



Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina

Laboratorial

ISSN: 1676-2444

jbpml@sbpc.org.br,adagmar.andriolo@g
mail.com

Sociedade Brasileira de Patologia
Clínica/Medicina Laboratorial

de Araujo Borba, Claudia Michele; Matoso de Oliveira, Viviane; Arend, Lavínia N. V. S.;
Pilonetto, Marcelo

Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de *Klebsiella*
pneumoniae carbapenemases (KPC)

Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, vol. 48, núm. 6, diciembre, 2012,
pp. 427-433

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial
Rio de Janeiro, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=393541969007>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe , Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Validação do teste de inibição pelo ácido aminofenilborônico para triagem de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC)

Primeira submissão em 21/11/11
Última submissão em 04/10/12
Aceito para publicação em 13/11/12
Publicado em 20/12/12

Validation of inhibition test by aminophenyl boronic acid to Klebsiella pneumoniae carbapenemases (KPC) screening

Claudia Michele de Araujo Borba¹; Viviane Matoso de Oliveira²; Lavínia N. V. S. Arend¹; Marcelo Pilonetto³

unitermos

Ácido aminofenil borônico
Klebsiella pneumoniae
Carbapenemase
KPC

resumo

Introdução: A produção de enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) tem se tornado um importante e preocupante mecanismo de resistência, e ensaios que combinem alta sensibilidade e alta especificidade para a detecção dessas enzimas são escassos. **Objetivo:** Validar o teste de inibição pelo ácido 3-aminofenilborônico como método de triagem fenotípica de cepas produtoras de enzima KPC, comparando os resultados obtidos com os de testes confirmatórios por reação em cadeia da polimerase (PCR). **Metodologia:** Avaliou-se o uso do ácido 3-aminofenilborônico impregnado em discos de antibióticos de imipenem, meropenem e ertapenem. Foram testadas 36 cepas positivas e 12 negativas, todas confirmadas por PCR. Foram ainda testadas três concentrações diferentes de ácido borônico: 300, 400 e 600 µg. **Resultados:** Entre as cepas positivas testadas, o resultado mais adequado se deu com a adição do composto em disco contendo ertapenem, com especificidade de 100%, porém com sensibilidade de apenas 50%. **Conclusão:** Novos estudos são necessários, sobretudo no que diz respeito à padronização da técnica e aos insumos utilizados, pois o método se revela promissor na triagem de cepas produtoras de KPC.

abstract

Introduction: The production of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases enzymes (KPC) has become an important and worrisome resistance mechanism. Furthermore, tests that combine high sensitivity and high specificity for the detection of these enzymes are scarce. **Objective:** To validate the inhibition test by 3-aminophenyl boronic acid as a phenotypic screening method for KPC-producing strains by comparing the results with confirmatory polymerase chain reaction testing (PCR). **Methods:** We evaluated the use of 3-aminophenyl boronic acid applied on disks with imipenem, meropenem and ertapenem antibiotics. 36 strains were positive and 12 were negative, all confirmed by PCR. Three different concentrations of boronic acid were also tested: 300, 400 and 600 µg. **Results:** Among the positive strains, the results were more accurate with the addition of the compound to the ertapenem disk, presenting 100 % specificity and 50% sensitivity. **Conclusion:** Further studies are required, mainly regarding the standardization of the technique and materials, since the method seems to be promising as to the screening of KPC strains.

key words

Aminophenyl boronic acid
Klebsiella pneumonia
Carbapenemases
KPC

1. Especialista em Microbiologia; farmacêutica bioquímica.

2. Mestra em Ciências Farmacêuticas; farmacêutica bioquímica.

3. Mestre em Ciências Farmacêuticas; farmacêutico bioquímico; professor de Microbiologia da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR).

Introdução

A produção de enzimas *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) tem se tornado um importante e preocupante mecanismo de resistência^(1, 14, 15, 20). O grupo das carbapenemases tem alto potencial de disseminação, pois se localiza no plasmídio e, embora as KPC sejam predominantemente encontradas em *K. pneumoniae*, há relatos das enzimas em *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii*, *Serratia spp.* e *Pseudomonas aeruginosa*^(2, 8, 9, 15, 19, 20).

O composto 3-aminofenil ácido borônico (APBA) tem sido utilizado com sucesso na detecção de betalactamases classe C mediada por plasmídeo^(4, 17). Esse composto é descrito como inibidor reversível das enzimas do tipo KPC⁽¹⁸⁾. O método foi descrito por Coudron⁽⁵⁾ em 2005 e consiste em um teste de disco combinado. A sinergia do ácido fenilborônico (PBA) com os antibióticos foi aplicada para a identificação fenotípica do primeiro isolado produtor de KPC na Grécia. Posteriormente, uma avaliação mais aprofundada, com uma grande coleção de isolados produtores de KPC, apresentou um claro efeito sinérgico entre o PBA e carbapenens, inferindo uma aparente interação da molécula de PBA com o sítio ativo das enzimas KPC de classe A⁽¹³⁾. Estudos que combinaram imipenem, cefepime e meropenem com PBA mostraram alta sensibilidade e especificidade para detecção de KPC, cujo PBA aumentou de 8 a 11 mm o halo de inibição do meropenem para a maioria dos isolados KPC positivos⁽¹⁸⁾.

No entanto, ensaios que combinam alta sensibilidade e alta especificidade na detecção dessas enzimas não existem⁽¹⁸⁾. Assim, é imprescindível o conhecimento e a validação de métodos laboratoriais para que estes possam fornecer resultados fidedignos de detecção e identificação dos mecanismos de resistências, contribuindo de maneira eficaz na redução dos índices de morbidade e mortalidade.

Este estudo teve por objetivo validar o teste de inibição por APBA como método de triagem para pesquisa fenotípica de cepas produtoras de enzimas betalactamases tipo KPC, comparando os resultados obtidos por esse teste com os dos testes confirmatórios por reação em cadeia da polimerase (PCR).

Materiais e métodos

Critérios de inclusão

Amostras positivas

Trinta e seis cepas de *K. pneumoniae*, confirmadas como produtoras de betalactamase do tipo KPC por PCR,

utilizando os primers: KPC A – sequência 5'-3': CTGTCT-TGTCTCATGGCC; e KPC B – sequência 5'-3': CCTCG-CTGTGCTTGTACCC.

Amostras negativas

Doze cepas de bactérias, não produtoras de KPC, confirmadas por PCR. Foram incluídas outras espécies além de *K. pneumoniae*.

Microrganismos

Foram utilizados 48 isolados clínicos da família *Enterobacteriaceae*, previamente identificadas pelo sistema Vitek® 2 (bioMéuriex), cedidas pelo Laboratório Central do Estado do Paraná (LACEN). Entre as 48 cepas, 36 eram *K. pneumoniae*, confirmadas como produtoras de enzima KPC por PCR; dessas 36 cepas, 12 também eram produtoras de betalactamases de amplo espectro (ESBL), identificadas pelo sistema automatizado Vitek® 2 (bioMéuriex). Entre as 12 cepas restantes que foram confirmadas negativas para a produção de KPC por PCR, seis eram *K. pneumoniae*; duas, *Enterobacter cloacae*; uma, *Escherichia coli*; e uma, *Enterobacter aerogenes*. As cepas mantidas em caldo brain heart infusion (BHI) + glicerol a -70°C foram previamente reativadas por repique em Ágar MacConkey e incubadas a 36°C por 24 horas, antes da realização do teste de inibição pelo APBA.

Amplificação por PCR

Todas as cepas foram previamente confirmadas molecularmente para a presença ou não do gene *bla_{KPC}*. A PCR foi feita por método *in house*. Primeiramente, preparou-se uma solução *master mix*, a qual continha os primers forward e reverse, sendo KPC A: sequência 5'-3': CTGTCTTGCTC-TCATGGCC, KPC B: sequência 5'-3': CCTCGCTGTGCT-TGTCATCC; Taq polimerase (*Taq* ácido desoxirribonucleico [DNA] polymerase recombinante, invitrogen), dNTPs, MgCl₂ e DNA previamente extraído conforme explanado por Naas *et al.*⁽¹⁰⁾. Os tubos de reação foram levados ao termociclador, no qual foi realizada a amplificação do DNA com desnaturação inicial de 94°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento do primer a 65°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, além de uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O gene pesquisado foi o *bla_{KPC}* e o resultado se deu por meio da presença de uma banda específica em eletroforese em gel de agarose 2%.

Teste de inibição pelo ácido borônico para identificação fenotípica de KPC

Preparação dos discos

Discos de antibióticos contendo 30 µg de meropenem, imipenem e ertapenem (Oxoid®) foram impregnados com solução aquosa de APBA (Sigma Aldrich®) 50 mg/ml, que foi adicionada nos volumes de 6 µl, 8 µl e 12 µl, gerando três concentrações finais de APBA (300, 400 e 600 µg, respectivamente) para cada antibiótico. Controle dos discos sem APBA também foram realizados. Os discos foram deixados para secar por 30 minutos e armazenados a -20°C por até três semanas⁽⁵⁾.

Controles positivo e negativo

Foi utilizada como controle negativo a cepa de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883, sensível aos carbapenêmicos. Como controle positivo, utilizou-se cepa de *Klebsiella pneumoniae*, nº 2470, cedida pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL), confirmada como produtora de KPC por PCR. Os testes para os controles foram realizados em triplicata.

Ensaio de sinergismo

O teste de inibição pelo APBA foi realizado de acordo com DOI *et al.*⁽⁶⁾. Para cada cepa, preparou-se uma suspensão direta em salina 0,85% a partir de colônias isoladas com 24 horas de crescimento, e a turvação da suspensão foi ajustada de acordo com o tubo 0,5 de Mac Farland, utilizando-se um densitômetro (Densimat® - bioMérieux) com comprimento de onda de 625 nm, o que gera uma suspensão de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/ml. Com um swab estéril, a suspensão foi inoculada na superfície da placa de Ágar Muller-Hinton. Após, os discos foram colocados sob a superfície da placa inoculada e estas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18-24 horas.

Os resultados foram obtidos pela leitura dos halos de inibição obtidos sem e com a adição da solução de APBA. Quando o halo de inibição ao redor do disco contendo o antibiótico mais APBA for maior ou igual a 5 mm que o halo do disco sem a solução de APBA, a prova será considerada positiva para a produção de KPC⁽⁴⁰⁾. Os resultados foram ainda analisados sob a perspectiva de novo ponto de corte (3 mm), na tentativa de otimizar a sensibilidade do teste.

Parâmetros de avaliação e validação do teste

Os resultados obtidos foram comparados com os resultados fornecidos pelo teste molecular. Determinou-se, ainda, a sensibilidade e a especificidade para cada

concentração de APBA e para cada antibiótico, de acordo com a análise sugerida por Ilstrup⁽⁷⁾. Diferenças estatísticas entre os resultados obtidos com as diferentes concentrações de APBA e antibióticos foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), com nível de significância 0,05.

Resultados

Para as 48 amostras testadas, como critério para avaliação dos resultados foi considerada amostra verdadeira positiva/negativa aquela obtida por PCR. Na **Tabela 1**, pode-se observar que, entre as 36 cepas positivas para a presença da enzima KPC por PCR, apenas 11, 8 e 12 foram positivas pelo método proposto, utilizando meropenem com adição de 300, 400 e 600 µg, respectivamente. Utilizando o antibiótico ertapenem com a adição de 300, 400 e 600 µg, apenas 15, 12 e 18 foram positivas, respectivamente. Em relação ao imipenem, entre as 36 cepas positivas pelo PCR, nenhuma se apresentou positiva com a utilização desse antibiótico. No entanto, para as cepas negativas pelo PCR para a presença de KPC, o método proposto forneceu resultado negativo para todas as 12 cepas molecularmente negativas com os três antibióticos testados.

Observam-se na **Tabela 2** os resultados obtidos com ponto de corte de 3 mm. Dessa forma, das 36 amostras verdadeiras positivas, meropenem nas concentrações de APBA 300, 400 e 600 µg, foi capaz de detectar 25, 21 e 26 amostras, respectivamente, enquanto ertapenem foi capaz de detectar 28, 31 e 31, respectivamente. Imipenem, todavia, detectou apenas duas amostras, quando associado ao APBA 300 µg. Quando foram utilizadas concentrações de 400 e 600 µg, este não detectou nenhuma amostra positiva. Quanto à concordância entre os métodos nas amostras negativas, meropenem e imipenem forneceram resultados negativos para todas as amostras negativas por PCR, contudo, observaram-se dois resultados falso-positivos quando se utilizou ertapenem em associação com APBA 300 e 400 µg, e quatro falso-positivos com APBA 600 µg.

Com o ponto de corte de 5 mm, o ertapenem apresentou sensibilidade de 50%, 41,67% e 33,33% quando associado a 600 µg, 300 µg e 400 µg, respectivamente. O meropenem apresentou sensibilidade de 33,33% com 600 µg de APBA, 30,56% com 300 µg e 2,22% com 400 µg. Para o antibiótico imipenem, a sensibilidade foi de 0% para todas as concentrações de APBA testadas (**Figura 1**). Com o ponto de corte de 3 mm, ertapenem apresentou sensibilidade de 86,11% quando utilizado em associação com 400 e

Comparativo dos resultados obtidos entre meropenem, ertapenem e imipenem em diferentes concentrações de APBA e teste molecular (PCR) – (ponto de corte de 5 mm) para a detecção de cepas produtoras de KPC

Tabela 1

Antibiotico	Concentração de APBA	Teste de inibição pelo APBA	PCR	
			Positiva	Negativa
Meropenem	300 µg	Positivo	11	0
		Negativo	25	12
	400 µg	Positivo	8	0
		Negativo	28	12
	600 µg	Positivo	12	0
		Negativo	24	12
	300 µg	Positivo	15	0
		Negativo	21	12
Ertapenem	400 µg	Positivo	12	0
		Negativo	24	12
	600 µg	Positivo	18	0
		Negativo	18	12
	300 µg	Positivo	0	0
		Negativo	36	12
	400 µg	Positivo	0	0
		Negativo	36	12
Imipenem	600 µg	Positivo	0	0
		Negativo	36	12

APBA: 3-aminoenil ácido borônico; PCR: reação em cadeia da polimerase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

Comparativo dos resultados obtidos entre meropenem, ertapenem e imipenem em diferentes concentrações de APBA e teste molecular (PCR) – (ponto de corte de 3 mm) para a detecção de cepas produtoras de KPC

Tabela 2

Antibiotico	Concentração de APBA	Teste de inibição pelo APBA	PCR	
			Positiva	Negativa
Meropenem	300 µg	Positivo	25	0
		Negativo	11	12
	400 µg	Positivo	21	0
		Negativo	15	12
	600 µg	Positivo	26	0
		Negativo	10	12
	300 µg	Positivo	28	2
		Negativo	8	10
Ertapenem	400 µg	Positivo	31	2
		Negativo	5	10
	600 µg	Positivo	31	4
		Negativo	5	8
	300 µg	Positivo	2	0
		Negativo	34	12
	400 µg	Positivo	0	0
		Negativo	36	12
Imipenem	600 µg	Positivo	0	0
		Negativo	36	12

APBA: 3-aminoenil ácido borônico; PCR: reação em cadeia da polimerase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

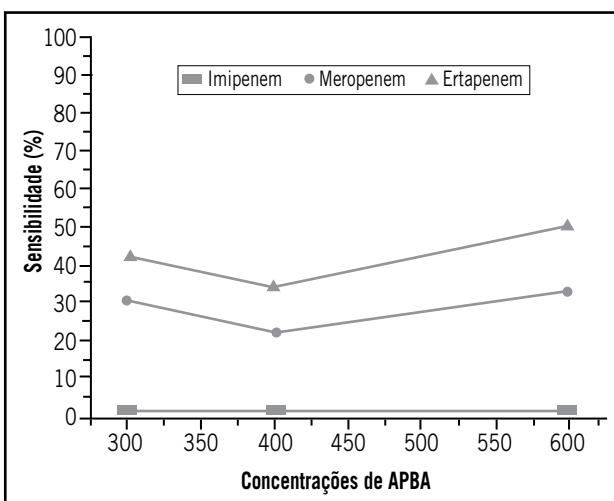


Figura 1 – Sensibilidade (%) do teste de inibição pelo APBA para cada antibiótico e concentração de APBA (ponto de corte = 5 mm) para a detecção de cepas produtoras de KPC

APBA: 3-aminoenil ácido borônico; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

600 µg de APBA e de 77,78% com 300 µg. Para meropenem, a sensibilidade foi de 69,44%, 58,33% e 72,22%, respectivamente, com as concentrações de 300, 400 e 600 µg de APBA. Imipenem mostrou sensibilidade de apenas 5,56% quando associado a 300 µg de APBA (**Figura 2**).

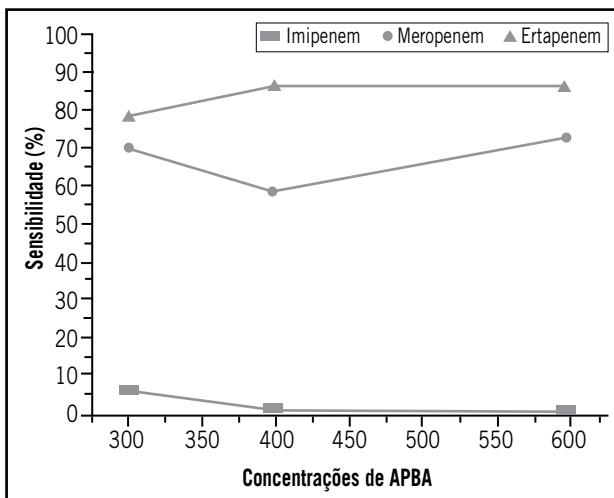


Figura 2 – Sensibilidade (%) do teste de inibição pelo APBA para cada antibiótico e concentração de APBA (ponto de corte = 3 mm) para a detecção de cepas produtoras de KPC

APBA: 3-aminoenil ácido borônico; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

Na **Figura 3**, os dados são expressos como média ± erro padrão (EP) dos halos de inibição para os três antibióticos nas três concentrações de APBA. Imipenem 0 µg APBA ($16,36 \pm 0,691$); 300 µg ($12,44 \pm 0,75$); 400 µg ($6,89 \pm 0,385$); 600 µg (6 ± 0). Meropenem 0 µg APBA ($12,69 \pm 0,761$); 300 µg ($15,97 \pm 0,613$); 400 µg ($15,69 \pm 0,671$); 600 µg ($16,03 \pm 0,705$). Ertapenem 0 µg APBA ($8,64 \pm$

$0,645$); 300 µg ($12,78 \pm 0,561$); 400 µg ($12,64 \pm 0,626$); 600 µg ($13,11 \pm 0,623$). Observa-se que a adição de APBA ao antibiótico imipenem ocasionou diminuição dos halos de inibição, enquanto para o ertapenem e meropenem, os halos de inibição se mantiveram os mesmos ou aumentaram de tamanho com a adição de APBA. A diferença entre os halos de inibição observada entre meropenem e ertapenem apresenta significância estatística com $p < 0,001$, $< 0,001$, $< 0,01$ para as concentrações 300, 400 e 600 µg, respectivamente. Entretanto, diferenças entre as concentrações de APBA, tanto para meropenem quanto para ertapenem, só foram significativas entre a concentração 0 µg e as demais (meropenem, $p < 0,05$ e ertapenem, $p < 0,01$), não sendo, portanto, significativa a diferença entre as concentrações 300, 400 e 600 µg para os dois antibióticos (meropenem, $p = 0,983$; 1,000; 0,983) (ertapenem, $p = 0,993$; 0,970; 0,892).

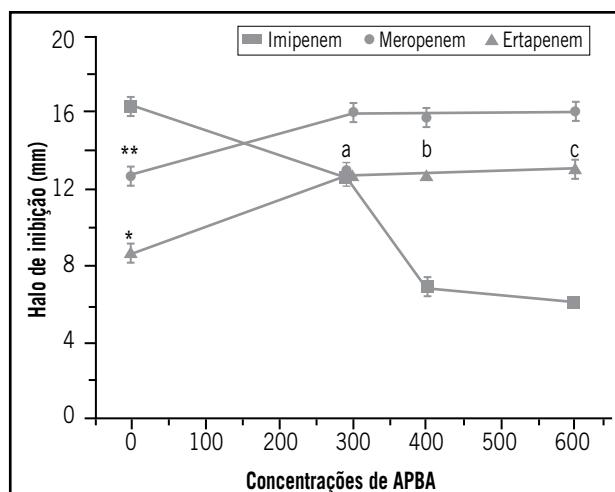


Figura 3 – Comportamento dos halos de inibição para cada antibiótico de acordo com a concentração de APBA

* Diferença estatística entre as concentrações 0 µg de demais APBA (300, 400 e 600 µg) para antibiótico ertapenem ($p < 0,01$).

** Diferença estatística entre as concentrações 0 µg de demais APBA (300, 400 e 600 µg) para antibiótico meropenem ($p < 0,05$).

(a) diferença estatística entre os antibióticos meropenem e ertapenem na concentração de 300 µg de APBA ($p < 0,001$); (b) diferença estatística entre os antibióticos meropenem e ertapenem na concentração de 400 µg de APBA ($p < 0,001$); (c) diferença estatística entre os antibióticos meropenem e ertapenem na concentração de 600 µg de APBA ($p < 0,01$).

Discussão

O número de casos de resistência aos carbapenêmicos tem aumentado em vários centros brasileiros e no mundo todo, o que tem se tornado grande motivo de preocupação, sobretudo no ambiente hospitalar^(3, 11, 15).

Diante disso e da limitação terapêutica existente, a detecção correta desses mecanismos de resistência se torna o passo fundamental no controle da disseminação. Diversas técnicas moleculares têm oferecido ótimo desempenho na detecção dessas enzimas, no entanto, são limitadas por serem de alto custo. O teste de Hodge modificado é uma técnica menos onerosa, porém, sua interpretação requer alguma experiência; ademais, o teste pode apresentar resultados falso-positivos^(12, 13).

De acordo com relatos que avaliaram a eficácia do teste de inibição pelo ácido borônico na detecção de enzimas betalactamases, pode-se observar um excelente desempenho do teste para este fim, já que exibiu alta sensibilidade e especificidade na maioria dos estudos realizados^(4, 17). Em estudo conduzido por DOI⁽⁶⁾ que avaliou a atividade inibitória do ácido aminofenilborônico, impregnando discos de antibióticos carbapenêmicos, demonstrou concordância que excede 90%, sendo o ertapenem e meropenem substratos que apresentaram maior sensibilidade, em comparação ao imipenem. No entanto, o presente estudo apresentou baixa sensibilidade do teste utilizando APBA na detecção de enzimas KPC em três diferentes concentrações de APBA e em três diferentes substratos. Isso também foi observado em um estudo realizado por Su *et al.*⁽¹⁶⁾, que utilizou duas diferentes formulações de ácido borônico (APB e APBA) e a mesma técnica, na qual discos de cefotaxima e ceftazidima impregnados com solução de APB e APBA foram utilizados para detecção de enzimas do tipo ampC. Uma hipótese seria que os diferentes percentuais de sensibilidade encontrados entre este estudo e os outros para detecção dessas enzimas podem ter ocorrido devido a diferentes formulações de ácido borônico utilizadas. Outra pesquisa também sugere que a capacidade de detecção das enzimas KPC por APBA é menor quando comparada com PBA⁽¹³⁾. Diante disso, faz-se necessário mais estudos para aperfeiçoar e padronizar a técnica a fim de otimizar a detecção desses mecanismos de resistência, bem como melhorar a sensibilidade e a especificidade dos testes, sobretudo na detecção de enzimas do tipo KPC.

A diminuição do ponto de corte para 3 mm foi sugerida com o intuito de otimizar os resultados, buscando

um aumento na sensibilidade do teste, sem diminuir a especificidade. Sob esse novo aspecto, pode-se observar que houve aumento significativo na sensibilidade, que foi de 50% para 86,11% para o ertapenem com APBA 400 µg. Já a especificidade, para o mesmo antibiótico e a mesma concentração, apresentou uma ligeira queda, passando para 83,33%. Como o objetivo do teste com APBA é ser implantado para triagem, a diminuição do ponto de corte mostrou-se eficaz, pois aumenta consideravelmente a sensibilidade. Já a diminuição da especificidade não compromete sua eficácia, uma vez que esses resultados precisam ser confirmados por métodos moleculares.

Conclusão

Diante deste estudo, observa-se que o teste de inibição pelo ácido borônico mostra-se como um potencial teste de triagem para detecção da enzima KPC. Contudo, a validação pretendida neste trabalho não foi possível, o que aponta a necessidade de novas pesquisas que visem a padronização da técnica, com a escolha da melhor formulação de ácido borônico, determinação da estabilidade da solução e dos antibióticos quando submetidos ao armazenamento, bem como determinação dos pontos de corte utilizados para interpretação do teste, e até mesmo avaliação de outros métodos, como o de disco aproximação. Todo esforço no sentido de aperfeiçoar a técnica é importante, pois torna-se necessária a implantação de novos testes na rotina laboratorial que sejam de fácil execução e que permitam a identificação correta de surtos, sobretudo em ambientes hospitalares, pois eles têm sofrido com o crescente aumento nos índices de morbidade e mortalidade relacionadas com esse mecanismo de resistência.

Agradecimentos

Ao LACEN-PR, à equipe do setor da Bacteriologia Geral, Karin Obladen, Thales Wuicik e Marcella Duarte, e ao Luiz Augusto da Silva, pelo auxílio estatístico.

Referências

- ALBA, J. *et al.* Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 4760-2, 2005.
- BRATU, S. *et al.* Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 776-8, 2005.

3. BRATU, S. et al. Rapid spread of carbapenemresistant *Klebsiella pneumoniae* in New York city: a new threat to our antibiotic armamentarium. *Arch Intern Med*, v. 165, p. 1430-5, 2005.
4. BRENTWALD, N. P. et al. Disc methods for detecting AmpC β -lactamase-producing clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *J Antimicrob Chemother*, v. 56, p. 600-1, 2005.
5. COUDRON, P. E. Inhibitor-based methods for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, and *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol*, v. 43, p. 4163-7, 2005.
6. DOI, Y. et al. Simple disk-based method for detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-type-lactamase by use of a boronic acid compound. *J Clin Microbiol*, v. 46, n. 12, p. 4083-6, 2008.
7. ILSTRUP, D. M. Statistical methods in microbiology. *Clin Microbiol Rev*, v. 3, p. 219-26, 1990.
8. MARCHAIM, D. et al. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 52, p. 1413-8, 2008.
9. MIRIAGOU, V. et al. Imipenem resistance in a *Salmonella* clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 1297-1300, 2003.
10. NAAS, T. et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, p. 4423-4, 2005.
11. NORDMANN, P.; CUZON G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis*, v. 9, p. 228-36, 2009.
12. PASTERAN, F. et al. Controlling false-positive results obtained with the hodge and masuda assays for detection of class A carbapenemase in species of *Enterobacteriaceae* by incorporating boronic acid. *J Clin Microbiol*, v. 48, n. 4, p. 1323-32, 2010.
13. POURNARAS, S.; POULOU, A.; TSAKRIS, A. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemases-producing *Esterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. *J Antimicrob Chemother*, 2010.
14. QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clinical Microbiology Review*, v. 20, p. 440-58, 2007.
15. SMITH M. E. et al. Plasmid-mediated, carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumonia* isolates. *J Antimicrob Chemother*, v. 51, p. 711-4, 2003.
16. SU, W. Y.; GOTTLIEB, T.; MERLINO, J. Optimal phenotypic testing of ampC beta-lactamases using boronic acid solutions. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2011.
17. TENOVER, F. C. et al. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. *Emerg Infect Dis*, v. 12, p. 1209-13, 2006.
18. TSAKRIS, A. et al. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol*, v. 47, p. 362-7, 2009.
19. VILLEGAS, M. V. et al. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing-lactamase. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 51, p. 1553-5, 2007.
20. YIGIT, H. et al. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 47, p. 3881-9, 2003.

Endereço para correspondência

Viviane Matoso de Oliveira
Rua Saldanha Marinho, 3.770, apto 08
Bairro dos Estados
CEP: 85035-160 – Guarapuava-PR