, C. G; Avaliação do teste Carbapenem Inactivation Method (CIM) na detecção de carbapenemases em Enterobactérias. UFRGS – 2016.
- 35- RIBEIRO, V. B; Detecção de resistência aos carbapenêmicos e avaliação da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (kpc) em isolados clínicos da família enterobacteriaceae. UFRGS – 2013.

Recebido em 07/03/2020  
Aprovado em 22/04/2020  
Received in 07/03/2020  
Approved in 22/04/2020