

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VIGILÂNCIA SANITÁRIA
INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Sthefanie da Silva Ribeiro

**PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE
CARBAPENEMASES DOS TIPOS KPC E NDM PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS
GRAM-NEGATIVAS**

Rio de Janeiro
2016

Sthefanie da Silva Ribeiro

**PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE
CARBAPENEMASES DOS TIPOS KPC E NDM PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS
GRAM NEGATIVAS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Orientadora: Marise Dutra Asensi

Rio de Janeiro
2016

Catálogo na fonte
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
Biblioteca

Ribeiro, Sthefanie da Silva

Padronização de PCR em Tempo Real para detecção de carbapenemases dos tipos KPC e NDM produzidas por bactérias Gram negativas. / Sthefanie da Silva Ribeiro – Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2016.

95 f.: il., tab.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária) – Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional em Controle de Qualidade em Saúde. Fundação Oswaldo Cruz. 2016.

Orientadora: Marise Dutra Asensi

1. Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real. 2. Carbapenêmicos. 3. Bactérias Gram-Negativas. 4. Técnicas de Análises. I. Título

**STANDARDIZING OF A REAL-TIME PCR TO DETECT KPC AND NDM
CARBAPENEMASES PRODUCED BY GRAM NEGATIVE BACTERIA.**

Sthefanie da Silva Ribeiro

**PADRONIZAÇÃO DE PCR EM TEMPO REAL PARA DETECÇÃO DE
CARBAPENEMASES DOS TIPOS KPC E NDM PRODUZIDAS POR BACTÉRIAS
GRAM NEGATIVAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz como requisito para obtenção do título de Mestre em Vigilância Sanitária

Aprovado em: 29 / 02 / 2016

BANCA EXAMINADORA

Ivano Raffaele Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Cláudio Marcos Rocha de Souza (Doutor)
Instituto Oswaldo Cruz

Flávia Lúcia Piffano Costa Pellegrino (Doutora)
Centro Universitário Estadual da Zona Oeste

Marise Dutra Asensi (Doutora) - Orientadora
Instituto Oswaldo Cruz

Dedico este trabalho aos meus pais, familiares e amigos; também dedico a todos que estão dispostos a realizar seus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu Deus pelo seu amor e pelos sonhos que gerou em meu coração.

Agradeço ao meu melhor amigo o Espírito Santo, que foi o meu consolo, meu refúgio e minha fortaleza. Minha alegria em tempos difíceis

Agradeço aos meus pais, meus maiores incentivadores que nunca mediram esforços para me ajudar a alcançar meus objetivos.

Agradeço aos meus amigos que me apoiaram e me fizeram sorrir durante todo esse período.

Agradeço ao Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde pela grande oportunidade de crescimento e amadurecimento intelectual, e por abrir as portas de um mundo de possibilidades.

Agradeço a minha orientadora Marise Dutra Asensi pela oportunidade, paciência e dedicação em que me apoiou durante todo o desenvolvimento de projeto.

Agradeço a Bio-Manguinhos por todo o suporte técnico e intelectual aplicado ao projeto.

Agradeço ao PDTIS por ter acreditado e investido nesse projeto.

Por fim, agradeço de coração a todos que participaram da realização deste grande sonho.

“Por que quem compreendeu a mente do Senhor? ou quem foi seu conselheiro? Ou quem lhe deu primeiro a ele, para que lhe seja recompensado? . Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente. Amém.”
Romanos 11:34-36

RESUMO

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento. A vigilância sanitária possui papel fundamental para o controle e contenção da disseminação de patógenos carreadores de genes de resistência no ambiente hospitalar e na comunidade. O mecanismo mais importante associado à resistência aos β -lactâmicos é a produção de β -lactamases que hidrolisam sua estrutura química causando a perda de função deste antimicrobiano. Os carbapenêmicos são a principal opção para o tratamento de infecções por bactérias Gram-negativas multiresistentes. Recentemente a resistência mediada por carbapenemases tem crescido, sendo observada no Brasil e ao redor do mundo. As carbapenemases mais descritas no Brasil são as serina carbapenemases KPC e OXA-48 em enterobactérias, OXA-23 em *A. baumannii* e as Metallo-beta-lactamases NDM, SPM. **Objetivo:** Padronizar uma metodologia para detecção de carbapenemases *bla_{kpc}* e *bla_{ndm}* em bacilos Gram-negativos através de PCR em Tempo Real. **Metodologia:** Os ensaios de padronização foram realizados no ABI PRISM Prism7500 (Applied Biosystems) com cepas controle previamente identificadas por testes fenotípicos e PCR convencional como produtoras de KPC, NDM e não-produtoras. O controle endógeno utilizado foi o gene constitutivo 16SrRNA. A padronização seguiu cinco pontos principais: 1) Metodologia de extração, através de sonicação, lise térmica e lise de colônia diretamente durante a reação de PCR. 2) Definição da metodologia de ciclagem. 3) Otimização da reação com diferentes concentrações de sondas e iniciadores. 4) Comparação entre MasterMix NAT e IBMP. 4) Bioequivalência de sondas e iniciadores de diferentes fabricantes. 5) Análise da especificidade e sensibilidade do protótipo frente a 100 cepas previamente caracterizadas. 6) determinação do Limite de detecção do protótipo **Resultados:** As metodologias de extração testadas se mostraram igualmente eficazes com amplificação de *bla_{kpc}* e *bla_{ndm}*, entretanto a lise térmica da colônia realizada durante a ativação enzimática da enzima Taq *hot start* possuía maior relação custo benefício, sendo mais rápida que as demais. O protocolo de ciclagem do CDC se mostrou tão eficaz quanto o estabelecido por Bio-Manguinhos, sendo o do CDC mais rápido. Os ensaios de otimização revelaram que as melhores concentrações de sondas e iniciadores testadas foram (0,2 μ M e 0,4 μ M respectivamente) com valores médios de Ct de 17,43 para KPC e 20,53 para NDM. Mesmo após a otimização realizada com o Master Mix IBMP e adição de ROX, este não apresentou resultados tão expressivos quando comparados com o MIX NAT. Quanto a Bioequivalência os melhores resultados foram encontrados com Sondas da marca BIOSEARCH e iniciadores da marca IDT. O protótipo padronizado possuiu 100% de especificidade para a detecção de KPC e NDM e 100% de sensibilidade. Mesmo após a diluição seriada por 10 vezes, o protótipo foi capaz de detectar a presença dos genes alvos em concentrações mínimas de DNA. A partir desta primeira etapa para a validação do protótipo foi possível determinar sua eficácia frente a um grande número de cepas, sendo necessária a análise de outros parâmetros para a validação total do protótipo.

Palavras chave: PCR em tempo real; Carbapenemases; Bactérias Gram-negativas.

ABSTRACT

Hospital acquired infections (HAI's) are considered as a serious public health problem. It has been present even in developed countries and underdeveloped countries. Health surveillance has an important role of controlling resistance dissemination between pathogens, in the hospital and in the community. The most important mechanism associated to beta-lactamic resistance is the beta-lactamases production. These enzymes are able to hydrolyze the chemical structure causing the loss of antimicrobial function. Carbapenems are the main option for treatment of multiresistant Gram-negative bacterial infections. Recently, the carbapenem resistance has increased in Brazil and worldwide. The most described carbapenemases in Brazil are KPC e OXA-48 in *Enterobacteriaceae*, OXA-23 in *A. baumannii* and the Metallo-beta-lactamases NDM and SPM. **Methodology:** The multiplex real-time PCR assays were performed in ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) according to CDC protocol for detection of KPC e NDM, using control strains previously characterized as KPC and/or NDM producers and non-producers by phenotypic tests, conventional PCR and DNA sequencing. The constitutive gene 16S rRNA was used as endogenous control. This study has followed six main steps: 1) Bacterial DNA extraction (sonication, thermal lyses, and enzymatic lyses direct from bacteria colony. 2) *qPCR* Cycle definition. 3) Optimization of distinct concentration of primers and probes. 5) Comparison between two different master Mix (NAT and IBMP). 4) Bioequivalence between probes and primers from two different brands. 6) Determination of limit of detection (LOD). **Results:** The DNA extraction strategies tested showed equal efficiency in amplifying both target genes. However, the thermal lyses direct of a colony from Taq *hot start* action showed major relation cost-benefit, being faster than the others conditions tested. The protocol established by CDC was very efficient as well the established by Bio-Manguinhos, but the CDC protocol was faster. The trials for optimization of reactions revealed the best concentrations of probes and primers (0,2µM and 0,4µM respectively) with Ct mean of 17,43 for KPC and 20,53 for NDM. Even after optimization reactions and addition of ROX. The bioequivalence showed best results with probes produced by BIOSEARCH and primers produced by IDT. The prototype has 100% of specificity for detection of KPC and NDM, and 100% of sensibility. Even over serial 10-fold dilution, the prototype was capable to detect the target genes even with minimal concentration of DNA. Starting from this first step for validation, was possible to determine the effectiveness against 100 bacterial isolates, being necessary to analyze others parameters final validation of the prototype

Keywords: Carbapenemases, Real Time PCR, Gram-negative bacteria.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação de beta-lactamases	28
Tabela 2	Sequências nucleotídicas de sondas e iniciadores	46
Tabela 3	Amostras controles para a padronização do protótipo	47
Tabela 4	Valores de Ct para as concentrações testadas	55
Tabela 5	Valores de <i>Threshold</i> e <i>Baseline</i> para cada um dos alvos	56
Tabela 6	Reagentes e seus volumes para uma reação do protótipo.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Reação de ciclo-adição que gera anel beta-lactâmico	23
Figura 2	Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos existentes.	24
Figura 3	Esquema representando o mecanismo de ação das beta-lactamases.	27
Figura 4	Reações químicas envolvidas na técnica de <i>qPCR</i>	40
Figura 5	Amplificação dos genes <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM} e controle interno 16s RNA através da metodologia de extração LT3	54
Figura 6	Amplificação dos genes <i>bla</i> _{KPC} e <i>bla</i> _{NDM} com MIX NAT e com MIX IBMP	57
Figura 7	Amplificação de <i>qPCR</i> utilizando sondas e iniciadores produzidos pela BIOSEARCH	58
Figura 8	Amplificação de <i>qPCR</i> utilizando sondas e iniciadores produzidos pela IDT	59
Figura 9	Amplificação de <i>qPCR</i> utilizando sondas produzidas pela IDT e iniciadores produzidos pela BIOSEARCH	59
Figura 10	Amplificação de <i>qPCR</i> , utilizando sondas produzidas pela BIOSEARCH e iniciadores produzidos pela IDT	60
Figura 11	Curvas de amplificação das cepas <i>bla</i> _{KPC} positivas	66
Figura 12	Curvas de amplificação das cepas <i>bla</i> _{NDM} positivas	67
Figura 13	Curvas de amplificação das cepas negativas	67

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Descrição das cepas selecionadas para padronização	63
Gráfico 2	Distribuição das cepas <i>bla_{KPC}</i> de acordo com sua espécie	64
Gráfico 3	Distribuição das cepas <i>bla_{NDM}</i> positivas	64

LISTA DE SIGLAS

IRAS	Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
WHO	do ingles <i>World Health Organization</i>
CDC	do ingles <i>Centers for Diseases Control and prevention</i>
EUA	Estados Unidos da América
ECDC	do ingles <i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
PNCIH	Programa Nacional de Controle de infecção hospitalar
CCIH	Central de Controle de Infecção Hospitalar
CF	Comissões Farmacoterapêuticas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BGN-NF	Bacilos Gram-negativos não fermentadores
MYSTIC	do ingles <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
PBP	do inglês <i>Penicillin binding proteins</i>
ESBL	Beta-lactamases de Espectro Estendido
OMP	do inglês <i>Outer membrane proteins</i>
TEM	Beta-lactamase Temoneira
VIM	Verona imipenemase
SPM	São Paulo Metalo-beta-lactamase
NDM	<i>New Delhi</i> Metalo-beta-lactamase
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
IMP	Imipenemase
ST	Sequence type
OXA	Oxacilinase
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CLSI	do ingles <i>Clinical Laboratory and Standarts Institute</i>
EUCAST	do ingles <i>European committee on antimicrobial susceptibility testing</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
LACEN	Laboratório Central de Saúde Pública
MgSO₄	Sulfato de Magnésio
DNA	Ácido desoxirribonucléico
<i>et al</i>	e outros
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
qPCR	do ingles <i>Fluorescence-based quantitative real-time PCR</i>
qRT-PCR	do inglês <i>Transcriptase reverse Qpcr</i>
Ct	do inglês <i>Threshold Cycle</i>
DO	Densidade Ótica
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
SHV	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
RNA	Ácido ribonucleico
CCBH	Coleção de Culturas de Bactérias em Infecção Hospitalar
BHI	do ingles <i>Brain Heart Infusion</i>
ATCC	do ingles <i>American Type Culture Collection</i>
IBMP	Instituto de Biologia Molecular do Paraná
NAT	Teste de Ácido Nucleico
UFC	Unidades Formadoras de Colônias

ROX	do ingles <i>Passive Reference Dye</i>
POP	Procedimento Operacional Padrão
IT	Instrução de Trabalho
LATED	Laboratório de Tecnologia em Diagnóstico
<i>T_m</i>	do inglês <i>Melting Temperature</i>
<i>bla</i>	Gene beta-lactamases
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
mM	Milimolar
mg	Miligrama
Rpm	Rotações por minuto
%	Porcentagem
°C	Graus centígrados
Mg	Micrograma
μL	Microlitro

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE E A VIGILÂNCIA SANITÁRIA	16
1.2. BACILOS GRAM-NEGATIVOS E INFECÇÕES HOSPITALARES	18
1.2.1. Bacilos Gram-Negativos Não Fermentadores	19
1.2.2. Família <i>Enterobacteriaceae</i>	21
1.3. ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS	22
1.3.1. Antimicrobianos Carbapenêmicos	24
1.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS	26
1.4.1. Carbapenemases	29
1.4.1.2 KPC (<i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase)	31
1.4.1.3 NDM (<i>New Delhi</i> Metalo beta-lactamase)	33
1.5. MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES	35
1.5.1 Diagnóstico Baseado Em PCR (Reação Da Cadeia Da Polimerase)	36
1.5.1.1 Real Time PCR ou <i>q</i> PCR (PCR em Tempo Real, Ou Quantitativo)	38
2. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA	43
3. OBJETIVO	44
3.1. OBJETIVO GERAL	44
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS/ESTRATÉGIAS	44
4. METODOLOGIA	45
4.1. FLUXOGRAMA DE METODOLOGIA	45
4.2. ETAPA DE PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM <i>Q</i> PCR DO PROTÓTIPO	45
4.2.1 Seleção E Fabricação De Iniciadores E Sondas Para Genes <i>bla</i> _{kpc} E <i>bla</i> _{ndm-1} .	46
4.2.2. Seleção De Amostras Controles Para Etapa De Padronização.	47
4.2.3. Determinação Da Metodologia De Extração E Processamento De Amostra.	47
4.2.3.1 Extração De DNA Por Lise Celular Mecânica.	48
4.2.3.2 Extração De DNA Por Lise Celular Térmica.	48
4.2.4. Determinação Da Ciclagem Para Detecção Dos genes <i>bla</i> _{kpc} E <i>bla</i> _{ndm-1}	49
4.2.5 Padronização Das Concentrações Dos Insumos.	49
4.2.6 Avaliação De Bioequivalência De Insumos (Sondas E Iniciadores).	50
4.3 ETAPA DE TESTE E AVALIAÇÃO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO.	50
4.3.1 Seleção De Amostras Clínicas Para Avaliação Do Protótipo.	51
4.3.2 Avaliação Da Sensibilidade E Especificidade Do Protótipo.	51

4.3.3	Determinação Do Limite De Detecção (LOD)	52
5.	RESULTADOS	53
5.1.	DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO	53
5.2.	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO QUANTO À CICLAGEM.	55
5.3.	PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INSUMO.	55
5.4.	AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE INSUMOS (SONDAS E INICIADORES)	58
5.5.	DESCRIÇÃO DOS DOCUMENTOS PRODUZIDOS PARA A PERMISSÃO DO ENVASE DO PROTÓTIPO	61
5.6.	SELEÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA AVALIAÇÃO DO PROTÓTIPO QUANTO SUA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE	63
5.7.	ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO PROTÓTIPO	65
5.8.	DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)	68
6.	DISCUSSÃO	69
7.	CONCLUSÕES	76
	REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFECÇÕES RELACIONADAS À ASSISTÊNCIA À SAÚDE E A VIGILÂNCIA SANITÁRIA.

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS) constituem um grave problema de saúde pública, tanto em países desenvolvidos, quanto naqueles em desenvolvimento (WHO, 2009). As IRAS podem ser definidas como qualquer infecção adquirida pelos pacientes em consequência aos cuidados de saúde a ele prestados, dentro ou fora do ambiente hospitalar, sobretudo devido à realização de procedimentos invasivos, da terapêutica antimicrobiana ou imunossupressora e das internações subseqüentes, seja na Unidade de Tratamento Intensivo (UTI) ou em outras unidades (COSTA, SILVA & NORIEGA, 2007).

A incidência de IRAS pode variar em função de diversos fatores: tamanho dos hospitais, especialidade médica envolvida, condições de higiene e eficácia de programas de controle de infecção nos hospitais (JERASSY *et al.*, 2006; FOGLIA, FRASER & ROSENTHAL *et al.*, 2010). Segundo dados de 2002, da Organização Mundial de Saúde (WHO, “World Health Organization”) os constantes avanços da medicina permitiram que pacientes tivessem o tempo de sobrevivência prolongado, além do aumento na expectativa de vida da população, sendo esses fatores contribuintes para aumento nas taxas de IRAS.

Infecções Relacionadas à Assistência em Saúde (IRAS) são aquelas que se desenvolvem durante a estadia do paciente no ambiente hospitalar, que não estavam presentes no momento de sua admissão (HAUBLER, 2007) O Centers for Diseases Control and prevention (CDC) define IRAS como infecções localizadas ou sistêmicas que foram geradas como consequência de uma reação adversa gerada por um microrganismo ou por sua toxina. (CDC, surveillance definition of health care–associated infection, Manual 2016). Consideram-se IRAS se a data do evento ocorrer no terceiro dia após a admissão do paciente. (Manual, CDC 2016)

Um estudo conduzido por WHO em 2002 demonstrou as IRAS em cerca de 10% de todas as hospitalizações realizadas na Europa e na América do Norte, e em mais de 40% das hospitalizações realizadas em partes da Ásia, América Latina, e África Subsaariana (WHO, 2002). Já outro estudo mais recente conduzido em 2014, estimou que aproximadamente 10 % dos pacientes ao redor do mundo desenvolveram pelo menos um caso de infecção hospitalar durante sua estadia no hospital (WHO, 2014).

Infecções adquiridas no ambiente hospitalar sempre foram um desafio para a segurança de pacientes hospitalizados. Assim, um estudo realizado em 2002 por Klevens e colaboradores, estimam a ocorrência de um milhão de IRAS nos EUA, cerca de 4.5 infecções em cada 100 admissões, com pelo menos noventa e nove mil óbitos em decorrência deste tipo de infecção, tornando-se a sexta maior causa de mortes nos EUA. O European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), em trabalho publicado em 2013 estimou que cerca de 37 mil pessoas morrem a cada ano como consequência de infecções hospitalares (HEBDEN *et al.*, 2012; MARTIN *et al.*, 2013).

Além disso, estudos revelam que as IRAS podem aumentar os custos do tratamento administrado ao paciente (KILGORE & BROSSETTE, 2008; EBER *et al.*, 2010). Dal-Paz e colaboradores (2010) mostraram que os custos do tratamento para infecções de sítio cirúrgico em um hospital brasileiro são muito elevados, podendo chegar a R\$6 mil por paciente. Os custos estimados para o tratamento destes tipos de infecções nos EUA estão entre cinco e dez bilhões por ano (YOKOE *et al.*, 2008).

A habilidade de prevenir e controlar infecções hospitalares, aliado com a redução de transmissão de fatores de resistência à antibióticos tem se tornado essenciais para organizações particulares, que preveem assistência de qualidade à saúde e segurança ao paciente, da mesma forma estratégias de controle e vigilância também devem ser incorporadas às políticas de saúde pública (GREENE, *et al* 2009).

Na década de 70, o CDC (Centers for Disease Control and Prevention), estabeleceu um modelo ativo, prospectivo e sistemático de vigilância epidemiológica para infecções hospitalares, onde comitês de controle de infecção eram responsáveis pela vigilância através de coleta, análise e interpretação de registros clínicos e diagnósticos (MERTENS, *et al* 2013). Já no Brasil, a promoção ampla e efetiva de ações iniciou-se a partir de 1990, onde foi realizada a Conferência Regional sobre Prevenção e Controle de Infecções Hospitalares, em que foi apontada a necessidade de implementação de comissões nacionais de prevenção e controle de IRAS. (SANTOS, 2006)

O Ministério da Saúde em 1998 regulamentou as ações de controle de infecção hospitalar através do Programa Nacional de Controle de infecção hospitalar (PNCIH) (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO - Lei nº 9431, 1997), onde previa que cada hospital deveria constituir a sua própria CCIH (Central de Controle de Infecção Hospitalar) e esta aliada a chamada CF (Comissões Farmacoterapêuticas) deveriam definir as medidas de controle e utilização de antimicrobianos, assim como analisar os registros de infecções e implantar ações de vigilância contra IRAS. (MINISTÉRIO DA SAÚDE – Portaria nº 2616, 1998). Com isso

diversos instrumentos regulatórios surgiram para sustentar o trabalho realizado pelas CCIH espalhadas pelo país (CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA – Resolução nº1552, 1999; ANVISA – RDC nº 48, 2000).

A partir do ano 2000 o PNCIH foi vinculado à e essa mudança se tornou um marco, indicando para o Estado brasileiro que o manejo das IRAS em âmbito governamental, seria mantido na esfera de auditoria sanitária (ANVISA – RDC nº 48, 2000; ANVISA, 2004). Desde então diversas medidas para o diagnóstico e fluxo de informações epidemiológicas de IRAS foram criados e implementados para melhorar a questão no país (NOGUEIRA, *et al* 2014; TOLEDO, *et al* 2012), contudo a falta de estrutura, informação e adesão as normas e manuais publicados pela ANVISA, resultam na emergência de novos casos de IRAS, aliados à altas taxas de resistência à antibióticos.

1.2. BACILOS GRAM-NEGATIVOS E INFECÇÕES HOSPITALARES.

Um grande número de microrganismos possui a capacidade/habilidade de causar IRAS. Entretanto, estudos apontam que cerca de 90% de infecções de origem hospitalar são causadas por bactérias enquanto fungos, vírus ou protozoários estão menos envolvidos (ANDRUS *et al.*, 2008).

As bactérias Gram-negativas possuem grande diversidade metabólica e morfológica, e são reconhecidas por sua importância ecológica, médica e industrial. Filogeneticamente esse grupo de bactérias pertence ao domínio Bacteria, filo Proteobacteria e possuem diversas características intrínsecas ao seu grupo que favoreceram ao longo dos anos a colonização no homem, animais, assim como, a sua permanência no ambiente. (VERMELHO-BRANQUINHA *et al.*, 2008).

A estrutura da parede celular de bactérias Gram-negativas é bastante complexa quando comparada a bactérias Gram-positivas. Basicamente ela é constituída por uma membrana externa, a peptidoglicana e o espaço periplasmático ou periplasma. A presença de membrana externa tornam os patógenos Gram-negativos resistentes a defesas do organismo hospedeiro, como certa resistência contra lisozima, enzima considerada participante da defesa inata de organismos. (VERMELHO-BRANQUINHA *et al.*, 2008).

Infecções causadas por bactérias Gram-negativas geram preocupações particulares, pois estes organismos possuem sistemas regulatórios altamente eficientes, além da capacidade de adquirir genes de resistência a antimicrobianos aumentando os riscos de morte

relacionados aos pacientes (BOUCHER *et al.*, 2009). Estudo conduzido pelo National Healthcare Safety Network em 2008 indica que bactérias Gram-negativas são responsáveis por mais de 30 % das infecções adquiridas no ambiente hospitalar, estando predominantemente relacionados a casos de pneumonia associadas a ventilação mecânica (47%), e infecções do trato urinário (45%) (HIDRON *et al.*, 2008). Em unidades de tratamento intensivo nos Estados Unidos, bactérias Gram-negativas estão associadas a pelo menos 70% das infecções, e estes dados estão de acordo com outros estudos ao redor do mundo (GAYNES *et al.*, 2005).

Os tratamentos terapêuticos contra infecções de origem hospitalar causadas por bactérias Gram-negativas tem se tornado mais escassos devido à alta taxa de resistência antimicrobiana encontrada nessas amostras (GALES *et al.*, 2012; GALES *et al.*, 2011). Estudos realizados na Europa, EUA e no Brasil descrevem a alta taxa de disseminação de genes carreadores de resistência, devido a falhas nos sistemas de controle de infecção, falhas terapêuticas devido ao diagnóstico errôneo e descontrole no uso de antibióticos. (BEREKET *et al.*, 2012; KONSTANTINOS *et al.*, 2012)

Os principais patógenos Gram-negativos relacionados com infecção hospitalar são bactérias pertencentes a dois grandes grupos de bacilos: membros da família Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) (ANDRADE *et al.*, 2006; RILEY, 2004). Um estudo de vigilância epidemiológica realizado por Gales e colaboradores (2012) sobre a presença de IRAS causadas por BGNs na América Latina no período de 2008 a 2010 mostrou que *E. coli* é o segundo patógeno mais isolado a partir de infecções da corrente sanguínea (19%), *P. aeruginosa* é o principal agente causador de pneumonia (31,2%) e em infecções de feridas cirúrgicas, *E. coli*, *P.aeruginosa* e *Klebsiella* spp. são os principais microrganismos isolados. O estudo ainda mostra que o Brasil foi o país com maior taxa de BGNs multirresistentes (40,9%), mostrando assim a presença de espécies da família Enterobacteriaceae e bacilos Gram-negativos não fermentadores (BGN-NF) protagonizando diversos quadros de infecção além de altas taxas de resistência. (GALES *et al.*, 2012)

1.2.1 FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*.

Bactérias da família *Enterobacteriaceae* apresentam papel importante nas infecções hospitalares, sendo consideradas como um dos principais agentes etiológicos entre os Gram-negativos e um grande problema de saúde pública (COQUE *et al.* , 2008; ANVISA., 2005). A

família *Enterobacteriaceae* compreende 50% de todas as amostras bacterianas hospitalares e 80% de todas as amostras bacterianas Gram-negativas de importância médica (ANVISA, 2005).

Dados do Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede-RM, obtidos no período de julho de 2006 a junho de 2008, onde foram monitoradas infecções primárias da corrente sanguínea de pacientes internados em UTIs, mostraram que as enterobactérias mais frequentemente isoladas foram *K. pneumoniae* (n=711, 13%), *Enterobacter* spp. (n=316, 6%) e *E. coli* (n=178, 3%). Dados mais recentes, obtidos em 2012 mostram a presença de bactérias Gram-negativas entre os principais causadores de infecções primárias de corrente sanguínea no Brasil; as amostras notificadas apresentam-se como 3.573 (19,6%) causadas por *Staphylococcus coagulase negativo* (SCon), seguidas por *Staphylococcus aureus* (2.637 – 14,5%), *Klebsiella pneumoniae* (2.508 – 13,8%), *Acinetobacter* spp. (2.159 – 11,8%) e *Pseudomonas aeruginosa* (1.850 – 10,1%). (ANVISA, 2012). Ainda outro estudo multicêntrico MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), para os bacilos Gram negativos obtidos de pacientes internados em UTIs, indica que *K. pneumoniae* (12,1%) é o terceiro microrganismo mais isolado, seguido de *E. coli* (10,5%), *E. cloacae* (7, 9%), *S. marcescens* (5,6%) e *P. mirabilis* (3,2%). (MENDES *et al.*, 2005).

Estudos apontam *E. coli* está entre os bacilos Gram-negativos isolados com maior frequência nos pacientes com sepse; é responsável por produzir mais de 80% das UTI adquiridas na comunidade, assim como a maioria das infecções hospitalares; é causa importante de gastroenterite nos países em desenvolvimento e também de meningite neonatal (BROOKS *et al.*, 2007). É importante citar que a maioria das infecções (exceto a meningite neonatal e a gastroenterite) é de origem endógena e ocorre quando o sistema imune do paciente se encontra com algum tipo de alteração. (ESTAPÉ *et al.* , 2011; HERNANDES *et al.* , 2009; KAPER *et al.* , 2004; TRABULSI *et al.* , 2002).

Klebsiella spp. outro gênero muito comum entre isolados de infecções hospitalares, foi relatado recentemente como segundo maior causador de infecções do trato urinário no Irã, cerca de 16% , perdendo apenas para *E.coli* (51,7%) entre os isolados Gram-negativos (TAJBAKSHI *et al.*, 2015). Outro estudo realizado no Brasil com total de 2.563 casos de infecções da corrente sanguínea apontaram *Klebsiella* spp. como principal Gram-negativo envolvido neste tipo de infecção, sendo responsável por cerca de 15 % das infecções (PEREIRA *et al.*, 2013).

Outro gênero bacteriano da família Enterobacteriaceae muito presente em relatos é *Enterobacter spp.* Um trabalho realizado por Weber e colaboradores em 2009, mostra que *Enterobacter spp.* foi o terceiro patógeno mais encontrado causando pneumonia e o quinto mais frequente provocando infecções da corrente sanguínea e infecção de feridas cirúrgicas em paciente de UTI nos Estados Unidos. No Brasil em um estudo publicado em 2014 foram identificados 205 isolados de *Enterobacter spp.* de 4907 pacientes com hemoculturas positivas, e cerca de 20 % deles apresentavam determinantes gênicos de resistência contra antibióticos beta-lactâmicos (NOGUEIRA *et al.*, 2014). Com menor frequência ainda é possível observar relatos de infecções graves causadas por outras espécies como: *Serratia marcescens*, *Proteus mirabilis* e *Providência spp* aliados a altas taxas de resistência (TAJBAKHSI *et al.*, 2015; DIRANZO *et al.*, 2015, CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013; AHMED *et al.*, 2014)

Nas últimas décadas, esses microrganismos têm se destacado devido a altos índices de resistência aos antimicrobianos, gerando aumento da taxa de mortalidade e dos custos para o tratamento do paciente (SADER *et al.*, 2004; MENDES *et al.*, 2005; GALES *et al.*, 2012). Um estudo recente comparou taxas de resistência mediadas por enzimas Beta-lactamases em enterobactérias e seus países de origem. Os resultados englobaram amostras isoladas de cinco continentes: EUA, Europa, América Latina, África e Ásia/Pacífico, assim as taxas encontradas foram respectivamente: para *E.coli*, 2.8%, 6.4%, 12.0%, 10.0%, e 19.6%; para *Klebsiella spp.* 5.3%, 8.8%, 27.6%, 27.4%, e 22.9%; e para *Enterobacter spp.* 25.3%, 11.8%, 31.1%, 17.8%, e 36.4%. No Brasil especificamente o estudo mostrou presença de enzimas beta-lactamases em 10 % das amostras de *E.coli*, em 17 % de amostras de *Klebsiella spp.* e em 22% de amostras de *Enterobacter spp* (ROSSI *et al.*, 2006).

1.2.2. BACILOS GRAM-NEGATIVOS NÃO FERMENTADORES.

Dentre os gêneros e espécies que compõem o grupo dos BGN-NF, os mais frequentes em infecções humanas são: *P. aeruginosa*, *Acinetobacter spp*, *Stenotrophomonas maltophilia* e o Complexo *Burkholderia cepacia*.

P. aeruginosa é o patógeno humano mais importante do gênero. Ela está associada a infecções hospitalares e é frequentemente responsável por surtos. Essa bactéria é um patógeno versátil, com a habilidade de causar diversos tipos de doenças clínicas. Dentre elas podemos citar infecções do trato respiratório inferior, infecções primárias e secundárias da pele, infecções do trato urinário, infecções do aparelho auditivo (otites), infecções oculares,

infecções da corrente sanguínea, endocardite, entre outras infecções. (GALES *et al.*, 2001; KERR *et al.*, 2011; MESAROS *et al.*, 2007; ANVISA, 2010)

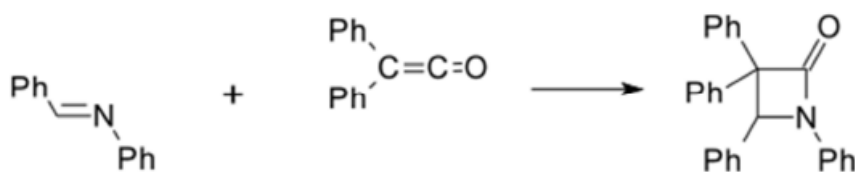
No Brasil, dados da Rede de Monitoramento e Controle da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde da ANVISA obtidos no período de julho de 2006 a Junho de 2008, em que foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs de cerca de 70 hospitais sentinelas mostraram que *P. aeruginosa* foi o quarto microrganismo mais isolado e apresentou taxas de resistência a ceftazidima, imipenem, ciprofloxacina, gentamicina e amicacina em torno de 50%.

A.baumannii é um patógeno oportunista com crescente importância em infecções hospitalares causando pneumonia associada a ventilação mecânica, infecções da corrente sanguínea, infecções do trato urinário, e outras infecções relacionadas a surtos em Unidades de Tratamento Intensivo desde 1996. Pode ser isolado a partir do solo, água, animais e seres humanos, sendo ubíquo na natureza. (BAUMANN, 1968; SEIFERT *et al.*, 1997). Nos últimos anos, tem sido observado um aumento das infecções por *A. baumannii* no Brasil e em outras partes do mundo, principalmente, nas unidades de terapia intensiva e nas unidades de queimados. (MARTINS *et al.*, 2012; MC CONNELL *et al.*, 2012; GIAMARELLOU *et al.*, 2008). Na maioria das vezes, acomete pacientes hospitalizados, que foram submetidos a procedimentos invasivos ou pacientes imunocomprometidos. (PELEG *et al.*, 2008), apresentando altas taxas de mortalidade (TSAKIRIOU *et al.*, 2014) *A. baumannii* também está relacionado a altas taxas de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos (GALES *et al.*, 2012)

1.3. ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS.

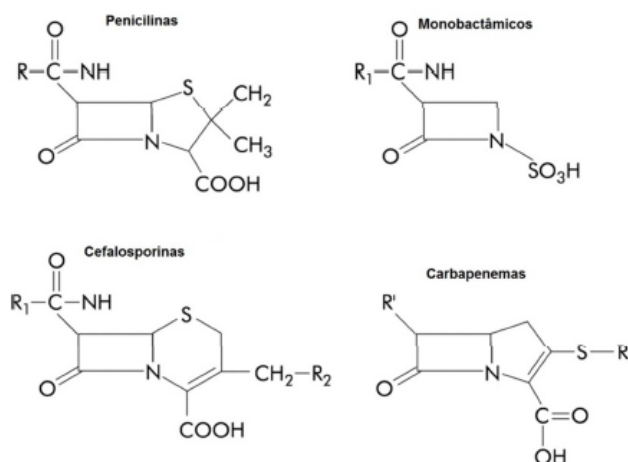
Os antimicrobianos beta-lactâmicos foram os primeiros a serem descritos e são até hoje, mesmo depois de 80 anos da sua descoberta, o maior grupo de antimicrobianos usados na prática clínica (FERNANDES *et al.*, 2013). A característica comum deste vasto grupo de antibióticos é a presença do anel beta-lactâmico na estrutura química da molécula. O anel beta-lactâmico é uma amida cíclica, com estrutura heteroatômica, consistindo de três átomos de carbono e um átomo de nitrogênio. O primeiro anel beta-lactâmico sintético foi preparado por Hermann Staudingerem 1907, a partir da reação de uma base de Schiff de anilina e benzaldeído com difenilqueteno, em uma reação de ciclo adição (THOMAS *et al.*, 2007), que pode ser evidenciada na figura 1.

FIGURA 1: Reação de ciclo-adição que gera anel beta-lactâmico.



Os antimicrobianos desta classe têm ação bactericida inibindo enzimas envolvidas na síntese da parede celular bacteriana, estrutura que é primordial para manter a forma dos microrganismos em ambientes hipertônicos e hostis, bem como o equilíbrio osmótico. A estrutura rígida da parede celular é resultado da alternância de duas subunidades, o ácido N-acetilmurânico e N-acetilglicosamina, sendo que as unidades glicídicas são unidas por transglicosidases. Um pentapeptídeo é ligado a cada unidade de ácido N-acetilmurânico e a ligação cruzada de duas D-alanina-D-alanina presentes no pentapeptídeo é catalisada por PBPs (Penicillin binding proteins), que atuam como transpeptidases. Entretanto, o anel beta-lactâmico é quimicamente similar a D-alanina-D-alanina do pentapeptídeo, e assim as PBPs inserem erroneamente o anel beta-lactâmico no lugar da D-alanina-D-alanina. Desta forma, ocorre a acilação das PBPs, que ficam impossibilitadas de realizar suas funções corretamente, causando a lise celular bacteriana (WALSH *et al.*, 2003, FERNANDES *et al.*, 2013). Uma grande vantagem para o uso dessa classe de drogas é sua baixa toxicidade, pois atua na parede celular bacteriana, estrutura inexistente em células eucariotas (DRAWZ *et al.*, 2009). Todavia, para que o beta-lactâmico seja ativo, deverá se unir a outros radicais (anéis ou cadeias lineares). A associação de diferentes cadeias lineares aos anéis modificam as propriedades do composto, resultando nos quatro tipos de beta-lactâmicos que existem hoje, disponíveis comercialmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química são capazes de modificar as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência as beta-lactamases, figura 2 (SUAREZ *et al.*, 2009)

FIGURA 2: Estrutura química das quatro classes de beta-lactâmicos existentes.



1.3.1. ANTIMICROBIANOS CARBAPENÊMICOS

Os antibióticos beta-lactâmicos apresentam estruturas químicas em comum contudo os carbapenêmicos se diferem dos outros beta-lactâmicos, pois possuem um carbono ao invés de uma sulfona na quarta posição da porção Tiazolidínica no anel B-lactâmico (BONFIGLIO *et al.*, 2002). Adquirindo assim amplo espectro de ação que costuma exceder outras classes já descritas (MOELLERING *et al.*, 1989). Os Carbapenêmicos são considerados agentes bactericidas de ação rápida, pois possuem alta afinidade de ligação á maioria das proteínas de alto peso molecular constituintes da parede celular de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. (CHAMBERS *et al.*, 2005).

A classe dos antimicrobianos carbapenêmicos foi primeiramente descrita através da análise do caldo de fermentação de um fungo, o actinomiceto *Streptomyces cattleya*, no ano de 1976, quando se observou a produção de um composto denominado “Thienamycin”, apresentando amplo espectro de atividade antibacteriana (KROPP *et al.*, 1980). Hoje, existem três carbapenemas liberados para uso no Brasil: Imipenem, Meropenem e Ertapenem. Os beta-lactâmicos dessa classe são os de maior espectro de ação, sendo indicados para o tratamento de infecções causadas por Gram-negativos, Gram-positivos, anaeróbicos, organismos produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs) e AmpC. (GREENWOOD *et al.*, 2000; KROPP *et al.*, 1980).

Os Carbapenêmicos com exceção do Ertapenem são ativos clinicamente contra Gram-negativos não-fermentadores como *P.aeruginosa*, *Burkholderia cepacia* e *Acinetobacter spp.*(QUALE *et al.*, 2006; UNAL *et al.* , 2005). E Este também possui atividade contra *Streptococcus* e *Staphylococcus* Sensível á Meticilina (HELLINGER *et al.*, 1999) diferentemente de outros antibióticos de amplo espectro, os carbapenêmicos são ativos contra a maioria dos anaeróbios Gram-positivos e Gram-negativos, incluindo sub-espécies como: *B. fragilis*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella bivia*, *Fusobacterium nucleatum*, *Fusobacterium mortiferum*, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* e *Clostridium perfringens* (TELLADO *et al.*, 2005; HELLENGER *et al.*,1999). As bactérias resistentes aos carbapenêmicos incluem: *Enterococcus faecium* resistentes á ampicilina, *Staphylococcus* resistentes à Meticilina, *Stenotrophomonas maltophilia* e algumas amostras de *Clostridium difficile* (LIVERMORE *et al.*, 2001; JONH *et al.*, 2006).

A atividade aprimorada e reconhecida dos carbapenêmicos se dá por diversos fatores como: 1) São moléculas menores do que as moléculas de cefalosporinas e possuem cargas positivas e negativas dissolvidas em solução, essas propriedades facilitam a rápida penetração através da membrana de Gram-negativos (HELLINGER *et al.*, 1999); 2) Possuem alta afinidade por proteínas de ligação à penicilina essenciais na estrutura da parede celular (PBP-2, PBP-4, PBP-3 e PBP-1b) de grande variedade de bactérias (BONFIGLIO *et al.*, 2002).

Como mais antigo dos Carbapenêmicos, Imipenem ainda é utilizado consideravelmente, embora possua diversas desvantagens quando comparado aos novos antibióticos de mesma classe (HELLINGER *et al.*, 1999). Dentre os casos de contraindicações é possível citar infecções causadoras de meningites, assim como deve ser evitado no tratamento de infecções do sistema nervoso central, pois podem causar convulsões em pacientes sob tratamento e com elevados fatores de risco (CHAMBERS *et al.*,2005). É descrito sua alta efetividade contra *P. aeruginosa* e *Acinetobacter spp*, embora a resistência já tenha sido descrita desde 1986 (QUIN *et al.*,1986). O meropenem possui espectro de ação parecido ao imipenem, incluindo atividade contra *P.aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* e parece possuir vantagem quanto à sua atividade contra Gram-negativos aeróbios. Comparado ao Imipenem e Meropenem, o Ertapenem possui menor espectro de atividade, pois não é ativo contra *P. aeruginosa* e *Enterococcus spp.*

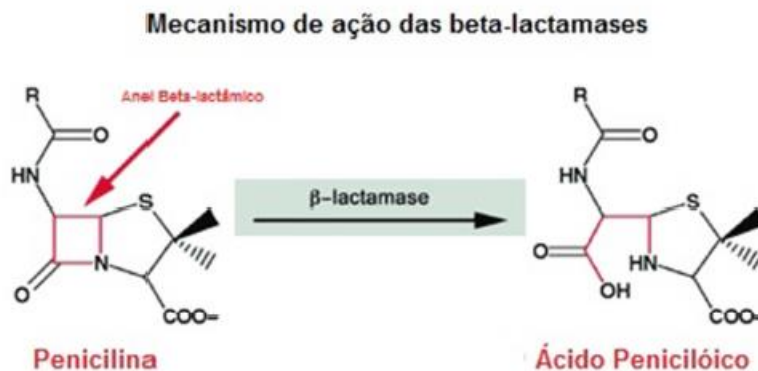
1.4. RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS BETA-LACTÂMICOS.

Os antimicrobianos beta-lactâmicos são os mais utilizados na rotina terapêutica devido a sua baixa toxicidade para mamíferos, entretanto os patógenos apresentam diversos mecanismos de resistência a esta classe de drogas. Existem quatro principais mecanismos pelos quais as bactérias podem se tornar resistentes aos beta-lactâmicos: mudança no sítio ativo das PBPs; diminuição da expressão de porinas (OMPs); aumento da expressão de bombas de efluxo e; produção de enzimas beta-lactamases (DRAWZ *et al.*, 2010; FALAGAS *et al.*, 2005).

A alteração da permeabilidade da membrana, comumente observada em gram-negativos, corresponde à alteração dos canais de porinas, modificando a penetração e, conseqüentemente, a ação dos diferentes antibióticos. A alteração da proteína alvo está associada à alteração do sítio específico de ligação dos antibióticos na bactéria, diminuindo assim a afinidade da droga pelo sítio e, conseqüentemente, a atividade antimicrobiana. Quanto à inativação enzimática, bactérias podem produzir enzimas como, por exemplo, as beta-lactamases, as quais neutralizam as drogas e seus efeitos antibióticos. Outro mecanismo é o de efluxo ou bomba de efluxo que corresponde à propriedade de expulsar ativamente os antibióticos para fora da célula, promovendo uma ação não-efetiva do antimicrobiano (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

O mecanismo mais importante de resistência clínica aos beta-lactâmicos ocorre através de enzimas beta-lactamases. A especificidade destas enzimas aos beta-lactâmicos determina a sua eficácia para a hidrólise dos mesmos. A capacidade ou não dessas enzimas de conferir resistência aos beta-lactâmicos de amplo espectro irá depender da quantidade de enzima produzida pelo microrganismo, da habilidade dessa enzima em hidrolisar o antimicrobiano e da velocidade com que o beta-lactâmico penetra pela membrana externa (LIVERMORE, 1991). A primeira beta-lactamase a ser descrita foi identificada em uma cepa de *E.coli* antes sendo relacionada com a difusão em larga escala do uso da penicilina para a prática médica (ABRAHAM *et al.*, 1940). As beta-lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram-positivas e negativas e em patógenos Gram-negativos (AMBLER, 1980). O mecanismo de ação dessas enzimas ocorre através da hidrólise do anel beta-lactâmico presente no núcleo estrutural das penicilinas, o ácido 6-aminopenicilâmico. Esta hidrólise provoca a conversão deste ácido em ácido penicilóico, que é desprovido de atividade antimicrobiana (Figura 3) (AMBLER, 1980; TAVARES *et al.*, 2001; SHRESTHA *et al.*, 2001).

FIGURA 3: Esquema representando o mecanismo de ação das beta-lactamases.



A pressão de seleção exerce um papel importante na transferência e manutenção de genes de resistência aos antibióticos (SMALLA *et al.*, 2000). A exposição de bactérias aos antibióticos confere uma vantagem ecológica às cepas resistentes. Essa pressão seletiva antibiótica pode acontecer no hospedeiro, em consequência da quimioterapia, ou no ambiente. Devido ao extenso uso da penicilina na prática médica, observa-se a emergência de resistência em diferentes patógenos. Em Gram-positivos nos anos 40, notou-se a produção de penicilinases em cepas de *S. aureus* (DATTA *et al.*, 1965). A primeira beta-lactamase encontrada em Gram-negativos foi a TEM-1, descrita no início da década de 1960 (BRADFORD *et al.*, 2011). Entretanto, acredita-se que beta-lactamases, como AmpC e cefalosporinas cromossomais, já estavam presentes nas Enterobactérias muito antes do início da era antibiótica. Essas enzimas, provavelmente, teriam funções fisiológicas na montagem da cadeia do peptidoglicano ou poderiam estar envolvidas na defesa das bactérias contra beta-lactâmicos produzidos por bactérias ambientais e fungos. Contudo, sabe-se que o uso de beta-lactâmicos é o maior fator de seleção influenciando a produção de beta-lactamases por patógenos (BRADFORD *et al.*, 2001).

Ao longo dos anos as enzimas beta-lactamases foram classificadas de três formas diferentes. A primeira classificação, sugerida em 1973, baseava-se no perfil do substrato das enzimas e na localização de seus genes codificadores. Atualmente, consideram-se duas classificações: 1) Proposta por Ambler em 1980, que está baseada na estrutura molecular e na homologia nas sequências de aminoácidos, resultando em quatro grupos (A, B, C e D); 2).

Descrita por Bush, Jacoby e Medeiros, em 1995, se baseia nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequências nucleotídicas, separando as enzimas em quatro grupos funcionais e subgrupos. (Tabela1)

TABELA 1: Classificação de beta-lactamases.

Classificação de Bush, Jacoby e Medeiros (1995)		Classificação de Ambler (1980) (Classe Molecular)	Características
Grupo Funcional	Subgrupo		
1	-	C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias gram-negativas. Confere resistência a todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico. Inclui AmpC de gram-negativas e MIR-1.
2	2a	A	Penicilinasas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico.
-	2b	A	β -lactamases de espectro estendido de bactérias gram-negativas. Inclui TEM-1, TEM-2 e SHV-1.
-	2be	A	β -lactamases de espectro estendido. Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Inclui as ESBLs.
-	2br	A	β -lactamases resistentes aos inibidores de β -lactamases derivadas de TEM.
-	2c	A	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina.
-	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
-	2e	A	Cefalosporinasas inibidas por ácido clavulânico
-	2f	A	Enzimas que hidrolisam carbapenêmicos e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são inibidas por ácido clavulânico
3	3a,3b,3c	B	Metallo- β -lactamases que conferem resistência aos carbapenêmicos e todos os tipos de β -lactâmicos, exceto os monobactâmicos. Este grupo não é inibido pelo ácido clavulânico.
4	-	ND	Penicilinasas não sequenciadas e não categorizadas em nenhum dos grupos descritos.

(BUSH, *et al* 2011)

1.4.1. CARBAPENEMASES

Com o aumento da frequência de isolamento de amostras produtoras de ESBL, os carbapenemas passaram a ser altamente prescritos pelos clínicos como alternativa para tratamento, pois são estáveis a estas enzimas. Entretanto, o aumento da utilização destas drogas desencadeou o aparecimento de amostras resistentes às mesmas. Essa resistência pode ser mediada por diferentes mecanismos, sendo a produção de carbapenemases (beta-lactamases com atividade sobre carbapenemas) o mecanismo mais importante (QUENAN *et al.*, 2007).

Em patógenos Gram-negativos a resistência mediada por beta-lactamases está, frequentemente associada à alterações de porinas (DAVIS *et al.*, 2011). Estes mecanismos geralmente envolvem mutações cromossômicas, e não costumam requerer a aquisição de novo material genético. Entretanto a resistência mediada por carbapenemases pode ser produzida de maneira constitutiva ou através de elementos genéticos móveis. (BUSH *et al.*, 2013)

Diversos estudos recentes tem demonstrado a disseminação e emergência das principais carbapenemases descritas nos últimos anos (ARNLOD *et al.*, 2011; GUPTA *et al.*, 2011; NORDMAN *et al.*, 2011) com ênfase na rápida disseminação dessas novas enzimas, sendo comumente associados a patógenos resistentes à múltiplas drogas. Um aspecto curioso sobre a aquisição da resistência, é que o organismo receptor do determinante de resistência da carbapenemase normalmente produz pelo menos uma outra beta-lactamase, possuindo sobreposição de atividade. De forma similar carbapenemases de origem cromossomal são geralmente produzidas em conjunto á outra Beta-lactamase não relacionada. (RASMUNSSEM *et al.*, 1997)

O substrato de atuação das carbapenemases não incluem somente carbapenêmicos, mas também são ativas contra penicilinas e a maioria das cefalosporinas (YGIT *et al.*, 2003). Carbapenemases são encontradas em três das quatro classes de beta-lactamases (A, B e D), e pertencem aos subgrupos 2f, 2df e 3 (QUENAM *et al.*, 2007; JACOBY *et al.*, 2012). O mecanismo de hidrólise das carbapenemases pode ser de duas formas: 1) A acilação do sitio ativo de Serina, que ocorre para as enzimas dos subgrupos 2f e 2df, sendo assim chamadas de Serino-carbapenemases. 2) Pela presença de pelo menos um átomo de Zinco divalente (Zn^{2+}) que ativa o sitio de ação e facilita a hidrólise por carbapenemases do grupo 3, sendo assim chamadas de Metalo Beta-lactamases (BUSH *et al.*, 2011; GARAU *et al.*, 2004).

Embora as Metalo Beta-Lactamases (MBL's) estejam entre as primeiras beta-lactamases a serem descritas, estas não se tornaram de grande importância clínica porquanto não causavam relevância no impacto terapêutico, mesmo depois da descoberta de disseminação através de plasmídeos (YAMAOKA *et al.*, 1990). Com o aumento no uso de carbapenêmicos para o tratamento de infecções causadas por patógenos produtores de ESBL, houve um aumento concomitante na disseminação aquisição de MBL's (JACOBY *et al.*, 2012). Dessa forma ganhou grande destaque as carbapenemases IMP e VIM, estabelecendo-se no Japão e no Sul da Europa e nos Estados Unidos. Além dessas a SPM, encontrada principalmente em cepas de *P.aeruginosa* isoladas no Brasil (QUENAN *et al.*, 2007 ; COSTA *et al.*, 2015; GALLETI *et al.*, 2015), e ainda mais recentemente a NDM, encontrada em cepas de *K. pneumoniae* oriundas principalmente da Índia, Paquistão, Reino Unido e EUA (NORDMANN *et al.*, 2011) e no Brasil (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013).

As Serino-carbapenemases foram primeiramente descritas em Enterobactérias como Beta-lactamases de origem cromossômica por Medeiros e Hare em 1986 (NORDAMAN *et al.*, 1993; QUENAN *et al.*, 2000), com a sua descrição molecular sendo descrita em cepas isoladas na Europa poucos anos mais tarde (NORDMAN *et al.*, 1996; NAAS *et al.*, 1994). As Serino-carbapenemases do tipo KPC, NMC, IMI, SME e GES têm sido descritas na Europa, Américas e Ásia. Pertencentes a classe D as OXA's (oxacilinas) possuem grande importância entre cepas de *Acinetobacter spp.*, podendo ser de origem cromossômica (OXA-24, OXA-23) ou plasmidiais, com destaque para OXA-48, uma das mais prevalentes.(LIVERMORE *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram que as carbapenemases mais prevalentes são as Serino- carbapenemases KPC da classe A e OXA-48 da classe D e as Metalo-beta-lactamases VIM. IMP e NDM pertencentes à classe B (BUSH *et al.*, 2010).

A KPC (*Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*) tem sido apontada como a Serino-carbapenemase mais comumente associada a bastonetes Gram-negativos da família Enterobacteriaceae (BUSH *et al.*, 2010). Sendo a variante KPC-2 amplamente identificada no Brasil em diversos estados. (MONTEIRO *et al.*, 2009, PERIANO *et al.*, 2009; SEKI *et al.*, 2011.)

Para contribuir com os dados brasileiros a respeito da presença das carbapenemases em nosso país, destaca-se a atuação do LAPIH (Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar) FIOCRUZ/IOC, no qual a partir de 2010, em colaboração com a Rede RM (ANVISA, MS) intensificou sua atuação, realizando a identificação fenotípica e molecular de carbapenemases e outras beta-lactamases em de cerca 20.000 amostras resistentes.

1.4.1.2 KPC (*Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase)

A disseminação de Enterobactérias produtoras de carbapenemases parecia desconhecida até o início do ano 2000, onde quase todos os casos reportados eram esporádicos, baseados na hiperprodução da Beta-lactamase AmpC ou ESBL's, associados a perda de porinas (DAVIS *et al.*, 2011). Em 1996 ocorreu o primeiro relato da presença de KPC em uma amostra de *Klebsiella pneumoniae* de um projeto de vigilância isolado na Carolina do Norte, Estados Unidos. Essa amostra apresentava elevada concentração mínima inibitória (CIM) para os carbapenemas, após análise esse perfil de resistência foi associado à produção de KPC-1, presente em um plasmídeo de alto peso molecular (YGIT *et al.*, 2011).

Após a descoberta de KPC-1, diversos relatos surgiram apontando uma variante com diferença de apenas um aminoácido, denominado KPC-2. Essa amostra foi identificada em 2003 na Costa Leste americana, oriunda de quatro cepas, apresentando elevada CIM para carbapenemas (MOLAND *et al.*, 2013). Depois disto, esta carbapenemase foi reportada em Maryland e em Nova Iorque em 2004 (BRADFORD *et al.*, 2004). Ainda outra variante desta enzima, KPC-3 começou a ser detectada no período de 2000 e 2001, causando um surto em Nova Iorque. As análises cinéticas dessa enzima demonstraram um perfil de hidrólise similar a KPC-2, entretanto um pouco maior em relação à ceftazidima (WOODFORD *et al.*, 2004). Após uma análise detalhada da sequência das KPCs descritas até aquele momento, observaram que ocorreu um erro durante a publicação da KPC-1. Dessa forma, concluiu-se que a sequência da KPC-1 era igual a KPC-2, sendo assim a nomenclatura KPC-2 passou a ser utilizada.

Após os relatos a comunidade médica alertou-se para o problema. Pesquisas no Brooklin, relataram que 62 amostras (24%) de 257 estudadas eram produtoras de KPC (BRATU *et al.*, 2005), e mais tarde 96 isolados coletados de 10 hospitais no Brooklin durante 2003 e 2004 eram produtoras de KPC. Dessa forma entre 1996 e 2006 *Klebsiella* produtora de KPC espalhou-se endemicamente através dos Estados Unidos como um importante patógeno causador de infecções hospitalares. Paralelamente em 2005 foram relatados a presença de KPC em diversos países ao redor do mundo com surtos notáveis em Israel (SCHWABER *et al.* 2011; LEAVITT *et al.*, 2007) Grécia (POURNARAS *et al.*, 2009; MALTIZOU *et al.*, 2009) e Itália (MEZZATESTA *et al.*, 2011).

A KPC possui a capacidade de hidrolisar os beta-lactâmicos de todas as classes, apresentando maior potencial de hidrólise para nitrocefina, cefalotina, benzipenicilina, ampicilina e piperacilina. São enzimas da classe funcional 2f e da classe molecular A da

classificação de Bush, Jacob e Medeiros (BUSH *et al.*, 2012). Até o momento, já foram descritas onze variantes alélicas de KPC, sendo a KPC-2 a mais disseminada no mundo (WALSH *et al.*, 2010). Além disso, essa carbapenemase tem sido descrita associada a elementos genéticos móveis, como plasmídios e transposons.

Em nosso país a KPC foi descrita primeiramente em 2009, em cepas de *K.pneumoniae* isoladas de pacientes internados e UTI de um hospital em Recife em 2006. O segundo relato ocorreu no Rio de Janeiro, onde seis amostras (4 de sangue, 1 de urina e 1 de aspirado traqueal) de *K. pneumoniae*, isoladas entre 2007 e 2008, provenientes de dois hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro foram produtores de KPC-2. Todos apresentavam resistência e altas concentrações inibitórias mínimas frente aos beta-lactâmicos de amplo espectro, ciprofloxacina e gentamicina (PEIRANO *et al.*, 2009).

Desde estas descrições iniciais de KPC no Brasil, várias publicações têm demonstrado a sua disseminação em todo o Brasil, e sua presença em diversos gêneros e espécies bacterianas (CARVALHO-ASSEF *et al.* 2010; BEIRÃO *et al.*, 2011) inclusive bacilos Gram-negativos não fermentadores (ROBLEDO *et al.*, 2010; ROBLEDO *et al.*, 2011). A disseminação de Enterobactérias produtoras de KPC é um grave problema clínico e epidemiológico em diversas instituições de saúde brasileiras pela falta de controle de infecções e pela associação destes determinantes genéticos a plataformas genéticas móveis, como plasmídeos. Estes elementos, que possuem a capacidade de serem transferidos de uma bactéria para outra, muitas vezes entre espécies diferentes através de fenômenos de conjugação, tem contribuído para a aquisição de genes, aumentando a diversidade genética bacteriana e disseminando importantes genes de resistência (DORTET *et al.*, 2008; WOODFORD *et al.*, 2004; NAAS *et al.*, 2008).

1.4.1.3 NDM (New Delhi Metallo-beta-lactamase)

Em 2009, foi identificada a mais recente carbapenemase pertencente a classe B de Ambler, a Metallo-carbapenemase, denominada NDM (New-Dehli Metallo-beta lactamase) em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada na Suécia de um paciente com histórico de internação em uma instituição médica na Índia em 2008 (Yong, Toleman & Giske, 2009). Após esta descrição, a NDM tem sido observada em diversos países no mundo em diferentes espécies de microrganismos. (NORDMANN *et al.*, 2011), estudos também revelaram que enterobactérias produtoras de NDM tem sido isoladas de diversos tipos de amostras clínicas, refletindo diretamente na capacidade oportunista deste tipo de bactéria, incluindo infecções de trato urinário, septicemia, infecções pulmonares, infecções associadas a dispositivos e de tecidos moles. (PERRY *et al.*, 2011; NORDMANN *et al.*, 2011).

As primeiras descrições de cepas produtoras de NDM no continente americano foram em 2010 nos EUA e Canadá, isolado de pacientes com histórico de assistência médica recente em países fora da região. (CDC, 2010; KUS *et al.*, 2011). Em 2011, a NDM foi detectada na Guatemala, em uma cepa de *K. pneumoniae* com nenhum histórico de conexão ou viagens internacionais. (PASTERAN *et al.*, 2012)

Em dezembro de 2012, a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) / Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu um alerta informando a detecção de NDM em países da América do Sul. Começando pelo Uruguai em junho de 2012, onde se detectou a presença do gene em amostras de *Providencia rettgeri* que foram isolados de três pacientes internados; Na Colômbia onde se observou um surto entre amostras de *K. pneumoniae* em agosto do mesmo ano; E no Paraguai, em novembro de 2012 em isolados de *A. baumannii* de pacientes hospitalizados.

Estudos epidemiológicos indicam que amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de NDM podem pertencer a diversos tipos de ST (sequence Type) (POIREL *et al.*, 2011), embora muitas cepas de *E. coli* pertencentes ao ST101 tenham sido isoladas no Reino Unido, Canadá e Paquistão. Este fato pode indicar certa associação ou simplesmente seja consequência da prevalência desta linhagem nos países estudados. (NORDMANN *et al.*, 2011)

Do ponto de vista molecular, o gene *bla_{NDM-1}* está principalmente localizado em bactérias da família *Enterobacteriaceae* em diferentes tipos de plasmídeos, que parecem desempenhar um papel importante na disseminação mundial desta carbapenemase. (KWMARASAMY *et al.*, 2010; D'ANDREA *et al.*, 2011, HO *et al.*, 2011) Além disso, relatos de localização cromossômica de *bla_{NDM-1}*, também têm sido descritos.

Este gene tem sido associado a diferentes elementos móveis completos ou em variações da sequência de inserção, ISAb125 tanto em enterobactérias quanto em bacilos Gram-negativos não fermentadores como: *A. baumannii*. (NORDMANN *et al.*, 2011).

Em março de 2013, O Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH/IOC - Fiocruz), como parte da Rede de Monitoramento de Resistência a Antimicrobianos (ANVISA-CGLAB) relatou a primeira descrição da NDM-1 no Brasil, sendo detectada em uma cepa de *Providencia rettgeri* isolada de ferida cirúrgica de um paciente atendido em Porto Alegre, RS (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). Observou-se neste caso, que o gene bla_{NDM-1} estava localizado em um transposon, denominado Tn125 (10092 pb) localizado no cromossomo, mesmo elemento descrito na Alemanha (POIREL *et al.*, 2012), em uma cepa de *Acinetobacter baumannii* produtor de NDM-1. Este Tn125 estava delimitado por duas cópias da sequência de inserção ISAb125, elemento móvel que é responsável pela mobilização do gene.

Posteriormente ao estudo publicado em 2013, em uma análise retrospectiva de todos os isolados recebidos em 2012 e armazenados pelo LAPIH, também se detectou a existência de uma cepa de *Enterobacter hormaechei* produtora de NDM, isolado em setembro de 2012 em um swab retal de vigilância em paciente do mesmo hospital em Porto Alegre, RS.

Em estudos seguintes, foi detectado a co-produção de KPC (serina-carbapenemases Classe A de Ambler) e NDM também em *Enterobacter hormaechei* subsp. *oharae* no Rio de Janeiro (PEREIRA *et al.*, 2014). Na realização do sequenciamento do DNA verificou-se que o isolado apresentava variantes alélicas NDM-1 e KPC-2. No antibiograma a cepa foi resistente a todos os beta-lactâmicos testados (ertapenem, meropenem, imipenem, cefotaxima e ceftazidima) com MIC \leq 32 mg / L, a ciprofloxacina (32 mg / L), gentamicina (48 mg / L) e tigeciclina (4 mg / L, sendo sensível para amicacina (4 mg / L) e polimixina B (0,5 mg / L) .

Na análise do genoma completo deste microrganismo, foram detectados genes de resistência a beta-lactâmicos: $bla_{CTX-M-15}$, bla_{ACT-7} , bla_{TEM-1} , e bla_{OXA-1} uma parte da bla_{KPC-2} , bla_{NDM-1} ; genes de resistência a aminoglicosídeos diferentes (*aadA1*, *aadA2*, *strA*, *strB*, e *aac* (3) -II). Além de genes de resistência a quinolonas, e *qnrB1* *aac* (6') gene -IB-CR. Na análise PlasmidFinder, foi possível observar replicons pertencentes a grupos INCA / C, IncHI2, e INCN. Por fim, Este estudo mostrou a co-produção de duas importantes carbapenemases (KPC-2 e NDM-1) associadas a outros genes de resistência em elementos genéticos móveis de grande importância epidemiológica (Tn4401 e ISAb125) resultando em um largo espectro de resistência a antibióticos. Esses achados reforçam a ideia de urgência em adotar as medidas

necessárias para identificar (diagnostico), reduzir e prevenir a propagação de carbapenemases, principalmente nos ambientes hospitalares.

1.5 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA DETECÇÃO DE CARBAPENEMASES.

Com o advento da disseminação da resistência bacteriana mediada por carbapenemases houve a necessidade de implementação de metodologias que fossem específicas, sensíveis e simples para a identificação desse mecanismo de resistência de forma rápida nos laboratórios clínicos. Assim em 2010, o *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI), determinou a realização do teste de difusão em ágar para análise da sensibilidade aos carbapenêmicos ou mensuração da concentração inibitória mínima (CIM) e o teste de Hodge modificado. Um indicativo da produção dessas carbapenemases seria a resistência ou a sensibilidade no teste de disco difusão em ágar para quaisquer dos carbapenemas ou concentração inibitória mínima de 2ug/mL para ertapenem ou 2-4ug/mL para imipenem e meropenem, e um resultado do teste de Hodge modificado positivo (CLSI, 2010; LEE *et al.*, 2001).

O teste fenotípico de Hodge apesar de bem estabelecido para a identificação da produção de KPC, mostrou ser complexo e de difícil interpretação para grande parte dos laboratório clínicos, uma vez que se baseia na distorção do halo de inibição, que está sujeita a interpretação pessoal. (PASTERAN *et al.*,2010).

Dessa forma, devido a divergências a respeito da detetção fenotípica das carbapenemases pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) e pelo EUCAST (*European committee on antimicrobial susceptibility testing*), a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) decidiu implementar no dia 26 de outubro de 2010 a nota técnica N°1/2010. Nesta nota técnica, é preconizado que em laboratórios de microbiologia clínica no Brasil, os critérios a serem utilizados como base para interpretação dos testes de sensibilidade para Enterobacteriaceae deverão ser aqueles contidos no documento M100-S20 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) publicado em janeiro de 2010, com algumas modificações. Para imipenem e meropenem, a cepa deve ser considerada resistente com halo de inibição menor que 19 mm, intermediária quando o halo varia de 20-22 mm e sensível quando é maior que 23 mm. Já para ertapenem, a cepa deve ser considerada resistente com halo de inibição menor que 21 mm, intermediária quando o halo varia de 22-24 mm e sensível

quando é maior que 25 mm. Na mensuração da concentração inibitória mínima para imipenem e meropenem, a cepa deve ser considerada resistente com o CIM maior que 4ug/mL, intermediária 2ug/mL e sensível menor ou igual a 1ug/mL. Já em relação ao ertapenem, a cepa deve ser considerada resistente com o CIM maior que 2ug/mL, intermediária 1ug/mL e sensível menor que 0,5 ug/mL.

Outro fato importante abordado é que além das metodologias fenotípicas, a nota técnica também preconiza a realização de teste para detecção molecular da produção de carbapenemases através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Caso os laboratórios não possuam estrutura para realização de testes moleculares, estes devem enviar as cepas suspeitas de produção de carbapenemases para os laboratórios centrais (LACENs) de cada estado para que eles façam a identificação desses mecanismos (ANVISA, 2010).

1.5.1 DIAGNÓSTICO BASEADO EM PCR (Reação da Cadeia da Polimerase)

Desde 1985 a reação da cadeia da polimerase (PCR) é o método mais utilizado para amplificação de ácidos nucleicos e tem se mantido como importante ferramenta para caracterização de microrganismos (BARLET *et al.*, 2003). A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular utilizada para amplificar uma sequência específica de DNA, ou seja, produzir diversas cópias de uma sequência-alvo, até que sua concentração em dada solução seja tão alta a ponto de ser facilmente detectada por métodos clássicos de separação e identificação de substâncias. (MADIGAN *et al.*, 2010). A descoberta dessa técnica revolucionou os estudos no campo da biologia molecular, tornando-se amplamente difundida na pesquisa, assim como na área médica e de saúde (MARQUES *et al.* 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2007). A PCR foi desenvolvida nos anos 80 por Kary Mullis, rendendo-lhe, juntamente com Michael Smith, o Prêmio Nobel de química em decorrência da descoberta (BARLET *et al.*,2003).

Por ser uma técnica de amplificação de DNA, tem muitas aplicações, como a utilização do produto da PCR para sequenciamento de uma região específica do genoma, diagnóstico de doenças genéticas, identificação de *fingerprints* genéticos no caso dos testes de paternidade ou forenses, avaliação da presença de genes de resistência, entre outras.

A amplificação realizada *in vitro* através da PCR mimetiza o que ocorre durante a duplicação de DNA *in vivo*. Os reagentes necessários para a amplificação do DNA são: Taq polimerase (enzima originalmente isolada da bactéria *Thermus aquaticus*), nucleotídeos livres para a construção da fita de DNA, iniciadores (primers) com sequência complementar à sequência-alvo a ser pesquisada, cloreto de magnésio (o magnésio é cofator da enzima),

tampão para manter as condições da reação estáveis até o fim e por último, o DNA-molde. Após o preparo da reação, esta será levada ao termociclador para ocorrer a amplificação. (MADIGAN, 2010; SAMBROK *et al.*, 2001). A partir da PCR e avanços tecnológicos posteriores foi possível aprimorar a técnica de amplificação básica inicialmente descrita por Kary Mullis, buscando a produção de resultados de alto desempenho, um exemplo de variante desta técnica é o chamado PCR em tempo real (ou *qPCR*), que tem mostrado excelentes resultados como ferramenta rápida para o diagnóstico de doenças infecciosas e a presença de determinantes de resistência, mesmo em baixas concentrações amostrais (BUSTIN *et al.*, 2012).

1.5.1.1 REAL TIME PCR OU *q*PCR (PCR em tempo real, ou quantitativo).

A tecnologia *q*PCR (fluorescence-based quantitative real-time PCR) é a evolução da técnica de PCR que foi primeiramente descrita por Higuchi e colaboradores em 1993. Esta técnica tem sido bastante utilizada ao redor do mundo e possui a capacidade de detectar e mensurar pequenas quantidades de ácidos nucleicos em um grande número de amostras extraídas de diversas origens (HIGUCHI *et al.* , 1992; HIGUCHI *et al.*, 1993; WITTEWER *et al.*, 1997).

Na PCR em tempo real o acúmulo de DNA alvo é monitorado durante o processo de PCR. Isso é possível pela adição de uma mistura de sondas fluorescentes à reação da PCR, cuja fluorescência aumenta de acordo com a ligação ao DNA. À medida que o DNA é amplificado, o nível de fluorescência aumenta proporcionalmente. (MADIGAN, 2010). O conceito e a praticidade atribuídos a esta técnica aliado à sua velocidade, sensibilidade e especificidade em ensaios homogêneos tem mudado a prática para a quantificação de ácidos nucleicos. Com isso, esta técnica tem sido utilizada como ferramenta para diversas aplicações, incluindo quantificação microbiana, determinação de dosagem gênica, identificação de transgenes em alimentos geneticamente modificados, avaliação de riscos para recorrência de câncer, e aplicações para medicina forense. (BERNARD *et al.*, 2002; MACAY *et al.*, 2002; MACAY *et al.*, 2004; BUSTIN *et al.*, 2005; BUSTIN *et al.*, 2006).

A técnica de *q*PCR segue as mesmas etapas básicas de uma reação de PCR convencional. Os três principais passos que ocorrem durante a reação de *q*PCR são: etapa de desnaturação, etapa de anelamento e etapa de extensão, e ocorrem de maneira geral por cerca de 40 ciclos. Durante a etapa de desnaturação, a alta temperatura é utilizada para converter as moléculas de DNA dupla fita em moléculas de fitas simples, geralmente utiliza-se a temperatura de 95°C. O tempo de desnaturação pode variar de acordo com a quantidade de conteúdo GC na amostra a ser amplificada. Durante a etapa de anelamento, sequências de DNA complementar possuem a oportunidade de hibridizar com a sequência de DNA alvo, para isso utiliza-se uma temperatura apropriada é utilizada baseada no cálculo da temperatura de *melting* (T_m) dos iniciadores. A etapa de extensão ocorre entre 70–72°C, onde a atividade da DNApolimerase é considerada ótima e a extensão dos iniciadores ocorre numa velocidade aproximada de cerca de 100 bases por segundo. Quando um *amplicon* (gene-alvo), é pequeno, esta etapa é frequentemente combinada com a etapa de anelamento , utilizando 60°C como temperatura. (Manual *Handbook* _ Applied Biosystems, 2015).

A reação de *q*PCR também possui algumas variações como a chamada *q*RT-PCR. As reações de *q*RT-PCR (transcriptase reversa em PCR tempo real) podem ocorrer através de reações denominadas “*Two-step*” *q*RT-PCR ou “*One-step*” *q*RT-PCR. Em reações “*Two-step*” a reação de transcriptase reversa, ou seja, a conversão de moléculas de RNA em cDNA ocorrem em ensaios separados, onde após o primeiro ensaio cerca de 10 % do cDNA produzido é utilizado no próximo ensaio de *q*PCR. Em reações “*One-step*” tanto a reação de transcriptase reversa, quanto a reação *q*PCR ocorrem no mesmo ensaio, uma após a outra (Manual *Handbook* _ Applied Biosystems, 2015).

A técnica de *q*PCR necessita de um agente fluorescente para detectar a amplificação da sequência alvo a cada clique, para que assim gere resultados em tempo real. De maneira geral, esse agente fluorescente pode ser inespecífico, como o caso do *SYBERgreen*, que é um corante intercalante de DNA, que se liga de maneira inespecífica a qualquer sequência de DNA dupla fita, aumentando assim o seu nível de fluorescência durante a amplificação do gene alvo; ou pode ser específico, com a utilização de sondas (Figura 4).

A PCR em Tempo Real utilizando o sistema de sondas TaqMan é o mais comumente utilizado. Esta sonda possui em sua extremidade 5' um fluoróforo, mais especificamente molécula repórter, capaz de absorver e emitir luz em comprimentos de onda específicos, e na extremidade 3' uma molécula chamada *quencher*, capaz de absorver a fluorescência emitida pelo fluoróforo, por meio de um fenômeno físico denominado FRET (Transferência de energia de ressonância por fluorescência) (MACKAY, 2004). Durante a reação de *q*PCR a sonda hibridiza com a sequência de DNA fita simples complementar ao alvo para a amplificação. Quando a sonda está intacta, a proximidade da molécula *quencher* com a molécula repórter leva a redução do sinal de fluorescência emitida, garantindo assim que a extremidade 3' da sonda permaneça bloqueada. (NOVAIS & PIRES ALVES, 2004). Na etapa de a amplificação, a enzima DNA polimerase cliva a sonda devido à sua atividade exonucleásica 5'-3', separando o fluoróforo repórter do *quencher* durante a fase de extensão, assim a separação destas moléculas resulta no aumento da intensidade da fluorescência em escala exponencial. Dessa forma, ao utilizar sondas do tipo TaqMan, cada vez que uma nova fita dupla do DNA alvo é replicada, um sinal fluorescente é imediatamente emitido e captado pelo equipamento gerando os resultados da amplificação em tempo real. (ALVAREZ et al., 2004; NOVAIS & PIRES ALVES, 2004) (Figura 4)

FIGURA 4: Reações químicas envolvidas na técnica de *qPCR*

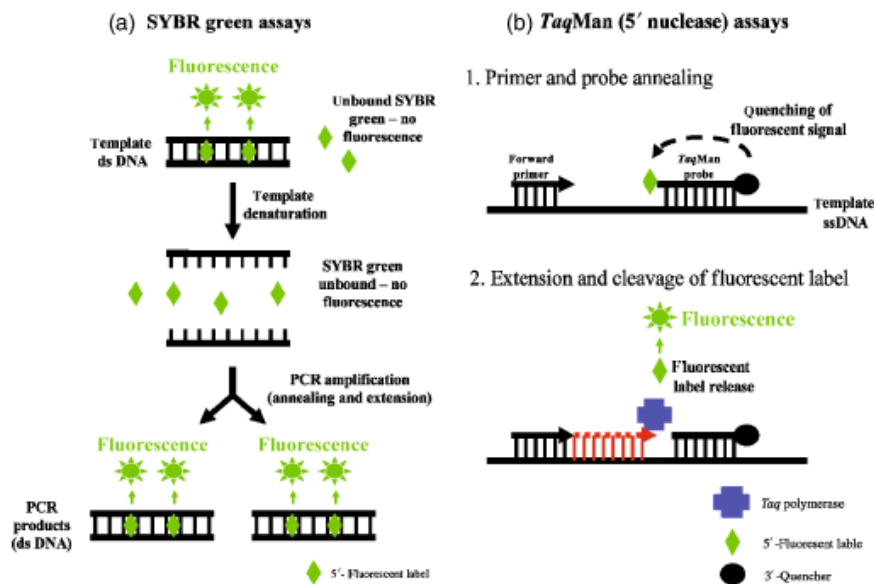


Figura 4: PCR tempo real: (a) detecção através de SYBR green. SYBR green se liga á todas as duplas fitas de DNA e emitindo fluorescência. (b) TaqMan sondas e iniciadores se unem ao DNA-alvo. Quando a sonda esta intacta a energia é transferida entre o quencher e o repórter, como resultados o sinal fluorescente é detectado como a fabricação de uma nova fita através da polimerase, a sua atividade exonuclease cliva os nucleotídeos da sonda, liberando o repórter da sonda. Uma vez que não há mais proximidade o sinal de fluorescência da sonda é detectado e a amostra amplificada é determinada pelo aumento da fluorescência.

Para a compreensão e análise dos resultados gerados pela técnica de *qPCR*, é necessária a compreensão de alguns conceitos, como os conceitos atribuídos ao *Baseline*, *Threshold* e *Threshold Cycle*. O *Baseline* de uma reação de PCR em tempo real se refere ao nível de fluorescência durante os ciclos iniciais da reação, geralmente do ciclo 3 ao 15, nos quais existe uma pequena mudança no nível de fluorescência. O baixo sinal emitido durante os primeiros ciclos no *Baseline* podem ser considerados como “*background*” ou ruídos durante a análise de uma reação.

O *Baseline* é determinado empiricamente de acordo com cada reação, e deve ser determinado de maneira cuidadosa para permitir a determinação apurada do chamado *Threshold cycle (Ct)*. O *Threshold* de uma reação de *qPCR* é o aumento no nível de sinal de fluorescência que reflete estatisticamente a amplificação do alvo além dos sinais basais durante o *Baseline*. Geralmente o software para a análise das reações da *qPCR* define automaticamente o *Threshold*, entretanto a sua posição pode ser determinada pelo executor da

reação em qualquer ponto da fase exponencial de amplificação. O *Threshold Cycle* (C_t) é o número de ciclo onde o sinal da fluorescência ultrapassa o *Threshold*, este parâmetro é utilizado para calcular o número inicial de cópias de DNA, uma vez que o valor de C_t é inversamente proporcional à quantidade inicial de DNA-alvo, logo quanto menor o valor de C_t , maior é a quantidade de DNA alvo inicial para a realização da reação. (Manual *Handbook* _ Applied Biosystems, 2015).

A utilização da plataforma *qPCR* permite ao usuário várias vantagens em relação ao uso de PCR convencional, como: coleta de resultados na fase exponencial da amplificação, a eliminação da etapa de eletroforese em gel após a corrida, a capacidade de produção resultados quantitativos, além de maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão de resultados. (SMITH and OSBORN *et al.*, 2012). Ainda outras vantagens, como: habilidade de monitorar o progresso da reação de PCR enquanto ela ocorre, habilidade de mensurar precisamente a quantidade de *amplicon* em cada ciclo, permitindo avaliar a medida inicial do material, aumento na faixa dinâmica de detecção (Real time PCR Handbook, Applied Biosystem. 2015).

Estudos recentes mostram que a utilização da plataforma *qPCR* permite a obtenção de resultados excelentes e confiáveis para diagnósticos moleculares, tanto para ciências humanas, agricultura e medicina (BUSTIN *et al.*, 2000; KUBISTA *et al.*, 2006), possuindo outras aplicabilidades incluindo quantificação microbiana, determinação de dosagem gênica, identificação de transgenes em alimentos geneticamente modificados, avaliação de riscos quanto a recorrência de câncer, e aplicados a medicina forense. (BERNAD *et al.*, 2002; MACKAY *et al.*, 2004; BERG *et al.*, 2007).

Estudo realizado por Mosca e colaboradores em 2013 sugeriu que a sensibilidade analítica da técnica PCR em Tempo Real para o diagnóstico de detecção de KPC é melhor do que as metodologias fenotípicas usualmente utilizadas. Com isso, cada vez mais *qPCR* tem sido utilizado como ferramenta de diagnóstico, em pacientes acometidos de diferentes comorbidades, seja de origem viral, ou bacteriana. (ALBUQUERQUE *et al.*, 2014; BELLAR-POMARES *et al.*, 2011; PAPP *et al.*, 2014)

Spanu e colaboradores em 2012 realizou um estudo na Itália, onde 300 amostras clínicas de Enterobacterias isoladas de bacteremias foram submetidas á análises de identificação e antibiograma por VITEK 2 e e-Teste, e foram comparadas com os resultados obtidos por q PCR, os resultados mostraram 100% de especificidade e 100% de sensibilidade para os testes realizados na plataforma PCR em Tempo Real, com resultados em até 2 horas. Outro trabalho propôs o desenvolvimento de multiplex Real-time PCR para detecção de CTX-

M, SHV, TEM e AmpCs em enterobactérias, e a partir de 114 amostras controles produziram resultados também com 100% de sensibilidade e especificidade.(ROCHANSKI *et al.*, 2014). Estes estudos corroboram a importância desta técnica como ferramenta de diagnóstico que pode ser de grande valia para ações de controle e vigilância epidemiológica de carbapenemases no ambiente hospitalar.

2. JUSTIFICATIVA/RELEVÂNCIA

A partir do aumento do número de casos de infecções associadas aos cuidados com a saúde e comunitárias a partir de bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases no Brasil, este estudo se apresenta como uma ferramenta de monitoramento epidemiológico de detecção e caracterização dessas amostras, servindo assim como mecanismo de vigilância quanto a presença e a possível disseminação desses microrganismos no ambiente hospitalar. Desta forma, estamos propondo um estudo para padronização de PCR multiplex em Plataforma de PCR em Tempo Real para detecção dos principais mecanismos de resistência a carbapenemases mais prevalentes no Brasil. O Protótipo deverá ser desenvolvido para a plataforma de PCR em Tempo Real e será capaz de detectar (KPC e NDM-1). Esta metodologia poderá ser utilizada em Laboratórios de hospitais, laboratórios privados, Laboratórios Centrais de Saúde Pública. Em bacteriologia médica, a proposta é inovadora e tem um grande potencial de transferência ou reaplicação da tecnologia, pois não existe até o momento produção nacional deste produto com baixo custo; existe um kit disponível no mercado internacional, com custo muito alto. Além disso, existe a possibilidade real do protótipo ser transformado em um “kit” comercial com o apoio do programa PDTIS/FIOCRUZ e parceria já estabelecida com Bio-Manguinhos/ Fiocruz.

3. OBJETIVO

3.1. OBJETIVO GERAL

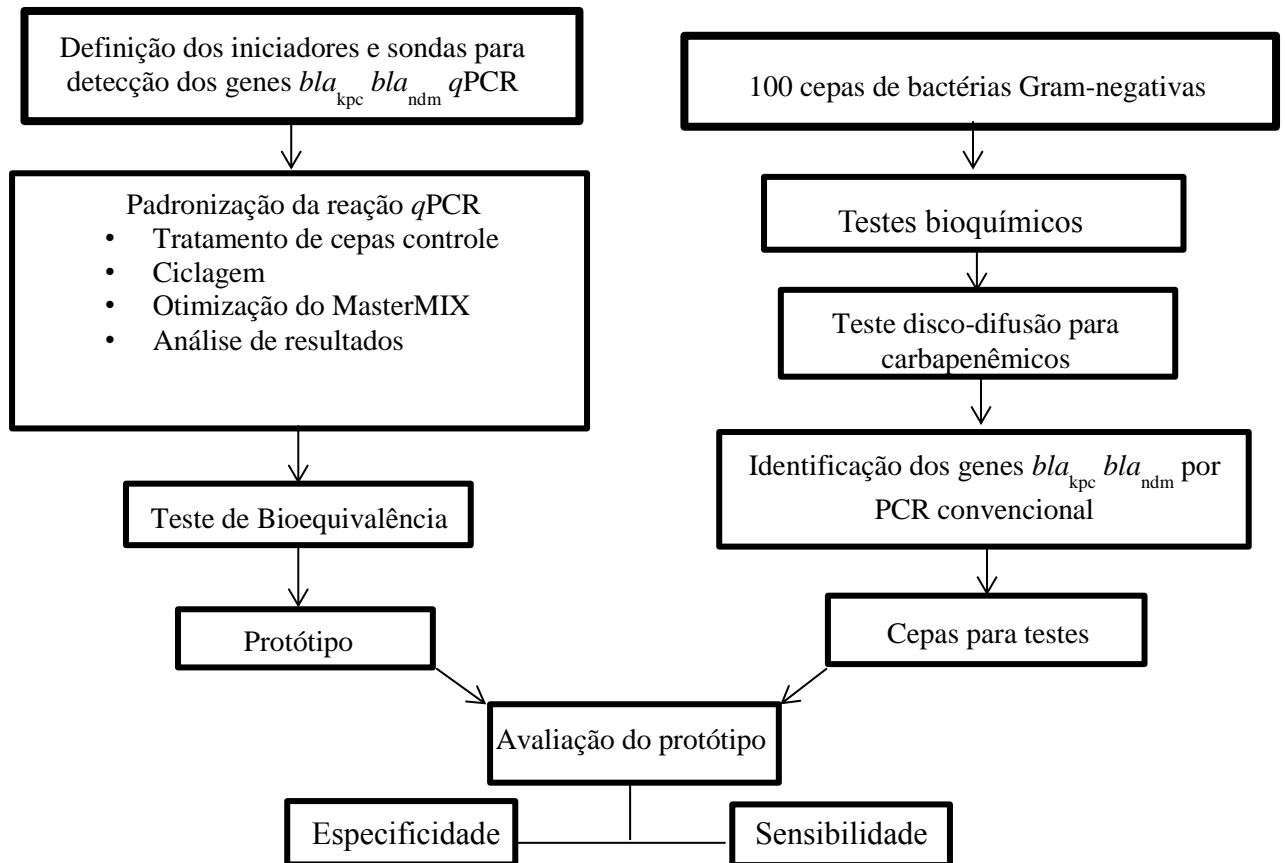
O objetivo proposto: Desenvolver um protótipo baseado em tecnologia de PCR multiplex para detecção de genes de carbapenemases *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1} em amostras de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e membros da família *Enterobacteriaceae* que seja simples e rápido e aplicável à rotina laboratorial.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS/ESTRATÉGIAS.

- Pesquisar e selecionar insumos (iniciadores e sondas) específicos para os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1} para realização da técnica de *qPCR*.
- Selecionar amostras controles previamente identificadas para a padronização do protótipo proposto.
- Avaliar e determinar a ciclagem a ser utilizada para detecção dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1} através da técnica de *qPCR*, assim como padronizar as concentrações dos insumos utilizados no protótipo proposto.
- Determinar a metodologia de extração e processamento de amostra para utilização do protótipo proposto.
- Avaliar a bioequivalência de insumos para a padronização do protótipo proposto.
- Produzir documentos oficiais para a utilização do protótipo desenvolvido.
- Avaliar o Protótipo quanto a sensibilidade e especificidade frente a cepas produtoras e não-produtoras de KPC e NDM.

4. METODOLOGIA

4.1. FLUXOGRAMA DE METODOLOGIA



4.2. ETAPA DE PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM qPCR DO PROTÓTIPO

Os experimentos para a padronização do protótipo e análise de especificidade e sensibilidade, foram realizados na plataforma ABI PRISM7500 (Applied bioSystems) baseados no manual do fabricante para manuseio e processamento de amostra. O software utilizado para análise foi o software ABI PRISM7500 Versão 2.3. As amostras controle foram submetidas ao qPCR de acordo com os procedimentos descritos no Manual do CDC (2011). O controle interno de reação utilizado foi o gene constitutivo 16S RNA.

4.2.1 SELEÇÃO E SÍNTESE DE INICIADORES E SONDAS PARA OS GENES *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1}.

A seleção dos iniciadores específicos para genes que codificam enzimas carbapenemases *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} e 16SrRNA seguiu o protocolo do CDC (2011) e estão descritos na tabela 2. Os iniciadores e as sondas foram sintetizados por duas empresas distintas a BIOSEARCH e a IDT para ensaios posteriores de Bioequivalência. Os insumos foram diluídos de acordo com as normas do fabricante em tampão TE pH 8,0 (10mM TRIS pH8,0, 1mM EDTA pH 8,0) e mantidos em concentração de 100µm em freezer à temperatura de -20°C.

TABELA 2: Sequências nucleotídicas de sondas e iniciadores.

Iniciadores e Sondas	Sequência nucleotídica 5'–3'
NDM-F iniciador	GACCGCCCAGATCCTCAA
NDM-R iniciador	CGCGACCGGCAGGTT
NDM- sonda (HEX)	HEX-TGGATCAAGCAGGAGATCAACCTGCC-BHQ
KPC-F iniciador	GGCCGCCGTGCAATAC
KPC-R iniciador	GCCGCCCAACTCCTTCA
KPC- sonda (FAM)	FAM-TGATAACGCCGCCGCCAATTTGT-BHQ
16S rRNA-F iniciador	GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGA
16S rRNA-R iniciador	GTTGCGGGACTTAACCCAACA
16S rRNA- sonda(Quasar 670)	Quasar-CACGAGCTGACGACARCCATGCA-BHQ

KPC_ *Klebsiella pneumonia* carbapenemase ; NDM_ New Delhi Metalo-beta-lactamase; * R = A ou G

4.2.2. SELEÇÃO DE AMOSTRAS CONTROLES PARA ETAPA DE PADRONIZAÇÃO.

Para a etapa de padronização foram selecionadas quatro cepas pertencentes a Coleção de Culturas de Bactérias em Infecção Hospitalar (CCBH). As cepas selecionadas foram previamente submetidas a identificação bioquímica clássica, além da utilização do sistema miniaturizado API 20E e API20NE (bioMérieux, Brasil) e sequenciamento do genoma total. A detecção fenotípica de carbapenemases foi realizada de acordo com a Norma técnica da ANVISA nº 1/2013. A detecção das sequências gênicas codificadoras de *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, foi realizada previamente através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) convencional de acordo com (YGITI *et al.*,2001). Estas cepas foram mantidas preservadas em caldo de cultura BHI (BD Brain Heart Infusion) com Glicerol 20%. A Tabela 3 descreve as amostras selecionadas como controles para as reações de padronização.

TABELA 3: Amostras controles para a padronização do protótipo.

Identificação	Espécie bacteriana	Gene de resistência
CCBH 8107	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{KPC}
CCBH 8340	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>bla</i> _{NDM}
CCBH 14397	<i>Enterobacter cloacae</i>	<i>bla</i> _{KPC} ; <i>bla</i> _{NDM}
ATCC 700603	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Controle negativo

CCBH_Coleção de Cultura em Bactérias em Infecção Hospitalar.

4.2.3. DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO E PROCESSAMENTO DE AMOSTRA.

Para a determinação da melhor estratégia de extração de DNA para a realização do *q*PCR para detecção dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1} foram testadas duas estratégias, uma baseada na metodologia de lise mecânica e a outra realizada através de lise térmica.

4.2.3.1 EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE CELULAR MECÂNICA.

A extração através de lise celular mecânica foi realizada através do método de sonicação, a partir de um crescimento recente em Agar Nutriente (Biosystems), prepara-se uma suspensão bacteriana em 500µl de água ultrapura (*MilliQ*). Os microtubos com suspensão bacteriana são colocados em banho-maria de ultrassom (Cristofoli) e realiza-se a sonicação (dois ciclos de 30 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada ciclo), após a sonicação, os microtubos são encaminhados a centrifuga (BIOFUGE fresco Heraus) e são centrifugados à 13.000rpm por dois minutos. Neste caso, é usado 10µL desse sonicado, como amostra, no *mix* de reagentes.

4.2.3.2 EXTRAÇÃO DE DNA POR LISE CELULAR TÉRMICA.

A extração através de lise celular térmica foi realizada através de três estratégias diferentes:

- Primeira estratégia denominada LT1, onde realizou-se a inoculação de uma pequena alçada de bactérias anteriormente isoladas sob semeadura em Agar Nutriente (Biosystems) à 29,5µl de água ultra pura (*MilliQ*), logo após essa suspensão bacteriana é submetida a aquecimento de 95°C por cinco minutos. Todo o volume foi misturado ao *mix* de reagentes para realização da amplificação através de *qPCR*.
- A segunda estratégia denominada de LT2, realizada de acordo, onde realizou-se a inoculação de uma pequena alçada de bactérias anteriormente isoladas sob semeadura em Agar Nutriente (Biosystems) à 50µl de água ultra pura (*MilliQ*), logo após essa suspensão bacteriana é submetida a aquecimento de 95°C por cinco minutos. Somente 10µl dessa suspensão foi utilizada na reação.

- Para a terceira estratégia denominada de LT3, seguiu-se a inoculação de uma colônia utilizando uma ponteira como instrumento ao Mix de reagentes com volume final de 50 µL, dessa forma a lise pode ocorrer durante a ativação enzimática da *TAQpolimerase* (*TAQ hot start*) no termociclador à temperatura de 95°C por 10 minutos.

4.2.4. DETERMINAÇÃO DA CICLAGEM PARA DETECÇÃO DOS GENES *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1}.

Foram testadas duas ciclagens distintas para avaliar qual possuía melhor performance. A primeira ciclagem testada foi denominada de Protocolo Bio-Manguinhos (Desnaturação: 95°C por 10 min.; Anelamento: 50 ciclos 95°C por 30 seg.; Extensão: 60°C por 60 seg.); esta ciclagem é usualmente utilizada para experimentos internos realizados em Bio-Manguinhos, e a segunda foi denominada Protocolo CDC (Desnaturação: 95°C por 10 min.; Anelamento: 40 ciclos 95°C por 3 seg.; Extensão: 60°C / 30 seg.); que segue as instruções do manual publicado do CDC para detecção de carbapenemases através de *qPCR* (2011). As duas ciclagens foram testadas em reações “*single*” (único alvo) e “*multiplex*” para os genes de interesse *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM-1}.

4.2.5 PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DOS INSUMOS.

Para a padronização e determinação da concentração ótima de insumos foram avaliadas duas plataformas de reagentes distintas. Uma considerada fechada, ou seja um *MasterMix* que continha em sua composição reagentes como *TAQpolimerase*, Cloreto de magnésio e nucleotídeos livres em concentrações estabelecidas pelo fabricante (*MasterMix NAT*). O *MasterMix NAT* é produzido e comercializado por BIO-MANGUINHOS. A outra plataforma era “aberta” sendo assim era possível alterar de maneira conveniente todos os componentes da reação de *qPCR*. Estes reagentes foram produzidos pelo IBMP (Instituto de Biologia Molecular do Paraná). As diferentes concentrações de reagentes foram testadas de modo a obter um volume final de reação de 50 µl ou de 25µl. Durante a padronização do

MasterMix IBMP também foi analisada a influência da adição da referência passiva ROX (Applied Biosystems) na reação. O ROX é uma molécula normalizadora da reação que é responsável por equalizar possíveis variações, erros de pipetagem, ruídos, ou variações durante a emissão e detecção de fluorescência. (Manual_Handbook Applied Biosystems, 2015).

As concentrações de iniciadores e sondas também foram definidas a partir destes ensaios, para avaliação das sondas foram testadas concentrações de 0,1 μM a 0,4 μM e para os iniciadores as concentrações testadas foram de 0,2 μM a 0,6 μM ; desta forma foi possível definir e estabelecer os limites de *Threshold* e *baseline* que seriam utilizados no protótipo.

4.2.6 AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE INSUMOS (SONDAS E INICIADORES).

Para a avaliação de bioequivalência, sondas e iniciadores foram obtidos de dois fabricantes distintos, a BIOSEARCH e a IDT *technologies*. Estes insumos foram utilizados seguindo o protocolo que foi desenvolvido a partir da padronização inicial para o protótipo. Os insumos foram avaliados da seguinte forma: 1) Reações com sondas e iniciadores da marca BIOSEARCH; 2) Reações com sondas e iniciadores da marca IDT *technologies*; 3) Reações utilizando sondas BIOSEARCH e iniciadores IDT *Technologies*; por fim 4) Reações utilizando sondas IDT *Technologies* e iniciadores BIOSEARCH. Foram utilizados os controles descritos na tabela 3 para a realização deste experimento.

4.3 ETAPA DE TESTE E AVALIAÇÃO DO PROTÓTIPO DESENVOLVIDO.

Para a realização da etapa de avaliação do protótipo foi necessário a construção de documentos que instruem e habilitam outros indivíduos a utilizarem o protótipo, IT (Instrução de Trabalho) e ainda documentos para o controle da qualidade pós envase e rotulagem. Da mesma forma, foram produzidos ainda documentos para controle interno de insumos e controle de envase, este realizado por Bio-Manguinhos. Após a etapa de padronização e formalização de documentos no Laboratório de Tecnologia em Diagnóstico (LATED) em Bio-Manguinhos foi possível a produção do primeiro protótipo padronizado para detecção de carbapenemases KPC e NDM.

As etapas de avaliação do protótipo quanto à especificidade e sensibilidade também foram realizadas sob a plataforma ABI PRISM 7500 (Applied biosystems), utilizando o gene constitutivo 16S RNA como controle interno de reação.

4.3.1. SELEÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA AVALIAÇÃO DO PROTÓTIPO.

Para determinação dos parâmetros de sensibilidade e especificidade do protótipo foram selecionadas 100 cepas bacterianas Gram-negativas pertencente à Coleção de Culturas de Bactérias em Infecção Hospitalar (CCBH) para serem testadas quanto à presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM-1}*. O critério de seleção para composição do número amostral para esta análise foi: 1) As amostras devem pertencer à Família *Enterobacteriaceae* ou ao grupo dos Bacilos Gram-negativos não-fermentadores; 2) Deveriam conter em seu genoma a presença de pelo menos um dos genes avaliados, (Para composição do grupo amostral positivo); 3) Não deveriam possuir qualquer um dos genes alvos para o protótipo (composição do grupo amostral negativo); 4) deveriam ser escolhidos aleatoriamente quanto ao ano de isolamento , ou origem de amostra.

As cepas escolhidas foram submetidas à confirmação de identificação, quanto ao gênero e a espécie por bioquímica convencional, assim como a presença ou ausência dos genes foi confirmada pela técnica de PCR convencional descrita por (YGITI *et al.*,2001). A Coleção de Cultura de Bactérias em Infecção hospitalar é preservada pelo método de congelamento em nitrogênio líquido (-180°C).

4.3.2 AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE E ESPECIFICIDADE DO PROTÓTIPO.

A especificidade é a capacidade que um teste possui de determinar resultados negativos em face de uma amostra que seja sabidamente negativa. Por outro lado a avaliação da sensibilidade é realizada em um teste a partir da sua capacidade de determinar resultados positivos em amostras sabidamente positivas. (GALEN E GAMBINO, 1975).

Para a avaliação da especificidade e sensibilidade do protótipo as cepas foram divididas em dois grupos amostrais, o grupo de amostras positivas para um dos genes alvos e o grupo de amostras negativas. A determinação se deu pela capacidade do protótipo em não revelar resultados falsos negativos ou falsos positivos, de acordo com a identificação previa das amostras por PCR convencional. Os grupos amostrais foram submetidos ao protótipo final, já envasado de acordo com as boas práticas de fabricação seguidas por BIO-MANGUINHOS.

4.3.3 DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

A determinação do Limite de detecção foi realizada utilizando as cepas controles produtoras de KPC e NDM. As cepas foram semeadas em Agar Nutriente (Biosystems), e selecionou-se uma única colônia para a extração de DNA pela metodologia de sonicação. Assim, preparou-se uma suspensão bacteriana em 100µl de água ultrapura (*MilliQ*). Os microtubos com suspensão bacteriana foram colocados em banho-maria de ultrassom (Cristofoli) e realizou-se a sonicação (dois ciclos de 30 segundos, com intervalos de 10 segundos entre cada ciclo), após a sonicação, os microtubos foram encaminhados à centrifuga (BIOFUGEfresco *Heraus*) e foram centrifugados à 13.000rpm por dois minutos.

Após a centrifugação o sobrenadante contendo o DNA sofreu diluições seriadas partindo da concentração de 1:10. Foram realizadas dez diluições para determinação do LOD do protótipo para cada cepa controle representante de cada alvo. O DNA presente em cada uma das diluições foi medido através do equipamento GeneQuant espectrofotômetro (Bioscience) com absorvância de 360nm. Após a medição, estas diluições foram utilizadas como *Template* para a reação de *qPCR*.

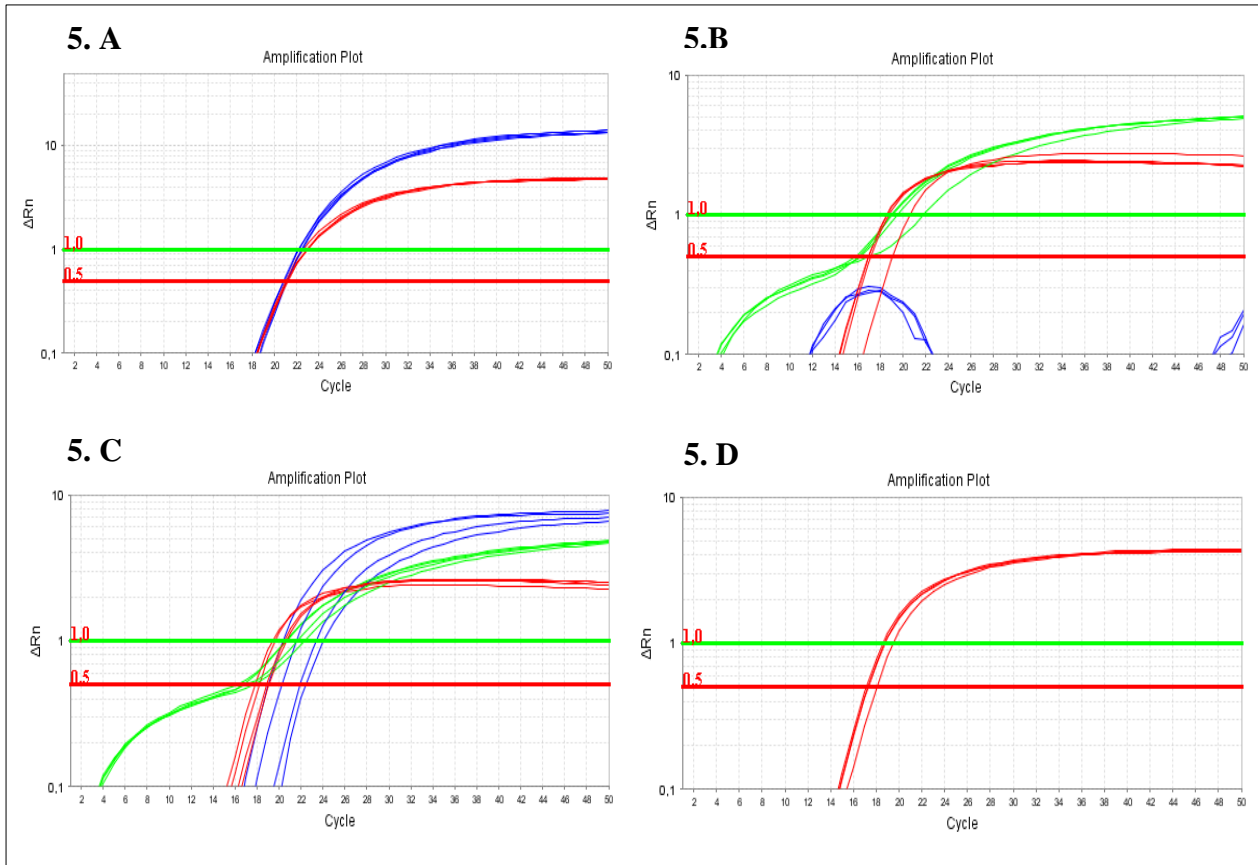
5. RESULTADOS

5.1. DETERMINAÇÃO DA METODOLOGIA DE EXTRAÇÃO.

Nesta primeira etapa de padronização, foi realizada a reação em *qPCR* para definição da melhor estratégia de extração de DNA para detecção dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}*. A partir das análises observou-se a amplificação em ótimas condições para os dois alvos além do controle interno negativo (gene16S RNA). Os valores de CT variavam de 16,0 a 19,0 em todas as condições testadas para KPC, e de 20,0 á 23,0 para NDM.

No que se refere à técnica de extração, foi possível inferir que a utilização da condição **LT3**, realizada a partir da coleta de colônias diretamente da placa, mostrou-se capaz de favorecer a amplificação ótima dos alvos testados (Figura 5), além de possuir maior relação custo-benefício quando comparada as outras condições testadas, pois permitiu a diminuição com gastos de materiais para sonicação além de diminuir o tempo para a obtenção dos resultados.

Figura 5: Amplificação dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* e controle interno 16s RNA através da metodologia de extração LT3.



Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **Figura 5:** Curvas de amplificação para os genes de interesse relacionando a variação de fluorescência com o número de ciclos de reação. **Figura 5.A:** Gráfico de amplificação da cepa controle KPC positivo; **Figura 5.B:** Gráfico de amplificação da cepa controle NDM positivo; **Figura 5.C:** Gráfico de amplificação da cepa controle KPC/NDM positivo; **Figura 5.D:** Gráfico de amplificação da cepa controle negativo.

5.2. PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO QUANTO À CICLAGEM.

Os experimentos para avaliação da ciclagem foram realizados com os controles descritos na tabela 1 de acordo com o protocolo descrito pelo CDC. As ciclagens testadas mostraram-se igualmente eficientes para a amplificação dos genes alvos *blaKPC* e *blaNDM* quando realizadas em “single” alvo único ou em “multiplex” mais de um alvo.

A partir dos resultados obtidos foi possível inferir que protocolo do CDC é tão eficaz quanto o utilizado em BIO-MANGUINHOS, sendo o protocolo de CDC bem mais rápido. Por isso adotou-se a partir desse experimento a utilização do protocolo do CDC para os testes seguintes.

5.3. PADRONIZAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE INSUMO.

A partir do MIX NAT (BIO-MANGUINHOS) foram testadas diversas concentrações com o intuito de definir a concentração ótima dos insumos para a reação. A tabela 4 mostra as diferentes concentrações testadas para sondas e iniciadores e os valores de Ct (*Threshold cycle*) obtidos em cada uma das condições.

TABELA 4: Valores de Ct para as concentrações testadas.

Condições testadas	Mix	Concentração Sondas (μM)	Concentração Iniciadores (μM)	Valores de Ct *	
				KPC	NDM
Condição 1	NAT	0,2	0,4	17,43	20,53
Condição 2	NAT	0,1	0,4	18,63	19,23
Condição 3	NAT	0,4	0,4	18,36	18,52
Condição 4	NAT	0,2	0,2	19,54	20,01
Condição 5	NAT	0,2	0,6	35,38	30,38

Ct : *Threshold cycle*; * = Média dos valores de Ct, as reações foram realizadas em triplicada para cada um dos controles.

A partir dos valores de Ct observou-se que a **Condição 1** foi a melhor testada, pois o aumento na concentração de sondas e iniciadores apenas gerou o aumento do platô da curva de amplificação, além disso foi possível observar que a diminuição na concentração dos insumos reflete na diminuição dos valores de Ct. Após este experimento foi proposta a determinação dos valores de *Threshold* e de *Baseline* para cada um dos alvos (TABELA 5).

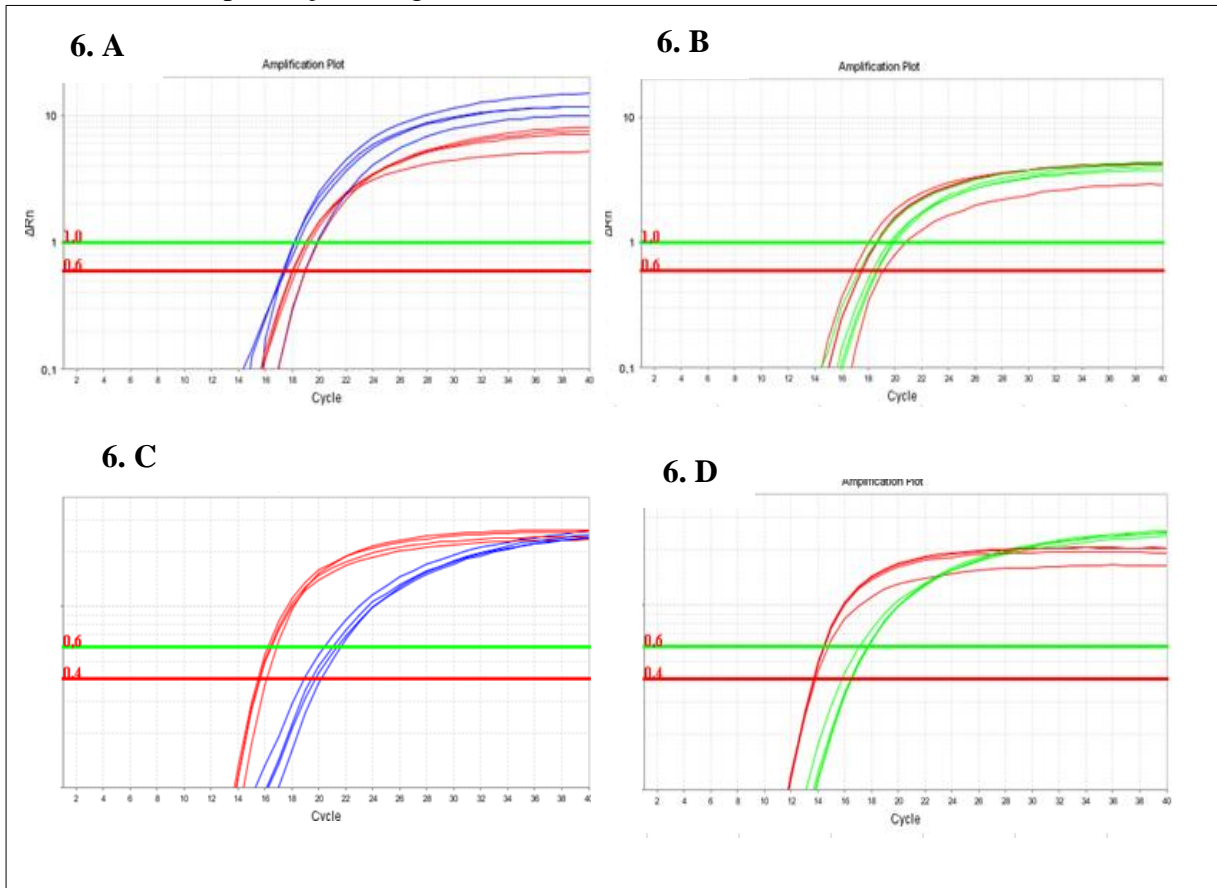
TABELA 5: Valores de *Threshold* e *Baseline* para cada um dos alvos.

Gene alvo	Sonda correspondente	Valores de Threshold	Valores de Baseline
<i>bla</i> _{KPC}	FAM	0,9	5 – 8
<i>bla</i> _{NDM}	HEX	0,4	5 – 15
16S RNA	Quasar 670	0,5	5 – 8

Para a produção do protótipo, foram analisadas as possibilidades de utilização de dois mixes de fabricantes diferentes, o primeiro é um sistema fechado fabricado por BIOMANGUINHOS denominado NAT (*Nucleic Acid Test*), o outro é o MIX IBMP fabricado pelo IBMP (Instituto de Biologia Molecular-Paraná) sendo este um sistema aberto passível de otimização. Estes dois sistemas foram testados e observou-se que o desempenho do MIX NAT permaneceu constante depois de vários testes, entretanto o MIX IBMP ganhou melhora gradativa após a padronização de seus reagentes. Os melhores resultados foram obtidos com as seguintes concentrações: *d*NTP 0,8mM, Sulfato de Magnésio (MgSO₄) 0,9mM, e com adição de ROX, na concentração final de 5nM, apresentando um Ct final de 21,09 para KPC e 17,54 para NDM (Gráficos 2).

Os resultados avaliados mostraram que mesmo após padronização intensa o MIX IBMP não alcançou as expectativas, possuindo menor sensibilidade que o MIX NAT. Com isso a partir desta etapa resolveu-se utilizar o MIX NAT como componente do Kit protótipo de *q*PCR, desenvolvido por este trabalho.

FIGURA 6: Amplificação dos genes bla_{KPC} e bla_{NDM} com MIX NAT e MIX IBMP.

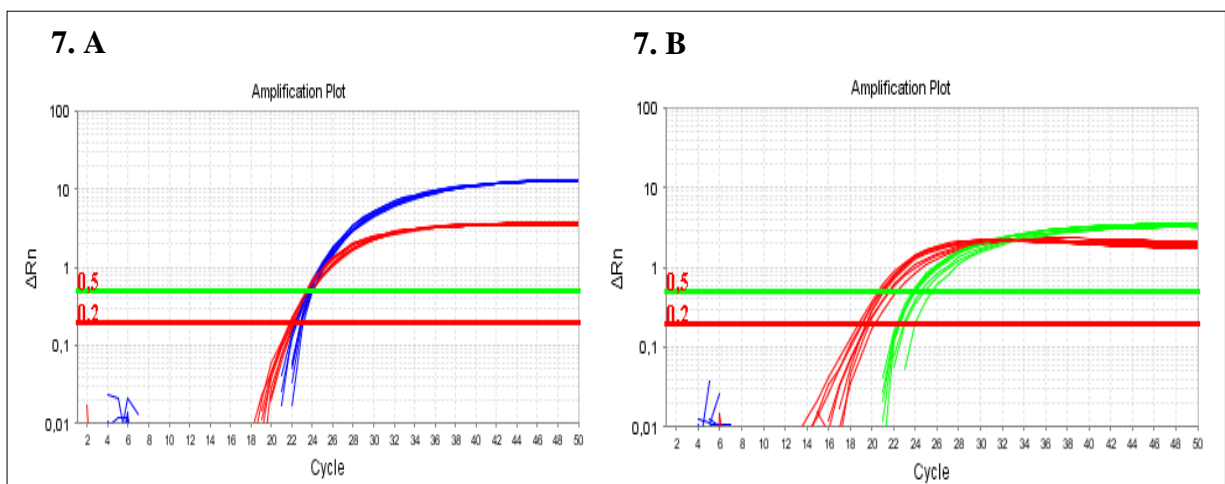


Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde_ Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **FIGURA 6:** Curvas de amplificação para comparação entre os MIXES NAT e IBMP para os genes de interesse relacionando a variação de fluorescência com o número de ciclos de reação. **Figura 6.A:** Gráfico de amplificação da cepa controle KPC positivo com MIX NAT; **Figura 6.B:** Gráfico de amplificação da cepa controle NDM positivo com MIX NAT; **Figura 6.C:** Gráfico de amplificação da cepa controle KPC positivo com MIX IBMP; **Figura 6.D:** Gráfico de amplificação da cepa controle NDM + com MIX IBMP.

5.4. AVALIAÇÃO DE BIOEQUIVALÊNCIA DE INSUMOS (SONDAS E INICIADORES)

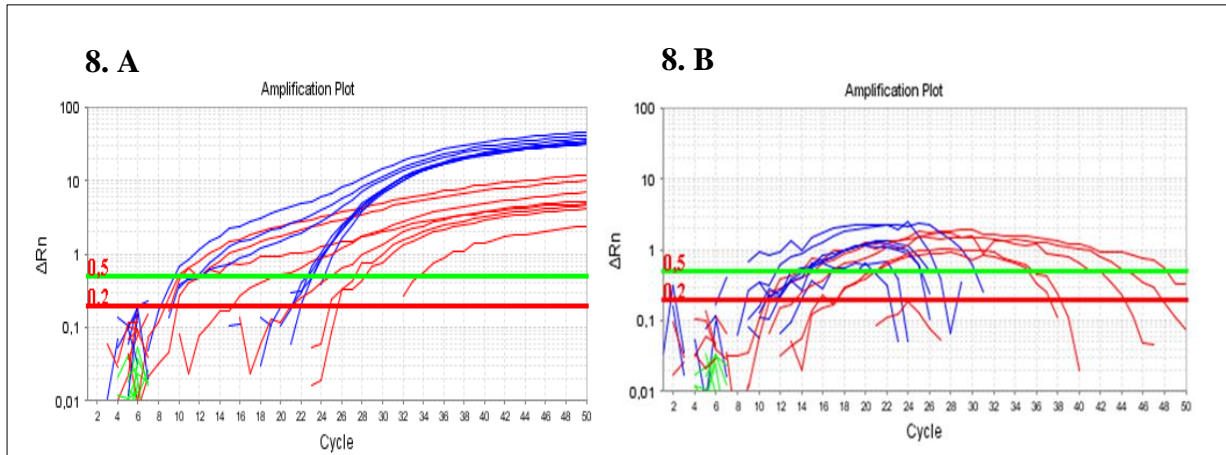
Os resultados obtidos através da análise de Bioequivalência de insumos nos permitiu determinar qual a melhor combinação entre sondas e iniciadores para a produção do protótipo. As figuras de amplificação abaixo demonstram os resultados para cada uma das condições testadas. (Figuras 7 à 10).

FIGURA 7: Amplificação das cepas controle e KPC e NDM positivas, utilizando sondas e iniciadores produzidos pela BIOSEARCH.



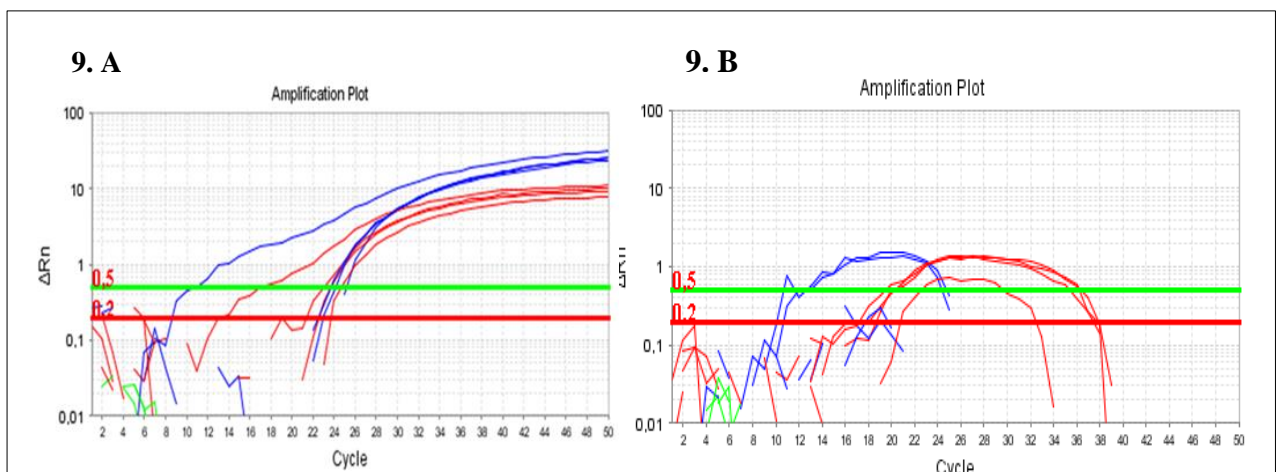
Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **Figura 7.A:** Amplificação da cepa KPC positiva com sondas e iniciadores BIOSEARCH. **Figura 7.B:** Amplificação da cepa controle NDM positiva com sondas e iniciadores BIORESEARCH.

FIGURA 8: Amplificação das cepas controle KPC e NDM positiva, utilizando sondas e iniciadores produzidos pela IDT.



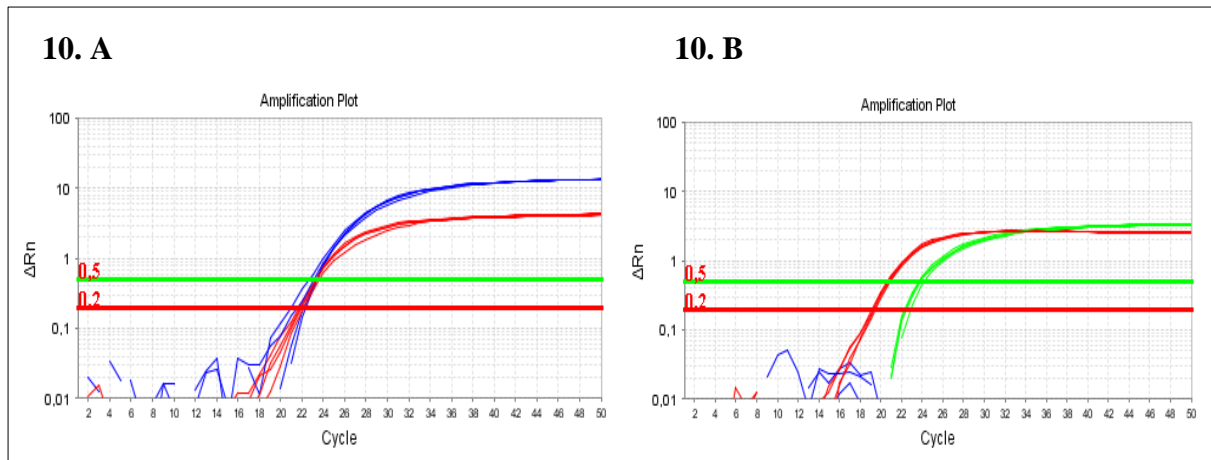
Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **Figura 8.A:** Amplificação da cepa KPC positiva com sondas e iniciadores IDT. **Figura 8.B:** Amplificação da cepa controle NDM positiva com sondas e iniciadores IDT.

FIGURA 9: Amplificação das cepas controle KPC e NDM positiva, utilizando sondas produzidas pela IDT e iniciadores produzidos pela BIOSEARCH



Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **Figura 10.A:** Amplificação da cepa KPC positiva com sondas IDT e iniciadores BIOSEARCH. **Figura 10.B:** Amplificação da cepa controle NDM positiva com sondas IDT e iniciadores BIOSEARCH.

FIGURA 10: Amplificação da Cepa Controle KPC e NDM positiva, utilizando sondas produzidas pela BIOSEARCH e iniciadores produzidos pela IDT.



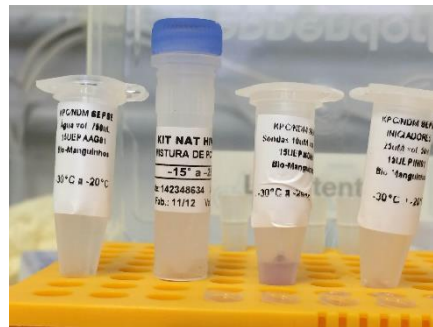
Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). **Figura 9.A:** Amplificação da cepa KPC positiva com sondas BIOSEARCH e iniciadores IDT. **Figura 9.B:** Amplificação da cepa controle NDM positiva com sondas BIOSEARCH e iniciadores IDT

Os melhores resultados foram obtidos com a combinação 1, (sondas e iniciadores da marca BIOSEARCH) e com a combinação 4 (Iniciadores IDT e sondas BIOREASEARCH). Com uma leve vantagem para a condição 4, que mostrou menores valores de Ct tanto para amplificações para o alvo NDM quanto para KPC (Ct 23,09 para KPC e Ct 23,85 para NDM), enquanto a condição 1 apresentou valores de Ct 23,59 para KPC e 24,07 para NDM. Acredita-se que os resultados insatisfatórios observados nas condições 2 e 3 se deve a problemas de fabricação das sondas de marca IDT.

5.5 DESCRIÇÃO DOS DOCUMENTOS PRODUZIDOS PARA A PERMISSÃO DO ENVASE DO PROTÓTIPO

Para a realização do processo de envase do protótipo (Foto 1) foram elaborados os seguintes documentos abaixo:

FOTO 1: Componentes do protótipo



- **IT (Instrução de Trabalho)**

Título: Realização de PCR em Tempo Real para genes de resistência antimicrobiana

Número do documento: 9710

Objetivos: Detectar a presença dos genes de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} em amostras de Enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores através de PCR em Tempo Real.

Título: Diluição, rotulagem e envase dos iniciadores (KPC F, KPC R, NDM F, NDM R, 16S RNA F, 16S RNA R) do protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9707

Objetivos: Estabelecer procedimentos para diluição. Rotulagem, envase dos iniciadores (KPC F, KPC R, NDM F, NDM R, 16S RNA F, 16S RNA R), componentes do teste de protótipo do KIT de utilização da PCR em Tempo Real para genes de resistência

Título: Diluição, rotulagem e envase de Sondas KPC, NDM e 16S RNA F do protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9708

Objetivos: Estabelecer procedimentos para diluição. Rotulagem, envase das sondas componentes do protótipo do KIT de utilização da PCR em Tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Título: Envase e rotulagem de Água/DEPC para o protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9709

Objetivos: Estabelecer procedimentos para o envase e rotulagem da Água/DEPC, componente do protótipo do KIT de utilização da PCR em Tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

- **Documentos de Controle de Processamento**

Título: Controle de processamento pós envase de Água/DEPC do módulo de amplificação para protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9705

Título: Controle de processamento pós diluição, rotulagem e envase dos iniciadores (KPC F, KPC R, NDM F, NDM R, 16S RNA F, 16S RNA R) do protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9706

Título: Controle de processamento pós diluição, rotulagem e envase de sondas KPC, NDM e 16S RNA do protótipo do KIT de utilização de PCR em tempo Real para genes de resistência antimicrobiana.

Número do documento: 9704

5.6. SELEÇÃO DE AMOSTRAS CLÍNICAS PARA AVALIAÇÃO DO PROTÓTIPO QUANTO SUA ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE

Seguindo os critérios estabelecidos na metodologia para o no tópico 4.2.1. foram selecionadas 100 cepas bacterianas. As cepas pertencem ao grupo de bactérias Gram-negativas, pertencentes à família *Enterobacteriaceae* ou ao grupo dos Bacilos Não-Fermentadores. Foram isoladas a partir de 13 estados brasileiros: Bahia, Pernambuco, Ceará, Minas Gerais, Distrito Federal, Alagoas, Amazonas, Santa Catarina, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Maranhão, Sergipe e Rio Grande do Sul no decorrer dos anos 2007 até 2016. O gráfico 1 mostra todas as espécies selecionadas e utilizadas no estudo.

GRÁFICO 1: Descrição das cepas selecionadas para padronização.

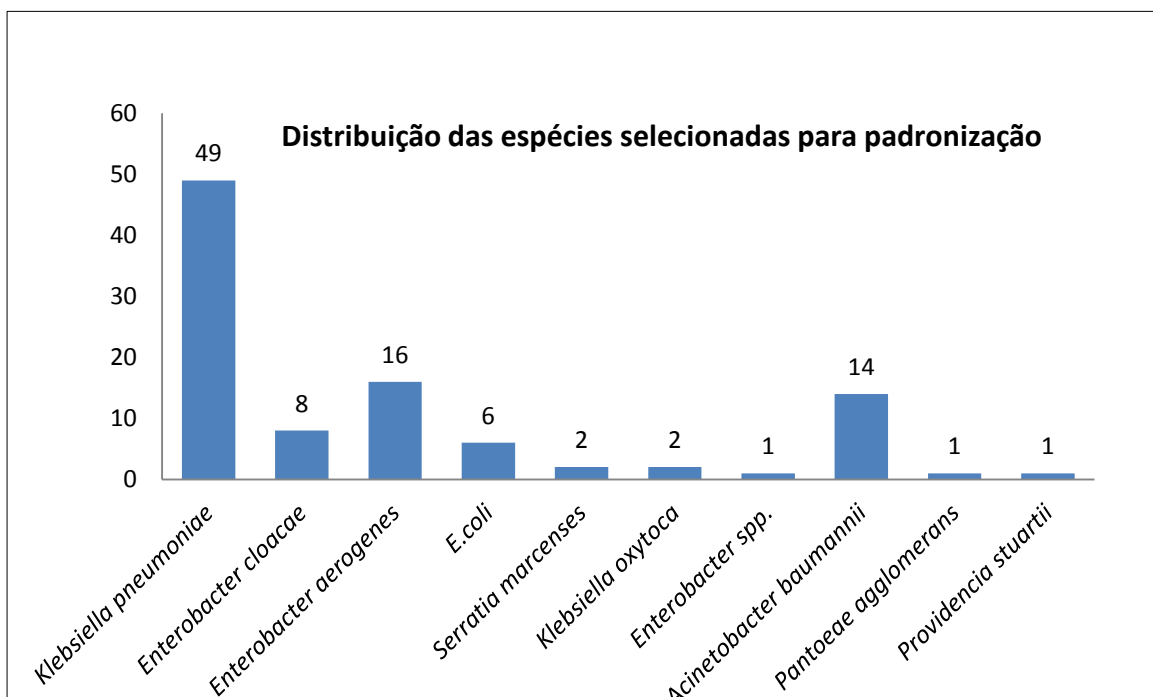


Gráfico 1: Espécies selecionadas e quantidade de cepas isoladas para cada espécie

A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi a mais prevalente entre as amostras selecionadas, seguidas das espécies *Enterobacter aerogenes* e *Acinetobacter baumannii*. As cepas deste estudo foram reisoladas e submetidas á confirmação da presença dos genes bla_{KPC} e bla_{NDM} por PCR convencional e separadas da seguinte forma: 40 cepas positivas para o gene bla_{KPC} , 40 cepas positivas para o gene bla_{NDM} e 20 cepas negativas para ambos os genes. Os gráficos 2 e 3 descrevem a distribuição das amostras de acordo com os alvos de resistência estudados.

GRÁFICO 2: Distribuição das cepas bla_{KPC} de acordo com sua espécies.

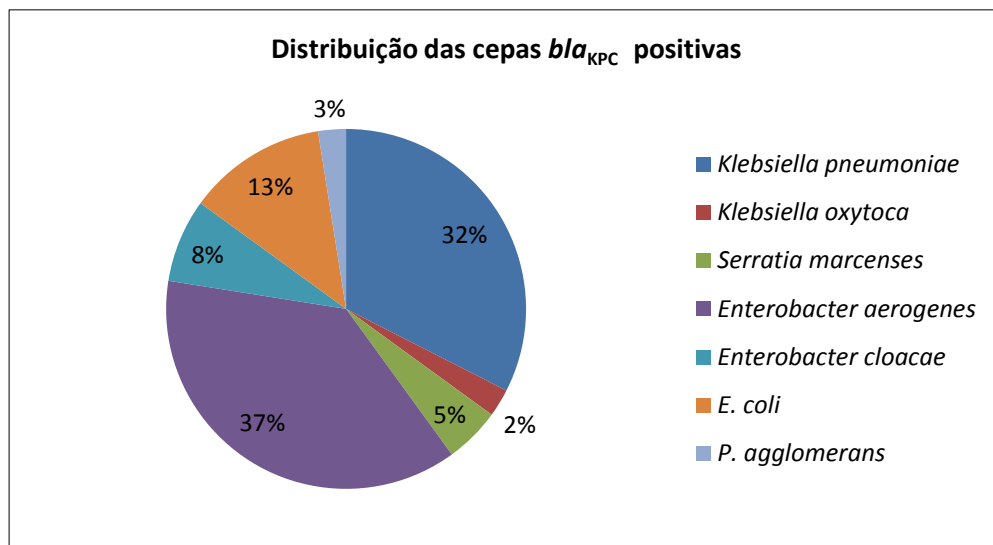
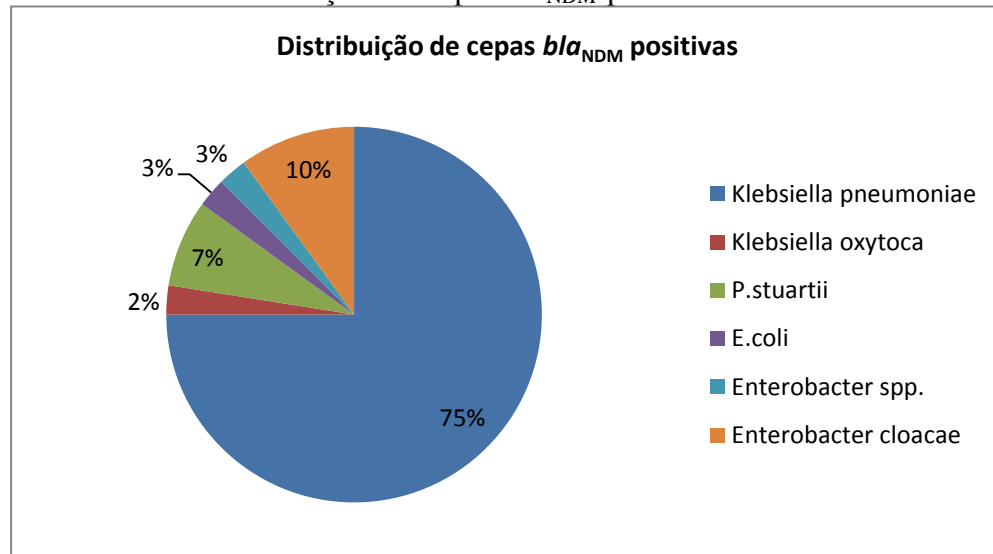


GRÁFICO 3: Distribuição das cepas bla_{NDM} positivas.



Dentre as cepas bla_{KPC} positivas as espécies *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* possuem o maior número de isolados 32% (13 isolados) e 37% (15 isolados) respectivamente (Gráfico 1). As amostras NDM positivas possuem em sua grande maioria cepas da espécie *Klebsiella pneumoniae*, 75% (30 isolados), seguidas de cepas da espécie *Enterobacter cloacae*, 10% das amostras totais para este gene (4 isolados). As cepas negativas para ambos os genes estão distribuídas da seguinte forma : *Acinetobacter baumannii* 65% das cepas (13 isolados), *Klebsiella pneumoniae* 30 % das cepas (6 isolados) e *Enterobacter cloacae* com 5 % (1 isolado).

5.7. ANÁLISE DE ESPECIFICIDADE E SENSIBILIDADE DO PROTÓTIPO

Após a realização de intensa padronização o protótipo para detecção de bla_{KPC} e bla_{NDM} foi definido da seguinte forma: 1) Metodologia de extração LT3 realizada diretamente da colônia; 2) A ciclagem definitiva é a estabelecida pelo CDC; 3) Utilização do MIX NAT; 4) Utilização de sondas BIOSEARCH , com concentração final de reação de 0,2 μ M; 5) Utilização de iniciadores IDT *technologies*, com concentração final de reação de 0,2 μ M. A Tabela 6 descreve os volumes para cada reagents utilizados no *mix*. Como descrito anteriormente a reação de *qPCR* foi realizada na plataforma ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems) e a análise dos resultados foi obtida através do software específico do equipamento na versão 2,3. O gene constitutivo 16S RNA foi utilizado como controle interno de reação.

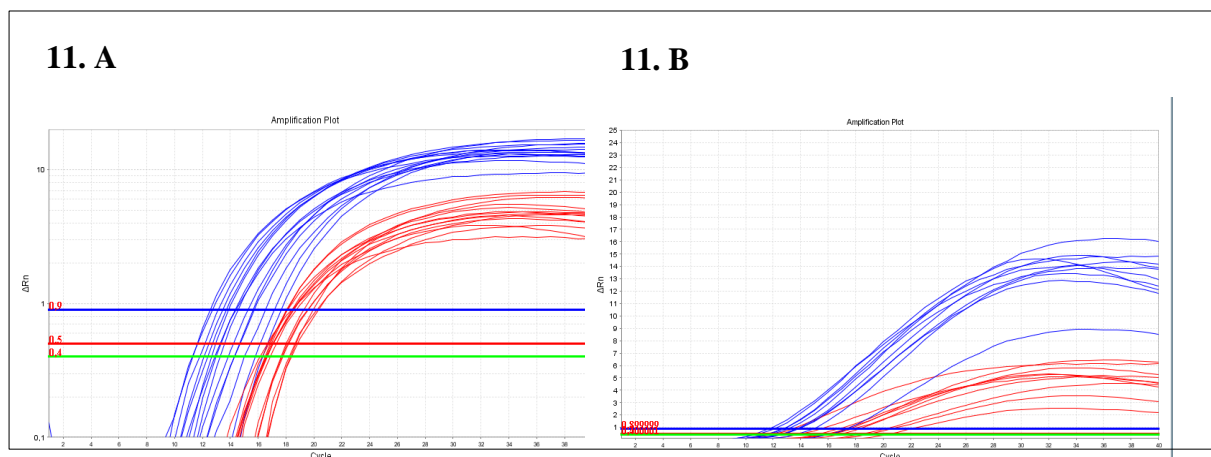
TABELA 6: Reagentes e seus volumes para uma reação do protótipo.

Reagentes do protótipo	Volume (μ l)
<i>MasterMIX</i> NAT	16,7 μ l
Água	29,5 μ l
Iniciadores *	0,8 μ l
Sondas*	3 μ l

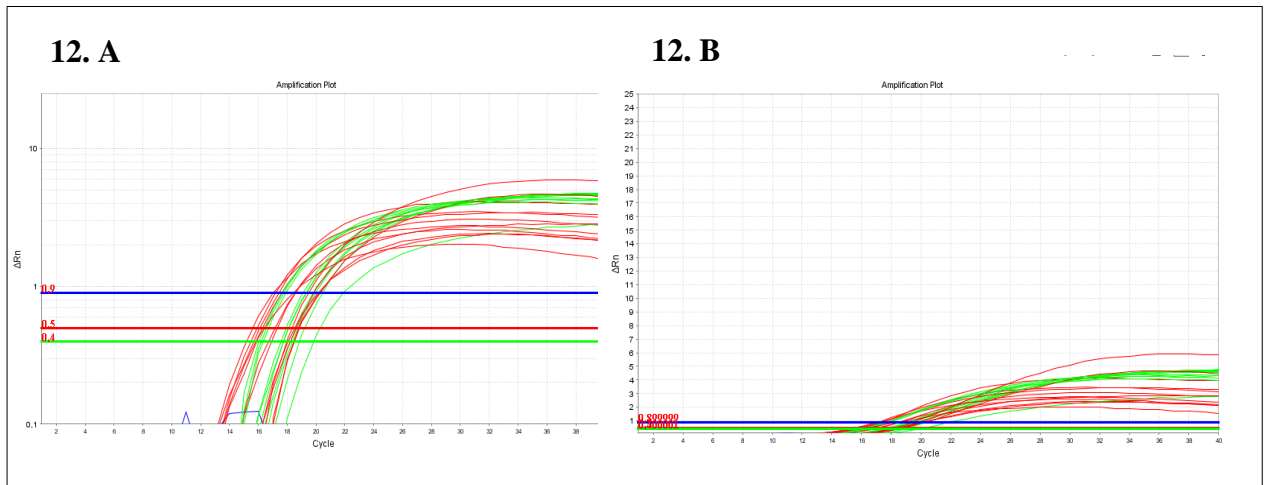
Tabela 6: Descrição dos volumes de reagentes para volume final de 50 μ l;*_ os iniciadores e as sondas para os alvos bla_{KPC} , bla_{NDM} e 16S RNA foram envasados em conjunto.

A partir das 100 cepas previamente selecionadas realizou-se a avaliação da especificidade e sensibilidade do protótipo. Foi possível identificar 100 % de especificidade para a identificação do gene *bla_{KPC}*, (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo variação nos valores de Ct entre 11 e 17 (Figura 11); e 100 % de especificidade para identificação do gene *bla_{NDM}* (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo variação nos valores de Ct entre 15 e 22 (Figura 12). Não houve a presença de resultados “falso positivos”, todas as amostras negativas amplificaram somente o controle interno o 16S RNA resultando em 100 % de sensibilidade com a detecção de 20 cepas negativas (Figura 13).

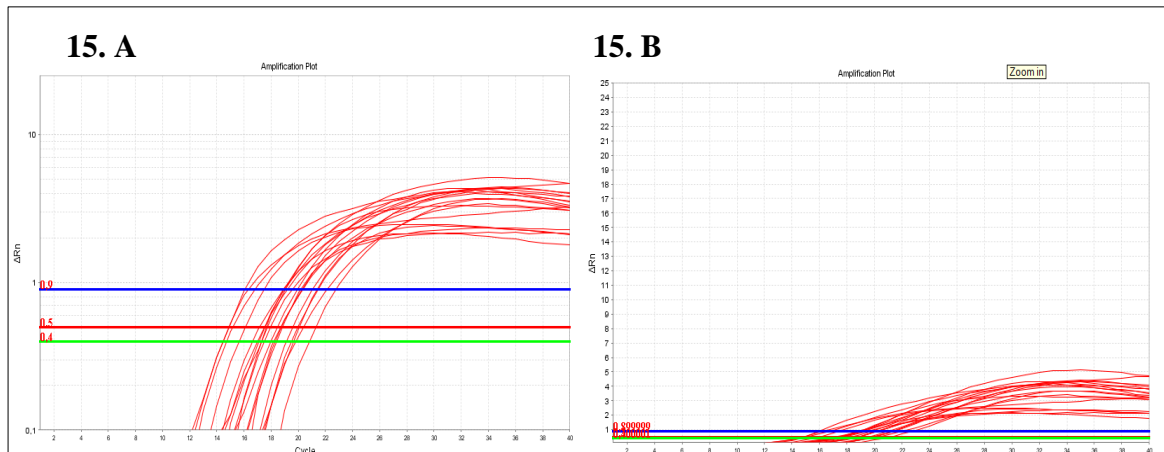
FIGURA 11: Curvas de amplificação das cepas *bla_{KPC}* positivas.



Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). Figura 11.A: “Amplification plot” em escala logarítmica, amplificação das cepas produtoras de KPC e especificidade de 100%. Figura 11.B: “amplification plot” em escala linear de cepas produtoras de KPC e especificidade de 100%

FIGURA 12: Curvas de amplificação das cepas bla_{NDM} positivas.

Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde_ Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). Figura 12.A: “Amplification plot” em escala logarítmica, amplificação das cepas produtoras de NDM e especificidade de 100%. Figura 12.B: “amplification plot” em escala linear de cepas produtoras de NDM e especificidade de 100%.

FIGURA 13: Curvas de amplificação das cepas negativas.

Legenda: Curva azul_ Sonda FAM (KPC); Curva verde _ Sonda HEX (NDM); Curva vermelha_ Sonda Quasar 670 (16S RNA). Figura 13.A: “Amplification plot” em escala logarítmica, amplificação das cepas produtoras de NDM e especificidade de 100%. Figura 13.B: “amplification plot” em escala linear de cepas produtoras de NDM e especificidade de 100%.

5.8. DETERMINAÇÃO DO LIMITE DE DETECÇÃO (LOD)

Foi realizada a diluição seriada 1:10 por 10 vezes para tentar identificar o LOD para os genes *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM}, contudo o protótipo conseguiu detectar a presença dos genes mesmo na última diluição. A quantificação do DNA foi realizada através do *geneQuant* para cada uma das diluições dos alvos. O protótipo foi capaz de realizar a amplificação do DNA-alvo das cepas controle sonicadas até a última diluição testada. A concentração de DNA nas diluições variou de 907ng/μl até 141ng/μl para cepa controle KPC positiva e de 310 ng/μl até 34 ng/μl de DNA para cepa controle NDM positiva. Esta análise inicial nos mostra que para alcançar o nível de limite de detecção se faz necessária a realização de diluições ainda maiores, para que se possa avaliar a partir de qual concentrações o protótipo começa a perder a sua capacidade de detectar o gene-alvo em 100% das vezes testadas.

6. DISCUSSÃO

A emergência e a disseminação de carbapenemases entre enterobactérias através da última década representa um sério problema dentro do ambiente hospitalar. Este fato é preocupante, especialmente porque essas enzimas são capazes de hidrolisar diversos antibióticos beta-lactâmicos além dos carbapenêmicos. Os genes codificadores dessa resistência geralmente estão localizados em elementos genéticos móveis, o que facilita a disseminação da resistência entre diferentes bactérias. (BUSH *et al.*, 2011; QUENNAM *et al.*, 2007; PATEL *et al.*, 2011). Bactérias Gram-negativas produtoras de carbapenemases tem sido associadas com o aumento de mortalidade e com a presença de surtos que geram grandes desafios para o tratamento terapêutico e o controle de disseminação (PATEL *et al.*, 2011). Por essas razões, a disseminação intra e inter hospitalar dessas enzimas tem se tornado a principal preocupação das equipes médicas, sendo o diagnóstico rápido e preciso a melhor maneira de reduzir a disseminação da resistência entre esses microrganismos (NAAS *et al.*, 2012).

A rápida identificação de carbapenemases em patógenos da família Enterobacteriaceae é crítico para o controle da disseminação desses patógenos, e pode ser realizada através de detecção molecular (SIEGEL *et al.*, 2006). Em alguns casos a identificação rápida de microrganismos e o seu perfil de resistência pode salvar vidas de pacientes internados, contudo atualmente na maioria dos hospitais a identificação da resistência pode levar de 24-96 horas. Como solução para a identificação fenotípica que costuma ser lenta, diversos meios de cultura cromogênicos tem sido propostos para detecção de cepas produtoras de carbapenemases. Contudo, apesar de algumas vantagens quanto a redução no tempo de identificação muitos deles possuem desvantagens como a identificação errônea de cepas resistentes com baixos valores de CIM assim como a baixa sensibilidade para cepas que não possuem co-produção de mais de uma beta-lactamase.(CARRER *et al.*, 2010; NORDMAN *et al.*, 2012)

A proposta deste estudo é o desenvolvimento de uma metodologia para detecção de carbapenemases do tipo KPC e NDM através de *q*PCR, para a produção de um futuro Kit de identificação em parceria com Bio-Manguinhos que seja rápida, eficaz e aplicável a rotina laboratorial servindo como resposta á demanda por diagnósticos de alta qualidade e com maior rapidez.

O primeiro passo da metodologia proposta envolve a etapa de extração de DNA para detecção dos genes alvos. Estudos recentes abordam diversas metodologias de extração para

detecção de carbapenemases através de *qPCR*. Naas e colaboradores em 2012 realizou a extração das cepas de seu estudo através do Kit de extração QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Les Ulis, France) e obteve sucesso em seus experimentos para a detecção de carbapenemase do tipo OXA-48. Outro estudo conduzido por Monteiro e colaboradores em 2012 utilizou uma metodologia de extração baseada em *beeds* magnéticas através da plataforma NucliSens easyMAG (bioMe´rieux, France) também para detecção de carbapenemases em PCR em tempo real. Ainda outros estudos descrevem a sua metodologia de extração através de tampão de lise, para a realização de uma extração química, que duram em média cerca de uma hora. (MANGOLD *et al* .,2011; VASOO *et al.*, 2013). Todas as técnicas de extração descritas acima levaram a obtenção de resultados satisfatórios, entretanto a demanda de tempo para realização das mesmas pode aumentar o tempo total previsto para o diagnóstico, da mesma forma a utilização de *kits* de extração são muito onerosos e demandam uma série de etapas para a obtenção do DNA final a ser utilizado como *template* na reação de *qPCR*.

De maneira oposta aos trabalhos descritos a cima, a metodologia proposta por este estudo, escolheu como metodologia de extração uma técnica simples, pouco onerosa, e muito rápida, que seria a utilização de uma pequena colônia bacteriana adicionada diretamente ao *mix* de reagentes a ser utilizado para detecção dos alvos, as células bacterianas seriam lisadas durante a ativação da Taq *polimerase* (Taq *hot-start*). Os resultados descritos nesse trabalho se mostraram de grande valia, através da observação de curvas perfeitas de amplificação para os genes *bla_{KPC}* e *bla_{NDM}* a partir da utilização desta técnica. De certo, vale ressaltar que a utilização de reagentes de boa qualidade favoreceram a realização da técnica mesmo com condições tão simples de obtenção de DNA bacteriano.

Sabe-se que a ciclagem e o tempo que um reação de *qPCR* varia essencialmente de acordo com o tipo de reação (*One step* ou *Two step*), o material escolhido como *template* e os alvos selecionados. Geralmente a detecção de carbapenemases em bactérias Gram-negativas através de PCR em tempo real dura entre quatro e cinco horas, incluindo etapas de extração de DNA por métodos químicos e análise dos resultados (MONTEIRO *et al* 2012; NAAS *et al.*, 2012).

Em nosso trabalho, foram testadas duas metodologias de ciclagem, sendo a ciclagem desenvolvida pelo CDC (CDC, 2011) escolhida como ciclagem definitiva para avaliação do protótipo. Esta ciclagem consistia em (Desnaturação: 95°C por 10 min.; Anelamento: 40 ciclos 95°C por 3 seg.; Extensão: 60°C / 30 seg.), totalizando o tempo médio para a mistura de reagentes, ciclagem/reação na plataforma *qPCR*, mais a avaliação dos resultados, de duas a três horas dependendo no número de amostras analisadas. A metodologia de extração simples

utilizada no protótipo contribuiu para a diminuição de tempo para diagnóstico, assim como a ciclagem de rápida duração. O protótipo conseguiu unir uma a detecção eficaz de cepas produtoras de carbapenemases do tipo KPC e NDM em um curto período de tempo, sendo ainda mais rápido do que outros trabalhos publicados recentemente (COLE *et al.*, 2009; NAAS *et al.*, 2012, MEDEIROS *et al.*, 2012).

Hidiyeh e colaboradores em 2008 descreveram o desenvolvimento e a validação de um ensaio de *qPCR* para a detecção do gene *bla_{KPC}* “in house”. A validação foi realizada comparando os resultados obtidos através do ensaio em *qPCR* com testes fenotípicos convencionais. Além disso, duas metodologias de extração foram testadas o KIT bioMérieux NucliSENS easyMAG e o Roche MagNA Pure LC DNA isolation kit III (bacteria, fungi). O desenvolvimento do ensaio de *qPCR* foi realizado nas plataformas de detecção ABI PRISM PRISM Prism 7700, 7500, e 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). Assim como em nosso trabalho, a otimização da reação foi realizada partir de diferentes concentrações de sondas e iniciadores, Os melhores resultados foram obtidos com iniciadores na concentração de 300 nM e na concentração de 200nM para sondas. A reação foi realizada utilizando o MasterMix Plus reaction buffer (Eurogentec, Belgium) adicionado da referencia passiva ROX. Foram testadas cepas controles carreadoras do gene *bla_{KPC}*, e mesmo após vinte ensaios sequenciais a cepa controle mostrou resultado positivos com valor de *Ct* igual a 29.6. Quando os resultados obtidos através do ensaio em *qPCR* foram comparados com os resultados obtidos através da técnica fenotípica de detecção de KPC, foi possível observar maior sensibilidade para a técnica molecular pois determinou a positividade da resistência em sete amostras consideradas negativas através do teste fenotípico. Adicionado a isto, o tempo previsto para o diagnóstico através de *qPCR* durou em média 3 horas enquanto a técnica de análise fenotípica demanda cerca de 24 horas para liberação dos resultados.

Os resultados descritos acima corroboram com os resultados descritos por este estudo, ressaltando a importância da otimização de técnicas moleculares para a detecção de carbapenemases. A adição da referência passiva ROX ao MastreMix é fundamental para a equalização de fluorescência durante a reação, a sua importância foi observada durante a otimização do MIX IBMP testado durante este estudo. A adição do ROX, melhorou os resultados obtidos através do MIX IBMP, tornando-os similares aos obtidos através do KIT NAT (que já possui o ROX em sua composição), Diversos estudos mostram a adição de ROX em suas reações para a detecção de carbapenemases (HINDIYEH *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013)

A determinação da melhor concentração de sondas e iniciadores em um ensaio de *q*PCR pode influenciar diretamente no valores de *Ct* dos alvos pesquisados. Em nosso trabalho, os ensaios de otimização foram realizados a partir de cinco condições diferentes em triplicatas, com concentrações que variavam de 0,1 μ M à 0,4 μ M para sondas, e de 0,2 μ M à 0,6 μ M para iniciadores. As melhores concentrações de sondas e iniciadores estavam presentes na condição 1 (0,2 μ M e 0,4 μ M respectivamente) apresentando os *Ct* médio de 17,43 para KPC e 20,53 para NDM, valores similares aos encontrados por Zheng e colaboradores em 2013, que a partir de uma reação duplex para a detecção de KPC e NDM, padronizaram um ensaio que resultaram em valores de *Ct* de 19,3 para KPC e 22,8 para NDM.

Na china, um trabalho desenvolvido por Zheng e colaboradores mostrou um diferencial relevante para a padronização do ensaio, que foi a utilização de cepas transformadas *in vitro* carreadoras de plasmídeos recombinantes pNDM-1 e pKPC-2. Dessa forma foi possível rastrear a quantidade de cópias do gene alvo durante as análises mais profundas de LOD (limite de detecção), e eficiência de reação. Assim como a maioria dos estudos publicados a extração do DNA foi realizada através de um KIT de extração, neste caso o Kit utilizado foi o TaKaRa MiniBEST DNA Fragment Purification Kit Ver.3.0 (TaKaRa Bio, Inc.). A plataforma utilizada foi o ABI PRISM 7500 apparatus (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Os resultados mostraram que o ensaio é altamente estável e preciso evidenciado pela performance da amplificação dos genes presentes nos plasmídeos recombinantes no qual permaneceram estáveis após cinco corridas consecutivas. Este ensaio uma vez padronizado foi testado frente a 157 cepas caracterizadas previamente como enterobactérias resistentes aos carbapenemicos, incluindo sete amostras produtoras de NDM e 10 produtoras de KPC, 140 cepas negativas para ambos os genes. Os ensaios mostraram 100% de especificidade e sensibilidade.

Outro estudo conduzido por Anneke e colaboradores em 2014 publicaram um trabalho que descreve ensaio *q*PCR multiplex para a detecção das carbapenemases NDM, KPC, VIM, IMP e OXA-48. Para cada carbapenemase escolhida, as concentrações de iniciadores e sondas foram otimizadas tanto em reações “single” quanto para as reações “multiplex”. O controle interno utilizado nas reações era o PhHV (Phocinen Herpes Virus). Para a avaliação da especificidade foram testadas uma coleção de 86 cepas incluindo 58 produtoras de carbapenemases e 28 controles negativos. As 58 cepas produtoras de carbapenemases incluíam diversas espécies (45 *K. pneumoniae*, 4 *E. coli*, 3 *Enterobacter sp.*, 2 *P. mirabilis*, 2 *Citrobacter sp.*, e 2 *P. aeruginosa*). As cepas foram semeadas em Agar e em caldo, e a extração foi realizada através de lise química, utilizado a solução de extração: Extraction

Solution (SIGMA, E7526). Com os ensaios foi possível observar que todas as cepas produtoras de carbapenemases foram positivas com valores de Ct variando de 15.4 - 23 para as cepas crescidas em Ágar, e com valores de Ct de 20.1 - 28 para culturas em caldo, correspondendo a sensibilidade de 100 %. Todas as 26 cepas negativas mostraram resultados negativos no ensaio de $qPCR$, correspondendo a especificidade de 100%.

A metodologia para a identificação de especificidade e sensibilidade realizada por Aneneke e colaboradores em 2014 mostrou a utilização de diversas espécies para identificação de carbapenemases em $qPCR$. Nosso trabalho realizou os ensaios para a determinação de especificidade e sensibilidade a partir de 100 cepas previamente identificadas pertencentes a dez espécies. A espécie *Klebsiella pneumoniae* foi a mais prevalente entre as amostras selecionadas, seguidas das espécies *Enterobacter aerogenes* e *Acinetobacter baumannii*. Assim, foi possível identificar 100 % de especificidade para a identificação do gene bla_{KPC} , (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo valores de Ct entre 11 e 17 e 100 % de especificidade para identificação do gene bla_{NDM} (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo valores de Ct entre 15 e 22. Não foram observados resultados “falso positivos”, todas as amostras negativas amplificaram somente o controle interno o 16S RNA resultando em 100 % de sensibilidade com a detecção de 20 cepas negativas.

Alguns trabalhos recentemente publicados padronizam reações de $qPCR$ para a detecção de carbapenemases através da metodologia chamada HRM, ou High Resolution Melting (HEMARAJATA *et al.*, 2015; ROTH *et al.*, 20113; MONTEIRO *et al.*, 2011). Esta técnica não utiliza sondas específicas para os alvos em sua reação, do contrário, em seu Mastermix utilizam corantes intercalantes de DNA, como o SYBERgreen (Applied Biosystems), ou o EVAgreen (Quiagem). Quando utilizadas em reações “multiplex” avaliam a diferenciação entre alvos através da Tm (temperatura de *melting*), ou seja, temperatura na qual metade do DNA na solução está desnaturado (fita simples) cada alvo possuirá uma Tm diferente, o que permitirá a sua posterior diferenciação. Um estudo conduzido por Monteiro e colaboradores em 2011 desenvolveu um ensaio para detectar seis diferentes tipos de carbapenemases (KPC, GES, NDM, IMP, VIM e OXA-48), o equipamento utilizado neste ensaio foi o Rotor-Gene 6000 instrument (Corbett Life Science, Valencia, CA, USA). Cada uma das carbapenemases testadas apresentaram diferentes curvas de melting após a amplificação: bla_{IMP} (Tm 80.18C), bla_{OXA-48} (Tm 81.68C), bla_{NDM-1} (Tm 84.8C), bla_{GES} (Tm 88.68C), bla_{VIM} (Tm 90.38C) e bla_{KPC} (Tm 91.68C), nenhuma amplificação foi observada para os controles negativos. E os resultados mostraram 100% de concordância com os genótipos identificados

previamente, dessa forma o estudo concluiu que o ensaio é capaz de detectar a presença de seis diferentes carbapenemases de uma única vez em 3 horas (MONTEIRO *et al.*, 2011).

Existem discordâncias a respeito da utilização da metodologia de diferenciação de curvas de melting para a detecção de alvos em um sistema multiplex. (Handbook Manual, Applied Biosystems, 2015). Ensaio de especificidade são de grande importância para a avaliação de desempenho de qualquer teste. Ensaio baseado na atuação de corantes intercalantes de DNA não se beneficiam de sua especificidade quando comparados com ensaios realizados através de sondas, fazendo deles mais vulneráveis a problemas de variação gênica, como a porcentagem do conteúdo GC dos alvos, ou diferenças alélicas. Os corantes intercalantes de DNA, como o SYBERgreen se liga a qualquer produto amplificado, sendo este o gene alvo, ou não, e todos esses sinais são somados produzindo um único sinal de amplificação, por isso utiliza-se a curva de dissociação que analisa o valor de T_m produzido reação. Dessa forma muitos autores optaram pela utilização de sondas para o desenvolvimento de sua metodologia de qPCR (NAAS *et al.*, 2011; COLE *et al.*, 2008; ZHENG *et al.*, 2013; HINDIYEH *et al.*, 2008).

Sabe-se que o desenvolvimento de uma metodologia para a detecção qualitativa de genes através de qPCR demandam diversas etapas experimentais que permitem a avaliação de parâmetros que estabelecem a qualidade do ensaio (BUSTIN *et al.*, 2009). Neste trabalho até o momento foi possível padronizar a reação quanto a metodologia de extração, escolha e concentração dos reagentes, especificidade e sensibilidade da reação. A detecção da LOD a partir da diluição seriada por dez vezes, seguida da quantificação do material diluído nos permitiu descrever que o ensaio consegue detectar a presença dos genes em concentrações mínimas de DNA. Para avaliação plena desses resultados se faz necessária a construção de curvas padrão para cada um dos alvos, para melhor determinação da LOD, eficiência de reação, linearidade e reprodutibilidade. O objetivo desse trabalho é criar um protótipo que possa ser utilizado como base para a criação de um KIT rápido e simples para identificação de carbapenemases nos hospitais e laboratórios de diagnóstico. Os resultados propostos até o momento indicam que o protótipo funciona e é capaz de detectar a presença das carbapenemases KPC e NDM mesmo através de uma única colônia de crescimento bacteriano, podendo ser utilizado “in house” para a detecção das carbapenemases KPC e NDM. A partir desses resultados pretende-se avaliar outros parâmetros para a validação completa da metodologia, para assim prosseguir com a pesquisa para formulação do KIT.

A genética das bactérias multirresistentes à drogas tem nos ensinado o quanto é difícil prevenir a sua emergência. Dessa forma estudos de padronização de metodologias de

diagnóstico para genes de resistência podem servir de ferramenta para reconduzir de maneira rápida o paciente a outras terapias antimicrobianas mais eficazes para cada caso específico de infecção. A detecção contínua da presença desses genes aliado a vigilância e controle de infecções podem prevenir a disseminação destes genes, seja no ambiente hospitalar, ou na própria comunidade. (SMITH *et al.*, 2008; BOTES *et al.*, 2012; VASOO *et al.*, 2013).

7. CONCLUSÕES

- A utilização de uma colônia da placa mostrou-se ser um método simples e rápido para a amplificação dos genes codificadores de carbapenemases.
- O protocolo preconizado pelo CDC revelou-se rápido e eficaz.
- A concentração ideal para as sondas foi de 0,2 μ M e para iniciadores 0,4 μ M .
- O desempenho do MIX NAT teve melhor desempenho que o MIX IBMP, permanecendo com maior sensibilidade e com resultados constantes depois de vários testes,
- A análise de bioequivalência de fabricantes mostrou melhores resultados a partir da combinação de iniciadores e sondas BIOSEARCH; e com a combinação de iniciadores IDT e sondas BIOSEARCH.
- Identificou-se 100 % de especificidade para a identificação do gene *bla*_{KPC} , (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo variação nos valores de *Ct* entre 11,0 à 17,0.
- Identificou-se 100 % de especificidade para identificação do gene *bla*_{NDM} (40 cepas detectadas de 40 cepas positivas) possuindo variação nos valores de *Ct* entre 15,0 à 22,0.
- Não se detectou a presença de resultados “falso positivos”, todas as amostras negativas amplificaram somente o controle interno o 16S RNA resultando em 100 % de sensibilidade com a detecção de 20 cepas negativas.
- O protótipo proposto, produzido dentro das boas práticas de fabricação, é capaz de detectar a presença das carbapenemases KPC e NDM. Desta forma, podemos passar da etapa de produção de Protótipo para a produção do KIT em maior escala.

REFERENCIAS.

ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**.1940;146:837.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Investigação e controle de bactérias multiresistentes. Brasília (DF); 2007 [citado 2012 nov 3]. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Roteiro de inspeção do programa de controle de infecção hospitalar. RDC nº 48, de 2 de junho de 2000. Diário Oficial Uniao. 6 jul 2000;Seção I:1415.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Bol inform Secur Pac Qual Serv Saude.2011 [citado 2013 fev 2];I(1):p.1-12.

ALBUQUERQUE, Y.M.; LIMA, A.L.; LINS, A.K.; MAGALHÃES, M.; MAGALHÃES, V. Quantitative real-time PCR (q-PCR) for sputum smear diagnosis of pulmonary tuberculosis among people with HIV/AIDS. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 2014 Mar-Apr;56(2):p.139-42.

AMBLER, R.P.; The Structure of β -Lactamases. **Biological Sciences**. 1980;289(1036)p.321-331.

ANDRADE, S.S.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; PEREIRA, A.S.; PIGNATARI, A.C.C; GALES, A.C. Increased resistance to first-line agents among bacterial pathogens isolated from urinary tract infections in Latin America: time for local guidelines?. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 101(7): p.741-748, November 2006.

ANDRUS, T.; COX, W.; GRAY, B.; KILLINGSWORTH, C.; STEINER, P.; MCPHERSON, B. Nonprofit health care organizations and universal health care coverage. **Inquiry**. 2008 Spring;45(1):7-14. **Antibiotics (Tokyo)** 1990;43:p.1302-6.

ARNOLD, R.S.; THOM, K.A.; SHARMA, S.; PHILLIPS, M.; KRISTIE, J.J.; MORGAN, D.J. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Southern Medical Journal** 2011;p.104:40-5.

BARTLETT, J. M. S.; STIRLING, D. "A Short History of the Polymerase Chain Reaction". PCR Protocols. 2003. 226. pp. 3-6. CHAMBERLAIN JS, GIBBS RA, RANIER JE, NGUYEN PN, CASKEY CT. "Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification". **Nucleic Acids Research** 1988. 16 (23): p.11141-11156.

BAUMANN, P. Isolation of *Acinetobacter* from soil and water. **J. Bacteriol**. 1968 Jul;96(1):p.39-42.

BEIRÃO, E.M.; FURTADO, J.J.; GIRARDELLO, R.; FERREIRA FILHO, H.; GALES, A.C. Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **Braz J Infect Dis**. 2011 Jan-Feb;15(1):p.69-73.

BEREKET, W.; HEMALATHA, K.; GETENET, B.; Update on bacterial nosocomial infections. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. 2012 Aug;16(8):p.1039-44.

BERNARD, P.S.; WITTEWER, C.T. Real-time PCR technology for cancer diagnostics. **Clin Chem** 2002;48:p.1178–1185.

BILLARD-POMARES, T.; HERWEGH, S.; WIZLA-DERAMBURE, N.; TURCK, D.; COURCOL, R.; HUSSON, M. O. Application of quantitative PCR to the diagnosis and monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* colonization in 5-18-year-old cystic fibrosis patients. **J Med Microbiol**. 2011 Feb;60(Pt 2):p.157-61.

BOUZA, E.; MOLINA, J.P. & MUÑOZ, P. On behalf of Cooperative Group of European Study Group on Nosocomial Infections (ESGNI). Report of ESGNI-001 and ESGNI-002 studies. **Bloodstream infections in Europe**. Clin. Microbiol. Infect. 5, p.2s1-2s12, 1999

BRADFORD, A.P. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. **Clin Microb Rev**. 2001;4(14):p.933-51.

BRADFORD, P.A.; BRATU, S.; URBAN, C.; VISALLI, M.; MARIANO, N.; LANDMAN, D.; RAHAL, J.J.; BROOKS, S.; CEBULAR, S.; QUALE, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. **Clin Infect Dis**. 2004 Jul 1;39(1):p.55-60.

BRASIL – ANVISA - Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008 – Boletim informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em serviços de Saúde – Rede RM, Ano III - Edição nº 1, de 10 de julho de 2009

BRASIL – ANVISA - MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS. Nota técnica 1º/2013.

BRASIL – ANVISA – UIPEA - GGES. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes. **Nota Técnica Nº1/2010**

BRASIL- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Principais Síndromes Infeciosas (Manual-MóduloI). 2005 [Acesso em 18 jan. 2016] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/microbiologia.asp>.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) no. 48 de 2 de junho de 2000. Diário Oficial da União 6 de julho de 2000. São Paulo: Produtos e Resoluções em Vigilância Sanitária/Optionline; 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria no. 2616 de 12 de maio de 1998 [site da Internet]. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/portaria2616.html>. Acessado em 15 janeiro de 2005.

BRASIL, Ministério da Saúde. Portaria no. 32 de 16 de fevereiro de 1993. Diário Oficial da União 17 de fevereiro de 1993 [CD-ROM]. São Paulo: Produtos e Resoluções em Vigilância Sanitária Optionline; 2016

BRASIL, Presidência da República. Lei no. 9431 de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. Diário Oficial da União 7 de dezembro de 1997 [CD-ROM]. São Paulo: Produtos e Resoluções em Vigilância Sanitária/ Optionline;2016.

BRATU, S. M.; MOOTY, S. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**: p.3018–3020.2005.

BURLINGTON, M.A.: Lahey Clinic; 2012, <http://www.lahey.org/Studies/> [accessed 18.01.16].

BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Current Opinion in Microbiology* 2010;13:p.558–64

BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Curr.Opin.Microbiol.*2010,13;p.558–64.

BUSH, K.; COURVALIN, P.; DANTAS, G.; DAVIES, J.; EISENSTEIN, B.; HUOVINEN, P. Tackling antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology* 2011;9:p.894–6.

BUSH, K.; FISHER, J.F. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2011;65:p.455-78.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. *Antimicrob Agents Chemother.* 2010 Mar;54(3):p.969-76.

BUSTIN, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000;25:p.169 –93.

BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR (qRT-PCR) and its potential use in clinical diagnosis. *Clin Sci (Lond)* 2005;109:p.365–79.

BUSTIN, S.A.; MUELLER, R. Real-time reverse transcription PCR and the detection of occult disease in colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2006;27: p.192–223.

BUSTIN, S.A.; BENES, V.; GARSON, J.A.;HELLEMANS, J.; HUGGETT, J.; KUBISTA, M.; MUELLER, R.; NOLAN, T.; PFAFFL, M.W.; SHIPLEY, G.L.; VANDESOMPELE, J.;WITTEWER, C.T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem.* 2009 Apr;55(4):p.611-22

CARRE, R. A.; FORTINEAU, N.; NORDMANN, P. Use of ChromID ESBL medium for detecting carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. *J Clin Microbiol.* 2010; 48: p.1913–4.

CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R.M.; BERIÃO, G.C.; CHAGAS, T.P.; TIMM, L.N.; DA SILVA, R.C.; FALCI, D.R.; ASENSI, M.D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. *J Antimicrob Chemother.* 2013 Dec;68(12):2956-7. doi: 10.1093/jac/dkt298. Epub 2013 Jul 18.

CDC. surveillance definition of health care-associated infection, Manual, acessado em Janeiro de 2016.

CHI, C.Y.; WANG, S.M.; LIN, C.C.; & LIU, C.C. Microbiological characteristics of community-associated *Staphylococcus aureus* causing uncomplicated infective endocarditis. **Jour Clin Microbiol**, 48(1),p. 292–294, 2010

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S19 CLSI, Wayne, PA, 2012.

CONSELHO FEDERAL DE FARMÁCIA. Resolução no. 300 de 30 de janeiro de 1997. Regulamenta o exercício profissional em farmácia de unidade hospitalar, clínica e casa de saúde de natureza pública ou privada. Em: Conselho Federal de Farmácia. A organização jurídica da profissão farmacêutica. 4º ed. Brasília: Conselho Federal de Farmácia; 2003. Pp. 210–1.

CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA. Resolução no. 1552 de 20 de agosto de 1999. Diário Oficial da União 17 de setembro de 1999 [CD-ROM]. São Paulo: Produtos e Resoluções em Vigilância Sanitária/ Optionline; 2016.

COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Euro Surveil**. 2008 Nov 20;13(47).

CORNAGLIA, G.; ROSSOLINI, G.M. The emerging threat of acquired carbapenemases in Gram-negative bacteria. **Clin Microbiol Infect**. 2010 Feb;16(2):p.99-101. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03114.x.

COSTA, A.C.; SILVA, M.G. & NORIEGA, E. Manual de operacionalização do Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção Associada aos Cuidados de Saúde. Ministério da Saúde, Portugal, 2007. Disponível em <http://www.arslvt.min-saude.pt>. Acessado em 1/6/2013.

COSTA, L.M.; FLEMING, M.E.; DE PAULA, G.R.; TEIXEIRA, L.A.; MONDINO, P.J.; DE MONDINO, S.S.; MENDONÇA-SOUZA, C.R.; Production of metallo- β -lactamase among *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in the State of Sergipe, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**. 2015 Mar-Apr;48(2):p.212-5. doi: 10.1590/0037-8682-0198-2014.

D'ALINCOURT, A.P.; LEÃO, R.S.; DA SILVA, R.V.; FERREIRA, A.G.; SEKI, L.M.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, 68 (3): p.337-8, 2010.

D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A.P.; LEÃO, R.S.; DA SILVA, R.V.; FERREIRA, A.G.; SEKI, L.M.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2010 Nov;68(3):p.337-338.

D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A.P.; LEÃO, R.S.; DA SILVA, R.V.; FERREIRA, A.G.; SEKI, L.M.; ASENSI, M.D.; MARQUES, E.A. *Escherichia coli* producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2010 Nov;68(3):337-8. 107.

DAL-PAZ, K.; OLIVEIRA, P.R.; PAULA, A.P.; EMERICK, M.C.; PÉCOR, J.R. & LIMA, A.L. Economic impact of treatment for surgical site infections in cases of total knee arthroplasty in a tertiary public hospital in Brazil. **Braz J Infect Dis**, 14(4):356-359, 2010

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. *Nature*. 1965;208:239-44.

DAVIES, T.A.; QUEENAN, A.; MORROW, B.J.; SHANG, W.; AMSLER, K.; HE, W. Longitudinal survey of carbapenem resistance and resistance mechanisms in Enterobacteriaceae and non-fermenters from the USA in 2007–2009. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** 2011;66:2298–307.

DORTET, L., I. RADU, V. GAUTIER, F. BLOT, E. CHACHATY, AND G. ARLET. 2008. Intercontinental travels of patients and dissemination of plasmid-mediated carbapenemase KPC-3 associated with OXA-9 and TEM-1. **J. Antimicrob. Chemother.** 61:455–457.

DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three Decades of β -Lactamase Inhibitors. **Clin Microbiol Rev.** Jan 2010; 23(1): 160–201.

EBER, M.R.; LAXMINARAYAN, R.; PERENCEVICH, E.N. & MALANI, A. Clinical and economic outcomes attributable to health care–associated sepsis and pneumonia. **Arch Intern Med**, 170(4),347-353, 2010.

ESTAPÉ, J.V.; ZBOROMYRSKA, Y. **Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas.** **Gastroenterol Hepatol.** 2011 doi:10.1016/j.gastrohep.

European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). EUCAST Clinical Breakpoint Table v. 1.3 2011-01-05, *Enterobacteriaceae*; 2011.

FALAGAS, M.E.; KASIAKOU, S.K.; Colistin: The revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. **Clin Infect Dis.** 2005;40:133- 41.

FOGLIA, E.E.; FRASER, V.J. & ELWARD, A.M. Effect of nosocomial infections due to antibiotic-resistant organisms on length of stay and mortality in the pediatric intensive care unit. **Infect Control Hosp Epidemiol**, 28(3), 299-306, 2007.

GALES, A.C., JONES, R.N., TURNIDGE J., RENNIE, R. & RAMPHAL, R. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-1999. *Clin. Infect. Dis* 2001. 32: suppl. 2, 146-155.

GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis.** May 30. (2012).

GALETTI, R.; ANDRADE, L.N.; CLÍMACO, E.C; PITONDO-SILVA, A.; FERREIRA, J.C.; DARINI, A.L. Genomic diversification and virulence features in SPM-1-producing *Pseudomonas aeruginosa* 13 years later. **Diagn Microbiol Infect Dis.** 2015 Jun;82(2):179-80. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2015.02.011. Epub 2015 Feb 26.

GARAU, G.; GARCÍA-SÁEZ, I.; BEBRONE, C.; ANNE, C.; MERCURI, P.; GALLEN, M. Update of the standard numbering scheme for class B β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2004;48:2347–9.

GAYNES, B.N.; RUSH, A.J.; TRIVEDI, M.; WISNIEWSKI, S.R.; BALASUBRAMANI, G.K.; SPENCER, D.C.; PETERSEN, T.; KLINKMAN, M.; WARDEN, D.; SCHNEIDER, R.K.; CASTRO, D.B.; GOLDEN, R.N. A direct comparison of presenting characteristics of depressed outpatients from primary vs. specialty care settings: preliminary findings from the STAR*D clinical trial. **Gen Hosp Psychiatry.** 2005 Mar-Apr;27(2):87-96.

GIAMARELLOU, H.; ANTONIADOU, A.; KANELLAKOPOULOU, K. *Acinetobacter baumannii*: a universal threat to public health? **Int J Antimicrob Agents** 2008; 32(2):106-119.

GREENE, J. The new pace of strategic planning. **Hosp Health Netw.** 2009 Nov;83(11):31-2, 34, 1.

GREENE, L.R.; CAIN, T.A.; KHOURY, R.; KRISTOFIAK, S.P.; PATRICK, M.; STREED, S. The importance of surveillance technologies in the prevention of health care-associated infections. **Am J Infect Control.** 2009; 37(6): 510–3.

GREENWOOD, D. **Antimicrobial Chemotherapy. 5ed. Oxford: Oxford University Press; 2000.**

GUPTA, N.; LIMBAGO, B.M.; PATEL, J.B.; KALLEN, A.J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clinical Infectious Diseases.** 2010;36(3): S8-S14.2011;53:60–7.

HEBDEN, J.N. Rationale for accuracy and consistency in applying standardized definitions for surveillance of health care-associated infections. **Am J Infect Control.** 2012; 40(5) Suppl: S29–S31.

HEMARAJATA, P.; YANG, S.; HINDLER, J.A.; HUMPHRIES, R.M.; Development of a novel real-time PCR assay with high-resolution melt analysis to detect and differentiate OXA-48-Like β -lactamases in carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol.** 2013 Jan;51(1):61-5. doi: 10.1128/JCM.02193-12. Epub 2012 Oct 17.

HERNANDES, R.T.; ELIAS, W.P.; VIEIRA, M.A.M.; GOMES, T.A.T. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. **FEMS Microbiol Lett.** 2009 Aug;297(2):137-49

HIDRON, A.I. et al. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 2008 Nov;29(11):996-1011. doi: 10.1086/591861.

HIGUCHI, R.; DOLLINGER, G.; WALSH, P. S.; GRIFFITH, R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. **Biotechnology (N Y)** 1992;10:413–7.

HIGUCHI, R.; FOCKLER, C.; DOLLINGER, G.; WATSON, R. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions. **Biotechnology (N Y)** 1993;11:1026–30.

HORIZON PRESS- Real Time PCR: The Basic Theory. Theory and explanation of Real-Time Polymerase Chain Reaction (adaptado de Bustin et al 2012 An Introduction to the real-time polymerase chain reaction qPCR). [Acesso em 09 dez. 2012]. Disponível em: <http://www.horizonpress.com/pcr/realtime-pcr-basics.html>

JACOBY, G.; BUSH, K. b-Lactamase classification and amino acid sequences for TEM, SHV and OXA extended-spectrum and inhibitor resistant enzymes. Burlington, MA: **Lahey Clinic**; 2012, <http://www.lahey.org/Studies/> [accessed 04.12.12].

JERASSY, Z.; YINNON, A.M.; MAZOUZ-COHEN, S.; BENENSON, S.; SCHLESINGER, Y.; RUDENSKY, B. & RAVEH, D. Prospective hospital-wide studies of 505 patients with nosocomial bacteraemia in 1997 and 2002. **J Hosp Infect** 62(2), 230-236, 2006.

JOSEPH SAMBROOK AND DAVID W. RUSSEL. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Terceira ed.). Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001. Capítulo 8: In vitro Amplification of DNA by the Polymerase Chain Reaction

KAPER, J.B.; NATAROJP, AND MOBLEYHLT. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nat Rev Microbiol**. 2004 Feb;2(2):123-40.

KERR, K.G., SNELLING A.M., *Pseudomonas aeruginosa*: a formidable and ever-present adversary. **Journal of Hospital Infection**. 2011. 73, 338-344.

KILGORE, M. & BROSENETTE, S. Cost of bloodstream infections. **Am J Infect Control**, 36(10): S172.e1-3, 2008.

KLEVENS, R.M.; EDWARDS, J.R.; RICHARDS, C.L.; HORAN, T.C.; GAYNES, R.P.; POLLOCK, D.A.; CARDO, D.M. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, **2002**. Public Health Rep. 2007 Mar-Apr;122(2):160-6

KROPP, H.; SUNDELOF, J.G.; KAHAN, J.S.; KAHAN, F.M.; BIRNBAUM, J. MK0787 (N-formimidoyl thienamycin): evaluation of in vitro and in vivo activities. **Antimicrob Agents Chemother**. 1980 Jun;17(6):993-1000.

KUBISTA, M.; ANDRADE, J.M.; BENGTSSON, M.; FOROOTAN, A.; JONAK, J.; LIND, K.; The real-time polymerase chain reaction. **Mol Aspects Med** 2006;27:95–125

LEAVITT, A.; S. NAVON-VENEZIA; I. CHMELNITSKY; 2007. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrob. Agents Chemother**. **51**: 3026–3029.

LEE, K.; CHONG, Y.; SHIN, H.B.; KIM, Y.A.; YONG, D.; YUM, J.H. Modified Hodge and EDTA disk synergy tests to screen metallo-beta-lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clin Microbiol Infect**. 2001 Feb;7(2):88-91.

MACKAY, I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. *Clin Microbiol Infect* 2004;10:190–212.

MACKAY, I.M.; ARDEN, K.E.; NITSCHKE, A. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 2002;30:1292–305.

MALTEZOU, H.C., P. GIAKKOUI, A. MARAGOS., 2009. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). *J. Infect.* **58**: 213–219.

MARQUES, M V. *Biologia Molecular e Genética Bacteriana*. Ribeirão Preto, 2012. Sociedade Brasileira de Genética

MARTINS, A.F.; KUCHENBECKER, R.S.; PILGER, K.O.; PAGANO, M.; BARTH, A.L.; the CMCIES-PMPA/SMS Task Force. High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in southern Brazil. *Am J Infect Control* 2013; 40(2):108-112.

MCCONNELL, M.J.; ACTIS, L.; PACHÓN, J. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev* 2012.

MENDES, C.; OPLUSTIL, C.; SAKAGAMI, E.; TURNER, P.; KIFFER C.; AND MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobiol Suscetibility in Intensive Care Units: MYSTIC program Brazil 2002. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*. v.9, p.44-51, 2005.

MERTENS, K.; MORALES, I.; CATRY, B. Infections acquired in intensive care units results of national surveillance in Belgium, 1997-2010. *J Hosp Infect*. 2013; 84(2): 120–5.

MESAROS, N., NORDMANN, P., PLÉSIAT, P., ROUSSEL-DELVALLEZ, M., VAN ELDERE, J., GLUPCZYNSKI, Y., VAN LAETHEM, Y., JACOBS, F., LEBECQUE, P., MALFROOT, A., TULKENS, P.M., VAN BAMBEKE, F. *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapeutic options at the turn of the new millennium. *Clinical Microbiology and Infection* 2007. 13,6: 560–578.

MEZZATESTA, M.L., F. GONA, C. CAIO, 2011. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. *Clin.Microbiol. Infect.* **17**: 1444–1447.

MICHAEL, T. MADIGAN; JOHN, M.; MARTINKO, PAUL, V. DUNLAP, DAVID, P. CLARK. *Microbiologia de Brock*.10. ed. 2010.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, 53: 333–334, 2009.

MOSCA, A.; MIRAGLIOTTA, L.; DEL PRETE, R.; TZAKIS, G.; DALFINO, L.; BRUNO, F.; PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PIAZZA, A.; MIRAGLIOTTA, G.; Rapid and sensitive detection of bla KPC gene in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* by a molecular real-time assay. [Springerplus](#). 2013 Dec;2(1):31. Epub 2013 Jan 30.

MULLIS, KARY. "The unusual origin of the polymerase chain reaction". **Scientific American** 1990. 262 (4): 56–61, 64–5.

NAAS, T., G. CUZON, M. V. VILLEGAS, M. F. LARTIGUE, J. P. QUINN, AND P. NORDMANN. 2008. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *blaKPC* gene. **Antimicrob. Agents Chemother.** 52:1257–1263.

NAAS, T., P. NORDMANN, G. VEDEL, AND C. POYART. 2005. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrob. Agents Chemother.** 49:4423–4424. (Letter.)

NAAS, T.; VANDEL, L.; SOUGAKOFF, W.; LIVERMORE, D.M.; NORDMANN, P. Cloning and sequence analysis of the gene for a carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase Sme-1, from *Serratia marcescens* S6. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1994;38:1262–70.

NOGUEIRA, K.D.A.; PAGANINI, M.C.; CONTE, A.; COGO, L.L.; TABORDA, E.; MESSIAS, REASON, DA SILVA, M.J.; DALLA-COSTA, L.M. Emergence of extended-spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2014 Feb;32(2):87-92. doi: 10.1016/j.eimc.2013.02.004. Epub 2013 Apr 12.

NOLAN, T.; HANDS, R.E.; BUSTIN, S.A. "Quantification of mRNA using real-time RT-PCR". *Nat. Protoc.* 2006. 1 (3): 1559–1582.

NORDMANN, P.; GIRLICH, D.; POIREL, L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **J Clin Microbiol** 2012; 50: 2761–6.

NORDMANN, P.; MARIOTTE, S. NAAS, T.; LABIA, R.; NICOLAS; M-H. Biochemical properties of a carbapenem-hydrolyzing β -lactamase from *Enterobacter cloacae* and cloning of the gene into *Escherichia coli*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1993;37:939–46.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae*. *Emerging Infectious Diseases* 2011;17:1791–8.

NORDMANN, P.; POIREL, L.; WALSH, T.R.; LIVERMORE, D.M. The emerging NDM carbapenemases. **Trends in Microbiology** 2011;19:588–95.

OLIVEIRA, M.C.S.; REGITANO, L.C.A., ROESE, A.D.; ANTHONISEN, D.G.; PATROCÍNIO, E.; PARMA, M.M.; SCAGLIUSI, S.M.M.; TIMÓTEO, W.H.B; JARDIM, S.N. 2007. Fundamentos teórico-práticos e protocolos de extração e de amplificação de DNA por meio da técnica de reação em cadeia da polimerase. Embrapa Pecuária Sudeste/ São Carlos, SP.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [Internet]. 2014. Disponível em <http://www.who.int>

PAPP, T.; SPANN, D.; MARSCHANG, R.E.; Development and use of a real-time polymerase chain reaction for the detection of group II invertebrate iridoviruses in pet lizards and prey insects. **J Zoo Wildl Med.** 2014 Jun;45(2):219-27.

PATEL, G.; BONOMO, R.A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. *Expert Rev Anti Infect Ther* 2011; 9: 555–70.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; VAL PASSOS, V.L.; PINTO, M.C.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M. D. Carbapenem hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, **Brazil. J Antimicrob Chemother.** 2009 Feb;63(2):265-8.

PELEG, A.Y.; TILAHUN, Y.; FIANDACA, M.J.; D'AGATA, E.M.; VENKATARAMAN, L.; MOELLERING, R.C.; ELIOPOULOS, G.M. Utility of peptide nucleic acid fluorescence in situ hybridization for rapid detection of *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. **J Clin Microbiol.** 2009 Mar;47(3):830-2. doi: 10.1128/JCM.01724-08. Epub 2008 Dec 30.

PEREIRA, C.A.; MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.; PIGNATARI, A.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.; MEDEIROS, E.A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; CARNEIRO, I.; BRITES, C.; REIS, M.; DE SOUZA, M.A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B. Brazilian SCOPE Study Group Nosocomial bloodstream infections in Brazilian pediatric patients: microbiology, epidemiology, and clinical features. **PLoS One.** 2013 Jul 4;8(7):e68144. doi: 10.1371/journal.pone.0068144. Print 2013.

POURNARAS, S., E. PROTONOTARIOU, E. VOULGARI, 2009. Clonal spread of KPC-2 carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greece. **J. Antimicrob. Chemother.** **64**: 348–352.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile b-lactamases. **Clin Microbiol Rev** 2007; 20: 440–58.

QUEENAN, A.M.; TORRES-VIERA, C.; GOLD, H.S.; CARMELI, Y.; ELIOPOULOS, G.M.; MOELLERING, J.R. SME-type carbapenem-hydrolyzing class A b-lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2000;44:3035–9.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K. Carbapenem-hydrolyzing b-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1997;41:223–32.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARERO'GARA, C. Characterization of IMI-1 b-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 1996;40: 2080–6.

RILEY, L.W.; *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases: principles and practice.* 1 ed. USA, Washington, 2004.

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; SANTÉ, M.I.; SANTANA, J.L.; OTERO, D.M.; LEÓN, C.F.; VÁZQUEZ, G.J.; Detection of KPC in *Acinetobacter* spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother.** 2010 Mar;54(3):1354-7.

ROBLEDO, I.E.; AQUINO, E.E.; VÁZQUEZ, G.J. Detection of the KPC gene in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Acinetobacter baumannii* during a PCR-based nosocomial surveillance study in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother.** 2011 Jun;55(6):2968-70.

ROSCHANSKI, N.; FISCHER, J. ; GUERRA, B.; ROESLER, U. Development of a Multiplex Real-Time PCR for the Rapid Detection of the Predominant Beta-Lactamase Genes CTX-M, SHV, TEM and CIT-Type AmpCs in Enterobacteriaceae. **Epub** 2010 Oct 14.

ROSENTHAL, V.D. et al. International nosocomial infection control consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. **Am J Infect Control**, 38(3), 95-106, 2010

ROSSI, F.; BAQUERO, F.; HSUEH, P. In vitro susceptibilities of aerobic and facultatively anaerobic Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: 2004 results from SMART

SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C.; SILVA, J.B.; PIGNATARI, A.C; SENTRY Participants Group (Latin America). SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis.** 2004 Feb;8(1):25-79.

SANTOS, A.A.M. O modelo brasileiro para o controle das infecções hospitalares após vinte anos de legislação, onde estamos e para onde vamos? [dissertação de mestrado]. Belo Horizonte: Faculdade de Medicina da UFMG; 2006.

SCHWABER, M.J., B. LEV, A. ISRAELI. 2011. Containment of a country-wide outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Israeli hospitals via a nationally implemented intervention. **Clin. Infect. Dis.** 52: 848–855.

SEIFERT, H.; DIJKSHOORN, L.; GERNER-SMIDT, P. Distribution of *Acinetobacter* species on human skin: comparison of phenotypic and genotypic identification methods. **J Clin Microbiol.** 1997 Nov;35(11):2819-25.

SEKI, L.M. Caracterização dos genes de resistência aos beta-lactâmicos e polimorfismo genético em cepas da família *Enterobacteriaceae* isoladas de hemoculturas em hospitais do Rio de Janeiro. [Tese de Doutorado]. **Fundação Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro; 2012

SENBAYRAK AKCAY, S., INAN, A.; CEVAN, S.; OZAYDIN, A.N.; COBANOGU, N.; OZYUREK, S.C.; AKSARAY, S. Gram-negative bacilli causing infections in an intensive care unit of a tertiary care hospital in Istanbul, Turkey. **J Infect Dev Ctries.** 2014 May 14;8(5):597-604. doi: 10.3855/jidc.4277.

SHRESTHA, N.K; TOMFORD, J.W. Fosfomicin : a Review. **Infect Dis Clin Pract.** 2001;10:255–60.

SIEGEL, J. D. E.; RHINEHART, M.; JACKSON, AND CHIARELLO L. 2007. Management of multidrug-resistant organisms in health care settings, 2006. **Am J Infect Control** 35:S165-170

SMITH MOLAND, E.; HANSON, N.D.; HERRERA, V.L.; BLACK, J.A.; LOCKHART, T.J.; HOSSAIN, A.; JOHNSON, J.A.; GOERING, R.V.; THOMSON, K.S. Plasmid-mediated, carbapenemhydrolysing beta-lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **J Antimicrob Chemother.** 2003 Mar;51(3):711-4.

SPANU, T.; FIORI, B.; D'INZEO, T.; Evaluation of the New NucliSENS EasyQ KPC test for rapid detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase genes (blaKPC). **J Clin Microbiol.** 2012 Aug;50(8):2783-5. doi: 10.1128/JCM.00284-12. Epub 2012 May 23.

SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos Beta-lactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin.** 2009; 27(2):116-129.

TAJBAKHS, E.; TAJBAKHS, S.; KHAMESIPOUR, F. Isolation and Molecular Detection of Gram Negative Bacteria Causing Urinary Tract Infection in Patients Referred to Shahrekord Hospitals, **Iran Iran Red Crescent Med J.** 2015 May 31;17(5):e24779. doi: 10.5812/ircmj.17(5)2015.24779. eCollection 2015

TAVARES, W.; Resistência bacteriana. Em: Manual de antibióticos e quimioterápicos Anti infecciosos. 3ed. São Paulo: **Atheneu**; 2001.

THOMAS, T.T. Schiff Bases, and a Century of b-Lactam Synthesis. **Angew Chem Int.** 2007;46:2-7.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia.** 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2003.

TRABULSI, L.R.; KELLER, R.; TARDELLI GOMES, T.A. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. **Emerg Infect Dis.** 2002 May;8(5):508-13

[TSAKIRIDOU, E.](#); [MAKRIS, D.](#); [DANIIL, Z.](#); [MANOULAKAS, E.](#); [CHATZIPANTAZI, V.](#); [VLACHOS, O.](#); [XIDOPOULOS, G.](#); CHARALAMPIDOU, O.; ZAKYNTHINOS, E.; Acinetobacter baumannii Infection in Prior ICU Bed Occupants Is an Independent Risk Factor for Subsequent Cases of Ventilator-Associated Pneumonia. **Biomed Res Int.** 2014;2014:193516. doi: 10.1155/2014/193516. Epub 2014 Jul 2.

VAN DEN BERG, R.J.; VAESSEN, N.; ENDTZ, H.P.; SCHULIN, T.; VAN DER VORM, E.R.; KUIJPER, E.J. Evaluation of realtime PCR and conventional diagnostic methods for the detection of *Clostridium difficile* associated diarrhoea in a prospective multicenter study. **J Med Microbiol** 2007;56:36-42.

VANGUILDER, H.D.; VRANAK, E.; FREEMAN, W.M. "Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis". **Biotechniques** 2008. 44 (5): 619-626.

VERMELHO, A.B.; BASTOS, M.C.F.; BRANQUINHA DE SÁ, M.H. **Bacteriologia Geral.** Editora Guanabara Kogan, 1ª Ed. 2008.

WALSH, C. Antibiotics, action, origins and resistance. Washington, District of Columbia: **ASM Press**; 2003.

WALSH, T.R. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Curr Opin Infect Dis** 2010; 21: 367–371.

WALSH, T.R. Emerging carbapenemases: a global perspective. *Int J Antimicrob Agents*.

WEBER, S.G. et al. Prevalence of antimicrobial-resistant bacteria isolated from older versus younger hospitalized adults: results of a two-centre study. **J Antimicrob Chemother**. 2009 Dec;64(6):1291-8.

WHO Guidelines on Hand Hygiene in Health Care. First Global Patient Safety Challenge Clean Care is Safer Care. **World Health Organizations**; 2009.

WHO. The burden of health care-associated infection worldwide. *Accessed*: 15 Jan 2016. Available from: http://www.who.int/gpsc/country_work/burden_hcai/en/

WITTEWER, C.T.; HERRMANN, M.G.; MOSS, A.A.; RASMUSSEN, R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. **Biotechniques** 1997;22: 130–8.

WOODFORD, N., P. M. TIerno, JR., K. YOUNG, L. TYSALL, M. F. PALEPOU, E. WARD, R. E. PAINTER, D. F. SUBER, D. SHUNGU, L. L. SILVER, K. INGLIMA, J. KORNBLUM, AND D. M. LIVERMORE. 2004. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrob. Agents Chemother**. **48**:4793–4799.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Interventions and strategies to improve the use of antimicrobials in developing countries: review [site da Internet]. Disponível em: http://www.who.int/drug_resistance/Interventions_and_strategies_to_improve_the_use_of_antim.pdf. Acessado em 15 janeiro de 2016.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001 Apr;45(4):1151-61.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; RASHEED, J.K.; BIDDLE, J.W.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; ALBERTI, S. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenemhydrolyzing b-lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** 2003;47:3881–9.

YOKOE, D.S. et al. A compendium of strategies to prevent healthcare-associated infections in acute care hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 2008 Oct;29 Suppl 1:S12-21. doi: 10.1086/591060.

ZHANEL, G.G.; WIEBE, R.; DILAY, L.; THOMSON, K.; RUBINSTEIN, E.; HOBAN, D.J.; NOREDDIN, AM.; KARLOWSKY, J.A. Comparative review of the carbapenems. **Drugs**. 2007;67(7):1027-52.