

Artigo de Revisão

RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS EM ENTEROBACTÉRIAS: FOCO EM CARBAPENEMASES

*Antimicrobial resistance among enterobacteriaceae: focus on carbapenemase
production*

Carolina Silva Nodari¹, Afonso Luís Barth²

¹ Laboratório ALERTA, Disciplina de Infectologia, Escola Paulista de Medicina,
Universidade Federal de São Paulo.

² Laboratório de Pesquisa em Resistência Bacteriana (LABRESIS), Hospital de Clínicas
de Porto Alegre.

Submetido em: 12/07/16

Aceito em: 09/09/16

albarth@hcpa.edu.br

RESUMO

As enterobactérias representam os principais agentes etiológicos de infecções comunitárias e nosocomiais, podendo ser isoladas de diversos sítios e materiais biológicos. Esses microrganismos podem apresentar determinantes de resistência a muitas classes de antimicrobianos sendo que a resistência pode ser intrínseca ou adquirida e é classificada em quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana; mecanismos de efluxo; alterações na proteína-alvo do antimicrobiano; e produção de enzimas capazes de degradar antibióticos. A alteração da permeabilidade de membrana, especialmente por modificações funcionais nas denominadas porinas, pode interferir no influxo tanto de β -lactâmicos quanto de quinolonas. O efluxo das moléculas que permeiam a membrana também pode ser regulado de forma a aumentar a extrusão dos β -lactâmicos, dos aminoglicosídeos e das tetraciclinas, entre outros. Nesse processo, as bombas de efluxo da família RND são particularmente importantes em enterobactérias, pois são capazes de formar complexos triméricos que transportam moléculas tóxicas do citoplasma diretamente para fora da célula bacteriana, sem passar pelo espaço periplasmático. Vale ressaltar que algumas bombas de efluxo são codificadas por genes presentes em elementos genéticos móveis, o que permite sua disseminação horizontal. Modificações de proteínas-alvo são observadas no desenvolvimento de resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos em enterobactérias, através de mutações nas topoisomerasas e nos ribossomos bacterianos,

respectivamente. A produção de enzimas pode promover a inativação dos aminoglicosídeos e, principalmente, dos β -lactâmicos. Entre os últimos, destaca-se a produção de carbapenemases, enzimas capazes de hidrolisar os carbapenêmicos e, em alguns casos, diversos outros β -lactâmicos. As carbapenemases podem ser classificadas em classes (A, B e D) conforme Ambler e os genes que codificam as mesmas estão inseridos em diversos contextos genéticos, que regulam sua expressão e favorecem sua disseminação. No Brasil, as carbapenemases mais relevantes em enterobactérias são a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC), a New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) e a OXA-370. Conhecer a epidemiologia desses mecanismos de resistência é fundamental para a implementação de medidas de controle de infecção hospitalar, evitando, assim, a disseminação dos mesmos.

DESCRITORES: alteração de permeabilidade de membrana; sistemas de efluxo; modificações de proteínas-alvo; produção de enzimas; KPC; NDM; OXA-370.

ABSTRACT

Enterobacteriaceae represent the most important etiological agents of community and nosocomial infections, and can be isolated from various sites and biological materials. These microorganisms may present resistance determinants to many antimicrobial classes; the resistance can be intrinsic or acquired and classified in four different mechanisms: alteration in the membrane permeability, efflux systems, alteration in the target protein and production of enzymes that hydrolyze the antibiotics. Alterations in membrane permeability, especially by functional changes in porins, may interfere with the influx of both β -lactams and quinolones. The efflux of molecules throughout the membrane may also be regulated to increase the extrusion of β -lactams, aminoglycosides and tetracyclines, among others. In this process, the RND efflux pump family are particularly important in enterobacteria, considering that they are able to form trimeric complexes capable of transporting toxic molecules from the cytoplasm directly to outside the bacterial cell, bypassing the periplasmic space. It is noteworthy that some efflux pumps are encoded by genes present in mobile genetic elements, which allows their horizontal spread. Target-mediated resistance is observed in the development of resistance to quinolones and aminoglycosides by mutations in bacterial topoisomerases and ribosomes, respectively. The production of enzymes can promote the inactivation of aminoglycosides and especially the β -lactams. Among the latter, we highlight the carbapenemase production, enzymes capable of hydrolyzing carbapenems and, in some cases, other β -lactams. The carbapenemases belong to Ambler classes A, B and D, and the genes encoding them are inserted in different genetic environments that regulate its expression and favor its spread. In Brazil, the most relevant carbapenemases among *Enterobacteriaceae* are the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), the New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) and OXA-370. The epidemiology of these resistance mechanisms is essential to implement adequate hospital infection control measures, thus preventing the spread such mechanisms.

KEYWORDS: modifications in membrane permeability; efflux systems; target-mediated resistance; enzyme production; carbapenemases; KPC; NDM; OXA-370.

As Enterobactérias estão entre os principais causadores de infecções do trato urinário adquiridas na comunidade, e podem ser isoladas de diversos outros importantes sítios de infecção, como o líquido cefalorraquidiano, a corrente sanguínea e o trato respiratório inferior.¹ Até o momento, não existem dados na literatura que indiquem a

real prevalência de infecções causadas por Enterobactérias. Sabe-se, no entanto, que aproximadamente 40% das infecções de corrente sanguínea são causadas por microrganismos dessa família e a incidência de pneumonia pode chegar a 25%, nos países da América Latina, de acordo com os dados obtidos pelo SENTRY de 2008 a 2010.²

Os membros da família *Enterobacteriaceae* apresentam perfis variáveis de susceptibilidade às diferentes classes de antimicrobianos. A resistência a esses fármacos pode ser intrínseca ou adquirida e é classificada em quatro mecanismos fundamentais: alteração na permeabilidade de membrana; mecanismos de efluxo; alterações na proteína-alvo do antimicrobiano; e produção de enzimas capazes de degradar estes fármacos.³ Nesta revisão, apresentaremos os principais aspectos da resistência a antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae*, com destaque para a produção de carbapenemases, mecanismo responsável pelo desenvolvimento de resistência aos fármacos considerados de última escolha para o tratamento de infecções por microrganismos dessa família.

Alteração de permeabilidade da membrana externa

A grande maioria dos alvos dos antimicrobianos encontra-se no interior das células bacterianas. Sendo assim, fica claro que, para que sejam efetivos, é necessário que os antibióticos atravessem as membranas celulares.⁴ A membrana externa presente nos bacilos Gram-negativos se torna, dessa maneira, a primeira defesa desses microrganismos contra agentes quimioterápicos.⁵ Antimicrobianos hidrofóbicos, como os aminoglicosídeos e os macrolídeos, são capazes de atravessar a membrana externa por difusão simples. Já as tetraciclina e as quinolonas são capazes de atravessar a membrana tanto por difusão simples quanto através de canais proteicos, as denominadas “porinas”. Por último, antibióticos hidrofílicos, como os β -lactâmicos, dependem exclusivamente das porinas para atingir o espaço periplasmático e a membrana citoplasmática.⁶

A principal função das porinas vai muito além do transporte de antimicrobianos. As denominadas “porinas clássicas”, presentes e estudadas pela primeira vez em *Escherichia coli*, facilitam, de forma inespecífica, a entrada de nutrientes e outros pequenos solutos na célula bacteriana.⁷ As porinas da família OmpC servem de canal preferencial a moléculas catiónicas pequenas, enquanto que as da família OmpF aumentam a permeabilidade da membrana externa para moléculas catiónicas um pouco

maiores. Já as porinas do tipo PhoE facilitam a entrada de moléculas aniônicas.⁵ Em *Klebsiella pneumoniae*, a OmpK35 apresenta papel semelhante à OmpF, enquanto a OmpK36 possui função homóloga à OmpC.⁸

Muitos estudos que descrevem o papel das porinas no desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos avaliam sua influência na redução do influxo dos β -lactâmicos na célula bacteriana.⁹⁻¹¹ Esses fármacos não são capazes de atravessar a membrana externa sem o auxílio de proteínas transportadoras, o que faz com que alterações na expressão e/ou na estrutura dessas proteínas tenham grande influência na sua efetividade clínica. As variações mais comumente estudadas são aquelas na região de constrição do poro, o que faz com que seu diâmetro seja reduzido e, conseqüentemente, limite a entrada desses antimicrobianos.¹² A redução da expressão das porinas também é um mecanismo adaptativo utilizado pelas bactérias para reduzir o influxo dos β -lactâmicos através da membrana. Isolados de *Escherichia coli* produtores de β -lactamases de espectro estendido (do inglês *extended-spectrum β -lactamase-ESBL*) desenvolveram resistência aos carbapenêmicos através da modulação da expressão de OmpC e OmpF, em decorrência de mutações do gene regulatório *ompR*.¹³ Em isolados obtidos no Chile, por exemplo, a alteração de porinas foi mais significativa para o desenvolvimento de resistência aos carbapenêmicos do que a produção de enzimas.¹⁴

A resistência às quinolonas também pode ser mediada por modificações na permeabilidade de membrana. Em *E. coli*, a entrada destes antibióticos é possível através de OmpF, enquanto que, em *K. pneumoniae*, esse papel é representado pela OmpK35. Nesses casos, o desenvolvimento da resistência parece ser resultado da sinergia entre as mutações na topoisomerase (proteína-alvo desses fármacos) e a redução na expressão de porinas.^{15,16}

Sistemas de efluxo

As bombas de efluxo são um mecanismo de transporte ativo cuja principal função é remover compostos tóxicos do interior da célula bacteriana.¹⁷ As primeiras bombas de efluxo descritas em bacilos Gram-negativos foram as da família Tet, as quais são específicas para a extrusão de tetraciclinas.¹⁸

A superfamília RND (do inglês, *Resistance-Nodulation-Division*) de transportadores está presente nos principais bacilos Gram-negativos de importância clínica. Essas proteínas estão localizadas na membrana citoplasmática, mas são capazes

de se ancorar em porinas presentes na membrana externa, criando um canal de passagem que permite que diversas substâncias sejam transportadas diretamente do citoplasma para o espaço extracelular, sem que seja necessária a passagem pelo espaço periplasmático.¹⁹ Em *E. coli*, o acoplamento de AcrB (pertencente à família RND) com a proteína de ligação AcrA e a porina TolC promove a saída ativa de diversas classes de antimicrobianos, como cefalosporinas, fluoroquinolonas e tetraciclinas.²⁰ A efetiva extrusão desses fármacos pode causar elevações expressivas na concentração inibitória mínima (CIM) quando essas proteínas estão superexpressas.²¹ O contrário também é válido, considerando que reduções de até 256 vezes da CIM podem ser observadas quando os genes codificantes para essas bombas estão deletados, fenômeno que pode acarretar na recuperação da atividade do antimicrobiano com efetiva inibição do crescimento bacteriano.^{22,23}

Diversos mecanismos regulatórios influenciam a relação entre as bombas de efluxo e a resistência às diferentes classes de antimicrobianos. Existem evidências de que a resistência às quinolonas mediada por esse mecanismo está relacionada com mutações no gene repressor *marR*, o qual aumenta a expressão do ativador de transcrição MarA e, conseqüentemente, de *acrAB*.²⁴ MarA também parece interferir, porém de maneira negativa, na expressão de porinas, aumentando ainda mais os níveis de resistência.²⁵ Em relação aos β -lactâmicos, alterações no influxo desses fármacos parecem ser mais representativas no desenvolvimento de resistência do que as modificações no efluxo. No entanto, manipulações gênicas nos reguladores da expressão das proteínas que compõem a bomba são capazes de conferir altos níveis de resistência a penicilinas, cefalosporinas e até aos carbapenêmicos.²⁶

Em *K. pneumoniae*, AcrAB não só apresenta um papel semelhante ao desempenhado em *E. coli*, no que diz respeito ao desenvolvimento de resistência a fluoroquinolonas e β -lactâmicos, mas também parece influenciar na virulência desses microrganismos.²⁷ Essa espécie também apresenta outras bombas capazes de mover antimicrobianos para o exterior da célula bacteriana. As proteínas OqxAB e KpgABC, por exemplo, estão envolvidas na diminuição de sensibilidade à tigeciclina.^{28,29}

O papel dos sistemas de efluxo em *S. marcescens* é mais relevante no desenvolvimento de resistência às quinolonas. Dentre eles, destaca-se a bomba SdeAB, pertencente à família RND e que apresenta atividade quando acoplada à proteína TolC-like HasF.³⁰ Esta proteína de membrana externa ainda pode estar acoplada com outra bomba, SdeXY, conferindo resistência também à tigeciclina.³¹ As bombas das famílias

MFS e SMR, SmfY e SsmE, respectivamente, também apresentam atividade contra quinolonas e estão presentes em isolados de *S. marcescens*.^{32,33}

Embora a maioria das bombas de efluxo seja constitutiva e, portanto, cromossomal, importantes exemplos de bombas de efluxo que conferem resistência a antimicrobianos são codificados por genes encontrados em plasmídeos.¹⁷ O mais importante deles parece ser aquele codificado pelos genes *tet*, os quais codificam bombas do tipo MFS.¹⁸ Ao contrário das bombas tipo RND, que são triméricas e capazes de transportar uma diversidade de substratos, esse grupo é composto por proteínas únicas e são específicas para determinados tipos de substratos: as proteínas Tet são capazes de transportar tetraciclinas, enquanto a bomba QepA2 é capaz de transportar quinolonas.^{34,35}

Considerando a importância das bombas de efluxo nas resistências intrínseca e adquirida, parece natural que se busquem inibidores específicos para essas proteínas.¹ Assim, por reduzir a superexpressão das bombas de efluxo, tem sido considerada a utilização de inibidores como adjuvantes da terapia antimicrobiana pode permitir que alguns fármacos que não eram utilizados no tratamento de determinados microrganismos passem a ter efetividade clínica.¹⁷ A inibição das bombas também pode interferir na formação de biofilme, o qual também é um fator relevante a ser considerado em alguns tipos de infecção, pois o acesso do antimicrobiano à célula bacteriana que crescem em biofilme é ainda mais limitado.^{37,38}

O inibidor mais estudado das bombas de efluxo bacterianas é o PA β N (do inglês *Phenyl-Arginine-Beta-Naphthylamide*). Essa substância, descoberta em 2001, é capaz de inibir as principais bombas de efluxo em bacilos Gram-negativos (a saber, MexAB-OprM, MexCD-OprJ e MexEF-OprN em *P. aeruginosa*, e AcrAB-TolC em *E. coli*).³⁹ A presença do inibidor em meio de cultura também é capaz de reduzir a frequência de surgimento de mutantes resistentes.³⁹ A utilização clínica dessa substância, no entanto, ainda não é possível. Em suas concentrações efetivas, a presença de dois grupos catiônicos em sua estrutura faz com que a molécula seja capaz de se acumular nos tecidos e, conseqüentemente, apresente elevado potencial nefrotóxico.^{40,41} A busca por potenciais inibidores de bomba permanece, pois esse parece ser um caminho promissor na luta contra a resistência a antimicrobianos, uma vez que sua utilização pode afetar a susceptibilidade a diversos fármacos.

Modificação dos sítios de ligação dos antimicrobianos

Quando pensamos na alteração de proteínas de ligação como forma de desenvolvimento de resistência a antimicrobianos, a primeira lembrança que muitos de nós temos diz respeito às mutações nas proteínas de ligação das penicilinas (do inglês *PenicillinBindingProtein*- PBP) em cocos Gram-positivos, que conferem resistência a todos os β -lactâmicos, principalmente no gênero *Staphylococcus*.⁴² Embora já existam estudos sobre o papel das PBPs na resistência aos β -lactâmicos em bacilos Gram-negativos, as principais modificações de proteína-alvo envolvidas na resistência a antimicrobianos em enterobactérias são aquelas que conferem resistência às quinolonas e aos aminoglicosídeos e, mais recentemente, às polimixinas.⁴³⁻⁴⁶

Quinolonas estão entre os fármacos mais prescritos para o tratamento de diversos tipos de infecções causadas por enterobactérias, especialmente infecções do trato urinário.⁴⁷ Esses antimicrobianos são capazes de se ligar às enzimas bacterianas DNA girase e topoisomerase IV, e a formação do complexo enzima-fármaco acarreta na interrupção da replicação do DNA e, conseqüentemente, na inibição da divisão celular.⁴⁸ Embora a resistência às quinolonas possa estar relacionada com a superexpressão de bombas de efluxo e até com mecanismos plasmidiais de inativação dos fármacos, as mutações na “região determinante de resistência às quinolonas” (do inglês *Quinolone-ResistanceDeterminingRegion*- QRDR) parecem ser o mecanismo mais eficiente de resistência às quinolonas.⁴⁹ É importante ressaltar que, para gerar níveis clínicos de resistência, geralmente são necessárias diversas mutações pontuais na região QRDR dos genes *gyrA* e *parC*.⁵⁰ A proteção conferida pelas proteínas Qnr à DNA girase também é capaz de impedir a ligação das quinolonas nessa enzima, impedindo, portanto, a ação desses fármacos.⁵¹ Diversas variantes dos genes *qnr* já foram descritas, sendo que a maior parte delas é localizada em plasmídeos, especialmente os das famílias A/C, L/M e N.⁵²

A efetividade clínica dos aminoglicosídeos, por sua vez, está diretamente relacionada com a sua capacidade de se ligar a subunidade 16S do ribossomo bacteriano. Sua ligação com o sítio A dessa organela é capaz de interromper a tradução proteica, a qual é fundamental para a sobrevivência da célula.⁵³ Mecanismos capazes de diminuir a afinidade dessa classe de antimicrobianos são uma das alternativas encontradas pelo microrganismo para sobreviver na presença desses fármacos. A metilação de resíduos específicos da subunidade menor do ribossomo impede a ligação

de diversos aminoglicosídeos, e pode ser considerada uma maneira mais abrangente de aquisição de resistência do que aquela provocada por modificações enzimáticas nos fármacos.⁵⁴

As metilases codificadas pelo gene *armA* são as mais prevalentes entre aquelas responsáveis pelo desenvolvimento de resistência aos aminoglicosídeos, seguidas por aquelas codificadas por *rmtB*.⁵⁵ Outro fator notável é que essas enzimas são facilmente transferidas horizontalmente, uma vez que seus genes codificantes estão presentes em elementos genéticos móveis, como transposons.⁵⁶ Além de facilitar a disseminação desses determinantes de resistência, alguns transposons ainda carregam outros genes de resistência. À montante de *rmtB*, por exemplo, é possível encontrar o gene *bla*_{TEM-1} e, em alguns contextos, observa-se a presença de DNA codificante para a proteína de efluxo de quinolonas Qep2.⁵⁷

A ação das polimixinas depende de sua interação com as moléculas do lipopolissacarídeo (LPS) da membrana externa das bactérias Gram-negativas. Sua carga positiva promove o deslocamento de cátions divalentes, como cálcio e magnésio, da porção negativa do LPS, desestabilizando a membrana e, em última instância, formando poros que permitem a entrada e saída livres de solutos, provocando o rompimento celular.⁵⁸ Apesar dessa ação rápida, os microrganismos são capazes de se adaptar facilmente à presença das polimixinas, desenvolvendo resistência. O principal mecanismo envolvido nesse processo é a alteração da carga dos lipídeos de membrana, através da modificação dos substituintes do LPS.⁵⁹ Em *K. pneumoniae*, essas modificações são reguladas pelos sistemas de dois componentes PhoP/PhoQ e PmrA/PmrB. A ativação desses sistemas ocorre por alterações no ambiente, como a mudança da concentração de íons, e resulta na adição de 4-amino-4-deoxi-L-arabinose (L-Ara4N) aos grupos fosfato, reduzindo a carga do LPS a zero.⁵

Por muito tempo, acreditou-se que essas modificações eram causadas por proteínas codificadas por genes presentes no cromossomo bacteriano. No entanto, Liu e colaboradores demonstraram recentemente a presença de um mecanismo plasmidial de desenvolvimento de resistência às polimixinas.⁶⁰ O gene *mcr-1* codifica uma enzima capaz de modificar o lipídio A através da adição de fosfoetanolamina no mesmo. O estudo relata a presença desse gene em isolados humanos e de porcos obtidos na China, além de identificar o mesmo em sequências depositadas por pesquisadores da Malásia, cujo produto era, até então, de função desconhecida. Finalmente, eles destacam a elevada taxa de transferência horizontal do plasmídeo contendo o gene *mcr-1*, através

de experimentos de conjugação *in vitro*. Desde esta publicação, o gene *mcr-1* já foi relatado em diversos países, e, atualmente, já pode ser encontrado também no Brasil.^{61,62} A maior prevalência do gene *mcr-1* tem sido descrita em animais de produção, em particular frangos, e isso estaria associado ao uso de polimixinas como substâncias promotoras de crescimento em aves. No entanto já existe relato do gene *mcr-1* em *E. coli* obtidas de frangos que não receberam polimixinas como estimulantes de crescimento.⁶³

Produção de enzimas

Não há dúvida de que o mecanismo mais importante para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos em enterobactérias é a produção de enzimas capazes de degradar os antibióticos. A efetividade das principais opções terapêuticas – aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e β -lactâmicos – para o tratamento de infecções por membros da família *Enterobacteriaceae* é comprometida pela aquisição desses determinantes de resistência. Além disso, a maioria dos genes codificantes de enzimas podem ser transferidos de forma horizontal, pois estão presentes em uma diversidade de elementos genéticos móveis.⁶⁴

Enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AMEs)

Embora a produção de metilases seja, clinicamente, o mecanismo mais relevante de resistência aos aminoglicosídeos, uma vez que uma única proteína é capaz de conferir resistência a diversos fármacos dessa classe, a produção de enzimas modificadoras dos aminoglicosídeos (do inglês *aminoglycosides modifying enzymes* - AMEs) apresenta expressiva relevância epidemiológica, uma vez que os genes codificantes para as AMEs podem ser encontrados em elementos genéticos móveis.⁶⁵ De acordo com o tipo de modificação que realizam no fármaco, as AMEs podem ser classificadas em três grupos: acetiltransferases (do inglês *aminoglycosides N-acetyltransferases* – AACs), fosfotransferases (do inglês *aminoglycosides O-phosphotransferases* – APHs) e nucleotidiltransferases (do inglês *aminoglycosides O-nucleotidyltransferases* – ANTs). O primeiro grupo se destaca porque um de seus membros também possui fluoroquinolonas como substrato, conferindo, portanto, resistência às mesmas.⁶⁶

Entre as acetiltransferases, as mais frequentes e relevantes são as do tipo AAC(6'). Além de estarem presentes tanto em cromossomos quanto em elementos

genéticos móveis, em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, essas enzimas têm como substratos alguns dos aminoglicosídeos mais usados clinicamente: amicacina e gentamicina.⁶⁷ As acetiltransferases apresentam uma grande dificuldade de organização em subclasses, uma vez que, em alguns casos, o perfil de resistência é semelhante a um determinado grupo, mas a identidade dos aminoácidos pode colocá-la em outro.⁶⁵ Além disso, o aumento no número de estudos referentes a esse mecanismo de resistência fez com que, em determinado momento, duas enzimas diferentes recebessem a mesma nomenclatura.⁶⁸ A atividade de acetiltransferase pode ainda ser encontrada em proteínas fusionadas, que acumulam funções de APH, ANT e até outras AACs.⁶⁵

Uma subclasse que se destaca entre as acetiltransferases é a AAC (6')-Ib. Microrganismos produtores de enzimas do tipo AAC(6')-Ib-cr apresentam reduzida susceptibilidade não somente aos aminoglicosídeos, mas também às quinolonas.⁵⁰ Também chama a atenção a diversidade de elementos genéticos em que os genes codificantes para essas enzimas podem ser encontrados, bem como sua capacidade de associação com outros determinantes de resistência. Além de serem encontrados junto a outros genes causadores de resistência às quinolonas, como os da família *qnr*, as enzimas dessa subclasse são amplamente associadas com β -lactamases, especialmente as ESBLs do tipo CTX-M.⁶⁶ Por último, quando incorporados a transposons do tipo Tn1331, genes *aac(6')-Ib* são parcialmente fusionados com o gene *bla*_{TEM}.⁶⁷

Os genes codificantes para as fosfotransferases comumente apresentam mais de uma nomenclatura. O gene *aph(6)-Ia*, por exemplo, também pode ser referido como *aphD* ou *strA*; já o *aph(6)-Id* é também denominado *strB* ou *orfI*; o *aph(3')-IIa* pode ser encontrado na literatura como *aphA-2*.⁶⁵ Independentemente do nome que recebem, esses dois últimos são encontrados de forma contígua no transposon Tn5, o que permitiu a disseminação dessas APHs em Gram-positivos e Gram-negativos, e hoje é utilizado como marcador em alguns sistemas de clonagem.^{69,70} Clinicamente, as fosfotransferases são mais relevantes em Gram-positivos, nos quais diversas subclasses têm importância epidemiológica no desenvolvimento de resistência aos aminoglicosídeos.⁶⁵ Em Gram-negativos, dois aspectos chamam a atenção: a presença concomitante de *strA**strB* em isolados clínicos, os quais conferem resistência a estreptomicina; e a disseminação de genes da subclasse APH(3') em uma variedade de plasmídeos e transposons.⁷¹

As nucleotidiltransferases mais relevantes em Gram-negativos são as das subclasses ANT(2'') e ANT(3''), sendo que as últimas também podem ser encontradas

na literatura com o nome de *aadA*. O contexto genético destas é bastante diverso e, assim como as AACs, também podem ser encontrados em transposons carreadores de β -lactamases. De fato, o transposon Tn1331 carrega tanto *aac(6')-Ib* quanto *aadA1*, além de *bla_{OXA-9}* e *bla_{TEM-1}*.⁷² Transposons do tipo Tn21 também carregam genes codificantes de ANTs, e acredita-se que o sucesso de sua disseminação esteja relacionado com a presença concomitante de *ant(3'')-Ia* e de um operon de resistência ao mercúrio.⁷³

β -lactamases

As β -lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico presente nos fármacos dessa classe. Assim como os fármacos, que são divididos em subclasses, de acordo com o substituinte ligado ao anel, as β -lactamases podem ser classificadas em diferentes grupos. Em 1980, Ambler propôs a divisão dessas enzimas em duas classes, de acordo com suas características estruturais – a classe A, que compreendia a maior parte das β -lactamases, as quais possuíam um resíduo de serina no sítio ativo; e a classe B, que é caracterizada pela necessidade de íons de zinco como cofator.⁷⁴ Posteriormente, as classes C e D foram adicionadas a essa classificação, visto que as enzimas do tipo AmpC e as oxacilinases, embora também sejam consideradas serino- β -lactamases, apresentavam “motifs” distintos das duas primeiras classes.^{75,76}

A classificação de Ambler pode ser considerada a forma mais simples de dividir as aproximadamente 1500 β -lactamases descritas até o momento, mas apresenta pouca correlação com o fenótipo apresentado pelos isolados clínicos.² Sendo assim, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram, em 1995, uma classificação que leva em consideração os substratos e os inibidores de cada tipo de enzima e ainda apresenta correlações com os grupos de Ambler.⁷⁷ Essa classificação foi atualizada pelos autores em 2010, para incluir novas enzimas descritas no período, e é apresentada na tabela 1.⁷⁸ Resumidamente, o grupo 1 é composto por cefalosporinases pertencentes à classe C de Ambler, as quais são inibidas pela cloxacilina mas não sofrem ação dos inibidores comumente utilizados na prática clínica; o grupo 2 contém as β -lactamases de classe A e D, e apresenta o maior espectro de atividade, que vai desde as penicilinas até os carbapenêmicos, e variável inibição por ácido clavulânico ou tazobactam, de acordo

com o subgrupo; o grupo 3 corresponde às metalo- β -lactamases, que compõem a classe B de Ambler, são inibidas por agentes quelantes e têm ação contra carbapenêmicos.

A diversidade das β -lactamases vai além de suas características estruturais e funcionais. Essas enzimas podem ser encontradas em uma infinidade de contextos genéticos, os quais serão responsáveis pela expressão e disseminação desses mecanismos de resistência. Em microrganismos do grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Serratia marcescens*, *Proteus* spp., *Providencia* spp. e *Morganellamorganii*), por exemplo, as cefalosporinases do tipo AmpC são cromossomais e induzíveis na presença de antimicrobianos como amoxicilina e imipenem.⁷⁹ Já o *Acinetobacter baumannii* apresenta oxacilinases cromossomais que, dependendo do promotor presente, são superexpressos e apresentam atividade contra carbapenêmicos.⁸⁰ *Stenotrophomonas maltophilia* é intrinsecamente resistente aos carbapenêmicos, especialmente ao imipenem, devido à produção das carbapenemases cromossomais L1 e L2.⁸¹

Embora a presença de β -lactamases de origem cromossomal interfira na escolha do tratamento com β -lactâmicos, são os genes transferíveis por elementos genéticos móveis que apresentam maior relevância clínica e epidemiológica. A transferência horizontal desses mecanismos de resistência chama ainda mais atenção quando se considera o espectro de ação das β -lactamases codificadas por genes plasmidiais, uma vez que as mais disseminadas são aquelas que atuam sobre cefalosporinas de 3ª e 4ª gerações e sobre os carbapenêmicos. Em um artigo de revisão, Carattoli apresentou os principais plasmídeos relacionados com a disseminação de β -lactamases pelo mundo.⁸² A autora destacou que ESBLs do tipo CTX-M-15 são comumente encontrados em plasmídeos do grupo de incompatibilidade IncF e podem estar associados com outros genes de resistência, como *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-1} e *aac(6')-Ib-cr*. Em outra publicação, Mathers, Peirano e Pitout destacam os *sequencetypes* (STs) com relevante disseminação global e que estão associados com mecanismos de resistência em enterobactérias – a ST131 de *E. coli* está fortemente associada com a produção de CTX-M-15, enquanto a ST258 de *K. pneumoniae* é uma das principais responsáveis pela produção de KPC-2.⁸³

Carbapenemases

As carbapenemases configuram-se como as β -lactamases de maior relevância clínica em enterobactérias, considerando que o elevado poder hidrolítico de algumas dessas enzimas faz com que os isolados produtores sejam resistentes não somente aos

carbapenêmicos, mas a todas as classes de β -lactâmicos. Essas enzimas encontram-se nas classes A, B e D de Ambler, ou nos grupos 2df, 2f e 3 de Bush e Jacoby. Para a descrição das principais carbapenemases de relevância clínica, nessa revisão, será utilizada apenas a classificação de Ambler. As carbapenemases são epidemiologicamente importantes, uma vez que os genes codificadores para essas enzimas estão normalmente localizados em elementos genéticos móveis.⁸⁴ Os contextos genéticos nos quais as carbapenemases são encontradas são bastante diversos. Uma representação esquemática do ambiente genético em que as principais carbapenemases são encontradas é apresentada na Figura 1.

Tabela 1: Esquema de classificação das β -lactamases bacterianas.

Grupo de Bush-Jacoby	Classe Molecular (Ambler)	Substrato característico	Inibidas por		Característica do grupo
			CA ou TZB	EDT A	
1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise mais pronunciada de cefalosporinas do que de benzilpenicilinas; hidrolisam cefamicinas
1e	C	Cefalosporinas	Não	Não	Elevada hidrólise de ceftazidima e de outros oximino- β -lactâmicos
2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrólise mais pronunciada de benzilpenicilinas do que de cefalosporinas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de 1 ^a e 2 ^a gerações	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas
2be	A	Cefalosporinas de espectro	Sim	Não	Elevada hidrólise de oximino- β -lactâmicos

		ampliado, monobactâmicos			(cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam)
2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2ber	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactâmicos	Não	Não	Elevada hidrólise de oximino- β -lactâmicos combinada com resistência a ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Elevada hidrólise de carbenicilina
2ce	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Elevada hidrólise de carbenicilina, cefepime e cefpiroma
2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Elevada hidrólise de cloxacilina ou oxacilina
2de	D	Cefalosporinas de espectro ampliado	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos
2df	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Hidrolisam cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos
2e	A	Cefalosporinas de espectro ampliado	Sim	Não	Hidrolisam cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico, mas não por aztreonam
2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Elevada hidrólise de carbapenêmicos, oximino- β -lactâmicos e cefamicinas
3a	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise de β -lactâmicos

					de amplo espectro, incluindo carbapenêmicos, mas não os monobactâmicos
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos

CA, ácido clavulânico; TZB, tazobactam. Adaptado de Bush e Jacoby(78).

Carbapenemases de classe A

As carbapenemases de classe A podem ser de origem cromossomal ou plasmidial. No primeiro grupo, temos como exemplo as enzimas IMI/NMC e SME, enquanto a KPC e a Guiana Extended-Spectrum (GES) são as principais carbapenemases plasmidiais dessa classe.⁸⁵ Recentemente, uma nova carbapenemase de classe A (BKC) codificada em um plasmídeo foi descrita no Brasil, mas a extensão de sua prevalência ainda não é conhecida.⁸⁶ Algumas enzimas dessa classe apresentam o maior espectro de ação entre as carbapenemases, incluindo todas as penicilinas e cefalosporinas, além dos monobactâmicos, e são parcialmente inibidas pelo ácido clavulânico.⁸⁷ Outra característica relevante da classe é a sua inibição pelo ácido fenilborônico, a qual tem sido amplamente utilizada para a detecção fenotípica dessas enzimas.⁸⁸

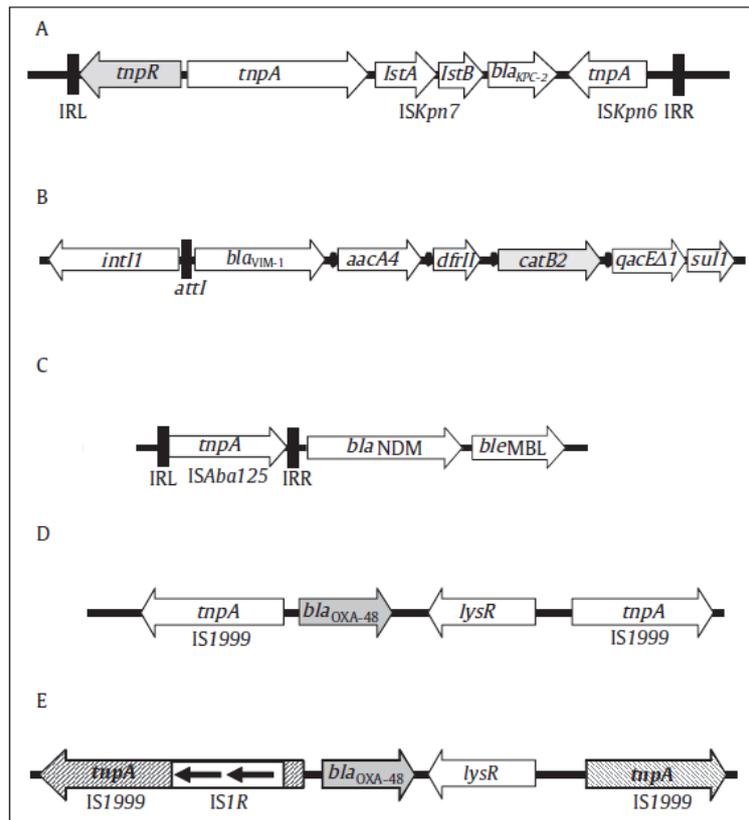


Figura 1: Representação esquemática de diversos ambientes genéticos associados com genes codificadores de carbapenemases em isolados da família *Enterobacteriaceae*. A) Estrutura de um transposon do tipo Tn4401, que codifica o gene *bla_{KPC}*. B) Estrutura de um integron de classe I contendo o gene *bla_{VIM-1}*. C) Estrutura do gene *bla_{NDM}* associado a ISAba125. D) Estrutura do transposon Tn1999, contendo o gene *bla_{OXA-48}*. E) Estrutura do transposon Tn1999.2, contendo o gene *bla_{OXA-48}*. Extraído de Martinez-Martinez & Gonzalez-Lopez.⁸⁷

A KPC é considerada a carbapenemase de classe A mais importante da família *Enterobacteriaceae*. O gene *bla_{KPC}* é carregado por plasmídeos e tem se destacado em função da sua rápida disseminação mundial.⁸⁹ O primeiro relato de um isolado produtor de KPC ocorreu nos Estados Unidos em 2001, enquanto que, no Brasil, sua detecção se deu somente em 2009, em diversos estados, inclusive no Rio Grande do Sul, e, atualmente, encontra-se amplamente disseminada no país.⁹⁰⁻⁹³ Essa amplitude não é apenas geográfica, mas também pode ser percebida em relação às espécies nas quais pode ser encontrada – KPC já foi descrita em virtualmente todas as espécies de enterobactérias de importância clínica, bem como em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*.⁹⁴⁻

96

O gene *bla_{KPC}* normalmente está associado a transposons do tipo Tn4401, o qual é caracterizado pela presença de duas sequências de inserção (*ISKpn6* e *ISKpn7*) em torno do gene da carbapenemase. Uma região variável de 200bp pode ser encontrada entre *ISKpn7* e o gene *bla_{KPC}*.⁹⁷ Vale ressaltar que Ribeiro e colaboradores encontraram

variações na estrutura clássica desse transposon ao avaliarem o contexto genético de *bla*_{KPC} em enterobactérias produtoras dessa carbapenemase isoladas no Brasil.⁹⁸ Esses transposons, por sua vez, podem ser encontrados em diversas famílias de plasmídeos e podem estar associados a outros genes determinantes de resistência. Uma correlação bastante descrita do gene *bla*_{KPC} é com o gene *aac(6')-Ib-cr*, que, conforme já mencionado, confere resistência aos aminoglicosídeos e quinolonas, bem como com outras β-lactamases, como TEM-1. Essa associação, em muitos casos, é produto da inserção do transposon Tn4401 em um outro transposon, o Tn1331, cuja estrutura contém *aac(6')-Ib-cr*, *bla*_{OXA-9}, *aadA1* e *bla*_{TEM-1}.⁹⁹

Enquanto a atividade carbapenemase da KPC foi responsável pela denominação dada à enzima, as primeiras β-lactamases da família GES foram assim identificadas por se tratarem de ESBLs.¹⁰⁰ Modificações na sequência de aminoácidos, no entanto, fizeram com que suas variantes passassem a ter maior afinidade pelos carbapenêmicos, especialmente imipenem.¹⁰¹ Em enterobactérias, a variante com atividade de carbapenemase mais relevante é a GES-5, sendo que, no Brasil, ela já foi descrita tanto em amostras clínicas quanto de ambientes hospitalares.¹⁰²⁻¹⁰⁴ Recentemente, os plasmídeos de dois isolados de *E. coli* e dois isolados de *Serratia marcescens* contendo o gene *bla*_{GES-5} foram sequenciados no Canadá. A análise do sequenciamento destacou que o gene pode ser encontrado em integrons das classes 2 e 4 e que continham outros determinantes de resistência, tais como *aacA4* e *sull1*. Nas conclusões do estudo, os autores ainda destacam que foi possível, posteriormente, identificar outro isolado de *S. marcescens*, obtido da pia do hospital em que os primeiros isolados foram obtidos, carregando o mesmo plasmídeo das amostras clínicas, indicando, portanto, que essa poderia ser a origem dos genes de resistência.¹⁰⁵

Carbapenemases de classe B

As metalo-β-lactamases (MBLs) são as carbapenemases mais antigas descritas em bacilos Gram-negativos e, por muito tempo, foram clinicamente relevantes apenas entre os não-fermentadores. As enzimas do tipo imipenemase (IMP) e *Verona Integron-Mediated Metallo-β-Lactamase* (VIM), as primeiras dessa classe a serem codificadas em plasmídeos, eram encontradas primariamente em isolados clínicos de *P. aeruginosa*.⁸⁴ No Brasil, ainda foi caracterizada uma terceira enzima, também prevalente em *P. aeruginosa*, denominada São Paulo Metallo-β-Lactamase (SPM), cuja relevância epidemiológica ficou, até o momento, restrita ao nosso país.¹⁰⁶

A importância das MBLs na família *Enterobacteriaceae* aumentou rápida e drasticamente após o isolamento da primeira *K. pneumoniae* produtora de NDM, em um paciente sueco que havia estado na Índia.¹⁰⁷ Nos cinco anos que sucederam a sua descrição, essa enzima se espalhou rapidamente pela Europa, Ásia e América do Norte, e é considerada, hoje, endêmica em seu país de origem.¹⁰⁸ Os primeiros relatos de enterobactérias produtoras de NDM em isolados brasileiros ocorreram em 2013 em *P. rettgeri*/*E. cloacae*.^{109,110} Da mesma forma que a KPC, a detecção do gene *bla*_{NDM} não é restrita às enterobactérias, e ele pode ser encontrado em bacilos Gram-negativos não-fermentadores, como os do complexo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*.¹¹¹⁻¹¹⁴

A elevada capacidade de disseminação da NDM pode ser devido ao contexto genético no qual o gene *bla*_{NDM} está inserido. Diferentemente das outras MBLs plasmidiais, que normalmente estão inseridas em integrons de classe I, esse gene se encontra associado à sequência de inserção *ISAbal25*, à montante (*upstream*), e ao gene de resistência à bleomicina *ble*_{MBL}, à jusante (*downstream*).^{115,116} Essa estrutura ainda pode estar inserida em um transposon do tipo *Tn21*, o qual carrega outros determinantes de resistência, como AMEs e um operon de resistência ao mercúrio.⁷³

Carbapenemases de classe D

As oxacilinas são o segundo maior grupo de β -lactamases descritas até o momento, e representam aproximadamente 1/3 do total de β -lactamases. Embora todas sejam pertencentes à classe D de Ambler, Bush e Jacoby propõem que elas sejam divididas em, ao menos, três grupos: o grupo 2d inclui aquelas capazes de hidrolisar apenas cloxacilina e oxacilina; o grupo 2de apresenta atividade também contra cefalosporinas de espectro ampliado; e o grupo 2df pode degradar inclusive os carbapenêmicos.⁷⁸ Apesar de possuir afinidade pelos carbapenêmicos, as enzimas dessa classe são as que apresentam menor poder hidrolítico entre as carbapenemases.¹¹⁷

As carbapenemases de classe D tem sua importância mais significativa no gênero *Acinetobacter*, sendo que o gene *bla*_{OXA-51} é constitutivo e pode ser utilizado para a identificação e tipagem molecular dos principais clones internacionais da espécie *A. baumannii*.¹¹⁸ Entre as carbapenemases codificadas em plasmídeos, destacam-se ainda a OXA-23 e a OXA-58, que, quando associadas à sequência de inserção *ISAbal1*, têm sua expressão muito aumentada, gerando elevados níveis de resistência aos carbapenêmicos.⁸⁰

Na família *Enterobacteriaceae*, a OXA-48 parece ser a enzima epidemiologicamente mais relevante, especialmente na Europa, sendo considerada endêmica em alguns países mediterrâneos.¹¹⁹ O gene *bla*_{OXA-48} está localizado em um transposon do tipo *Tn1999*, o qual é caracterizado pela presença de duas cópias da IS1999 flanqueando o gene da β -lactamase. A presença dessas ISs é fundamental para a expressão e mobilização desse gene, uma vez que elas atuam tanto como sequências promotoras da β -lactamase, como facilitam sua transposição.¹²⁰ A variante desse transposon, denominada *Tn1999.2*, apresenta a *ISIR* inserida na cópia de IS1999 localizada à montante de *bla*_{OXA-48}, que atua como um segundo promotor, aumentando ainda mais a expressão da enzima.¹²¹

Diversas variantes de OXA-48 já foram descritas, tais como OXA-163, OXA-181, OXA-232, OXA-244, sendo que, dessas, apenas a OXA-163 não possui atividade de carbapenemase.^{87,122} No Brasil, já existem relatos de isolados produtores de uma variante da OXA-48, denominada OXA-370, cuja sequência de aminoácidos apresenta 99% de identidade com a OXA-48. A análise do ambiente genético de *bla*_{OXA-370} revelou que esse gene é flanqueado por uma sequência de inserção IS5075-like, à montante, e por IS4-like, à jusante, fazendo com que sua mobilização seja, portanto, bastante distinta.¹²³ Um estudo de Pereira e colaboradores detectou a presença de *bla*_{OXA-370} em 24 isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*, especialmente *K. pneumoniae*.¹²⁴ Esses achados revelam a rápida disseminação dessa enzima, uma vez que, menos de um ano após sua primeira detecção, ela já podia ser encontrada em uma região geográfica e uma espécie distinta daquela na qual foi originalmente identificada.

Considerações finais

As enterobactérias permanecem como os principais agentes etiológicos de infecções comunitárias e nosocomiais. Esses microrganismos são capazes de adquirir uma grande diversidade de mecanismos de resistência, os quais diminuem a eficácia clínica de praticamente todas as classes de antimicrobianos disponíveis atualmente. Entre esses determinantes de resistência, destacam-se as carbapenemases, enzimas com capacidade de hidrolisar os β -lactâmicos mais potentes disponíveis atualmente, os carbapenêmicos. Os genes que codificam essas proteínas normalmente estão localizados em elementos genéticos móveis com contextos genéticos bastantes distintos, os quais são responsáveis por sua expressão e disseminação. Em muitos casos, esses contextos genéticos incluem os genes determinantes de resistência a outros antimicrobianos, o que

pode dificultar ainda mais a erradicação desses microrganismos. A contínua pesquisa e a divulgação do conhecimento a respeito desses determinantes de resistência são a melhor maneira de entendermos a epidemiologia dos mesmos e, assim, buscar e implementar metodologias efetivas de controle de infecção para evitar a disseminação da resistência a antimicrobianos tanto no ambiente hospitalar quanto na comunidade.

REFERÊNCIAS

1. Donnenberg MS. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, editors. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. Philadelphia, PA: Churchill Livingstone Elsevier; 2010.
2. Gales AC, Castanheira M, Jones RN, Sader HS. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2012;73(4):354-60.
3. Levinson W, Jawetz E. *Microbiologia Médica e Imunologia*. 7. ed. ed. Porto Alegre: Artmed; 2005.
4. Rice LB, Bonomo RA. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents In: Versalovic J, Carroll KC, Funke G, Jorgensen JH, Landry ML, Warnock DW, editors. *Manual of Clinical Microbiology*. 1. Washington: ASM Press; 2011.
5. Nikaido H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR. 2003;67(4):593-656.
6. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1794(5):808-16.
7. Nikaido H, Vaara M. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiological reviews* 1985;49(1):1-32.
8. Hernandez-Alles S, Alberti S, Alvarez D, et al. Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* 1999;145 (Pt 3):673-9.
9. Jaffe A, Chabbert YA, Semonin O. Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1982;22(6):942-8.
10. Doumith M, Ellington MJ, Livermore DM, Woodford N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009;63(4):659-67.

11. Sturenburg E, Sobottka I, Mack D, Laufs R. Cloning and sequencing of *Enterobacter aerogenes* OmpC-type osmoporin linked to carbapenem resistance. *International journal of medical microbiology: IJMM* 2002;291(8):649-54.
12. Vidal S, Bredin J, Pages JM, Barbe J. Beta-lactam screening by specific residues of the OmpF eyelet. *Journal of medicinal chemistry* 2005;48(5):1395-400.
13. Tangden T, Adler M, Cars O, et al. Frequent emergence of porin-deficient subpopulations with reduced carbapenem susceptibility in ESBL-producing *Escherichia coli* during exposure to ertapenem in an *in vitro* pharmacokinetic model. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013;68(6):1319-26.
14. Wozniak A, Villagra NA, Undabarrena A, et al. Porin alterations present in non-carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* with high and intermediate levels of carbapenem resistance in Chile. *Journal of medical microbiology* 2012;61(Pt 9):1270-9.
15. Chen FJ, Lauderdale TL, Ho M, Lo HJ. The roles of mutations in *gyrA*, *parC*, and *ompK35* in fluoroquinolone resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Microbial drug resistance* 2003;9(3):265-71.
16. Kishii R, Takei M. Relationship between the expression of *ompF* and quinolone resistance in *Escherichia coli*. *Journal of infection and chemotherapy: official journal of the Japan Society of Chemotherapy* 2009;15(6):361-6.
17. Li XZ, Plesiat P, Nikaido H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clinical microbiology reviews* 2015;28(2):337-418.
18. Levy SB. Active efflux mechanisms for antimicrobial resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 1992;36(4):695-703.
19. Blair JM, Piddock LJ. Structure, function and inhibition of RND efflux pumps in Gram-negative bacteria: an update. *Current opinion in microbiology* 2009;12(5):512-9.
20. Nikaido H, Takatsuka Y. Mechanisms of RND multidrug efflux pumps. *Biochimica et biophysica acta* 2009;1794(5):769-81.
21. Sulavik MC, Houseweart C, Cramer C, et al. Antibiotic susceptibility profiles of *Escherichia coli* strains lacking multidrug efflux pump genes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001;45(4):1126-36.
22. Nishino K, Yamaguchi A. Analysis of a complete library of putative drug transporter genes in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 2001;183(20):5803-12.
23. Nichols RJ, Sen S, Choo YJ, et al. Phenotypic landscape of a bacterial cell. *Cell* 2011;144(1):143-56.

24. Oethinger M, Podglajen I, Kern WV, Levy SB. Overexpression of the *marA* or *soxS* regulatory gene in clinical topoisomerase mutants of *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998;42(8):2089-94.
25. Swick MC, Morgan-Linnell SK, Carlson KM, Zechiedrich L. Expression of multidrug efflux pump genes *acrAB-tolC*, *mdfA*, and *norE* in *Escherichia coli* clinical isolates as a function of fluoroquinolone and multidrug resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(2):921-4.
26. Seecoomar GD, Marmol BC, Kwon DH. Promoter deletions of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-encoding genes (*bla_{KPC-2}*) and efflux pump (AcrAB) on beta-lactam susceptibility in KPC-producing *Enterobacteriaceae*. *FEMS microbiology letters* 2013;348(2):120-6.
27. Padilla E, Llobet E, Domenech-Sanchez A, et al. *Klebsiella pneumoniae* AcrAB efflux pump contributes to antimicrobial resistance and virulence. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54(1):177-83.
28. Kim HB, Wang M, Park CH, et al. *oqxAB* encoding a multidrug efflux pump in human clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53(8):3582-4.
29. Nielsen LE, Snesrud EC, Onmus-Leone F, et al. IS5 element integration, a novel mechanism for rapid in vivo emergence of tigecycline nonsusceptibility in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014;58(10):6151-6.
30. Begic S, Worobec EA. The role of the *Serratia marcescens* SdeAB multidrug efflux pump and TolC homologue in fluoroquinolone resistance studied via gene-knockout mutagenesis. *Microbiology* 2008;154(Pt 2):454-61.
31. Hornsey M, Ellington MJ, Doumith M, et al. Tigecycline resistance in *Serratia marcescens* associated with up-regulation of the SdeXY-HasF efflux system also active against ciprofloxacin and ceftiofloxime. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010;65(3):479-82.
32. Shahcheraghi F, Minato Y, Chen J, et al. Molecular cloning and characterization of a multidrug efflux pump, SmfY, from *Serratia marcescens*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2007;30(4):798-800.
33. Minato Y, Shahcheraghi F, Ogawa W, et al. Functional gene cloning and characterization of the SsmE multidrug efflux pump from *Serratia marcescens*. *Biological & pharmaceutical bulletin* 2008;31(3):516-9.

34. McMurry L, Petrucci RE, Levy SB. Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 1980;77(7):3974-7.
35. Cattoir V, Poirel L, Nordmann P. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. Antimicrobial agents and chemotherapy 2008;52(10):3801-4.
36. Cox G, Wright GD. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. International journal of medical microbiology: IJMM 2013;303(6-7):287-92.
37. Baugh S, Phillips CR, Ekanayaka AS, et al. Inhibition of multidrug efflux as a strategy to prevent biofilm formation. The Journal of antimicrobial chemotherapy 2014;69(3):673-81.
38. Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annual review of microbiology 1987;41:435-64.
39. Lomovskaya O, Warren MS, Lee A, et al. Identification and characterization of inhibitors of multidrug resistance efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*: novel agents for combination therapy. Antimicrobial agents and chemotherapy 2001;45(1):105-16.
40. Lomovskaya O, Bostian KA. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic--a vision for applied use. Biochemical pharmacology 2006;71(7):910-8.
41. Watkins WJ, Landaverry Y, Leger R, et al. The relationship between physicochemical properties, in vitro activity and pharmacokinetic profiles of analogues of diamine-containing efflux pump inhibitors. Bioorganic & medicinal chemistry letters 2003;13(23):4241-4.
42. Katayama Y, Ito T, Hiramatsu K. A new class of genetic element, staphylococcus cassette chromosome *mec*, encodes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial agents and chemotherapy 2000;44(6):1549-55.
43. Cayô R, Rodriguez MC, Espinal P, et al. Analysis of genes encoding penicillin-binding proteins in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. Antimicrobial agents and chemotherapy 2011;55(12):5907-13.

44. Vashist J, Tiwari V, Das R, et al. Analysis of penicillin-binding proteins (PBPs) in carbapenem resistant *Acinetobacter baumannii*. The Indian journal of medical research 2011;133:332-8.
45. Lee M, Heseck D, Blazquez B, et al. Catalytic spectrum of the penicillin-binding protein 4 of *Pseudomonas aeruginosa*, a nexus for the induction of beta-lactam antibiotic resistance. Journal of the American Chemical Society 2015;137(1):190-200.
46. Moya B, Beceiro A, Cabot G, et al. Pan-beta-lactam resistance development in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains: molecular mechanisms, penicillin-binding protein profiles, and binding affinities. Antimicrobial agents and chemotherapy 2012;56(9):4771-8.
47. Kim ES, Hooper DC. Clinical importance and epidemiology of quinolone resistance. Infection & chemotherapy 2014;46(4):226-38.
48. Hiasa H, Shea ME. DNA gyrase-mediated wrapping of the DNA strand is required for the replication fork arrest by the DNA gyrase-quinolone-DNA ternary complex. The Journal of biological chemistry 2000;275(44):34780-6.
49. Shigemura K, Tanaka K, Yamamichi F, et al. Does mutation in *gyrA* and/or *parC* or efflux pump expression play the main role in fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* urinary tract infections?: A statistical analysis study. International journal of antimicrobial agents 2012;40(6):516-20.
50. Robicsek A, Jacoby GA, Hooper DC. The worldwide emergence of plasmid-mediated quinolone resistance. The Lancet Infectious diseases 2006;6(10):629-40.
51. Hooper DC, Jacoby GA. Mechanisms of drug resistance: quinolone resistance. Annals of the New York Academy of Sciences 2015;1354:12-31.
52. Jacoby GA, Strahilevitz J, Hooper DC. Plasmid-mediated quinolone resistance. Microbiology spectrum 2014;2(5).
53. Magnet S, Blanchard JS. Molecular insights into aminoglycoside action and resistance. Chemical reviews 2005;105(2):477-98.
54. Doi Y, Arakawa Y. 16S ribosomal RNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2007;45(1):88-94.
55. Lioy VS, Goussard S, Guerineau V, et al. Aminoglycoside resistance 16S rRNA methyltransferases block endogenous methylation, affect translation efficiency and fitness of the host. RNA (New York, NY) 2014;20(3):382-91.

56. Wachino J, Arakawa Y. Exogenously acquired 16S rRNA methyltransferases found in aminoglycoside-resistant pathogenic Gram-negative bacteria: an update. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2012;15(3):133-48.
57. Perichon B, Courvalin P, Galimand M. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;51(7):2464-9.
58. Hancock RE. Peptide antibiotics. *Lancet (London, England)* 1997;349(9049):418-22.
59. Olaitan AO, Morand S, Rolain JM. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology* 2014;5:643.
60. Liu YY, 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. *The Lancet Infectious diseases* 2015.
61. Liakopoulos A, Mevius DJ, Olsen B, Bonnedahl J. The colistin resistance *mcr-1* gene is going wild. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2016.
62. Fernandes MR, Moura Q, Sartori L, et al. Silent dissemination of colistin-resistant *Escherichia coli* in South America could contribute to the global spread of the *mcr-1* gene. *Euro surveillance* 2016;21(17).
63. Lentz SA, de Lima-Morales D, Cuppertino VM, et al. Letter to the editor: *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* gene isolated from poultry not exposed to polymyxins in Brazil. *Euro surveillance* 2016;21(26).
64. Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. *The American journal of medicine* 2006;119(6 Suppl 1):S20-8; discussion S62-70.
65. Ramirez MS, Tolmasky ME. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy* 2010;13(6):151-71.
66. Strahilevitz J, Jacoby GA, Hooper DC, Robicsek A. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. *Clinical microbiology reviews* 2009;22(4):664-89.
67. Tolmasky ME. Bacterial resistance to aminoglycosides and beta-lactams: the *Tn1331* transposon paradigm. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library* 2000;5:D20-9.

68. Vanhoof R, Hannecart-Pokorni E, Content J. Nomenclature of genes encoding aminoglycoside-modifying enzymes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1998;42(2):483.
69. Steiniger-White M, Rayment I, Reznikoff WS. Structure/function insights into *Tn5* transposition. *Current opinion in structural biology* 2004;14(1):50-7.
70. Wright GD, Thompson PR. Aminoglycoside phosphotransferases: proteins, structure, and mechanism. *Frontiers in bioscience* 1999;4:D9-21.
71. Vakulenko SB, Mobashery S. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clinical microbiology reviews* 2003;16(3):430-50.
72. Sarno R, McGillivray G, Sherratt DJ, et al. Complete nucleotide sequence of *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pJHCMW1. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2002;46(11):3422-7.
73. Liebert CA, Hall RM, Summers AO. Transposon *Tn21*, flagship of the floating genome. *Microbiology and molecular biology reviews* 1999;63(3):507-22.
74. Ambler RP. The structure of beta-lactamases. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* 1980;289(1036):321-31.
75. Jaurin B, Grundstrom T. *ampC* cephalosporinase of *Escherichia coli* K-12 has a different evolutionary origin from that of beta-lactamases of the penicillinase type. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1981;78(8):4897-901.
76. Ouellette M, Bissonnette L, Roy PH. Precise insertion of antibiotic resistance determinants into *Tn21*-like transposons: nucleotide sequence of the OXA-1 beta-lactamase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1987;84(21):7378-82.
77. Bush K, Jacoby GA, Medeiros AA. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1995;39(6):1211-33.
78. Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54(3):969-76.
79. Jacoby GA. AmpC beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews*. 2009;22(1):161-82, Table of Contents.
80. Turton JF, Ward ME, Woodford N, et al. The role of *ISAbal* in expression of OXA carbapenemase genes in *Acinetobacter baumannii*. *FEMS microbiology letters* 2006;258(1):72-7.

81. Lin CW, Huang YW, Hu RM, et al. The role of AmpR in regulation of L1 and L2 beta-lactamases in *Stenotrophomonas maltophilia*. *Research in microbiology* 2009;160(2):152-8.
82. Carattoli A. Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53(6):2227-38.
83. Mathers AJ, Peirano G, Pitout JD. The role of epidemic resistance plasmids and international high-risk clones in the spread of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. *Clinical microbiology reviews* 2015;28(3):565-91.
84. Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2007;20(3):440-58, table of contents.
85. Nordmann P, Poirel L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clinical microbiology and infection* 2002;8(6):321-31.
86. Nicoletti AG, Marcondes MF, Martins WM, et al. Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;59(9):5159-64.
87. Martinez-Martinez L, Gonzalez-Lopez JJ. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: types and molecular epidemiology. *Enfermedades infecciosas y microbiologia clinica* 2014;32 Suppl 4:4-9.
88. Pasteran F, Mendez T, Guerriero L, et al. Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of *Enterobacteriaceae*. *Journal of clinical microbiology* 2009;47(6):1631-9.
89. Nordmann P, Cuzon G, Naas T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *The Lancet Infectious diseases* 2009;9(4):228-36.
90. Yigit H, Queenan AM, Anderson GJ, et al. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001;45(4):1151-61.
91. Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, et al. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53: 333-4.
92. Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, et al. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2009;63(2):265-8.

93. Zavascki AP, Machado AB, de Oliveira KR, et al. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *International journal of antimicrobial agents* 2009;34(3):286-8.
94. Ribeiro VB, Zavascki AP, Nodari CS, et al. Detection of *bla*_{KPC-2} in a carbapenem-resistant *Kluyvera georgiana*. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012;67(11):2776-7.
95. Villegas MV, Lolans K, Correa A, et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2007;51(4):1553-5.
96. Robledo IE, Aquino EE, Sante MI, et al. Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2010;54(3):1354-7.
97. Naas T, Cuzon G, Villegas MV, et al. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008;52(4):1257-63.
98. Ribeiro VB, Andrade LN, Linhares AR, et al. Molecular characterization of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing isolates in southern Brazil. *Journal of medical microbiology* 2013;62(Pt 11):1721-7.
99. Chen L, Mathema B, Chavda KD, et al. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. *Trends in microbiology* 2014;22(12):686-96.
100. Poirel L, Le Thomas I, Naas T, et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2000;44(3):622-32.
101. Bae IK, Lee YN, Jeong SH, et al. Genetic and biochemical characterization of GES-5, an extended-spectrum class A beta-lactamase from *Klebsiella pneumoniae*. *Diagnostic microbiology and infectious disease* 2007;58(4):465-8.
102. Ribeiro VB, Falci DR, Rozales FP, et al. Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. *The Brazilian journal of infectious diseases* 2014;18(2):231-2.
103. Ribeiro VB, Zavascki AP, Rozales FP, et al. Detection of *bla*_{GES-5} in carbapenem-resistant *Kluyvera intermedia* isolates recovered from the hospital environment. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014;58(1):622-3.

104. Picao RC, Santos AF, Nicoletti AG, et al. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010;65(4):796-7.
105. Boyd D, Taylor G, Fuller J, et al. Complete sequence of four multidrug-resistant MOBQ1 plasmids harboring *bla*_{GES-5} isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* persisting in a hospital in Canada. *Microbial drug resistance* 2015;21(3):253-60.
106. Gales AC, Menezes LC, Silbert S, Sader HS. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2003;52(4):699-702.
107. 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. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2009;53(12):5046-54.
108. Johnson AP, Woodford N. Global spread of antibiotic resistance: the example of New Delhi metallo-beta-lactamase (NDM)-mediated carbapenem resistance. *Journal of medical microbiology* 2013;62(Pt 4):499-513.
109. Carvalho-Assef AP, Pereira PS, Albano RM, et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2013;68(12):2956-7.
110. Rozales FP, Ribeiro VB, Magagnin CM, et al. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. *International journal of infectious diseases* 2014.
111. Karthikeyan K, Thirunarayan MA, Krishnan P. Coexistence of *bla*_{OXA-23} with *bla*_{NDM-1} and *armA* in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* from India. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2010;65(10):2253-4.
112. Pfeifer Y, Wilharm G, Zander E, et al. Molecular characterization of *bla*_{NDM-1} in an *Acinetobacter baumannii* strain isolated in Germany in 2007. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2011;66(9):1998-2001.
113. Fu Y, Du X, Ji J, et al. Epidemiological characteristics and genetic structure of *bla*_{NDM-1} in non-*baumannii* *Acinetobacter* spp. in China. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 2012;67(9):2114-22.

114. Pagano M, Poirel L, Martins AF, et al. Emergence of NDM-1-producing *Acinetobacter pittii* in Brazil. *International journal of antimicrobial agents* 2015;45(4):444-5.
115. Shibata N, Doi Y, Yamane K, et al. PCR typing of genetic determinants for metallo-beta-lactamases and integrases carried by gram-negative bacteria isolated in Japan, with focus on the class 3 integron. *Journal of clinical microbiology* 2003;41(12):5407-13.
116. Dortet L, Nordmann P, Poirel L. Association of the emerging carbapenemase NDM-1 with a bleomycin resistance protein in *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2012;56(4):1693-7.
117. Evans BA, Amyes SG. OXA beta-lactamases. *Clinical microbiology reviews* 2014;27(2):241-63.
118. Pournaras S, Gogou V, Giannouli M, et al. Single-locus-sequence-based typing of *bla*_{OXA-51-like} genes for rapid assignment of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates to international clonal lineages. *Journal of clinical microbiology* 2014;52(5):1653-7.
119. Nordmann P, Poirel L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide. *Clinical microbiology and infection* 2014;20(9):821-30.
120. Aubert D, Naas T, Heritier C, et al. Functional characterization of IS1999, an IS4 family element involved in mobilization and expression of beta-lactam resistance genes. *Journal of bacteriology* 2006;188(18):6506-14.
121. Carrer A, Poirel L, Eraksoy H, et al. Spread of OXA-48-positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2008;52(8):2950-4.
122. Poirel L, Castanheira M, Carrer A, et al. OXA-163, an OXA-48-related class D beta-lactamase with extended activity toward expanded-spectrum cephalosporins. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2011;55(6):2546-51.
123. Sampaio JL, Ribeiro VB, Campos JC, et al. Detection of OXA-370, an OXA-48-related class D beta-lactamase, in *Enterobacter hormaechei* from Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2014;58(6):3566-7.
124. Pereira PS, Borghi M, de Araujo CF, et al. Clonal dissemination of OXA-370-producing *Klebsiella pneumoniae* in Rio de Janeiro, Brazil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2015;59(8):4453-6.