

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

Liliane Miyuki Seki

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS E
POLIMORFISMO GENÉTICO EM CEPAS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*
ISOLADAS DE HEMOCULTURA EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

Rio de Janeiro

2012

Liliane Miyuki Seki

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS E
POLIMORFISMO GENÉTICO EM CEPAS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*
ISOLADAS DE HEMOCULTURA DE HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

Tese de doutorado submetida à Comissão Examinadora composta pelo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores convidados de outras instituições, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Doutor.

Orientadora: Dra. Marise Dutra Asensi

Rio de Janeiro

2012

Catalago na fonte

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Biblioteca

Seki, Liliane Miyuki

Caracterização de Genes de Resistência aos Beta-lactâmicos e Polimorfismo Genético em Cepas da Família *Enterobacteriaceae* isoladas de hemocultura em hospitais do Rio de Janeiro / Liliane Miyuki Seki.- Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2012.

132 f., il.tab.

Tese (Doutorado em Vigilância Sanitária) -Fundação Oswaldo Cruz; Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Rio de Janeiro, 2012.

Orientadora: Marise Dutra Asensi.

1. Enterobactérias 2. Beta-lactamases 3. PFGE 4. Sequenciamento 5. Infecção Hospitalar. I. Título

Characterization of resistance genes to beta-lactams and genetic polymorphism in strains of the Family Enterobacteriaceae isolated from hemoculture from hospitals in Rio de Janeiro

Liliane Miyuki Seki

**CARACTERIZAÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA AOS BETA-LACTÂMICOS E
POLIMORFISMO GENÉTICO EM CEPAS DA FAMÍLIA *ENTEROBACTERIACEAE*
ISOLADAS DE HEMOCULTURA EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

Tese de doutorado submetida à Comissão Examinadora
composta pelo corpo docente do Programa de Pós-
Graduação em Vigilância

Sanitária do Instituto Nacional de Controle de Qualidade
em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz e por professores
convidados de outras

instituições, como parte dos requisitos necessários à
obtenção do Grau de Doutor.

Aprovado em: 27/03/2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Sérgio Eduardo Longo Fracalanza (IMPPG/UFRJ)

Profª. Dra. Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (INCQS/ FIOCRUZ)

Profª. Dra. Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef (IOC/FIOCRUZ)

A minha mãe Setsuko, ao meu pai Yoshijiro (*in memoriam*) e
ao meu marido Marco André que, com muito amor ,
me ajudaram na realização desse sonho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à DEUS pela sua presença constante em minha vida, pela força, pela fé e pela sabedoria que foram fundamentais não somente na realização desse trabalho, mas em todas as conquistas pessoais e profissionais.

Ao meu marido Marco André Favarini Mendes Campos pela companherismo, amor e amizade em todos os momentos, aos meus pais Yoshijiro Seki e Setsuko Miyakoda Seki, por tudo que me ensinaram, pelo exemplo de vida e pelo apoio incondicional e ao meu irmão Rogério Yoshiaki Seki pelo amor e carinho.

A toda a minha família querida, pelo constante incentivo e torcida para que este sonho se tornasse realidade.

À Pós-graduação em Vigilância Sanitária, pela oportunidade, e à minha orientadora, Dra. Marise Dutra Asensi, pela disponibilidade, e pela acolhida ao orientar esse trabalho.

Aos meus amigos, que compreenderam a minha ausência, ouviram minhas reclamações e me incentivaram a continuar, especialmente a Ana Luzia Lauria Filgueiras, Joseli Maria da Rocha Nogueira e Wagner Thadeu Cardoso Esteves.

A toda equipe da Bacteriologia do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ especialmente aos colegas dos setores de Preparo de Meios de Cultura, principalmente ao Sr. Evaldo Soares da Costa e às secretárias do apoio laboratorial Darcília e Lucilene pela ajuda e colaboração.

Às pesquisadoras Ana Paula D'Alincourt Carvalho Assef e Viviane Zahner pelos incentivos e conselhos e a Dra Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão pela revisão desse trabalho.

À Polyana da Silva Pereira pela ajuda na realização deste trabalho e pela disponibilidade em todos os momentos em que foi solicitada.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar em especial á Karyne Rangel Carvalho, Thiago Pavoni Gomes Chagas, Carlos Felipe Machado de Araújo, Paula Faro de Almeida Motta, Maria Fernanda Regis Mathias Figueira, Júlia Maria José dos Santos pelo apoio e ajuda.

À Plataforma Genômica de Sequenciamento e Bioinformática - DNA-PDTIS/IOC/FIOCRUZ pela ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

A todos que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento e para a realização desse trabalho.

Nada há de melhor para o homem do que alegrar-se com o fruto de seus trabalhos.

(ECLÉ 3, 22)

RESUMO

Enterobactérias produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) são reconhecidas mundialmente como importantes problemas de resistência bacteriana nos hospitais. Neste estudo, foi avaliada a prevalência dos genes codificadores de ESBL, bem como a epidemiologia molecular em isolados de hemocultura, em enterobactérias coletadas entre Setembro de 2007 a Setembro de 2008, em cinco hospitais localizados no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Das 293 amostras coletadas, 121 foram caracterizadas fenotipicamente como produtores de ESBL sendo a maior prevalência de *Klebsiella pneumoniae* 63 (52,1%), *Enterobacter cloacae* 16 (13,2%), *Escherichia coli* 14 (11,6%), *Proteus mirabilis* 11 (9,1%), *Serratia marcescens* 10 (8,3%), *Morganella morganii* 2 (1,7%), *Enterobacter aerogenes* 1 (0,8%), *Klebsiella oxytoca* 1 (0,8%), *Providencia stuartii* 1 (0,8%), *Citrobacter freundii* 1 (0,8%), *Serratia rubidaea* 1 (0,8%). Entre as produtoras de ESBL, 11 amostras de *K. pneumoniae* e 9 amostras de *E. cloacae* mostraram resistência ou redução de susceptibilidade a pelo menos um dos carbapenemas. A detecção por PCR dos genes de β -lactamase mostraram que 87,6% produziram *bla*_{CTX-M}, 65,3% *bla*_{TEM}, 64,5% *bla*_{SHV} e 9,1% *bla*_{KPC}. O gene do grupo CTX-M-1 foi predominante na maioria das espécies de enterobactérias, exceto para o *P. mirabilis*, onde 91% das amostras eram do gene do grupo CTX-M-2. Das amostras pertencentes ao grupo CTX-M-1, 88% das *K. pneumoniae* e 100% das *E. coli* foram determinadas como CTX-M-15. A análise do polimorfismo genético, por PFGE, demonstrou a disseminação do gene CTX-M-15 em 10 genótipos para as amostras de *K. pneumoniae* e de 3 genótipos para *E. coli* em diversos hospitais no Rio de Janeiro. Entre as amostras produtoras de KPC, o dominante genótipo (A), reportado como “*Kp-RJ*”, e pertencente a sequência tipo (ST) 437 que também co-produziu o gene CTX-M-15. Em conclusão, os resultados mostram a emergência do gene CTX-M-15, que provavelmente foi adquirido por clones, que estão circulando entre os hospitais no Rio de Janeiro, incluindo os produtores de KPC, principalmente em amostras de *K. pneumoniae* e de *E. coli*. Os dados deste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular de outras espécies de enterobactérias além das espécies *K. pneumoniae* e *E. coli*, que têm sido pouco descritas no Brasil, permitindo assim reforçar o monitoramento e implementar medidas de controle.

Palavras-chave: Infecção de corrente sanguínea. *Enterobacteriaceae*. KPC. CTX-M-15. PFGE. Brasil.

ABSTRACT

Extended spectrum β -lactamases (ESBL) and *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) in enterobacteria are recognized worldwide as an important bacterial resistance problem in hospital. In this study, was evaluated the prevalence of genes harboring ESBL and the molecular epidemiology of the enterobacteria in blood isolates collected between September 2007 and September 2008 from five hospitals located in State of Rio de Janeiro, Brazil. Of the 293 isolates collected, 121 were characterized as ESBL producers, as follows: *Klebsiella pneumoniae* 63 (52.1%), *Enterobacter cloacae* 16 (13.2%), *Escherichia coli* 14 (11.6%), *Proteus mirabilis* 11 (9.1%), *Serratia marcescens* 10 (8.3%), *Morganella morganii* 2 (1.7%), *Klebsiella oxytoca* 1 (0.8%), *Providencia stuartii* 1 (0.8%), *Citrobacter freundii* 1 (0.8%), *Serratia rubidaea* 1 (0.8%). Among the ESBL producers, 11 isolates of *K. pneumoniae* and 9 isolates of *E. cloacae* showed resistance or reduced susceptibility to at least one carbapenem. PCR detection of β -lactamase genes showed that 87.6% produced *bla*_{CTX-M}, 65.3% *bla*_{TEM}, 64.5% *bla*_{SHV}, and 9.1% *bla*_{KPC}. The group CTX-M-1 was predominant in the major species, except for the *P. mirabilis*, in which 91% of isolates harbored the group CTX-M-2. Of the isolates belonging group CTX-M-1, 88% in *K. pneumoniae* and 100% in *E. coli* were harbored the CTX-M-15 gene. The analysis of genetic polymorphism by PFGE demonstrated the dissemination of the CTX-M-15 gene in 10 genotypes for *K. pneumoniae* and 3 genotypes for *E. coli* in several hospitals in Rio de Janeiro. Among the KPC producers, the dominant genotype A, reported as “*Kp-RJ*”, and belonging to sequence type 437, also co-produced the CTX-M-15 gene. In conclusion, the results showed the emergence of the CTX-15 gene, that probably has been acquired by circulating clones among hospitals in Rio de Janeiro, including the KPC producers, mainly in *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates. These findings are relevant to public health because the molecular epidemiology of species of enterobacteria other than *E. coli* and *K. pneumoniae* has been poorly described in Brazil and reinforce the need for an increase in monitoring and implement control measures.

Key-words: Bloodstream infection. *Enterobacteriaceae*. KPC. CTX-M-15. PFGE. Brazil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mecanismo de ação das β -lactamases com serina no sítio ativo.....	23
Figura 2. Disposição dos discos para a realização do teste fenotípico para detecção de beta-lactamases de espectro estendido.....	51
Figura 3. Teste fenotípico positivo (indicado pela seta) para a detecção de beta-lactamases de espectro estendido.....	51
Figura 4. Teste Hodge modificado para detecção de carbapenemase, onde a seta indica a distorção na zona de inibição.....	52
Figura 5. Percentual de resistência aos antibióticos das cinco espécies de enterobactérias mais isoladas.....	68
Figura 6. Produto de amplificação do gene <i>bla</i> _{CTX-M} obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes amostras de enterobactérias.....	70
Figura 7. Perfis de fragmentação em amostras de <i>K. pneumoniae</i> , após a digestão com a enzima <i>Xba</i> I e eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE).....	76
Figura 8. Dendograma das 63 amostras de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL.....	78
Figura 9. Dendograma das 16 amostras de <i>E. cloacae</i> produtoras de ESBL	79
Figura 10. Dendograma das 14 amostras de <i>E. coli</i> produtoras de ESBL.....	80
Figura 11. Dendograma das 11 amostras de <i>P.mirabilis</i> produtoras de ESBL.....	81
Figura 12. Dendograma das 10 amostras de <i>S.marcescens</i> produtoras de ESBL.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores de genes de beta-lactamases utilizados nas reações da PCR.....	54
Tabela 2. Ocorrência de espécies da Família <i>Enterobacteriaceae</i> isoladas de hemocultura em hospitais sentinelas do Rio de Janeiro (setembro de 2007 a setembro de 2008).....	61
Tabela 3. Distribuição das espécies da Família <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura de acordo com o hospital de origem (setembro de 2007 a setembro de 2008).....	62
Tabela 4. Distribuição das 5 espécies mais frequentes da Família <i>Enterobacteriaceae</i> segundo a produção de ESBL de acordo com o hospital de origem (setembro de 2007 a setembro de 2008).....	63
Tabela 5. Distribuição das espécies da Família <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura por período de isolamento.....	64
Tabela 6. Distribuição das espécies da Família <i>Enterobacteriaceae</i> produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura de acordo com o setor de atendimento.....	65
Tabela 7. Resistência das espécies bacterianas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, frente aos antibióticos.....	67
Tabela 8. Perfis de resistência aos antimicrobianos de acordo com a espécie bacteriana.....	69
Tabela 9. Distribuição dos genes codificadores de beta-lactamases de acordo com as espécies da Família <i>Enterobacteriaceae</i>	71

Tabela 10. Grupos de genes *bla*_{CTX-M} encontrados de acordo com as espécies da Família *Enterobacteriaceae*.....73

Tabela 11. Perfis dos genes codificadores de beta-lactamases presentes nas espécies da Família *Enterobacteriaceae* isoladas.....74

Tabela 12. Perfis dos genes codificadores de beta-lactamases em *K. pneumoniae* portadoras de *bla*_{KPC} isoladas em três hospitais sentinelas do Rio de Janeiro.....75

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Correlação entre a classificação funcional das β -lactamases, segundo Bush e Jacoby e Ambler.....25
- Quadro 2.** Grupos e subtipos das enzimas CTX-M, segundo Rossolini, D'Andrea e Mugnaioli.....32
- Quadro 3.** Principais grupos de carbapenemases e seus perfis de hidrólise e inibição, segundo Queenam e Bush.....35

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μ- micron
μL- microlitro
AC- Ácido clavulânico
AE-CEF- cefalosporinas de amplo espectro
AK - Amicacina
AmpC - *Ampicilinase* da classe C de Ambler
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AMX - Amoxicilina
ATCC - *American Type Culture Collection*
ATM-Aztreonam
BEL- *Belgium extended β-lactamase*
BES- *Brazil extended spectrum*
bla - Genes das beta-lactamases
BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*
BSC – Buffer Suspension Celular (Tampão de Lise Celular)
CA- Califórnia
CARB - *carbenicilinase*
CAR - carbenicilina
CAZ - Cefotaxima
CC – Complexo clonal
CCBH – Coleção de Culturas de Bactérias de interesse Hospitalar
CDC - *Center for Disease Control and Prevention*
CEF - cefalosporinas
CepA - *cephalosporinase* da classe A de Ambler
CIP - Ciprofloxacina
CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute
CLX - cloxacilina
CMY - enzima ativa frente à *cephamycins*
CphA - *Carbapenemase* isolada em *Aeromonas hydrophila*
CRB - carbapenêmicos
CTI – Centro de Terapia Intensiva
CTX – Cefotaxima
CTX-M- *cefotaximase* isolada em Munich
DNA – Ácido Desoxiribonucleico
dNTPS - deoxinucleotídeos trifosfato
EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético
EMB - *Eosin Methylene Blue* (meio de cultura Eosina-azul de metileno)
ERIC - *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*
ERT -Ertapenem
ESAC -Beta-lactamase de espectro-estendido do tipo AmpC
ESBLs - Beta-lactamases de espectro-estendido
EUA - Estados Unidos da América
EUCAST- *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

FEP - Cefepima
FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz
FOX -Cefoxitina
FOX -enzima ativa frente à cefoxitina
GEN -Gentamicina
GES- *Guiana-extended spectrum*
GIM - *German imipenemase*
Gly - *glycine*
HFB -Hospital Federal de Bonsucesso
HSE -Hospital dos Srvidores do Estado do Rio de Janeiro
HNMD -Hospital Naval Marcílio Dias
HUAP – Hospital Universitário Antônio Pedro
HUPE -Hospital Universitário Pedro Ernesto
IEF- *Isoelectric Focusing*
IMI - β -lactamase que hidrolisa Imipenem
IMP - Imipenem
IMP- enzima Activa frente à imipenem
INCQS -Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IND - isolado de *Chryseobacterium indologenes*
IOC - Instituto Oswaldo Cruz
IRAS- Infecções relacionadas à assistência à saúde
IRT- *inhibidor resistant TEM β -lactamase*
KPC - *Klebsiella pneumoniae Carbapenemase*
“Kp-RJ” - Clone de *K. pneumoniae* descoberto no Rio de Janeiro
L-1 - *Labile enzyme de Stenotrophomonas maltophilia*
LAPIH - Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
LACEN - Laboratório Central de Saúde Pública
M β Ls - Metallo- β -lactamases
MBT - monobactâmico
MER - Meropenem
MgCl₂- Cloreto de magnésio
MIR - *descoberto no Hospital Miriam*
mL -Mililitro
mM- Milimolar
MLST - Tipagem por sequenciamento multilocus
MYSTIC - *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (Programa de Vigilância de Resistência ao Meropenem)
NaCl- Cloreto de sódio
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NDM - *New Delhi metallo- β -lactamase*
NMC - *Not metallo enzyme carbapenemase*
°C – Graus Celsius
OXA- oxacilinase
P99 - isolado de *Enterobacter cloacae* amostra P99
PAHO – Pan American Health Organization
pb - pares de bases

PBPs - Proteínas ligadoras de Penicilina (*Penicillin Binding Proteins*)
PCR - Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)
PC1- isolado de *Staphylococcus aureus* amostra PC1
PDTIS - Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde
PEN - Penicilina
PER- *Pseudomonas extended resistant*
PFGE - Eletroforese de campo pulsado em gel de agarose
pI- Ponto isoelétrico
pmoles- picomoles
PSE - *Pseudomonas-specific enzyme*
PTZ – Piperacilin –Tazobactam
RAPD- *Randomly Amplified Polymorphic*
RDC - Resolução Colegiada
REDE- RM - Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde
REP – *Repetitive Extragenic Palindromic*
rpm - rotação por minuto
SDS – Dodecil sulfato de sódio
SENTRY - (Programa de Monitoramento de Patógenos e Resistência em Infecções Hospitalares e adquiridas na Comunidade)
Ser- serine
Sfh- *Serratia fonticola carbapenem hydrolase*
SFO- isolada de *Serratia fonticola*
SHV- *Sulphydryl reagent variable*
SIM – *Seoul imipenemase*
SME - *Serratia marcescens enzyme*
SPM - *São Paulo metallo-β-lactamase*
ST – Sequência Tipo
SUB - subactam
SUS – Sistema Único de Saúde
SXT - Sulfametoxazol-trimetoprim
TBE – Tris- ácido bórico –EDTA
TE – Tris-EDTA
TEM-Nome da paciente Temoneira
TLA- descoberto em *Thahuicas Indians*
TSB - Tryptic Soy Broth
TZB - tazobactam
U-unidade
UFC/mL – Unidades formadoras de colônia por mililitro
UTIs- Unidades de terapia Intensiva
UPGMA - Grupo de pares com médias aritméticas não ponderadas
VEB- *Vietnam extended-spectrum β-lactamase*
VIM- *Verona integron-borne metallo-β-lactamase*
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1. FAMÍLIA <i>Enterobacteriaceae</i>	20
2.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS	21
2.3. AS BETA-LACTAMASES.....	22
2.3.1. Resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos.....	23
2.4. BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs).....	28
2.4.1. Tipos de ESBLs.....	29
2.4.1.1. <i>ESBL do tipo TEM</i>	30
2.4.1.2. <i>ESBL do tipo SHV</i>	30
2.4.1.3. <i>ESBL do tipo CTX-M</i>	31
2.4.1.4. Outros tipos de ESBL.....	33
2.5. CARBAPENEMASE.....	34
2.5.1. Carbapenemase do tipo KPC.....	37
2.6. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESBLs.....	38
2.7. DETECÇÃO LABORATORIAL DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL E KPC EM AMOSTRAS CLÍNICAS.....	40
2.7.1. Detecção fenotípica de mecanismos de resistência.....	40
2.7.2. Detecção molecular.....	43
2.7.2.1. <i>Tipagem molecular de micro-organismos</i>	43
2.8. VIGILÂNCIA SANITÁRIA COMO INSTRUMENTO PARA GARANTIR A QUALIDADE DA ASSISTÊNCIA À SAÚDE.....	45
3. OBJETIVOS	47
3.1. OBJETIVO GERAL.....	47
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4. METODOLOGIA	48
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	48
4.2. AMOSTRAS BACTERIANAS.....	48
4.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA <i>Enterobacteriaceae</i>	48

4.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS.....	49
4.5. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs).....	50
4.6. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASE PELO TESTE DE HODGE MODIFICADO.....	51
4.7. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL PELO MÉTODO DA GUANIDINA.....	52
4.8. DETECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CODIFICADORAS DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DE REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR).....	53
4.9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS.....	55
4.10. DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA CODIFICADORA DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO.....	55
4.11. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO APÓS ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO EM GEL DE AGAROSE (PFGE).....	56
4.11.1. Preparação e corrida do gel de agarose.....	57
4.11.2. Visualização dos perfis de fragmentação do DNA.....	58
4.11.3. Interpretação dos resultados.....	58
4.12. PRESERVAÇÃO DAS CEPAS.....	58
5. RESULTADOS.....	60
5.1. AMOSTRAS BACTERIANAS.....	60
5.2. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO FENOTÍPICA DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E CARBAPENEMASES.....	61
5.3. PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS.....	70
5.4. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA CODIFICADORA DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO.....	72
5.5. ANÁLISE DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE CAMPO PULSADO (PFGE).....	75
6. DISCUSSÃO.....	83
7. CONCLUSÕES.....	90

8. PERSPECTIVAS FUTURAS.....	92
REFERÊNCIAS.....	93
APÊNDICES.....	125
APÊNDICE A - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA.....	125
APÊNDICE B - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 2º SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA.....	126
APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE.....	127

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a resistência antimicrobiana tem aumentado rapidamente no Brasil e no mundo, sendo considerada atualmente como um dos maiores problemas de Saúde Pública.

A grande utilização de antimicrobianos de amplo espectro, principalmente em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs), tem contribuído, mundialmente, para a emergência de bastonetes Gram negativos multirresistentes (LIVERMORE, 1995; SADER et al, 2004).

O aumento da taxa de resistência aos antimicrobianos entre patógenos hospitalares é particularmente preocupante, pois aumenta a morbidade, mortalidade e o custo associado às infecções hospitalares (LANDMAN et al, 2007; HAWKEY; JONES, 2009). Para controlar esse crescimento, muitos programas de monitoramento têm sido descritos no Brasil e no mundo (SADER, et al, 2004; CASTANHEIRA, et al, 2008a; CASTANHEIRA, et al, 2008b; HAWSER, et al, 2009; BRASIL, 2009).

De acordo com dados publicados por Sader e colaboradores (2004), no âmbito do programa de vigilância SENTRY (Programa de monitoramento de patógenos e resistência em infecções hospitalares e adquiridas na comunidade), um dos principais problemas de resistência aos antimicrobianos na América Latina, principalmente no Brasil, são os bastonetes Gram negativos da família *Enterobacteriaceae* produtores de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

Enterobactérias produtoras de ESBL são reconhecidas como importantes agentes etiológicos de infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), responsáveis por pneumonias e infecções do trato urinário especialmente em pacientes críticos. Essas foram capazes de se adaptarem às profundas modificações farmacológicas e tecnológicas ocorridas nas últimas três décadas, sendo descritas em percentuais endêmicos e epidêmicos em hospitais de todo o mundo (PODSCHUN; ULMANN, 1998; PFALLER et al, 2001; WINOKUR et al, 2001; PATERSON, 2006; LANDMAN et al, 2007). Essa emergência de bactérias Gram-negativas multirresistentes tem se agravado, após o aparecimento de enterobactérias resistentes aos carbapenemas, devido à presença de uma carbapenemase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae carbapenemase*). Diversos estudos foram descritos, desde então, em várias partes do mundo como Grécia, Israel, Noruega, Inglaterra, Índia, França, Escócia, Suécia, Polônia, China, Colômbia e Argentina. (YIGIT, et al, 2001; VILLEGAS, et al, 2006; PASTERAN et al, 2008; QUALE, 2008; TSAKRIS et al, 2008; WOODFORD et al, 2008; BARANIAK, et al, 2009; SAMUELSEN, et al, 2009; KITCHEL, et al, 2009; SHEN et

al, 2009), inclusive no Brasil (MONTEIRO et al, 2009; PEIRANO et al, 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009, SEKI et al, 2011, ANDRADE, et al, 2011).

Bactérias produtoras de ESBL e carbapenemase do tipo KPC tem se tornado então uma preocupação, pois conferem resistência à maioria dos beta-lactâmicos entre eles os carbapenemas e muitas vezes estão associadas à resistência para outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluorquinolonas. Assim, o rápido reconhecimento de amostras produtoras destas enzimas, no ambiente hospitalar é importante para a seleção do agente antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção. Além disso, os genes que codificam estas enzimas fazem parte de elementos genéticos móveis como, integrons, transposons e plasmídeos que podem ser disseminados horizontalmente entre diferentes amostras, o que representa um risco epidemiológico.

Um fato importante é que apesar da utilidade dos testes convencionais de susceptibilidade aos antimicrobianos na detecção de certos perfis de resistência e seleção de potenciais agentes terapêuticos, esses não são suficientemente sensíveis para a identificação de amostras produtoras de ESBL e carbapenemase do tipo KPC. Logo, técnicas moleculares são ferramentas fundamentais para a detecção e confirmação dos genes responsáveis por estes mecanismos (PODSCHUN; ULLMANN, 1998). Dessa forma, a caracterização de genes de resistência pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo empregada com sucesso (ARLET; PHILIPPON, 1991; SENDA et al, 1996; KIM et al, 2002; GALES et al, 2003).

Além disso, estudos que estabeleçam o grau de similaridade entre essas amostras também são importantes, pois a determinação de genótipos de resistência ajudam a elucidar os mecanismos de resistência, a fim de entender se a resistência é devido a transmissão de genes de resistência entre diferentes micro-organismos ou se é devido a disseminação de uma única amostra bacteriana. A identificação de sub-populações de organismos mutantes associadas a altos níveis de resistência pode desencadear estratégias que previnam a sua disseminação e melhorem a terapia como um todo (TOSIN; SILBERT; SADER, 2003). Além da detecção da disseminação do clone resistente dentro de um determinado hospital, a utilização de métodos de tipagem molecular, também permite a identificação da disseminação por clones epidêmicos em diferentes hospitais (SILBERT et al, 2004).

Apesar de muitas pesquisas relatarem índices e mecanismos de resistência aos antimicrobianos em diferentes países e instituições, mostrando as tendências regionais e globais, dados locais são essenciais para poder direcionar as intervenções, a fim de conter os problemas causados por micro-organismos multirresistentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* envolve micro-organismos que estão amplamente distribuídos na natureza, sendo encontrados na água, no solo, nas plantas e na microbiota normal do trato intestinal de seres humanos e animais. Os membros dessa família são bacilos Gram negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, que medem 0,5 a 2 μ de diâmetro e 2 - 4 μ de comprimento, possuem motilidade peritríquia ou são imóveis, catalase positiva e oxidase negativa. Caracterizam-se bioquimicamente, pela capacidade de reduzir nitratos a nitritos, fermentar a glicose com produção de gás ou ácido e gás (KONEMAN et al, 2001).

A família *Enterobacteriaceae* pertence ao Domínio: Bactéria, Divisão: Proteobacteira, Classe: Gammaproteobacteria e Ordem: Enterobacteriales, abrangendo um total de 51 gêneros e 279 espécies descritas (EUZÉBY, 2010). Nesta família, os gêneros mais frequentemente isolados são *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. Essas bactérias podem estar associadas com infecções comunitárias e hospitalares, oportunistas ou não. No homem, são capazes de causar doenças infecciosas como pneumonias, meningite, septicemia, infecções do trato urinário e intestinal (KONEMAN et al, 2001).

A família *Enterobacteriaceae* compreende 50% de todas as amostras bacterianas hospitalares e 80% de todas as amostras bacterianas Gram-negativas de importância médica. (MURRAY et al, 2007).

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 a *Klebsiella pneumoniae* (n=711, 13%), *Enterobacter* spp. (n=316, 6%) e *Escherichia coli* (n=178, 3%) (BRASIL, 2009).

Já o estudo multicêntrico MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*), para os bacilos Gram negativos obtidos de pacientes internados em UTIs, indica que a *K. pneumoniae* (12,1%) é o terceiro micro-organismo mais isolado, seguido de *E. coli* (10,5%), *Enterobacter cloacae* (7, 9%), *Serratia marcescens* (5,6%) e *Proteus mirabilis* (3,2%) (MENDES et al, 2005).

Dados do SENTRY mostram que as variações na prevalência de amostras de enterobactérias são mais elevadas na América Latina quando comparadas com outros países. Em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, a prevalência na América Latina foi de 45,4%, no Canadá foi de 4,9%, nos Estados Unidos foi de 7,6%, e na Europa foi de 22,6%; para *E. coli* foi de 8,5% na América Latina, 4,2% no Canadá, 3,3% nos Estados Unidos e 5,3% na Europa e para *P. mirabilis* foram de 22,4%, 3,1%, 4,9% e 11,1 %, respectivamente (WINOKUR et al, 2001). No Brasil, este estudo mostrou uma elevada prevalência de amostras produtoras de ESBL para *K. pneumoniae* de 50,3% e para *E. coli* de 9,1% (SADER, et al, 2001).

A maioria dos dados sobre prevalência de ESBL é referente as amostras de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *P. mirabilis*, devido ao fato de existir uma padronização do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) para pesquisar esta enzima de resistência nestes microorganismos. Um estudo realizado no Brasil, em Curitiba encontrou 24% das amostras bacterianas da Família *Enterobacteriaceae* como produtoras de ESBL (NOGUEIRA et al, 2006). Este valor é relativamente alto quando comparado com a prevalência de ESBL na Família *Enterobacteriaceae* em estudos envolvendo outras áreas geográficas como na França, em 1998, a prevalência foi de 3,2% e na Itália, em 2003, foi de 7,4% (LUZZARO et al, 2006).

2.2. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

A resistência aos antibióticos, entre os vários gêneros bacterianos, representa um problema de saúde pública mundial. Para alguns estudiosos, a situação atual caminha para o que foi vivenciado na era pré-antibiótico, uma vez que o surgimento de novos recursos terapêuticos não acompanha a evolução dos mecanismos de resistência (SILVER, 2011; SANDIUMENGE et al, 2006).

As bactérias podem desenvolver resistência basicamente por quatro mecanismos diferentes, que podem estar sozinhos ou associados à outros mecanismos de resistência. São eles: (i) produção de enzimas (β -lactamases) que degradam ou inativam o antibiótico, (ii) alteração da permeabilidade da membrana que impede ou dificulta a penetração do antibiótico na célula, (iii) hiperexpressão de bombas de efluxo ao antibiótico e (iv) alteração do sítio alvo do antibiótico através da proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs) (PATERSON, 2006; RICE, 2006; TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana aos antibióticos é um processo adaptativo que resulta de alguns eventos, como, mutações em genes que passam a conferir resistência e transmissão

vertical e horizontal de genes de resistência, eventos estes que contribuem para que bactérias resistentes sejam selecionadas quando há pressão exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos. Em função desses eventos, a emergência e disseminação de genes de resistência aos antibióticos tornaram-se um problema tanto hospitalar, como na comunidade (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; RICE, 2006; SHAH, et al, 2004b).

A disseminação de genes conferindo resistência aos antibióticos pode ocorrer então por transmissão vertical, quando uma bactéria se divide, e todo o seu genoma é duplicado originando uma nova célula idêntica ou por transmissão horizontal, onde bactérias de mesma espécie ou de espécies diferentes trocam genes de resistência por transferência de DNA através de processos como, conjugação, transdução, transformação e transposição. Na transmissão horizontal, vários elementos genéticos estão associados com a mobilização de genes de resistência, como sequências de inserção, integrons, transposons e plasmídeos (FROST et al, 2005; THOMAS; NIELSEN, 2005).

Mutação em genes que passam a conferir resistência aos antibióticos, a transmissão horizontal de genes de resistência e a co-existência de genes que conferem resistência a diversas classes de antibióticos em um mesmo elemento móvel, possibilitam a sobrevivência de bactérias multirresistentes (SHAH, et al, 2004b; LIVERMORE; WOODFORD, 2006; RICE, 2006).

2.3. AS BETA-LACTAMASES

As beta-lactamases são enzimas que agem degradando o anel beta-lactâmico, inativando, assim, a ação de vários antibióticos pertencentes ao grupo dos beta-lactâmicos (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006; LIVERMORE, 1995; SAMAHA- KFOURY; ARAJ, 2003; TURNER, 2005).

A primeira beta-lactamase mediada por genes cromossômicos foi relatada em *E. coli*, em 1940 antes mesmo da liberação da penicilina para uso clínico. Assim, a penicilina foi muito utilizada e logo emergiram as primeiras cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes, devido à produção de penicilinases (LIVERMORE, 2009). À medida que os antimicrobianos beta-lactâmicos foram sendo utilizados em maior escala na prática clínica, novas β -lactamases foram surgindo (BRADFORD, 2001; YIM; WANG; DAVIES, 2006; JACOBY, 2006).

Em plasmídeo, a primeira β -lactamase foi descrita em 1965, também em uma cepa de *E.coli*, sendo chamada de TEM -1 (ANDERSON; DATTA, 1965), pois foi isolada de hemocultura de uma paciente na Grécia, cujo nome era Temoniera, daí o nome TEM

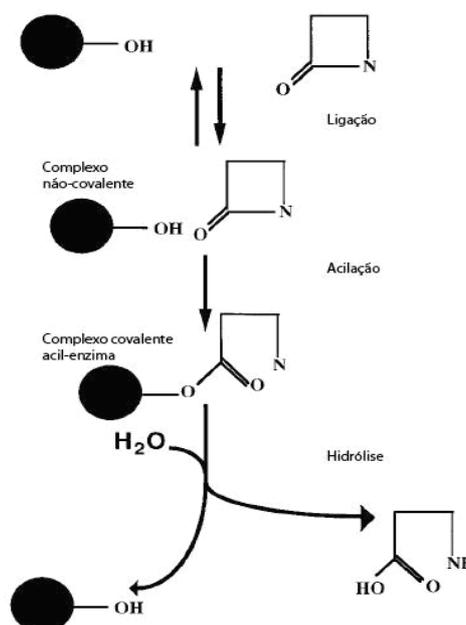
(DATTA; KONTOMICHALOU, 1965). Poucos anos depois de sua descrição, a β -lactamase TEM-1 disseminou-se por todo o mundo e já foi encontrada em outras enterobactérias, bem como em *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoea* (HEDGES; MATTHEW, 1979).

Muitas β -lactamases cromossômicas de algumas espécies começaram a aparecer em plasmídeos de outras espécies bacterianas, como o SHV-1 (variável sulfídril) de *K. pneumoniae*, que pode estar presente também em *E.coli*, mostrando a grande capacidade de mobilização desses genes (DE CHAMPS et al, 1989). Com isso, a indústria farmacêutica passou a desenvolver novos antimicrobianos beta-lactâmicos, que não fossem inativados pelas β -lactamases. Porém, o uso abusivo de novas gerações de antibióticos beta-lactâmicos foi selecionado sucessivas gerações de β -lactamases, cada qual com espectro de hidrólise mais potente que a anterior (LIVERMORE; WOODFORD, 2006).

2.3.1. Resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos

A resistência bacteriana ao grupo dos beta-lactâmicos ocorre por diversos mecanismos, sendo a produção de enzimas β -lactamases o de maior interesse em bactérias Gram-negativas. Algumas β -lactamases possuem zinco no sítio ativo para realizar a reação, mas a maioria age pelo mecanismo via éster de serina, como representado na Figura 1.

Figura 1. Mecanismo de ação das β -lactamases com serina no sítio ativo.



Fonte: LIVERMORE (1995).

Primeiramente, a enzima associa-se de forma não covalente ao anel beta-lactâmico do antimicrobiano. Então, o radical hidroxila, livre do resíduo de serina presente no sítio ativo da enzima, ataca o anel beta-lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e os antimicrobianos são hidrolisados e inativados. No caso das metalo- β -lactamases, o ataque ao anel beta-lactâmico é feito pelo zinco presente no sítio ativo da enzima (LIVERMORE, 1995).

As beta-lactamases são codificadas por genes chamados *bla*, que podem estar presentes no cromossomo bacteriano ou em plasmídeos. A expressão dos genes *bla* pode ser induzida pela presença dos beta-lactâmicos ou estar continuamente ativada. Assim, as beta-lactamases podem estar presentes de forma induzível ou constitutiva (LIVERMORE, 1995).

Atualmente, já foram descritas mais de 890 beta-lactamases (LAHEY CLINICS, 2012) e para facilitar o estudo, vários esquemas foram propostos para a classificação dessas beta-lactamases. As primeiras classificações funcionais foram propostas por Jack e Richmond em 1970 (JACK; RICHMOND, 1970) e expandidas por Richmond e Sykes em 1973 (RICHMOND; SYKES, 1973). Entretanto, as duas classificações mais utilizadas são as de Ambler (AMBLER, 1980) e a de Bush, Jacob e Medeiros (BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995). Essas classificações envolvem duas abordagens principais, uma distingue as enzimas conforme suas preferências pelo substrato e de acordo com o perfil de inibição ao ácido clavulânico ou ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e a outra pela estrutura molecular da enzima.

A classificação molecular proposta por Ambler, em 1980, utilizou a homologia da sequência de nucleotídeos e aminoácidos para agrupá-las em quatro classes, designadas A, B, C e D (Quadro1)

Já a classificação funcional proposta por Bush, em 1989 (BUSH, 1989a; b) e atualizada por Bush, Jacoby e Medeiros em 1995 (BUSH; JACOB; MEDEIROS, 1995) também divide as beta-lactamases em 4 grupos, denominados 1, 2, 3 e 4, possuindo subgrupos, relacionando características bioquímicas, enzimáticas e imunológicas. Essa classificação foi recentemente atualizada por Bush e Jacoby em 2009 (BUSH; JACOB, 2010), sendo a mais utilizada, mas com uma correlação entre as duas classificações anteriores (Quadro 1).

Quadro 1. Correlação entre a classificação funcional das β -lactamases, segundo Bush e Jacoby e Ambler.

Bush-Jacoby	Classe Molecular Ambler (subclasses)	Substratos	Inibido por AC/TZB	Inibido por EDTA	Características	Enzimas
1	C	CEF	Não	Não	Hidrólise CEF>PEN. Hidrólise das cefamicinas	AmpC, P99, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	CEF	Não	Não	Maior hidrólise de CAZ e outras AE-CEF	CMY-37
2a	A	PEN	Sim	Não	Hidrólise de PEN>CEF	PC1
2b	A	PEN; CEF	Sim	Não	Hidrólise CEF=PEN	TEM-1, TEM-2, SHV-1, TEM-90
2be	A	AE-CEF, MBT	Sim	Não	Maior hidrólise de AE-CEF e MBT	ESBLs: CTX-M-15, CTX-M-44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
2br	A	PEN	Não	Não	Resistente a AC, SUB, TZB	IRTs: TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	AE-CEF, MBT	Não	Não	Maior hidrólise de AE-CEF e MBT. Resistente a AC, SUB, TZB	TEM-50; TEM-68, TEM-89
2c	A	CAR	Sim	Não	Maior hidrólise de CAR	PSE-1, CARB-3
2d	D	CLX	V	Não	Maior hidrólise de CLX e OXA	OXA-1, OXA-10
2de	D	AE-CEF	V	Não	Hidrólise de CLX, OXA e AE-CEF	ESBLs: OXA-11, OXA-15
2df	D	CAR	V	Não	Hidrólise de CLX, OXA e CAR	OXA-23, OXA-48
2e	A	AE-CEF	Sim	Não	Hidrólise AE-CEF, mas não MBT. Inibido por AC	CepA
2f	A	CRB	V	Não	Maior hidrólise de CRB, AE-CEF e cefamicinas	KPC-2, KPC-3, IMI-1, SME-1, GES-2
3a	B(B1) B(B3)	CRB	Não	Sim	Hidrólise de AE-CEF e CRB, não MBT	IMP-1, VIM-1, L1, NDM-1
3b	B(B2)	CRB	Não	Sim	CRB	CphA, Sfh-1

Legenda: AE-CEF = cefalosporinas de amplo espectro; CRB = carbapenêmicos; CAR = carbenicilina; CAZ = ceftadizima; CEF = cefalosporinas; FEP = cefepima; CLX = cloxacilina; ESBLs= beta-lactamase de espectro estendido; MBT = monobactâmico; OXA = oxacilina; PEN = penicilinas; AC = ácido clavulânico; TZB = tazobactam; SUB = subactam; V= variável.

AmpC= *Ampicilinase* da classe C de Ambler; CARB = *carbenicilinase*; CepA = *cephalosporinase* da classe A de Ambler; CMY= ativo frente à *cephamycins*, CphA = *Carbapenemase* isolada em *Aeromonas hydrophila*; CTX-M= *cefotaximase* isolada em *Munich*; FOX = ativo frente à *cefoxitina*; GES= *Guiana-extended spectrum*; IMI = β -lactamase que hidrolisa *Imipenem*; IMP= Activo frente à *imipenem*; IND = isolado de *Chryseobacterium indologenes*; IRTs=*inibidor resistant TEM β -lactamase*; KPC=*K. pneumoniae carbapenemase*; L-1 = *Labile*

enzyme de *Stenotrophomonas maltophilia*; MIR= descoberto no Hospital *Miriam*; NDM= *New Delhi metallo- β -lactamase*; OXA=Ativo frente a oxacilina; P99=isolado de *Enterobacter cloacae* amostra *P99*; PC1= isolado de *Staphylococcus aureus* amostra *PC1*; PER=*Pseudomonas extended resistant*; PSE= *Pseudomonas-specific enzyme*; Sfh = *Serratia fonticola carbapenem hydrolase*; SFO=também isolada de *Serratia fonticola*; SHV=*Sulhydryl reagent variable*; SME=*Serratia marcescens enzyme*; TEM=Nome da paciente *Temoneira*; VEB= *Vietnam extended-spectrum β -lactamase*; VIM=*Verona integron-borne metallo- β -lactamase*.

Fonte: adaptado de BUSH e JACOBY (2010)

Na classificação de Bush e Jacoby (2010), o grupo 1 é o grupo das cefalosporinas. As enzimas desse grupo pertencem à classe molecular C e são codificadas nos cromossomos de muitas enterobactérias e alguns outros micro-organismos. São mais ativas contra cefalosporinas do que contra a benzilpenicilina, geralmente são resistentes à inibição por ácido clavulânico e são ativas contra cefamicinas, como a cefoxitina. No subgrupo 1e estão as variantes com maior atividade contra ceftazidima e outros oximino- β -lactâmicos como resultado de mutações. Essas variantes foram denominadas β -lactamases de espectro-estendido do tipo AmpC (ESAC) (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 2 estão classificadas as serina β -lactamases das classes moleculares A e D, que representam o maior grupo de β -lactamases. O subgrupo 2a corresponde às penicilinas com um espectro limitado de hidrólise, que são o tipo predominante em cocos Gram-positivos. As penicilinas são inibidas por ácido clavulânico e podem ser cromossômicas ou codificadas em plasmídeos. O subgrupo 2b corresponde as β -lactamases que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, são fortemente inibidas por ácido clavulânico e mediadas por plasmídeos. O subgrupo 2be compreende as ESBLs. Essas enzimas de amplo espectro mantêm a atividade contra as penicilinas e cefalosporinas do subgrupo 2b e, além disso, hidrolisam um ou mais oximino- β -lactâmicos, como a ceftazidima, cefotaxima e aztreonam, porém os micro-organismos permanecem sensíveis à inibição por ácido clavulânico, um recurso usado na detecção por laboratórios de análises clínicas (BUSH; JACOBY, 2010).

A β -lactamase cromossômica de *Klebsiella oxytoca*, pertencente a classe A (*bla_{OXY}*), foi classificada no grupo 2be na classificação de 1995 (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995), mas não foi incluída na classificação atual (BUSH; JACOBY, 2010). Essa β -lactamase, primeiramente chamada de K1 ou KOXY, é constitutivamente expressa em baixos níveis, que conferem resistência a amino e carboxipenicilinas. Os micro-organismos permanecem sensíveis a outros beta-lactâmicos como cefalosporinas, monobactâmicos e combinações com inibidores de β -lactamases. No entanto, a hiperprodução de OXY, que geralmente é devida a mutações na região promotora do gene, confere resistência a todas as penicilinas, combinações de penicilinas e ácido clavulânico, cefalosporinas de espectro

restrito, aztreonam e, ainda, sensibilidade reduzida à cefotaxima e ceftriaxona, sem afetar a ceftazidima (FEVRE et al, 2005). O subgrupo 2br é composto por β -lactamases de espectro restrito, resistentes ao ácido clavulânico e inibidores relacionados. O subgrupo 2ber são β -lactamases de amplo espectro que adquiriram resistência aos inibidores (BABIC; HUJER; BONOMO, 2006).

As enzimas do subgrupo 2c são caracterizadas por sua capacidade de hidrolisar carbenicilina ou ticarcilina tão rapidamente quanto benzilpenicilina, enquanto que a cloxacilina ou oxacilina é hidrolisada a taxas inferiores à metade da observada para benzilpenicilina. Essas penicilinas são geralmente inibidas por ácido clavulânico ou tazobactam. O subgrupo 2ce contém β -lactamases descritas recentemente, com a expansão de atividade contra cefepime e ceftipiro (BUSH; JACOBY, 2010).

O subgrupo 2d inclui β -lactamases que possuem capacidade de hidrolisar a cloxacilina ou oxacilina melhor que a benzilpenicilina e, portanto, são conhecidas como enzimas OXA. No subgrupo 2de estão as novas oxacilinas com um espectro estendido, que inclui oximino- β -lactâmicos, mas não carbapenêmicos. O novo subgrupo 2df de β -lactamases são enzimas OXA que hidrolisam carbapenêmicos e que foram divididas em nove grupos de acordo com a homologia de aminoácidos (BUSH; JACOBY, 2010).

O subgrupo 2e corresponde as cefalosporinas que possuem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. As cefalosporinas cromossômicas induzíveis, presentes em Proteae, pertencem a esse subgrupo. Elas podem ser confundidas com o grupo AmpC ou com ESBLs, porque elas podem ser encontradas nos mesmos micro-organismos e apresentar perfis de resistência comparáveis (BUSH; JACOBY, 2010).

O subgrupo 2f representa carbapenemases da classe molecular A e os carbapenêmicos são os substratos distintivos. Essas enzimas podem ser melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 3 estão as metalo- β -lactamases ($M\beta$ LS). Diferem estruturalmente das outras β -lactamases pela presença de um íon de zinco no sítio ativo. As $M\beta$ LS têm uma fraca afinidade pelos monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. Em vez disso, eles são inibidos por quelantes de íons metálicos, tais como EDTA. Podem ser subdivididos com base na estrutura em subclasses B1, B2 e B3, ou com base na função em subgrupos 3a, 3b e 3c. Devido à similaridade o grupo 3c foi incluído no 3a pelos autores da classificação atual (BUSH; JACOBY, 2010).

2.4. BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs)

No início da década de 80, as cefalosporinas de 3^a geração (oxiamino-cefalosporinas), ceftriaxona, cefotaxima, ceftazidima e cefpodoxima, foram instituídas como alternativas terapêuticas para infecções graves, provocadas principalmente por bactérias Gram-negativas produtoras de beta-lactamases de espectro restrito como TEM-1, TEM-2 e SHV -1. Estáveis à hidrólise pelas beta-lactamases de espectro restrito, as cefalosporinas de 3^a geração possuíam um amplo espectro de atividade antibacteriana e eram menos nefrotóxicas quando comparadas com aminoglicosídeos e polimixinas (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005).

Devido à pressão seletiva causada pelo intenso uso de cefalosporinas de terceira geração, não surpreendentemente, a resistência a esses antibióticos emergiu rapidamente. Mutações nos genes *bla*_{TEM-1}, *bla*_{TEM-2} e *bla*_{SHV-1}, que codificam as beta-lactamases de espectro restrito TEM-1, TEM-2 e SHV-1, conferiram um espectro de hidrólise estendido, codificando novas enzimas denominadas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês, *Extended Spectrum Beta-Lactamases*).

Os primeiros isolados clínicos resistentes à cefotaxima foram a *K. pneumoniae* e a *S. marcescens* expressando ESBL, identificados por Knothe, na Alemanha, em 1983 (KNOTHE et al, 1983). A prevalência, assim como os tipos de ESBL, aumentou no decorrer dos anos. Atualmente, o número de ESBLs caracterizadas já passa de 300 (LAHEY CLINICS, 2012), sendo que as pesquisas têm origem em mais de 30 países do mundo, o que demonstra a ampla distribuição dessas enzimas (PATERSON; BONOMO, 2005; GNIADKOWSKI, 2008).

A maioria das ESBLs pertence à classe molecular A de Ambler (AMBLER, 1980) e ao grupo 2be da classificação funcional de Bush e Jacob (BUSH; JACOBY, 2010).

A produção de ESBL por enterobactérias é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos beta-lactâmicos de amplo espectro. A ação hidrolítica destas enzimas pode conferir, clinicamente, resistência às penicilinas, cefalosporinas (incluindo as de amplo espectro) e monobactâmicos, mas não às cefamicinas e aos carbapenemas (BUSH; JACOBY, 2010). Essas ESBLs são mediadas por genes plasmidiais não induzíveis e são inibidas *in vitro* pelos inibidores de β -lactamases, como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; RAMPHAL; AMBROSE, 2006).

A classificação das β -lactamases, com alto nível de complexidade e subdivisões propostas pelos pesquisadores, tem tornado esse conhecimento inacessível aos clínicos e aos profissionais de controle de infecção hospitalar. Dessa forma, alguns pesquisadores têm proposto uma nova classificação mais simples, para facilitar a compreensão das diversas β -

lactamases de importância clínica. Essa nova classificação propõe a expansão da definição de ESBL a outras β -lactamases adquiridas com importância clínica e com atividade frente às cefalosporinas de amplo espectro e/ou carbapenêmicos. Assim, as ESBLs clássicas do grupo A seriam classificadas como ESBL_A, as β -lactamases do tipo AmpC e OXA seriam classificadas como ESBL miscelâneas, ou seja, ESBL_M. Por último, as carbapenemases seriam designadas ESBL_{CARBA}. Os autores da nova classificação acreditam que essa simplificação, encorajaria mais estudos e contribuiria na redução da disseminação dessas β -lactamases (GISKE et al, 2009).

2.4.1. Tipos de ESBLs

As ESBLs “clássicas” são enzimas transmitidas por plasmídeos, como as famílias Temoniera (TEM), Sulfidril variável (SHV) e Oxacilina (OXA). Dentro destas “famílias”, estão incluídas as duas primeiras variantes de β -lactamases identificadas. Embora essas variantes ainda se mantenham nos dias atuais, houve uma grande expansão no desenvolvimento de outras ESBLs como a do tipo CTX-M, que é atualmente a mais amplamente distribuída em várias regiões do mundo (LIVERMORE, 2008). Outras ESBLs menos frequentes são as das famílias PER, VEB, GES, TLA, BEL, BES e SFO). Essas ESBLs, assim como o grupo CTX-M, não foram originadas de outras β -lactamases já conhecidas, por mutações genéticas pontuais. Além disso, as ESBLs apresentam ampla distribuição geográfica.

Estas enzimas pertencem filogeneticamente à classe de β -lactamases denominadas “*Serina- β -Lactamases*” que, juntamente com as “*Metallo- β -Lactamases*”, formam os dois grandes grupos de enzimas que possuem a capacidade de degradar os antibióticos beta-lactâmicos (SHAH et al, 2004b).

A evolução das beta-lactamases de espectro estendido (*Serina-proteases*) é tão grande que foi criado um “*web site*” (LAHEY CLINICS, 2012), com o objetivo de tentar manter uma ordem no que diz respeito à nomenclatura a ser utilizada nas novas descobertas. Para caracterizar a descoberta de uma nova ESBL é necessário descobrir alguma modificação, como mutação na região promotora, sozinha e/ou em conjunto com uma substituição nucleotídica, que funcionalmente deve ser “silenciosa” (DALMARCO et al, 2006).

2.4.1.1. ESBL do tipo TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. A mutação ocorrida nas sequências de aminoácidos da enzima TEM-1, levou ao surgimento de muitas variantes e, atualmente mais de 190 beta-lactamases do tipo TEM foram identificadas, sendo aproximadamente 90 maioria definidas como ESBL. As outras variantes de TEM apresentam-se como β -lactamases dos grupos 2b e 2br ou, ainda, resistentes a ação de inibidores, chamadas de IRTs (*inhibitors resistant TEM*) (LAHEY CLINICS, 2012). A primeira β -lactamase do tipo TEM a expressar o fenótipo de ESBL foi a TEM-3, relatada em 1987. As substituições de aminoácidos são variadas, mas ocorrem em número limitado de posições. As combinações dessas trocas de aminoácidos resultam em várias alterações sutis nos fenótipos das ESBLs, como a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas, como cefotaxima e ceftazidima, ou mudanças no ponto isoelétrico que varia entre 5,2 e 6,5 (BRADFORD, 2001; GNIDKOWSKI, 2008).

Apesar das β -lactamases do tipo TEM, serem encontradas com maior frequência em *E.coli* e *K.pneumoniae*, também já foram descritas em outras espécies da família *Enterobacteriaceae*. Além disso, também já foram encontradas em *P.aeruginosa*. (GALDBART et al, 2000; PAGANI et al, 2002; BERTRAND et al, 2003).

Surtos de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de TEM, particularmente TEM-10 e TEM-26, já foram descritos nos Estados Unidos (PFALLER; SEGRETI, 2006).

Em Portugal, um estudo, em 3 hospitais, mostrou uma disseminação de TEM-24 em *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* (MACHADO et al, 2007).

2.4.1.2. ESBL do tipo SHV

O nome dessa enzima provém de um experimento em que a inibição da atividade da enzima pelo p-cloromercuriobenzoato variava de acordo com o substrato usado, sendo a enzima chamada de sulfidril-variável. Porém, o experimento nunca foi confirmado com o extrato purificado da enzima. O tipo SHV-1 é o mais comum em *K. pneumoniae*, sendo o principal responsável pela resistência intrínseca à ampicilina nessa espécie (PATERSON; BONOMO, 2005).

Atualmente o tipo SHV possui mais de 140 variantes, sendo aproximadamente 40 já definidas como ESBL. As mutações que originam as variantes ocorrem em poucas posições nos genes estruturais (LAHEY CLINICS, 2012). Algumas substituições são essenciais para a

hidrólise de ceftazidima e outras para a hidrólise de cefotaxima (GNIADKOWSKI, 2008).

A maioria das enzimas do tipo SHV é encontrada em cepas de *K. pneumoniae*. No entanto, também pode ser encontradas em outras enterobactérias e também em *P.aeruginosa* (BRADFORD, 2001; WU et al, 2003).

É relatado que os genes *bla_{SHV}*, em *K. pneumoniae* originaram-se a partir do cromossomo desta espécie e são comuns em bactérias gram-negativas, espalhadas em todo o mundo. Como as ESBLs do tipo SHV são resultantes de mutações pontuais no gene original, não é surpreendente que alguns fragmentos de DNA originados do cromossomo de *K. pneumoniae* sejam encontrados nas proximidades dos genes *bla_{SHV}* (MIRIAGOU et al, 2005).

A maioria das β -lactamases SHV tem fenótipo de ESBL, com exceção dos SHV-4, SHV-10 e SHV-11 que possuem fenótipos de resistência aos inibidores das β -lactamases. Esta enzima mantém parcialmente sua habilidade para hidrolisar as penicilinas, porém sua atividade frente as cefalosporinas é significativamente reduzida (BRADFORD, 2001; HOWARD et al, 2002; STÜRENBURG; MACK, 2003).

Entre os tipos de SHV as variantes mais comuns são SHV-2, SHV-5 e SHV-12 (PATERSON et al, 2005, VILLEGAS et al, 2008), embora no Brasil já tenha sido relatado o SHV-27 (CORKILL et al, 2001), o SHV-4 (MENDES et al, 2004) e mais recentemente o SHV-31 e o SHV-38 (TOLLENTINO et al, 2011).

2.4.1.3. ESBL do tipo CTX-M

Em 1989, na Alemanha, foi relatada uma amostra clínica de *E.coli* que produzia uma nova ESBL, denominada CTX-M (hidrolisa a CefoTaXima e foi isolada na cidade de Munique) que foi caracterizada pela maior capacidade de hidrolisar a cefotaxima, do que a ceftazidima (MATSUMOTO et al, 1988). Rapidamente surgiram variantes dessas ESBLs com esta característica e que foram relatadas em várias partes do mundo, caracterizando uma disseminação pandêmica dessas enzimas (BONNET, 2004; CANTÓN; COQUE, 2006).

As enzimas da família CTX-M hidrolisam cefalosporinas de amplo espectro como característica intrínseca da enzima e tem origem em genes cromossomicos do gênero *Kluyvera* (HUMENIUK et al, 2002; POIREL; GNIADKOWSKI; NORDMANN, 2002).

Atualmente, a família CTX-M é formada por mais de 120 enzimas (LAHEY CLINICS, 2012) que são agora endêmicas em muitos países, com emergência hospitalar e comunitária (LIVERMORE et al, 2007).

As enzimas CTX-M podem ser subclassificadas com base em sua sequência de aminoácidos. Estudos filogenéticos revelaram seis grupos maiores de enzimas CTX-M (os membros de cada grupo mostram identidade > 94% entre si e < 90% entre os grupos), sendo o nome de cada grupo definido de acordo com a primeira enzima descrita (BONNET, 2004; ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008) (Quadro 2).

Quadro 2. Grupos e subtipos das enzimas CTX-M, segundo Rossolini, D'Andrea e Mugnaioli.

GRUPO (origem)	SUBTIPOS
Grupo CTX-M-1 (<i>K. ascorbata</i>)	CTX-M-1; CTX-M-3; CTX-M-10; CTX-M-11; CTX-M-12; CTX-M-15; CTX-M-22; CTX-M-23; CTX-M-28; CTX-M-29; CTX-M-30; CTX-M-32; CTX-M-33; CTX-M-34; CTX-M-36; CTX-M-37; CTX-M-42; CTX-M-52; CTX-M-53; CTX-M-54; CTX-M-55; CTX-M-57; CTX-M-58 ; CTX-M-60 e CTX-M-61
Grupo CTX-M-2 (<i>K. ascorbata</i>)	CTX-M-2; CTX-M-4; CTX-M-5; CTX-M-6; CTXM-7; CTX-M-20; CTX-M-31; CTX-M-35; CTX-M-43 e CTX-M-44.
Grupo CTX-M-8 (<i>K. georgiana</i>)	CTX-M-8; CTX-M-40 e CTX-M-63
Grupo CTX-M-9 (<i>K. georgiana</i>)	CTX-M-9; CTX-M-13; CTX-M-14; CTX-M-16; CTX-M-17; CTX-M-18; CTX-M-19; CTX-M-21; CTX-M- 24; CTX-M-27; CTX-M-38; CTX-M-46; CTX-M-47; CTX-M-48; CTX-M-49; CTX-M-50; CTX-M-51; CTX-M-55e CTX-M-65
Grupo CTX-M-25 (Não determinado)	CTX-M-25, CTX-M-26; CTX-M-39 e CTX-M-41
Grupo CTX-M-45 (Não determinado)	CTX-M-45

Fonte: ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI (2008)

Genes codificadores das enzimas CTX-M têm sido encontrados em todas as enterobactérias, principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também há relatos em *Acinetobacter baumannii*, *Vibrio cholerae* e *Aeromonas hydrophila* (RADICE et al., 2002; VILLEGAS et al., 2004; BONNET, 2004; CANTÓN & COQUE, 2006).

Bactérias produtoras de CTX-M têm sido relatadas em todo o mundo, porém a disseminação destas enzimas é mais observada na Europa, Ásia e América do Sul. Fato curioso, é que nos Estados Unidos esta enzima é relatada em casos esporádicos. Algumas

enzimas apresentam-se difundidas em certos países, como a CTX-M-9 e a CTX-M-14 na Espanha, CTX-M-1 na Itália e CTX-M-2 na Argentina e a CTX-M-15 encontra-se disseminada por todo o mundo (RADICE et al., 2002; QUINTEROS et al., 2003; VTLLEGAS et al., 2004; CANTÓN & COQUE, 2006).

No Brasil, uma grande variedade de CTX-M já foi encontrada em diferentes espécies de enterobactérias como a CTX-M-2 em *P. mirabilis*, a CTX-M-9 e CTX-M-16 em *E. coli* (BONNET et al., 2001) e a CTX-M-8 em *Citrobacter amalonaticus*, *E. cloacae* e *Enterobacter aerogenes* (BONNET et al., 2000b). Posteriormente, foram relatadas também outras enzimas CTX-M no Brasil, como a CTX-M-3 (PEIRANO et al., 2010), a CTX-M-14 (CERGOLLA-NOVELLA et al., 2010), a CTX-M-15 (CERGOLLA-NOVELLA et al., 2010; PEIRANO et al., 2011 e TOLLENTINO et al., 2011), a CTX-M-59 (GARCIA et al., 2008; CLÍMACO et al., 2010 e TOLLENTINO et al., 2011), a CTX-M-28 (LOPES et al., 2010) das quais, a mais prevalente é a CTX-M-2 (GARCIA et al., 2008, MINARINI et al., 2009; CLÍMACO et al., 2010; LOPES et al., 2010; PEIRANO et al., 2011 e TOLLENTINO et al., 2011).

2.4.1.4 Outros tipos de ESBL

Outras enzimas foram descritas menos frequentemente, como BES, PER, GES e VEB, porém com importante ação hidrolítica sob cefalosporinas de amplo espectro (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; JACOB, 2006; LAHEY CLINICS, 2012).

BES possui 51 % de homologia com a penicilinase de *Yersinia enterocolitica* e 47 a 48 % de homnologia com as enzimas CTX-M. A enzima BES foi relatada em *S. marcescens* no Brasil, fornecendo alto nível de resistência ao aztreonam (BONNET et al, 2000a).

O grupo PER compreende as enzimas PER-1 a PER-7 (LAHEY CLINICS, 2012). PER-1 foi primeiramente relatada em *P. aeruginosa* e mais tarde em *Salmonella* spp. e *Acinetobacter* spp. Na Turquia foi encontrada a produção de PER-1, em 46 % das amostras hospitalares de *Acinetobacter* spp. e em 11 % de *P. aeruginosa*. Essa enzima tem sido encontrada também em isolados de *P. mirabilis* e *Alcaligenes faecalis* na Itália, em *P. aeruginosa* na França, Itália e Bélgica e apresentando alta prevalência em *Acinetobacter* spp., na Coreia. PER-2, que possui 86 % de homologia com PER-1 e foi relatada em *Salmonella* spp., *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *V. cholerae* 01 El Tor. PER-2 tem sido descrita na América do Sul (BAUERNFEIND et al, 1996; PATERSON; BONOMO, 2005).

A enzima GES-1 foi inicialmente identificada de uma amostra de *K. pneumoniae* em 1998 (POIREL et al, 2000). Esta β -lactamase foi caracterizada a partir de uma amostra coletada de um paciente proveniente da Guiana Francesa, sendo denominada Guiana *Extended-Spectrum β -Lactamase* (GES) (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005). Em 2001, uma nova variante de GES-1 foi relatada em *P. aeruginosa* na África do Sul, a GES-2 que possuía uma única alteração de aminoácido em relação à GES-1, no entanto, essa alteração ampliou o espectro de atividade da enzima que mostrava atividade catalítica frente ao imipenem, além das cefalosporinas de amplo espectro (PATERSON; BONOMO, 2005).

A enzima VEB-1 foi primeiramente caracterizada em uma amostra de *E. coli* proveniente de uma criança transferida do Vietnã para a França em 1999, onde recebeu o nome de *Vietnamese Extended-Spectrum β -Lactamase* (VEB) (POIREL et al, 1999). VEB-1 já foi encontrada em *P. aeruginosa* na Tailândia (BRADFORD, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; POIREL et al, 1999). Atualmente, já foram descritas sete enzimas (VEB-1 a VEB-7) (LAHEY CLINICS, 2012).

As OXA-ESBL, diferem das enzimas do tipo TEM e SHV, por pertencerem à família molecular D e grupo funcional 2d, que conferem resistência à ampicilina e cefalotina, têm alta atividade hidrolítica contra oxacilina, cloxacilina e metilcilina e são fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, sendo mais comumente encontradas em cepas de *P. aeruginosa* do que nas enterobactérias. Apesar de poucos relatos sobre o isolamento destas enzimas, não se deve esquecer que estas têm localização plasmidial e/ou em transposons, o que permite sua ampla distribuição (STÜRENBURG; MACK, 2003). Apesar das OXA-ESBLs possuírem sua atividade negligenciada frente às oximino-cefalosporinas, algumas OXAs (OXA-10-11, -13, -14, -16, -17, -18, -19, -32 e -45) têm variados graus de atividade contra as oximino-cefalosporinas (HARADA; ISHII; YAMAGUCHI, 2008).

2.5. CARBAPENEMASE

Os carbapenemas são muito utilizados como a droga de escolha para o tratamento de infecções graves causadas por micro-organismos produtores de ESBL, e tiveram assim seu consumo aumentado. A pressão seletiva fez surgir então, a resistência aos carbapenêmicos que embora ainda seja baixa em alguns locais, já é alarmante em outros. Nesse caso, os principais mecanismos de resistência envolvidos são a produção de carbapenemases como *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC), oxacilinases (OXA), metalo- β -lactamases

(MBL) ou, ainda, associação entre outras β -lactamases (ESBL ou AmpC) e a redução da permeabilidade aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2009), conforme o Quadro 3.

Quadro 3. Principais grupos de carbapenemases e seus perfis de hidrólise e inibição, segundo Queenam e Bush.

Classe	Grupo	Enzima	Perfil de Hidrólise					Perfil de Inibição	
			PEN	CEF	AE-CEF	MBT	CRB	EDTA	AC
A	2f	NMC	+	+	+	+	+	-	+
		IMI	+	+	+	+	+	-	+
		SME	+	+	±	+	+	-	+
		KPC	+	+	+	+	+	-	+
		GES	+	+	+	±	+	-	+
B	3	IMP	+	+	+	-	+	+	-
		VIM	+	+	+	-	+	+	-
		GIM	+	+	+	-	+	+	-
		SPM	+	+	+	-	+	+	-
D	2d	OXA	+	+	±	-	±	-	±

Legenda: CEF = cefalosporinas; AE-CEF = cefalosporinas de amplo espectro; PEN = penicilinas; MBT = monobactâmico; CRB = carbapenêmicos; AC = ácido clavulânico; (+) hidrolisa ou inibe ; (-) não hidrolisa e não inibe;

GES= *Guiana-extended spectrum*; GIM= *German imipenemase*; IMI = β -lactamase que hidrolisa *Imipenem*; IMP= Ativo frente ao *imipenem*; KPC=*K.pneumoniae carbapenemase*; NMC = *Not metallo enzyme carbapenemase*; OXA=Ativo frente à *oxacilina*; SPM= *São Paulo metallo- β -lactamase*; SME=*Serratia marcescens enzyme*; VIM=*V.eronia integron-borne metallo- β -lactamase*.

Fonte: QUEENAM; BUSH (2007).

Vários tipos de carbapenemases podem ser encontradas em enterobactérias. Para facilitar o estudo, pode-se dividi-las em serina-carbapenemases, que correspondem às classes A e D de Ambler, e metalo- β -lactamases que correspondem à classe B (QUEENAN; BUSH, 2007).

As famílias de serina-carbapenemases de classe A dos tipos SME, IMI e NMC correspondem às carbapenemases com localização cromossômica e que fornecem um perfil de resistência para os carbapenêmicos, mas estranhamente as cepas microbianas permanecem sensíveis às cefalosporinas. Estes mecanismos, apesar de raros têm sido descritos em amostras de *S. marcescens* (SME) e de *E. cloacae* (IMI e NMC) (RASMUSSEN et al, 1996; POTTUMARTHY et al, 2003; QUEENAN et al, 2006). Sua baixa prevalência está relacionada com sua localização, sem apresentar nenhuma associação com elementos genéticos móveis (QUEENAN; BUSH, 2007).

Outro tipo de serina-carbapenemase de classe A, é a do tipo GES que contém vinte enzimas descritas, onde a maioria possui alguma atividade para os carbapenêmicos, com exceção da GES-1, onde a atividade da carbapenemase é dificilmente reconhecível, sendo frequentemente considerada como ESBL. Essas β -lactamases têm sido relatada de forma esporádica, principalmente em *P. aeruginosa*, no entanto, em 2005 na Coréia foi descrita uma amostra de *K. pneumoniae* produtora de GES-5 (JEONG et al, 2005; WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007). No Brasil, GES-5 foi detectada em *K. pneumoniae* em São Paulo, em 2008 (PICÃO et al, 2010).

As carbapenemases do tipo OXA (classe D) são mais comuns em bactérias não fermentadoras da glicose, especialmente o *A. baumannii*, e são fracamente inibidas por ácido clavulânico, tendo menor importância em enterobactérias (WALTHER-RASMUSSEN; HØIBY, 2007; GÜLMEZ et al, 2008). Entretanto, uma OXA-carbapenemase denominada OXA-48 já foi identificada em *K. pneumoniae* na Turquia em 2001 (POIREL et al, 2004) e na Bélgica (CARRÈR et al, 2008; CUZON et al, 2008).

A família de metalo- β -lactamases não são inibidas por ácido clavulânico, mas por quelantes do zinco como o EDTA. Têm sido descritas em enterobactérias, porém com baixa frequência. São importantes em bactérias não fermentadoras da glicose, podendo ser intrínsecas (*Stenotrophomonas maltophilia*) ou adquiridas (*P. aeruginosa*). As principais famílias são IMP, VIM, GIM, SIM, SPM e NDM (QUEENAN; BUSH, 2007).

No Brasil, as metalo- β -lactamases do tipo IMP, VIM e SPM têm sido relatadas com frequência em amostras clínicas de *P. aeruginosa* (CAMARGO et al, 2011; FRANCO et al, 2010), mas em amostras de enterobactérias foram relatadas apenas em *K. pneumoniae* e *Providencia rettgeri* abrigando a enzima IMP-1 (LINCONPAN et al, 2006).

Esta última, a NDM, inicialmente detectada em Nova Delhi na Índia, de onde se originou o nome da enzima “*New Delhi metallo- β -lactamase*”, já foi detectada em diversos países como Paquistão, Inglaterra, Austrália, Japão, Canadá, Estados Unidos, Guatemala e também na Europa (PAHO/WHO, 2011), mas ainda não foi encontrada no Brasil. A emergência da enzima NDM se deve ao fato dessa ter sido identificada em vários gêneros de enterobactérias, além de bactérias Gram negativas não-fermentadoras da glicose apresentando co-resistência com outras carbapenemases como OXA (-23 e -48), KPC e IMP (KUMARASAMY; KALYANASUNDARAM, 2010; CHEN et al, 2011).

2.5.1. Carbapenemase do tipo KPC

As enzimas KPC são serina-carbapenemases pertencentes à Classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush, Jacoby e Medeiros. São inibidas por ácido clavulânico e tazobactam e, possuem a habilidade de hidrolisar uma grande variedade de beta-lactâmicos como cefalosporinas, penicilinas, aztreonam e carbapenêmicos. Diferenciam-se das demais carbapenemases do grupo 2f por apresentarem a capacidade de hidrolisar cefalosporinas aminotiazoleoxima (cefotaxima) além dos demais compostos já citados e por serem de origem plasmidial (QUEENAN; BUSH, 2007).

O primeiro membro da família KPC, KPC-1, foi isolado de uma *Klebsiella pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos nos Estados Unidos em 1996 (YIGIT et al., 2001). A descoberta de KPC-1 foi rapidamente seguida por vários relatos nos Estados Unidos de uma variante, que possuía um aminoácido diferente (Ser (174)-7Gly), denominada KPC-2, que depois descobriram se tratar da mesma enzima. A enzima KPC já foi documentada em diferentes bactérias por meio de estudos moleculares e diferenciada em KPC-1 a 12 (DIENSTMANN et al, 2010; LAHEY CLINICS, 2012).

Após a rápida expansão de KPC na costa leste dos Estados Unidos, a detecção da enzima foi documentada em vários outros países, como China (WEI et al, 2007), Israel (NAVON-VENEZIA et al, 2006), Colômbia (VILLEGAS et al, 2006), Reino Unido (WOODFORD et al, 2008) e Brasil (MONTEIRO et al., 2009). Já foi detectada em outras enterobactérias como *C. freundii* e *Enterobacter* spp. (MARCHAIM et al, 2008), *E. coli* (D'ALINCOURT et al, 2010) e também em *P. aeruginosa* (VILLEGAS et al, 2007).

No Brasil, as primeiras amostras produtoras de KPC foram isoladas no Recife, em 2006 (MONTEIRO et al, 2009). Foram isoladas também no Rio de Janeiro em 2007 e 2008 (PEIRANO et al, 2009). Ainda no ano de 2008, três outros grupos reportaram a ocorrência de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, em São Paulo e no Rio de Janeiro (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009). Atualmente, sabe-se que a KPC está disseminada por todo Brasil (SEKI et al, 2011; ANDRADE et al, 2011) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou recomendações quanto ao método de detecção e notificação dos casos (BRASIL, 2010).

2.6. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS ESBLs

As cepas produtoras de ESBLs disseminaram-se rapidamente pelo mundo e, quando se estabeleceram em uma região, passaram a ser o mecanismo de resistência prevalente. A frequência, assim como o tipo predominante, variaram de região para região, e mesmo entre instituições da mesma região (PATERSON; BONOMO, 2005).

A América do Norte apresenta os menores índices mundiais, sendo a prevalência no Canadá menor do que nos Estados Unidos da América (BUSH, 2008). Dados do MYSTIC, de 2001 a 2004, mostraram que a prevalência variava de 2,4 a 4,4% em *K. pneumoniae* e menor que 1,5% em *E. coli* (GOOSSENS; GRABEIN, 2005).

Outro trabalho realizado de 2001 a 2002 nos EUA encontrou índices um pouco maiores, 11,3% em *K. pneumoniae* e 2,6% em *E. coli*, porém, ainda menores que os encontrados em outros locais (MOLAND et al, 2006). Nos EUA e Canadá, o tipo SHV é o mais frequente, seguido de alguns isolados do tipo TEM (BUSH, 2008).

A Europa apresenta prevalência de ESBL maior do que nos EUA e menor do que na Ásia e América do Sul, sendo que a prevalência varia muito entre os países (CANTON et al, 2008). Em Portugal, um dos países europeus com os mais altos índices de ESBL, uma investigação mostrou que 39% das amostras bacterianas eram produtoras de ESBL (MACHADO et al, 2007). Um estudo do MYSTIC de 2001 a 2004 encontrou ESBL em 10,8% em *E. coli*, 13,6% em *K. pneumoniae* e menor que de 4% em *Enterobacter* spp., *C. freundii* e *P. mirabilis* (GOOSSENS; GRABEIN, 2005). Outro trabalho evidenciou ESBL em 1,3% em *E. coli*, 18,4% em *K. pneumoniae* e 5,3% em *P. mirabilis* (NIJSSEN et al, 2004). Um aumento na ocorrência de ESBL tem sido descrito na França, Itália, Espanha, Bélgica e Polônia (CANTON et al, 2008). Além disso, mudanças na epidemiologia das ESBLs vêm sendo reladas. A primeira mudança diz respeito aos tipos de ESBLs prevalentes, que antes eram TEM e SHV e agora é a CTX-M. As outras ESBLs continuam raras e são encontradas principalmente em *P. aeruginosa* e *A. baumannii*. Outras mudanças incluem a elevada frequência em infecções adquiridas na comunidade e a prevalência em *E. coli* maior do que em *K. pneumoniae* em alguns locais (LIVERMORE et al, 2007).

Na Ásia, a frequência também varia entre os países. Um estudo do SENTRY, de 1998 a 2002, encontrou 35,6% de *K. pneumoniae* produtora de ESBL em Singapura, 30,7% na China, 10% no Japão. Já a frequência de *E. coli* produtora de ESBL na China foi de 24,5%, em Hong Kong de 14,3% e em Singapura de 11,3% (HIRAKATA et al, 2005). Os tipos de ESBL predominantes foram CTX-M e SHV (HAWKEY, 2008).

Não existem muitos dados sobre ESBLs na África e na Austrália. Um trabalho que avaliou a região do Pacífico relatou 10% de *K. pneumoniae* produtora de ESBL na Austrália e de 28,1% na África do Sul (HIRAKATA et al, 2005).

Na América do Sul encontra-se a maior prevalência do mundo. Dados do MYSTIC, de 1999, relatam prevalência de 45,4% – 51,9% em *K. pneumoniae* e de 8,5% - 18,1% em *E. coli* (TURNER et al, 1999), havendo, assim como na Ásia e Europa, variação entre os países (VILLEGAS et al, 2008). O tipo de ESBL mais frequente é o tipo CTX-M, com poucos isolados do tipo TEM e SHV. O tipo PER-2, predominante na América do Sul, é o segundo tipo mais isolado na Argentina e tem sido encontrado com frequência no Uruguai, Chile e Bolívia (VILLEGAS et al, 2008).

No Brasil, os dados sobre a prevalência de ESBL são escassos, havendo apenas publicações de estudos locais. Um levantamento em Passo Fundo, no Rio Grande do Sul, encontrou ESBL em 24,8% das amostras de enterobactérias estudadas (LAGO; FUENTEFRIA; FUENTEFRIA, 2010). Já outros trabalhos realizados no Rio Grande do Sul, apresentaram uma prevalência de 21,8% e 35,2%, sendo este último em amostras de corrente sanguínea (SUPERTI; AUGUSTI; ZAVASCKI, 2009; WOLLHEIM et al, 2011).

Na região Nordeste, foi encontrada ESBL em 19% das amostras, com uma prevalência de 50,4% em *K. pneumoniae* e 16% em *E. coli* (ABREU et al, 2011). Outros estudos brasileiros avaliaram a presença de ESBL em pacientes com infecções comunitárias, encontrando esse mecanismo de resistência em 1,48% (MINARINI et al, 2007 e 2009) e 0,5% (WOLLHEIM et al, 2011) das enterobactérias testadas. Bactérias produtoras de ESBL também tem sido detectada em efluentes de esgoto hospitalar (PRADO et al, 2008; CHAGAS et al, 2011).

A enzima CTX-M-2 é a relatada com maior frequência, juntamente com a variante CTX-M-59. Outros tipos de CTX-M como a CTX-M-3 (PEIRANO et al, 2010), CTX-M-8 (BONNET et al, 2000a), CTX-M-9 e CTX-M-16 (BONNET et al, 2001), CTX-M-14 (CERGOLLE-NOVELLA, et al, 2010) e a CTX-M-15 (CERGOLLE-NOVELLA, et al, 2010; PEIRANO et al, 2011 e TOLLENTINO et al, 2011) e CTX-M-28 (LOPES et al, 2010) também foram encontradas.

ESBLs do tipo SHV-12, SHV-31, SHV-38 (TOLLENTINO et al, 2011) e SHV-5 (MINARINI et al, 2007) foram detectadas em estudos brasileiros, além da ESBL do tipo GES-5 em *P. aeruginosa* (PICÃO et al, 2009) e mais recentemente em *K. pneumoniae* hidrolisando imipenem (PICÃO et al, 2010).

2.7. DETECÇÃO LABORATORIAL DE BACTÉRIAS PRODUTORAS DE ESBL E KPC EM AMOSTRAS CLÍNICAS

O laboratório de Microbiologia tem um importante papel na detecção de bactérias produtoras de ESBL, pois um rápido diagnóstico é necessário para uma terapia adequada de pacientes hospitalizados, evitando assim as complicações clínicas e a morte. A demora no diagnóstico leva a permanência do paciente no ambiente hospitalar por tempo prolongado, possibilitando a disseminação intra e inter hospitalar desses patógenos multirresistentes

2.7.1. Detecção fenotípica de mecanismos de resistência

A redução de sensibilidade de alguns dos antimicrobianos beta-lactâmicos como a ceftazidima, a cefpodoxima, o aztreonam, a cefotaxima ou a ceftriaxona, na interpretação do antibiograma pelos métodos convencionais leva a suspeita de produção de ESBL. O CLSI (2009) recomendava então a realização de um teste fenotípico confirmatório.

Os testes de detecção fenotípica baseiam-se na redução da sensibilidade às oximinocefalosporinas, como ceftazidima ou cefotaxima e/ou monobactâmicos, como o aztreonam e empregam um inibidor de β -lactamase, usualmente o ácido clavulânico, que inibe a ESBL e reduz o nível de resistência à cefalosporina, indicando a sua presença (BRADFORD, 2001; DRIEUX et al, 2008).

Um dos primeiros métodos fenotípicos descritos foi o teste de disco-aproximação (JARLIER et al, 1988). Este método, considerado confiável para a detecção de ESBL, foi ajustado em relação ao espaço entre os discos, onde a redução da distância entre o disco contendo o ácido clavulânico e o disco das cefalosporinas de terceira geração para 20 mm melhorou significativamente a sensibilidade do ensaio (THOMSON; SANDERS, 1992).

Alguns anos depois, foi proposto por Thomsom o teste tridimensional. Esse teste é uma modificação do teste de disco-difusão, com um passo adicional que envolve a aplicação de um inóculo bacteriano padrão em uma fenda circular no ágar, localizado a 3 mm do local de aplicação dos discos em direção ao interior da placa. As amostras produtoras de ESBL apresentam distorções na zona de inibição. O teste apesar de considerado bastante sensível, é tecnicamente difícil, trabalhoso e precisa de um microbiologista experiente para interpretá-lo, por isso não é muito utilizado (THOMSON; SANDERS, 1992).

O teste de adição do ácido clavulânico consiste em adicionar inibidores de β -lactamase, como o ácido clavulânico, a discos de antimicrobianos como ceftazidima,

cefotaxima, ceftriaxona ou aztreonam. Quando se usa discos combinados (30 µg de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima *versus* 30 µg de cefpodoxima, ceftazidima ou cefotaxima mais 10 µg de ácido clavulânico) um aumento do diâmetro dos halos de inibição superior ou igual a 5 mm na presença do inibidor, em comparação aos halos dos discos não adicionados de ácido clavulânico, é evidência presuntiva da produção de ESBL (CLSI, 2009). Apesar da facilidade de execução e interpretação do teste, a descontinuidade da comercialização desses discos no Brasil, dificultou a sua realização na rotina laboratorial.

O método que utiliza a fita de E-test® consiste em concentrações crescentes do agente antimicrobiano em um dos lados da fita, como a cefalosporina, e do outro lado a cefalosporina, associada a uma concentração fixa de 2 mg/mL de ácido clavulânico. A bactéria é considerada produtora de ESBL quando a leitura apresentar uma diminuição de pelo menos duas diluições logarítmicas. O teste é fácil de ser realizado e sua interpretação é simples. A sensibilidade e especificidade para este método foi relatada em 96% e 100%, respectivamente. Devido, principalmente ao seu elevado custo, este teste se tornou praticamente inviável para uso em laboratório de rotina.

Os métodos automatizados para a identificação bacteriana, nos quais estão incluídas a detecção da produção de ESBL são sistemas que foram testados e comparados com o teste fenotípico confirmatório convencional em relação à habilidade em detectar a produção de ESBL e apesar de apresentarem uma elevada sensibilidade, esses sistemas automatizados apresentaram variações na especificidade, de acordo com o equipamento utilizado (PEREZ et al, 2007).

Apesar da existência de vários métodos para detecção de ESBL, todos possuem limitações e podem falhar na presença concomitante de outros mecanismos de resistência aos antimicrobianos beta-lactâmicos. Resultados falsos positivos podem ser observados com as β -lactamases que apresentem o mesmo efeito com ácido clavulânico, como algumas β -lactamases cromossômicas de *K. oxytoca*, *P. vulgaris*, *E. cloacae* e *S. marcescens*, que também são capazes de reduzir a susceptibilidade às cefalosporinas de terceira geração e ao aztreonam (BUSH; JACOBY; MEDEIROS, 1995; LIVERMORE; BROWN, 2001; SCHWABER et al, 2004). As carbapenemases mediadas por plasmídeos do tipo KPC, também são inibidas por ácido clavulânico e podem ser confundidas com ESBL nos testes fenotípicos (THOMSON, 2010).

Diferenças na habilidade de detecção de ESBL das diversas cefalosporinas podem ocorrer em regiões diferentes, devido ao tipo de enzima predominante. Isso demonstra a importância de se adaptar os testes de detecção de ESBL para as áreas geográficas, hospitais e

gêneros bacterianos particulares. Além disso, esses testes devem ser avaliados periodicamente, monitorando, assim, a introdução de novas enzimas (NAVON-VENEZIA et al, 2003).

Para detectar a produção de ESBL nas espécies que produzem β -lactamases do tipo AmpC, algumas modificações são sugeridas nos testes fenotípicos como a) a inclusão de um disco de cefepima, pois altos níveis de expressão de AmpC têm efeito mínimo na atividade de cefepima, o que faz dessa droga um agente de detecção de ESBL na presença de AmpC (GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010); b) outra modificação é a redução na distância entre os discos no teste de disco - aproximação para 20 mm (PITOUT et al, 2003); c) a adição de inibidores de AmpC, como cloxacilina ou ácido borônico, a fim de inibir esta enzima e favorecer a detecção de ESBL (GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010).

A dificuldade na padronização dos testes fenotípicos e o aumento da prevalência das ESBLs fizeram com que as instituições responsáveis pela padronização dos testes de sensibilidade como CLSI e EUCAST pensassem na possibilidade de mudar o parâmetro de avaliação para cefalosporinas em enterobactérias, de forma que não fosse mais necessária a pesquisa de ESBL e, ao mesmo tempo, melhorasse a correlação dos resultados dos testes com os observados *in vivo* (ANDES; CRAIG, 2005; JONES et al, 2005). Com isso, novos pontos de corte de suscetibilidade para cefalosporinas foram descritos baseados nos parâmetros farmacocinéticos e farmacodinâmicos. O CLSI padronizou então a liberação dos resultados como encontrados, independente da produção de ESBL (CLSI, 2010).

A redução na suscetibilidade aos carbapenêmicos em amostras de enterobactérias como o imipenem, meropenem e ertapenem é o meio de triagem que para a suspeita de produção de carbapenemases. O método de detecção fenotípica confirmatório para a produção da carbapenemase do tipo KPC é o teste de Hodge modificado. Esse teste é considerado positivo quando houver uma distorção na zona de inibição da *E.coli* ATCC 25922 próximo da inserção à borda do inóculo da amostra testada. O CLSI considera o teste altamente sensível e específico ($\geq 90\%$) para a detecção de carbapenemase do tipo KPC (CLSI, 2011). No entanto, resultados falso-positivos para a detecção da carbapenemase tem sido observados, devido a associação da produção de ESBL, do tipo CTX-M com a perda de expressão de porina (CARVALHAES et al, 2010), por isso a confirmação por métodos moleculares da presença da enzima carbapenemase é recomendada.

2.7.2. Detecção Molecular

2.7.2.1. Tipagem molecular de micro-organismos

Os métodos moleculares permitem detectar e definir os tipos de enzimas de ESBL e KPC presentes, sendo importantes a nível epidemiológico para saber qual a enzima é mais prevalente em determinado hospital ou região. Além disso, há casos em que um mesmo isolado clínico expressa múltiplas β -lactamases, sendo necessárias técnicas moleculares para detectar quais enzimas estão presentes.

Uma das técnicas para a detecção dessas enzimas é o estudo do ponto isoeletrico (pI) que consiste na detecção direta da enzima em extratos celulares através da eletroforese de ponto isoeletrico (*Isoelectric Focusing* –IEF). Esse método consiste em preparar uma suspensão da bactéria na qual se quer pesquisar a presença da enzima. Após a eletroforese, é feita uma análise do perfil migratório relacionando com o ponto isoeletrico (que é específico para cada enzima). Contudo, com o crescente aumento das variantes de beta-lactamases, muitas enzimas possuem ponto isoeletricos muito próximos, como exemplo a enzima do tipo TEM, que corresponde a mais de 190 tipos, o que torna a sua determinação somente pelo pI impossível. Uma situação semelhante é encontrada também nas enzimas do tipo SHV, CTX-M e OXA (BRADFORD, 2001; GARCIA; DE LA GANDARA; GARCIA, 2010).

O método molecular mais simples e mais utilizado para detectar essas enzimas é a da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando iniciadores específicos para os genes de β -lactamases. Esses iniciadores são escolhidos de forma a se hibridizar com regiões mais estáveis, que geralmente não sofrem mutações (SHAH et al, 2004a). No entanto, a PCR não discrimina entre os diferentes tipos de KPC, TEM, SHV ou CTX. Assim, além da PCR, o sequenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes das β -lactamases é o método padrão recomendado (BRADFORD, 2001; BUSH; JACOBY, 2010).

Além dos métodos moleculares para definir os tipos de enzimas presentes, outros métodos que avaliem a disseminação e perpetuação de micro-organismos produtores dessas enzimas no ambiente hospitalar também têm sido recomendados.

O monitoramento da diversidade clonal em amostras produtoras de beta-lactamases em enterobactérias de interesse clínico contribui para o esclarecimento da epidemiologia das infecções relacionadas à assistência à saúde. Esse monitoramento é muito importante, pois a disseminação de clones epidêmicos relacionados a bactérias multirresistentes como as produtoras de CTX-M e KPC têm sido muito reportada por diversos autores.

Um clone epidêmico em cepas de *E.coli* produtora de *bla*_{CTX-M-15} e pertencente ao grupo filogenético B2 e ST131 tem sido descrito disseminado por vários países como a Espanha, França, Canadá, Portugal, Suíça, Índia, Coreia, Reino Unido, Itália, Turquia, Croácia, Japão e Estados Unidos (PITOUT et al, 2009). A enzima CTX-M-15 também tem sido reportada em clones epidêmicos, em *K. pneumoniae* resistentes a ciprofloxacina e pertencentes ao ST11, na Hungria, na Espanha, na China, na Coreia (DAMJANOVA et al, 2008; OTEO et al, 2009; KO et al, 2010; RHEE et al, 2010). Recentemente, também vem se destacando um clone epidêmico de cepas de *K. pneumoniae* produtoras de *bla*_{KPC}, pertencentes ao ST258 e disseminados por diversos países como a Grécia, Israel, Noruega, Polônia e Estados Unidos (BARANIAK, et al, 2009; SAMUELSEN, et al, 2009; KITCHEL, et al, 2009).

No Brasil foram encontrados, além do clone ST258 em *K. pneumoniae* em São Paulo (ANDRADE et al., 2011), outros clones do mesmo complexo clonal (CC) 258 como o clone “*Kp-RJ*”, pertencente ao ST437 disseminado pelo Rio de Janeiro e Espírito Santo e o clone pertencente ao ST11, descrito nos Estados de Pernambuco e Minas Gerais (SEKI et al, 2011). Assim, a tipagem molecular é uma ótima ferramenta para ser utilizada por epidemiologistas, microbiologistas e pesquisadores na investigação do envolvimento de clones, entre amostras patogênicas multirresistentes.

Várias técnicas de “DNA fingerprinting” têm sido utilizadas para os estudos epidemiológicos como “Randomly Amplified Polymorphic” (RAPD), “Repetive Extragenic Palindromic” (REP-PCR) e “Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus” (ERIC-PCR), que apesar de serem simples, de rápida de execução, e de custo mais baixo, em relação a técnica de “Pulsed Field Gel de Eletroforese” (PFGE), questões como a sua reprodutibilidade ainda não estão totalmente esclarecidas (OLIVE; BEAN, 1999).

Outra técnica também muito utilizada é o “Multilocus Sequence Typing” (MLST). O MLST se baseia no polimorfismo de genes altamente conservados denominados “housekeeping”, onde estes genes de múltiplos “locus” são sequenciados e então analisados quanto à variação da sequência entre os alelos de muitas cepas, definido por “Sequence Type” (NEMOY et al, 2005; SINGH et al, 2006). Esta técnica, apesar do seu elevado poder discriminatório é muito trabalhosa e de elevado custo.

A técnica mais utilizada em várias investigações é a de “Pulsed Field Gel de Eletroforese” (PFGE). Essa técnica é considerada “Padrão Ouro” devido ao seu alto poder discriminatório e de maior reprodutibilidade, sendo o melhor método para determinar a relação entre os micro-organismos, pois utilizam a análise de fragmentos de DNA

cromossômico gerados por enzimas de restrição de baixa frequência de clivagem, através da eletroforese em campo pulsado (OLIVE; BEAN, 1999). Essa técnica tem sido utilizada com sucesso para avaliar patógenos multirresistentes, principalmente os produtores de ESBL e KPC em surtos, infecções recorrentes e disseminação clonal no ambiente hospitalar (SILBERT et al, 2004).

2.8. VIGILÂNCIA SANITÁRIA COMO INSTRUMENTO PARA GARANTIR A QUALIDADE DA ASSISTÊNCIA À SAÚDE

A resistência microbiana aos antibióticos vem aumentando rapidamente em todo o mundo e, em particular, no ambiente hospitalar. Para combater e controlar essa resistência, é preciso mapear o perfil de sensibilidade dos patógenos em nosso país e utilizar racionalmente os antimicrobianos pelos serviços de saúde.

No Brasil, dados de estatística nacional sobre nossos índices são escassos e desconhecemos a eficácia dos programas, estimando os custos com base nos dados americanos, que certamente diferem de nossa realidade (FREITAS, 1997). Essa situação vem mudando à medida que temos centros no Brasil como São Paulo, Florianópolis, Porto Alegre e Brasília que participam do programa SENTRY de vigilância epidemiológica e de resistência aos antimicrobianos, monitorando as infecções hospitalares e algumas comunitárias, através de uma rede de laboratórios colaboradores distribuídos em todo o mundo (SADER et al, 2004).

A ANVISA, a partir de 2004, em parceria com a Organização Pan-Americana de Saúde e o Ministério da Saúde, vem implantando e desenvolvendo ações, como medidas para prevenir e controlar a resistência microbiana em serviços de saúde. Dentre essas medidas destaca-se a criação da “Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede- RM”. Essa Rede- RM é constituída por Hospitais Sentinela, Laboratórios de Saúde Pública (LACENs), Vigilâncias Sanitárias Estaduais e Municipais, Comissões Estaduais e Municipais de Controle de Infecção Hospitalar e colaboradores.

A qualidade da assistência à saúde deixou de ser então uma atitude individual de profissionais envolvidos e tornou-se parte fundamental no planejamento e na gestão do sistema de saúde, criando normas e mecanismos de avaliação, objetivando controlar a qualidade assistencial.

A Infecção relacionada à assistência à saúde ou nosocomial é definida como uma infecção adquirida após a admissão do paciente na Unidade Hospitalar e que se manifesta

durante a internação ou após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares.

Sob o ponto de vista de Vigilância Sanitária, este estudo tem como base a Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, chamada Lei Orgânica da Saúde, que organiza o Sistema Único de Saúde e estabelece como objetivo e atribuição do SUS, “a assistência às pessoas por intermédio de ações de promoção, proteção e recuperação da saúde, com a realização integrada das ações assistenciais e das atividades preventivas”. Segundo essa Lei, a Vigilância Sanitária é definida como “um conjunto de ações capaz de eliminar, diminuir, ou prevenir riscos à saúde e de intervir nos problemas sanitários decorrentes do meio ambiente, da produção e circulação de bens e da prestação de serviços de interesse da saúde”. Desta forma, se as infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais e sua prevenção e controle envolvem medidas de qualificação de assistência hospitalar, de vigilância sanitária e outras, tomadas no âmbito do Estado, do Município e de cada hospital, fica muito bem caracterizado então o papel da Vigilância Sanitária nas infecções hospitalares (BRASIL, 1990).

Considerando o Brasil um país de dimensões continentais, a avaliação sistemática da qualidade dos serviços de saúde disponíveis para a população atendida pelo SUS, representa um desafio de grandes proporções. E para garantir essa qualidade a Lei nº 9431, de 06 de janeiro de 1997, dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de Programa de Controle de Infecções Hospitalares pelos hospitais do País, que é regulamentado pela Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998, onde consta, na forma de anexos, as diretrizes e normas para a prevenção e o controle das infecções hospitalares, determinando as ações mínimas necessárias, a serem desenvolvidas visando à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares. E para essa avaliação da qualidade das ações de Controle de Infecção Hospitalar à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) adotou a Resolução de Diretoria Colegiada nº 48, de 2 de junho de 2000, onde contém em seu anexo o Roteiro de Inspeção do Programa de Controle de Infecção Hospitalar, a fim de orientar às Vigilâncias Sanitárias Estaduais, Municipais e do Distrito Federal no cumprimento e aplicação das diretrizes estabelecidas pela legislação sanitária pertinente (BRASIL, 1997, 1998a, 2000).

Estas medidas legais se tornam mais importantes quando destinadas ao atendimento de pacientes graves ou de risco, em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs), que necessitam de assistência médica e enfermagem ininterruptas, com equipamentos específicos próprios e recursos humanos especializados, e com acesso a outras tecnologias destinadas ao diagnóstico e à terapêutica (BRASIL, 1998b).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Determinar a prevalência e caracterizar os genes codificadores de ESBL, bem como avaliar o polimorfismo genético de amostras bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais Sentinela situados em dois municípios do estado do Rio de Janeiro, coletadas entre setembro de 2007 e setembro de 2008 a fim de contribuir para o controle das infecções relacionadas à assistência à saúde.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar a prevalência de amostras bacterianas pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs nos hospitais incluídos no estudo, através de técnicas de detecção fenotípica;
- Determinar o perfil de resistência aos antimicrobianos entre as amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs;
- Confirmar a presença de carbapenemase em amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae* resistentes aos carbapenemas, através de técnicas de detecção fenotípica;
- Pesquisar os genes codificadores das beta-lactamases do tipo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} através de técnicas moleculares como PCR das espécies de enterobactérias isoladas;
- Sequenciamento dos produtos obtidos após a pesquisa de *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC};
- Pesquisar o gene *bla*_{CTX-M-15} em amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* pertencentes ao grupo CTX-M-1 através de técnicas moleculares como PCR e sequenciamento;
- Avaliar o polimorfismo genético das amostras, através da análise dos perfis de fragmentação do DNA cromossômico após eletroforese em campo pulsado (PFGE).

4. METODOLOGIA

4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo longitudinal prospectivo multicêntrico para determinar a prevalência e caracterizar os genes codificadores de ESBL, bem como avaliar o polimorfismo genético de amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, isolados de hemoculturas de pacientes internados em cinco Hospitais Sentinelas situados em dois municípios do estado do Rio de Janeiro.

4.2. AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram estudadas 293 amostras bacterianas de espécies pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, sendo uma amostra de cada paciente e coletadas no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, isoladas de hemoculturas, provenientes de pacientes internados em cinco Hospitais Sentinelas da ANVISA, sendo dois de grande porte da rede pública, Hospital Federal de Bonsucesso (HFB) e o Hospital dos Servidores do Estado (HSE), dois universitários, Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) e o Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e um militar, Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD).

Todas as amostras bacterianas coletadas nos hospitais determinados pelo estudo foram encaminhadas ao Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH)-IOC/FIOCRUZ.

4.3. IDENTIFICAÇÃO BACTERIANA DAS ESPÉCIES DA FAMÍLIA *Enterobacteriaceae*

A identificação das amostras foi inicialmente realizada através de métodos manuais e / ou automatizados, de acordo com a rotina realizada pelos laboratórios de microbiologia de cada hospital.

Estes resultados foram confirmados no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar LAPIH- IOC/FIOCRUZ, onde as amostras foram semeadas em meio seletivo indicador Ágar EMB (*Eosin Methylene Blue*) da marca-Difco para a confirmação da pureza das culturas e incubadas a 37° C por 18 a 24 horas. Após a observação da morfologia colonial e das características morfo-tintoriais, realizada pelo método de Gram, estes isolados foram repicados para o meio de triagem de Costa e Vernin (COSTA; HOFER, 1972) e incubados a

37° C por 24 horas.

Para a confirmação do perfil bioquímico foram utilizadas as seguintes provas bioquímicas: mobilidade, produção de indol e gás sulfídrico no meio de SIM; capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono no meio de Citrato de Simmons; descaboxilação da Lisina, Arginina e Ornitina no meio Base para Descaboxilase; e ausência de produção da enzima citocromo oxidase. Outros testes bioquímicos foram adicionados para observar as produções de urease no meio de Christensen e de DNase. Estes testes foram realizados de acordo com as recomendações de KONEMAN et al, 2001 & MURRAY et al, 2007.

4.4. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado pelos laboratórios de microbiologia de cada hospital, através de métodos automatizados ou quando necessário, pelo método de difusão em ágar, conforme as recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009) no Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar.

As amostras testadas foram cultivadas em Ágar Nutriente (Oxoid) por 18-24h a 37°C. Os inóculos foram preparados pela suspensão de 3 - 5 colônias isoladas em 2,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada e a turvação ajustada para o padrão de 0,5 da Escala de McFarland. Essa turvação corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente de $1 - 2 \times 10^8$ UFC/mL de *E.coli* ATCC® 25922 e foi determinada em um fotocolorímetro DensiCHEK™ Plus (BioMérieux). Cada suspensão foi semeada com o auxílio de um “swab” estéril, em uma placa contendo Ágar Müeller Hinton (Oxoid) em três direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma que o crescimento fosse uniforme em toda a superfície da placa. A tampa da placa foi deixada discretamente entreaberta por 3 - 5 minutos, para a absorção completa do inóculo. Os discos impregnados com antimicrobiano foram aplicados com auxílio de um dispensador de discos Mk III/ ST6090 (Oxoid). As placas foram incubadas por 16-18h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$. Os discos de antimicrobianos da marca Oxoid utilizados foram: amicacina (30µg), cefoxitina (30µg), cefepima (30µg), ceftazidima (30µg), cefotaxima (30µg), ciprofloxacina (5µg), gentamicina (10µg), sulfametoxazol-trimetoprim (1,25/23,75 µg), imipenem (10µg), meropenem (10µg), ertapenem (10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg) e aztreonam (30 µg).

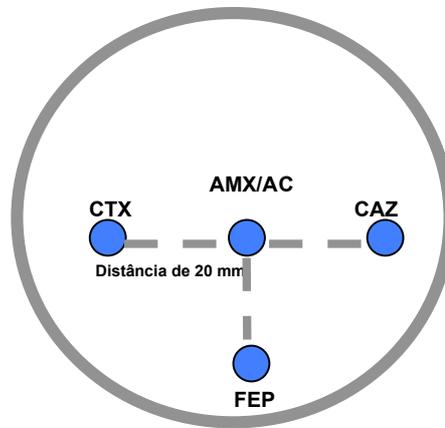
Os resultados foram interpretados segundo os halos de inibição descritos no CLSI (2011), caracterizados como sensíveis (S), intermediários (I) ou resistentes (R).

Para o controle de qualidade dos testes foram utilizados as cepas padrões *E. coli* ATCC[®] 25922, *P. aeruginosa* ATCC[®] 27853 e *S. aureus* ATCC[®] 25923.

4.5. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBLs)

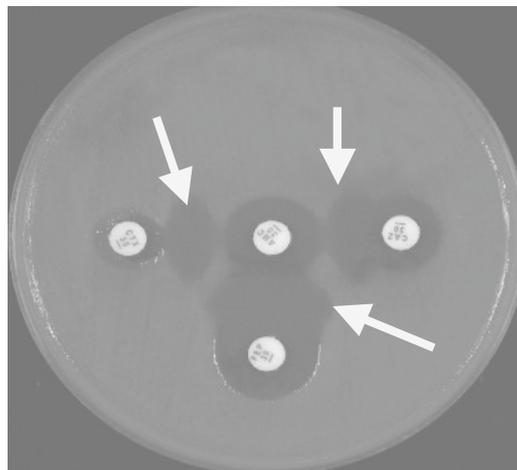
As amostras foram submetidas ao teste fenotípico de “disco-aproximação” conforme descrito por Jarlier e colaboradores (JARLIER et al,1988). As amostras testadas foram cultivadas em Ágar Nutriente (Oxoid) por 18-24h a 37°C. O inóculo foi preparado pela suspensão de 3 - 5 colônias isoladas, em 2,0 mL de solução de cloreto de sódio a 0,85% esterilizada e a turvação ajustada para o padrão de 0,5 da escala de McFarland. Em seguida a suspensão foi semeada com o auxílio de um “swab” estéril, em uma placa contendo Ágar Müeller Hinton (Oxoid) em três direções (horizontal, vertical e diagonal), de forma que o crescimento fosse uniforme em toda a superfície da placa. A tampa da placa foi deixada entreaberta para secar por 3 - 5 minutos. Os discos foram dispostos na placa do seguinte modo: um disco contendo amoxicilina com ácido clavulânico no centro e ao redor deste foram colocados um disco de ceftazidima, cefotaxima e cefepima em uma distância de 20 mm centro a centro. A disposição dos discos esta demonstrada na Figura 2. As placas foram incubadas por 18h a 35 ± 2°C. A produção de ESBL foi indicada por uma deformação (aumento) do halo de inibição próximo ao disco do inibidor ou aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (zona fantasma) entre o inibidor e um dos substratos beta-lactâmicos (Figura 3). Foram utilizadas como controles as cepas de *E. coli* ATCC[®] 25922 (controle negativo) e *K. pneumoniae* ATCC[®] 700603 (controle positivo).

Figura 2. Disposição dos discos para a realização do teste fenotípico para detecção de β -lactamases de espectro estendido.



Legenda: AMX/AC: amoxicilina com ácido clavulânico, CAZ: ceftazidima, CTX: cefotaxima, FEP:cefepima.

Figura 3. Teste fenotípico positivo (indicado pela seta) para a detecção de β -lactamases de espectro estendido



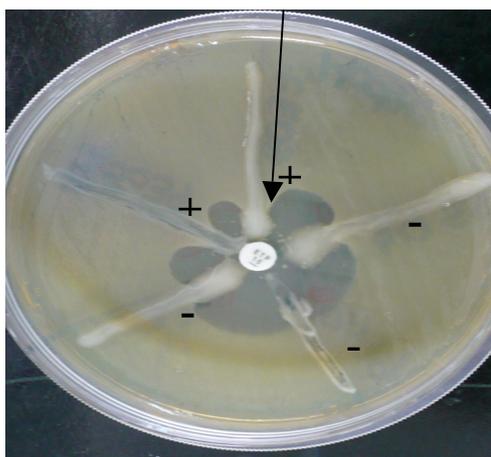
Fonte: LAPIH

4.6. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE CARBAPENEMASE PELO TESTE DE HODGE MODIFICADO

As amostras resistentes ou com susceptibilidade diminuída (halo de inibição menor ou igual a 22 mm) a pelo menos um dos carbapenemas (imipenem, meropenem ou ertapenem) foram submetidas ao teste fenotípico de Hodge modificado (CLSI, 2009). Foi preparado uma suspensão da cepa padrão de *E.coli* ATCC® 25922 em solução de cloreto de sódio a 0,85%

estéril, ajustada para uma turvação 0,5 da Escala McFarland. A seguir, foi realizada uma diluição dessa suspensão de 1:10 também em solução de cloreto de sódio a 0,85% estéril. Essa suspensão foi semeada conforme o procedimento de disco-difusão em placa contendo Ágar Müller Hinton, com auxílio de um “swab” estéril. A tampa da placa foi deixada entreaberta para secar por 3 - 5 minutos. No centro da placa, foi colocado um disco do ertapenem da marca Oxoid (10µg). Da amostra a ser testada foram retiradas, com auxílio de uma alça bacteriológica, 3-5 colônias de um cultivo de “overnight” em ágar nutriente. Foram realizadas estrias finas da borda do disco até a borda da placa. A produção de carbapenemase foi evidenciada através da presença de distorção na zona de inibição após incubação $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 16-20 horas (Figura 4).

Figura 4. Teste Hodge modificado para detecção de carbapenemase, onde a seta indica a distorção na zona de inibição.



Legenda: (+) : teste positivo; (-) : teste negativo

Fonte: LAPIH

4.7. EXTRAÇÃO DO DNA TOTAL PELO MÉTODO DA GUANIDINA

O DNA total das amostras produtoras de ESBL e carbapenemase, segundo os testes fenotípicos, foram extraídos pelo método do tiocinato de guanidina com base nos critérios descritos por Caetano-Anolles e Gresshoff, 1997. E foram mantidos em freezer a -20°C para a realização dos testes moleculares.

As amostras foram cultivada sem 3,0 mL de caldo TSB (Tryptic Soy Broth) da Difco e incubadas em banho-maria com agitação “overnight” a 37°C . A seguir, 1,5 mL da cultura foi transferida para um microtubo e centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm. O sobrenadante

foi desprezado e o restante do caldo TSB (1,5 mL) foi centrifugado novamente. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e foi adicionado 1,0 mL de NaCl 1M para ressuspender o sedimento, com agitação em equipamento tipo “vórtex”. Esta etapa foi repetida por duas vezes, intercalando com a centrifugação da amostra por 10 minutos a 10.000 rpm. O sedimento foi ressuspendido em 100 µL de Tampão TE (Tris-EDTA) e em seguida foram adicionados 500 µL da solução de tiocianato de guanidina. Esta solução foi homogeneizada por inversão (por 20 vezes) e incubada a -20°C durante 5 minutos. Após esta etapa, foram adicionados 250 µL de acetato de potássio 5M (estocado a -20°C), que foram homogeneizados por inversão (por 20 vezes) e novamente incubados a -20°C durante 5 minutos. Após este período, 500 µL de uma solução clorofórmio -álcool- isoamílico (24:1) foram adicionados e homogeneizados em equipamento tipo “vórtex” até obter uma cor leitosa. Esta solução leitosa foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. A seguir foram retirados 750 µL da fase superior da solução que foram transferidos para um novo microtubo contendo 380 µL de isopropanol. A suspensão contendo o DNA foi guardada em freezer a -20°C “overnight”. No dia seguinte, esta suspensão foi centrifugada por 10 minutos a 10.000 rpm. A seguir foi desprezado o sobrenadante. Ao sedimento contendo o DNA foi adicionado 150 µL de etanol a 70% e submetido a centrifugação por 10 minutos a 10.000 rpm. Essa etapa com o etanol a 70% foi repetida por mais uma vez. O sobrenadante foi desprezado e o microtubo contendo o sedimento foi mantido à temperatura ambiente por 60 minutos aproximadamente para secar naturalmente. Esse sedimento foi dissolvido em 100 µL de TE e levado a banho-maria a 37°C por 3 horas. O DNA extraído foi armazenado em freezer a -20°C. A concentração de DNA foi ajustada para 200 ng em equipamento “GeneQuant *pro*”.

4.8. DETECÇÃO DAS SEQUÊNCIAS GÊNICAS CODIFICADORAS DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Foram realizadas reações da PCR para a detecção das sequências gênicas de beta-lactamases do tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC}. Os iniciadores foram determinados a partir de sequências de oligonucleotídeos disponíveis em trabalhos científicos publicados e estão relacionados na Tabela 1.

Tabela 1. Iniciadores de genes de beta-lactamases utilizados nas reações da PCR

Gen alvo	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica
<i>bla</i> _{KPC}	KPC-F-TGTCACTGTATCGCCGTC	1011pb	YIGIT et al., 2001
	KPC-R-CTCAGTGCTCTACAGAAAACC		
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-M-F-ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC	593pb	MULVEY et al., 2003
	CTX-M-R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F-TTATCTCCCTGTTAGCCACC	797pb	HASMAN et al., 2005
	SHV-R-GATTTGCTGATTTGCTCGG		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F-GCGGAACCCCTATTTG	859pb	HASMAN et al., 2005
	TEM-R-ACCAATGCTTAATCAGTGAG		
<i>bla</i> _{CTX-M-15}	CTX-M-F- GGAATCTGACGCTGGGTAAA	875pb	MENDONÇA et al., 2007
	CTX-M-R- AGAATAAGGAATCCCATGGTT		

Legenda : pb = pares de bases. R = iniciador de orientação reverse. F = iniciador de orientação forward.

Para todas as reações de amplificação, uma alíquota contendo 1,0 µL do DNA cromossômico foi adicionado à uma mistura da reação da PCR para um volume final de 25 µL, contendo os seguintes componentes da marca Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA para a detecção dos genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{CTX-M-15}: 16,75 µL de água Milli-Q, 2,5 µL do tampão PCR 10X, 0,5 µL (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos trifosfatado (dNTPs), 1,25 µL (1,5 mM) de solução MgCl₂, 1,25 µL (25 pmoles) de cada uma das seqüências iniciadoras e 0,5 µL de *Taq* DNA polymerase recombinante (2,5 U).

Os tubos contendo os componentes das reações foram submetidos às seguintes condições de amplificação: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 5 minutos, seguidos de 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 45 segundos, anelamento a 61°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, com 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos, no equipamento Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research.

A mistura de reagentes para a reação da PCR na detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{KPC} foi preparada da mesma forma para os 3 genes, sendo modificados somente as seqüências iniciadoras (Tabela 2). A mistura de reagentes teve um volume final de 25 µL contendo 1,0 µL de DNA cromossômico, 17,25 µL de água Milli-Q, 2,5 µL do tampão PCR 10X, 0,5 µL (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos trifosfatado (dNTPs), 0,75 µL (1,5

mM) de solução $MgCl_2$, 1,25 μL (25 pmoles) de cada uma das sequências iniciadoras e 0,5 μL de *Taq* DNA polymerase (2,5 U).

Para as condições de amplificação dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* foram utilizados às seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 53°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para o gene *bla_{KPC}* as condições de amplificação foram: um ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 50°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, com 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos, no equipamento Peltier Thermal Cycler, modelo PTC-200, MJ Research.

4.9. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE E VISUALIZAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

Alíquotas de 5 μL dos produtos de amplificação foram visualizados através de eletroforese em gel de agarose (Sigma) a 1,5% em tampão TBE 0,5X (TRIS-BORATO-EDTA). Foram incluídos em cada gel 5 μL do padrão de peso molecular de 123pb (DNA Ladder, Invitrogen Carlsbad, CA, EUA). A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 130 Volts em temperatura ambiente. Após a corrida, o gel foi corado com brometo de etídio (10 mg /mL) durante 15 minutos, e as imagens foram digitalizadas sob luz ultravioleta em equipamento Image Quant 300-GE- Healthcare.

4.10. DETERMINAÇÃO DA SEQUÊNCIA GÊNICA CODIFICADORA DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO

Para a determinação da variante alélica das β -lactamases detectadas foi realizado o sequenciamento dos produtos da PCR obtidos de todas as enterobactérias produtoras das enzimas *bla_{CTX-M}*, *bla_{CTX-M-15}* e *bla_{KPC}*, por serem estas enzimas mais relevantes devido à sua disseminação clonal.

Os produtos foram purificados usando-se o kit de purificação “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification” (GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido) de acordo com as instruções do fabricante. Ao DNA amplificado foram adicionados 500 μL de tampão de captura (Tampão 1), e colocados numa coluna disposta em um microtubo. Este microtubo foi centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto e o líquido sobrenadante foi desprezado. Em seguida

foram adicionados na coluna 500 µL de tampão de lavagem (Tampão 2), sendo centrifugado novamente a 10000 rpm por 1 minuto e desprezado o líquido. A coluna então foi colocada em um novo microtubo e foram adicionados 50 µL do tampão e eluição (Tampão 3), seguido por 1 minuto de incubação em temperatura ambiente. A seguir o microtubo foi novamente centrifugado a 10000 rpm por 1 minuto. A coluna foi desprezada e o líquido mantido em freezer -20°C.

Para a preparação das microplacas para o sequenciamento foram adicionados 4,5 µL de água Milli-Q, seguido de 2,0 µL do DNA purificado e 1,0 µL das sequências de iniciação. As microplacas foram então encaminhadas para a Plataforma Genômica DNA- PDTIS do Laboratório de Sequenciamento e Bioinformática do Instituto Oswaldo Cruz- FIOCRUZ, onde foi utilizado o sequenciador 3730 DNA analyser (Applied Biosystems). O sequenciamento foi realizado pelo método de terminação com dideoxynucleotídeos usando o Big Dye terminator v.3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) (OTTO et al, 2008). As análises e comparações das sequências foram realizadas com o auxílio do software BLAST 2.0 (*Basic Local Alignment Search Tool*) disponível no website do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI, 2009).

4.11. DETERMINAÇÃO DO POLIMORFISMO GENÉTICO ATRAVÉS DA TÉCNICA DE ANÁLISE DOS PERFIS DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO APÓS ELETROFORESE DE CAMPO PULSADO EM GEL DE AGAROSE (PFGE)

Para a avaliação da clonalidade das amostras bacterianas produtoras de ESBL e carbapenemase do tipo KPC foi realizada a técnica de eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE). O DNA cromossômico das amostras pertencentes à família *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL e/ ou KPC foram preparados pela técnica de uso *in situ*, em blocos de agarose (CDC, 2004).

Para a preparação dos blocos as amostras bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente por “overnight” a 37°C. O crescimento bacteriano foi suspenso em aproximadamente 1 mL do Tampão de suspensão celular BSC (Buffer Suspension Celular) até uma turvação correspondente a 3,0 da Escala de McFarland. Em seguida, foram transferidos 200 µL da suspensão para um microtubo e acrescentados 5 µL de proteinase K (50 mg/mL) da marca Sigma. Esta suspensão foi homogeneizada invertendo-se suavemente 5– 6 vezes o microtubo. Após a homogeneização foram adicionados 200 µL de agarose a 1%

Seaken Gold, da marca Sigma, (agarose 1% e dodecil sulfato de sódio (SDS) 1%) e rapidamente distribuídos nos poços do moldador. O moldador foi colocado por 5 minutos em geladeira à 2 - 8°C para solidificar. A seguir, os blocos foram colocados em um tubo Falcon (15 mL) contendo 2 mL de solução de lise e 5 µL de proteinase K (50 mg/mL), e incubados em banho-maria a 50°C por 2h. Após este período foi retirada a solução de lise e foram feitas 3 lavagens com água Milli-Q (10 mL) e 1 lavagem com tampão TE 1X (Tris-HCl 10mM pH 8,0; EDTA 0,1mM pH 8,0), incubando-se a 50°C por 15 minutos em banho-maria entre as lavagens. Ao final desta etapa, os blocos foram guardados na geladeira à 2 - 8°C em tubo Falcon (15 mL) com 2 mL com tampão TE.

Para a digestão com enzima de restrição cada bloco foi dividido em três partes. Um terço do bloco foi então colocado em um microtubo que continha o tampão da enzima (tampão 10 µL e água Milli-Q 90 µL) e foi levado à geladeira à 2 - 8°C por 1h. Após este tempo, o tampão da enzima foi retirado e foi adicionado a mistura da enzima de restrição da marca Invitrogen (enzima, tampão e água Milli-Q em um volume final de 50 µL). Os fragmentos foram incubados por 3 horas em temperatura pré-definida de acordo com a enzima utilizada.

As seguintes quantidades de enzima e temperaturas de incubação foram usadas de acordo com a espécie: *Sma*I (10U) da marca Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, EUA para *P. mirabilis*, 0,5 µL a 30°C e *Xba*I (10U) da marca Roche, Indianápolis, USA para *K.pneumoniae*, *E.cloacae*, *E.coli* e *S.marcescens*, 2,2 µL a 37°C.

Após o tempo de incubação a mistura da enzima foi retirada e foram adicionados 100 µL de tampão TBE 0,75X (Tris 44,5 mM; Ácido Bórico 44,5 mM; EDTA 1mM pH final 8,3) para paralisar a reação.

4.11.1. Preparação e eletroforese em gel de agarose

Foi utilizado como marcador de peso molecular para a corrida eletroforética Lambda DNA Ladder (50-1000 Kb). Uma pequena porção do peso molecular foi cortada e colocada em um microtubo contendo 400 µL tampão TBE 0,75X (Tris/Borato/EDTA) e 400 µL de água Milli-Q.

A eletroforese foi realizada no equipamento de “CHEF- DRIII System” (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA EUA) utilizando-se 2500 mL de tampão de corrida TBE 0,5X.

Os blocos com o DNA digerido foram aplicados no pente, sendo que os marcadores ficaram nas extremidades. O excesso de líquido foi retirado dos blocos com o auxílio de uma micropipeta e 30µL de agarose foram adicionado para selar os blocos no pente. O pente foi encaixado na forma e o gel de agarose foi adicionado. Após a polimerização, foi levado ao equipamento “CHEF- DRIII System”.

As condições utilizadas na corrida foram: temperatura de 14°C, o ângulo de 120°, voltagem de 6 volts/cm². Os pulsos utilizados variaram de acordo com o micro-organismo e estão descritos abaixo:

Pulso: 0,5 - 35/15 horas (*XbaI*)- *K. pneumoniae* e *E. cloacae*

Pulso: 0,5 - 30 /16 horas (*XbaI*)-*E.coli*

Pulso: 5 - 20 /16 horas (*XbaI*)-*S. marcescens*

Pulso: 0,5 - 15 /18 horas (*SmaI*)-*P. mirabilis*

4.11.2. Visualização dos perfis de fragmentação do DNA

A corrida foi realizada em Gel de agarose a 1% Seakem Gold , com TBE 0,5X. A seguir os fragmentos foram corados com brometo de etídio (10 mg/mL) por 30 minutos e descorado em água por 20 minutos. A visualização e documentação foram feitas sob luz ultravioleta em equipamento Image Quant 300-GE- Healthcare.

4.11.3. Interpretação dos resultados

A análise dos genótipos foi realizada inicialmente através de inspeção visual dos géis de agarose com base nos critérios estabelecidos por Tenover e colaboradores em 1995. Os resultados obtidos foram analisados através de dendrogramas confeccionados a partir da análise da foto do gel no "software" Gel Compar II versão 4.0 (Applied Maths, Sint-Martins-Latem, Belgium). A similariedade entre os fragmentos foi determinada pelo Coeficiente de Dice. O dendograma foi elaborado utilizando UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic averages*), com coeficiente de similaridade maior ou igual a 80% para os perfis serem considerados pertencentes ao mesmo genótipo.

4.12. PRESERVAÇÃO DAS CEPAS

As amostras bacterianas estudadas foram preservadas em nitrogênio líquido e freezer a -30°C, em um criotubo contendo meio de caldo infusão cérebro e coração (Difco), acrescido

de 20% (v/v) de glicerol. Este método permite a integridade genética e estrutural dos microrganismos para estudos futuros com as cepas estocadas. Essas cepas estão fazendo parte da Coleção de Cultura de Bactérias de origem Hospitalar (CCBH).

5. RESULTADOS

5.1. AMOSTRAS BACTERIANAS

Foram incluídos neste estudo 293 amostras bacterianas isoladas de hemocultura de diversas clínicas em cinco hospitais sentinelas no Rio de Janeiro, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008. Essas amostras apresentaram-se como bastonetes Gram negativos, não produziram a enzima citocromo oxidase e o perfil bioquímico estava de acordo com cada espécie da Família *Enterobacteriaceae*.

Na Tabela 2, encontram-se os percentuais das 13 espécies encontradas por hospital de origem. *K.pneumoniae* foi a espécie mais encontrada (41%), seguida pela *E.coli* (25%), *E.cloacae* (12%), *S. marcescens* (10%) e *P. mirabilis* (6%). As demais espécies encontradas apresentaram percentuais iguais ou abaixo de 1%. Entre os hospitais estudados, o HUPE foi o que apresentou o maior número de amostras 106/293 (36%), seguidos do HUAP 64/293 (22%), HSE 48/293 (16%), HNMD 44/293 (15%) e HFB 31/293 (11%).

Tabela 2. Ocorrência de espécies da Família *Enterobacteriaceae* isoladas de hemocultura em hospitais sentinelas do Rio de Janeiro (setembro de 2007 a setembro de 2008).

Espécies bacterianas	Hospital (HFB) n(%)	Hospital (HSE) n(%)	Hospital (HNMD) n(%)	Hospital (HUAP) n(%)	Hospital (HUPE) n(%)	Total amostras n(%)
<i>K. pneumoniae</i>	17(14)	16(13)	17(14)	34(28)	37(31)	121 (41)
<i>E.coli</i>	9(12)	11(15)	13(18)	13(18)	28(37)	74 (25)
<i>E.cloacae</i>	-	8(22)	4(11)	7(19)	17(47)	36 (12)
<i>S. marcescens</i>	3(10)	6(21)	4(14)	6(21)	10(34)	29 (10)
<i>P.mirabilis</i>	2(11)	6(32)	3(16)	1(5)	7(36)	19 (6)
<i>Salmonella sp.</i>	-	-	-	-	1	1 (0,3)
<i>E. aerogenes</i>	-	-	1(33)	-	2(66)	3 (1)
<i>M. morgani</i>	-	-	1(33)	1(33)	1(33)	3 (1)
<i>P.vulgaris</i>	-	-	-	-	2	2 (0,7)
<i>C.freundii</i>	-	-	1	-	-	1(0,3)
<i>S. rubidaea</i>	-	-	-	1	-	1(0,3)
<i>K.oxytoca</i>	-	1(50)	-	-	1(50)	2(0,7)
<i>P. stuartii</i>	-	-	-	1	-	1(0,3)
Total amostras (%)	31(11)	48(16)	44(15)	64(22)	106(36)	293

Legenda: n= n° de amostras; HFB, Hospital Federal de Bonsucesso; HSE, Hospital dos Servidores do Estado; HNMD, Hospital Naval Marcílio Dias; HUAP, Hospital Universitário Antônio Pedro e HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto.

(%) percentual referente ao número de amostras encontrados por hospital em relação ao total de amostras por espécie bacteriana.

5.2. TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS E DETECÇÃO FENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E CARBAPENEMASES

Utilizando o teste fenotípico de “disco-aproximação” para a triagem das 293 amostras bacterianas, foram observados resultados positivos para a produção fenotípica de ESBL em 121 isolados (41%). Na tabela 3, está relacionada a distribuição das espécies isoladas produtoras de ESBL de acordo com o hospital de origem. Podemos observar que entre as 11

espécies produtoras de ESBL, a *K. pneumoniae* foi a mais frequente (52%), seguida pelo *E. cloacae* (13%), *E. coli* (12%), *P. mirabilis* (9%), *S. marcescens* (8%), *M. morgani* (2%). As espécies *E. aerogenes*, *P. stuartii*, *C. freundii*, *S. rubidaea* e *K. oxytoca* apresentaram 0,8% de frequência cada uma (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição das espécies da Família *Enterobacteriaceae* produtoras de enzimas beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura de acordo com o hospital de origem (setembro de 2007 a setembro de 2008).

Espécies bacterianas	Hospitais					Total amostras n (%)
	HFB	HSE	HNMD	HUAP	HUPE	
	n (%)					
<i>K. pneumoniae</i>	11 (17)	3 (5)	11 (17)	16(26)	22 (35)	63(52)
<i>E. cloacae</i>	-	3 (19)	-	3 (19)	10 (62)	16(13)
<i>E. coli</i>	4 (29)	2 (14)	-	3 (21)	5 (36)	14(12)
<i>P. mirabilis</i>	1 (9)	2 (18)	2 (18)	-	6 (55)	11(9)
<i>S. marcescens</i>	1 (10)	2 (20)	1 (10)	3 (30)	3 (30)	10(8)
<i>M. morgani</i>	-	-	1 (50)	1 (50)	-	2(2)
<i>E. aerogenes</i>	-	-	1	-	-	1(0,8)
<i>P. stuartii</i>	-	-	-	1	-	1(0,8)
<i>C. freundii</i>	-	-	1	-	-	1(0,8)
<i>S. rubidaea</i>	-	-	-	1	-	1(0,8)
<i>K. oxytoca</i>	-	1	-	-	-	1(0,8)
Total de amostras (%)	17(14)	13(11)	17(14)	28(23)	46(38)	121

Legenda: n= n° de amostras; HFB, Hospital Federal de Bonsucesso; HSE, Hospital dos Servidores do Estado; HNMD, Hospital Naval Marcílio Dias; HUAP, Hospital Universitário Antônio Pedro e HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto.

(%) percentual referente ao número de amostras encontrados por hospital em relação ao total de amostras por espécie bacteriana.

Proteus mirabilis foi a espécie que apresentou o maior percentual de produção de ESBL, 57%, dos 19 isolados estudados, 11 foram considerados produtores de ESBL. Considerando as outras quatro espécies destacam-se a *K.pneumoniae* com 52% (63/121), seguidos por *E.cloacae* 44% (16/36), *S. marcescens* 34% (10/29) e *E. coli* 19% (14/74) (Tabela 4).

Tabela 4. Distribuição das 5 espécies mais frequentes da Família *Enterobacteriaceae* segundo a produção ESBL de acordo com o hospital de origem (setembro de 2007 a setembro de 2008).

Espécies bacterianas	Hospitais					Total amostras n (%)
	HFB	HSE	HNMD	HUAP	HUPE	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>K. pneumoniae</i>	17/11 (65)	16/3 (19)	17/11 (65)	34/16(47)	37/22 (59)	121/63(52)
<i>E.cloacae</i>	-	8/3 (38)	-	7/3 (43)	17/10 (59)	36/16(44)
<i>E. coli</i>	9/4 (44)	11/2 (18)	-	13/3 (23)	28/5 (19)	74/14(19)
<i>P.mirabilis</i>	2/1 (50)	6/2 (33)	3/2 (66)	-	7/6 (86)	19/11(57)
<i>S.marcescens</i>	3/1 (33)	6/2 (33)	4/1 (25)	6/3 (50)	10/3 (30)	29/10(34)

Legenda: n= n° de amostras; HFB, Hospital Federal de Bonsucesso; HSE, Hospital dos Servidores do Estado; HNMD, Hospital Naval Marcílio Dias; HUAP, Hospital Universitário Antônio Pedro e HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto.

Quanto à distribuição das espécies de enterobactérias produtoras de ESBL por período de isolamento (Tabela 5) podemos observar que as espécies de *K. pneumoniae*, *E. cloacae*, *E.coli* e *P. mirabilis* foram isoladas em todos os quatros trimestres da coleta, enquanto que *S. marcescens* e *M.morganii* foram encontrados somente nos dois últimos trimestres. As outras espécies foram isoladas em diferentes períodos. Considerando o total de amostras bacterianas isoladas por período de coleta (trimestre) podemos observar uma distribuição uniforme nos 4 trimestres.

Tabela 5. Distribuição das espécies da Família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura por período de isolamento

Espécie bacteriana	Período de Isolamento				
	1º Trimestre	2º Trimestre	3º Trimestre	4º Trimestre	Total
	Set.-Nov/07	Dez/07-Fev/08	Mar.-Maio/08	Jun.-Set./08	amostras
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<i>K. pneumoniae</i>	20 (32)	14 (22)	13 (21)	16 (25)	63
<i>E. cloacae</i>	5 (31)	5 (31)	3 (19)	3 (19)	16
<i>E.coli</i>	2 (14)	2(14)	6 (43)	4 (29)	14
<i>P.mirabilis</i>	2 (18)	4 (36)	1 (9)	4 (36)	11
<i>S. marcescens</i>	-	-	8 (80)	2 (20)	10
<i>M. morgani</i>	-	-	1 (50)	1 (50)	2
<i>E.aerogenes</i>	1	-	-	-	1
<i>P. stuartii</i>	-	-	1	-	1
<i>C. freundii</i>	-	-	-	1	1
<i>S. rubidaea</i>	-	-	-	1	1
<i>K. oxytoca</i>	-	-	-	1	1
Total de amostras	30(25)	25(21)	33(27)	33(27)	121

Legenda: n= n° de amostras bacterianas; Set - Nov= Setembro a Novembro; Dez - Fev= Dezembro a Fevereiro; Mar - Maio= Março a Maio; Jun - Set= Junho a Setembro.

Quanto ao setor de atendimento do paciente, podemos ressaltar que sete espécies de enterobactérias produtoras de ESBL foram detectadas nos Centros de Tratamento Intensivo (CTI) e nas enfermarias. As enfermarias apresentaram maior número de isolados (69; 57%), seguidos do CTI (34; 28%), Centro Cirúrgico (9; 8%) e Emergência (8; 7%) (Tabela 6).

Tabela 6. Distribuição das espécies da Família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) isoladas de hemocultura de acordo com o setor de atendimento

Espécies bacterianas	Setor de Atendimento				
	Centro				Total amostras
	CTI n (%)	Enfermaria n (%)	Emergência n (%)	Cirurgico n (%)	
<i>K. pneumoniae</i>	21 (33)	32 (51)	6 (10)	4 (6)	63
<i>E. cloacae</i>	3 (18)	10 (64)	-	3 (18)	16
<i>E.coli</i>	1 (7)	11 (79)	1 (7)	1 (7)	14
<i>P.mirabilis</i>	4 (36)	7 (64)	-	-	11
<i>S.marcescens</i>	3 (30)	7 (70)	-	-	10
<i>M.morganii</i>	1 (50)	1 (50)	-	-	2
<i>E.aerogenes</i>	1	-	-	-	1
<i>P.stuartii</i>	-	-	1	-	1
<i>C.freundii</i>	-	1	-	-	1
<i>S.rubidaea</i>	-	-	-	1	1
<i>K.a oxytoca</i>	-	-	-	-	1
Total de amostras(%)	34 (28)	69 (57)	8 (7)	9 (8)	121

Legenda: n= n° de amostras bacterianas; CTI- Centro de Tratamento Intensivo

Analisando os perfis de resistência aos antibióticos das 121 amostras produtoras de ESBL, observou-se que todos foram resistentes à pelo menos uma das cefalosporinas de 3ª geração (cefotaxima e/ou ceftazidima) e/ ou aztreonam. Das amostras produtoras de ESBL, 91% (110/121) mostraram resistência para à cefotaxima. A porcentagem de resistência para os

outros beta-lactâmicos como a ceftazidima e o aztreonam foram de 52% (63/121) e 36% (44/121), respectivamente. Quanto à cefepima 79% (25 /121) das amostras foram resistentes a esse antibiótico. Neste estudo, 34% e 70%, respectivamente das amostras de *E. cloacae* e *S.marcescens* foram sensíveis para cefepima.

Os percentuais de resistência das amostras bacterianas produtoras de enzimas beta-lactamases de espectro estendido estão apresentados na Tabela 7.

Das 63 amostras de *K.pneumoniae* que apresentaram diminuição de sensibilidade às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam, 10 amostras (16%) foram resistentes à cefoxitina.

Somente uma amostra de *E. coli* produtora de enzima beta-lactamase de espectro estendido foi resistente à cefoxitina.

Todas as amostras de *E.cloacae* e *S. marcescens* que apresentaram resistência às cefalosporinas de 3ª geração e/ou aztreonam foram resistentes à cefoxitina.

Do total de amostras bacterianas estudadas, foram observados elevados percentuais de co-resistência para sulfametoxazol- trimetoprim (86,8%), ciprofloxacina (77,7%), gentamicina (45,5%) e amicacina (29,7%).

Quanto à resistência aos carbapenemas observou-se 11 amostras de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos deste grupo, sendo encontradas as mesmas 10 amostras resistentes ao imipenem, meropenem e ertapenem e 1 amostra resistente somente ao ertapenem. Foram detectados ainda 9 amostras de *E. cloacae* resistentes ao ertapenem. No teste fenotípico para as carbapenemases 20 amostras foram positivas.

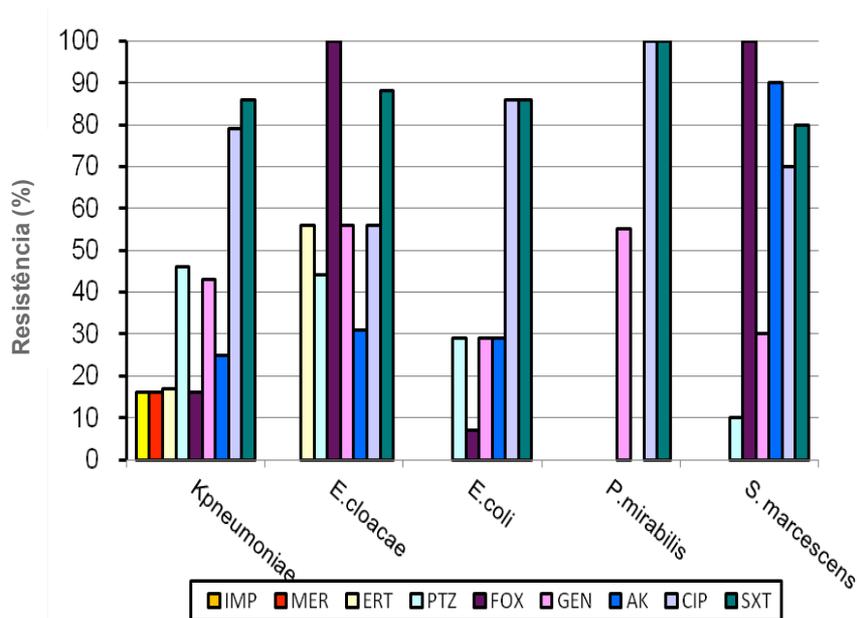
Tabela 7. Resistência das espécies bacterianas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido, frente aos antibióticos.

<i>Espécie bacteriana</i>	<i>Porcentuais de Resistência (%)</i>								
	PTZ	FOX	GEN	AK	CIP	SXT	IMP	MER	ERT
<i>K.pneumoniae</i> (n=63)	29(46)	10(16)	27(43)	16(25)	50(79)	54(86)	10(16)	10(16)	11(17)
<i>E. cloacae</i> (n=16)	7(44)	16(100)	9(56)	5(31)	9(56)	14(88)	-	-	9(56)
<i>E. coli</i> (n=14)	4(29)	1(7)	4(29)	4(29)	12(86)	12(86)	-	-	-
<i>P. mirabilis</i> (n=11)	-	-	6(55)	-	11(100)	11(100)	-	-	-
<i>S.marcescens</i> (n=10)	1(10)	10(100)	3(30)	9(90)	7(70)	8(80)	-	-	-
<i>M. morgani</i> (n=2)	-	1(50)	1(50)	-	1(50)	1(50)	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> (n=1)	-	1(100)	1(100)	1(100)	-	1(100)	-	-	-
<i>P.stuartii</i> (n=1)	-	-	1(100)	-	1(100)	1(100)	-	-	-
<i>C. freundii</i> (n=1)	-	1(100)	1(100)	-	1(100)	1(100)	-	-	-
<i>S. rubidaea</i> (n=1)	-	1(100)	1(100)	-	1(100)	1(100)	-	-	-
<i>K. oxytoca</i> (n=1)	-	-	1(100)	1(100)	1(100)	1(100)	-	-	-
Total amostras (%)	41 (33,8)	41 (33,8)	55 (45,5)	36 (29,7)	94 (77,7)	105 (86,8)	10 (8,3)	10 (8,3)	20 (16,5%)

Legenda: IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem; PTZ, piperacilin-tazobactam; FOX, cefoxitina; GEN, gentamicina; AK, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim. n=número de amostras

Na Figura 5 estão apresentados os percentuais das cinco espécies mais frequentemente isoladas, podendo-se observar uma elevada resistência a amicacina (90%) entre as amostras de *S. marcescens* em relação as outras espécies, enquanto para *P. mirabilis* foi observada 100% de susceptibilidade.

Figura 5. Percentual de resistência aos antibióticos das cinco espécies de enterobactérias mais isoladas



Legenda: IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem; PTZ, piperacilin-tazobactam; FOX, cefoxitina; GEN, gentamicina; AK, amicacina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim.

Foram detectadas 30 diferentes perfis de resistência aos antimicrobianos entre as espécies de enterobactérias estudadas. Em 111 amostras, o perfil de resistência simultânea à ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim (CIP-SXT) foi o mais encontrado (31 amostras; 28%), seguido pelo perfil de resistência simultânea à gentamicina, ciprofloxacina e sulfametoxazol-trimetoprim (GEN-CIP-SXT) em 17 amostras (15%) (Tabela 8).

Uma observação importante é que do total dos 121 amostras resistentes as cefalosporinas de 3^a geração e/ou aztreonam, 10 isolados não apresentaram co-resistência as outras classes de antimicrobianos.

Tabela 8. Perfis de resistência aos antimicrobianos de acordo com a espécie bacteriana.

Perfil de resistência	Espécie bacteriana											Total amostras
	<i>Kp</i> n	<i>Ecl</i> n	<i>Ec</i> n	<i>Pms</i> n	<i>Sm</i> n	<i>Mm</i> n	<i>Eaer</i> n	<i>Ps</i> n	<i>Cf</i> n	<i>Sr</i> n	<i>Koxy</i> n	
IMP-MER-ERT-PTZ-GEN-AK-CIP-SXT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ERT-PTZ-FOX-GEN-AK-CIP-SXT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ERT-PTZ-GEN-CIP-SXT	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
ERT-GEN-AK-CIP-SXT	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ERT-PTZ-CIP-SXT	2	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
PTZ-GEN-CIP-SXT	3	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4
PTZ-GEN-AK-CIP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
PTZ-AK-CIP-SXT	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
PTZ-FOX-CIP-SXT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
FOX-GEN-CIP-SXT	2	-	-	-	-	1	-	-	1	1	-	5
FOX-GEN-AK-SXT					-	-	1	-	-	-	-	1
GEN-AK-CIP-SXT	1	-	2	-	-	-	-	-	-	-	1	4
PTZ-GEN-CIP	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
PTZ-CIP-SXT	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
GEN-CIP-SXT	6	3	2	5	-	-	-	1	-	-	-	17
GEN-AK-SXT	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	4
FOX-CIP-SXT	1	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	2
AK-CIP-SXT	3	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	4
ERT-PTZ	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
ERT-SXT	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
GEN-AK	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
GEN-SXT	1	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3
GEN-CIP	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	1
AK-SXT	1	1	-	-	3	-	-	-	-	-	-	5
CIP-SXT	20	-	6	5	-	-	-	-	-	-	-	31
FOX	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
GEN	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
AK	1	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	4
CIP	1	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	2
SXT	2	2	-	-	1	-	-	-	-	-	-	5
Total de Amostras	58	13	13	11	10	1	1	1	1	1	1	111

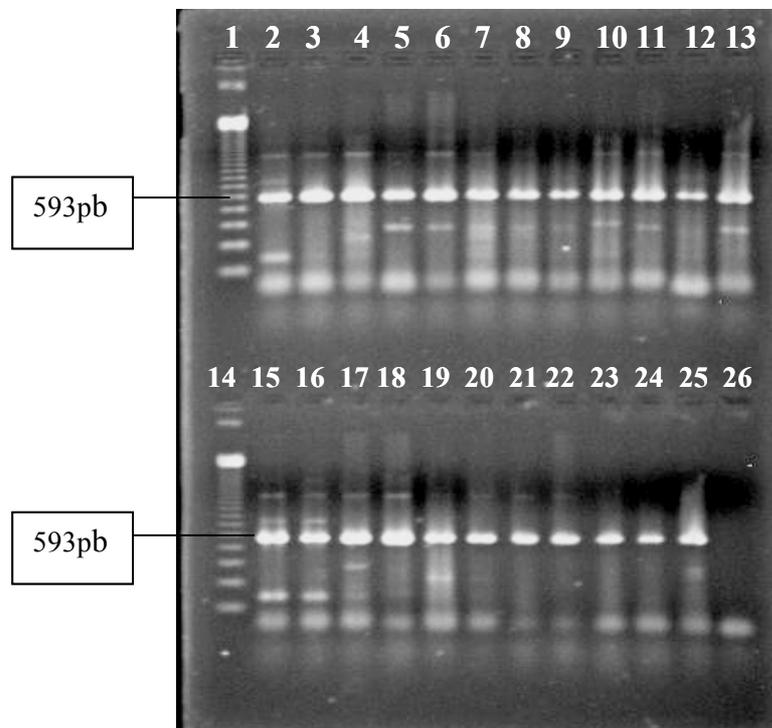
Legenda: *Kp*, *Klebsiella pneumoniae*; *Ecl*, *Enterobacter cloacae*; *Ec*, *Escherichia coli*; *Pm*, *Proteus mirabilis*; *Sm*, *Serratia marcescens*; *Mm*, *Morganella morganii*; *Eaer*, *Enterobacter aerogenes*; *Ps*, *Providencia stuartii*; *Cf*, *Citrobacter freundii*; *Sr*, *Serratia rubidaea*; *Koxy*, *Klebsiella oxytoca*; n= n° de amostras; IMP, imipenem; MER, meropenem; ERT, ertapenem; PTZ, piperacilin-tazobactam; FOX, cefoxitina; GEN, gentamicina; AK, ampicilina; CIP, ciprofloxacina; SXT, sulfametoxazol-trimetoprim.

OBS: Do total de 121 amostras, 10 apresentaram resistência somente as cefalosporinas e ao monobactâmico.

5.3. PESQUISA DOS GENES DE RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS

A detecção de genes de resistência aos beta-lactâmicos foi realizada através da técnica da PCR, em 121 amostras que foram positivas fenotipicamente para ESBL e KPC. Foram pesquisados: *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-15} e *bla*_{KPC}. A Figura 6 corresponde à fotografia de um gel de agarose com produtos de amplificação do gene *bla*_{CTX-M}.

Figura 6. Produto de amplificação do gene *bla*_{CTX-M} obtido através da reação em cadeia da polimerase (PCR) em diferentes amostras de enterobactérias



Legenda: Linha 1: Padrão de peso molecular (123pb); Linha 2: 3432CCBH (*P. mirabilis*); Linha 3: 3433CCBH (*E. cloacae*); Linha 4: 3506CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 5: 3508CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 6: 3527CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 7: 3551CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 8: 3551CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 9: 3557CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 10: 3558CCBH (*E. cloacae*); Linha 11: 3561CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 12: 3562CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 13: 3597CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 14: 3624CCBH (*P. mirabilis*); Linha 14: Padrão de peso molecular (123pb); Linha 15: 3624CCBH (*P. mirabilis*); Linha 16: 3626CCBH (*E. cloacae*); Linha 17: 3654CCBH (*E. cloacae*); Linha 18: 3662CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 19: 3670CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 20: 3672CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 21: 3782CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 22: 3788CCBH (*K. pneumoniae*); Linha 23: 4010CCBH (*S. marcescens*); Linha 24: 4177CCBH (*S. marcescens*); Linha 25: controle positivo; Linha 26: controle negativo.

A distribuição da presença destes genes de resistência entre as espécies da Família *Enterobacteriaceae* está apresentada na Tabela 9.

Tabela 9. Distribuição dos genes codificadores de beta-lactamases de acordo com as espécies da Família *Enterobacteriaceae*

Espécie bacteriana	Genes codificadores de beta-lactamases				Total amostras
	<i>bla</i> CTX-M	<i>bla</i> SHV	<i>bla</i> TEM	<i>bla</i> KPC	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
<i>K. pneumoniae</i>	59(94)	57 (90)	34 (54)	11 (9)	63
<i>E.cloacae</i>	15 (94)	7 (44)	12 (75)	-	16
<i>E.coli</i>	11 (79)	5 (36)	10 (71)	-	14
<i>P. mirabilis</i>	11 (100)	3 (27)	10 (91)	-	11
<i>S. marcescens</i>	4 (40)	5 (50)	5 (50)	-	10
<i>M. morgani</i>	1 (50)	-	2 (100)	-	2
<i>E. aerogenes</i>	1(100)	-	1 (100)	-	1
<i>P.stuartii</i>	1 (100)	-	1 (100)	-	1
<i>C. freundii</i>	1 (100)	-	1 (100)	-	1
<i>S.rubidaea</i>	1 (100)	-	1 (100)	-	1
<i>K. oxytoca</i>	1 (100)	1 (100)	1 (100)	-	1
Total de amostras (%)	106 (87)	79(65)	79 (65)	11(9)	121

Legenda: n= n° de amostras

O gene *bla*_{CTX-M} foi o mais encontrado (106 amostras; 87%), seguido do *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} com 79 amostras (65%) cada um. A presença da *bla*_{KPC} foi confirmada em 11 isolados de *K. pneumoniae* que apresentaram resistência aos carbapenemas, mas para os 9 isolados de *E.cloacae* resistentes ao ertapenem a presença da *bla*_{KPC} foi negativa. Observa-se, que os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foram encontrados em todas as espécies da família *Enterobacteriaceae*, enquanto o gene SHV foi detectado em apenas 6 (seis) espécies. O gene *bla*_{SHV} em *K. pneumoniae* estava presente em 57 amostras (90%).

5.4. ANÁLISE DA SEQUÊNCIA GÊNICA CODIFICADORA DE ESBL E KPC POR TÉCNICA DE SEQUENCIAMENTO

Foi realizada a avaliação dos grupos filogenéticos de CTX-M por sequenciamento e foi observada a predominância do grupo CTX-M-1 em 58 amostras (55%) seguido do grupo CTX-M-2 em 24 amostras (23%). O grupo CTX-M-1 foi o mais detectado em *K. pneumoniae* (73%), *E. coli* (55%), *E. cloacae* (53%), e foi encontrado apenas em 9% de *P. mirabilis*. Já o grupo CTX-M-2 foi detectado na maioria das espécies de enterobactérias (nove espécies), principalmente em amostras de *P. mirabilis* (91%), *S. marcescens* (25%), *K. pneumoniae* (12%) e *E. coli* (9%) e ainda em *M. morgani*, *P. stuartii*, *E. aerogenes*, *S. rubidae* e *K. oxytoca*. O grupo CTX-M-8 foi detectado em *S. marcescens* (50%), *E. coli* (36%) e *K. pneumoniae* (7%). Já o grupo CTX-M-9 foi evidenciado em 7 amostras (47%) de *E. cloacae*, 5 amostras (8%) de *K. pneumoniae* e 1 amostra de *S. marcescens* e *P. stuartii* (Tabela 10).

O sequenciamento dos produtos obtidos das 11 amostras que foram positivas para o gene *bla_{KPC}* demonstrou que todas essas apresentaram similaridade com o KPC do tipo 2 (figura 8).

Do sequenciamento dos produtos obtidos das 43 amostras de *K. pneumoniae* e 6 amostras de *E. coli* que pertenciam ao grupo CTX-M-1 foram realizados as pesquisas da PCR e sequenciamento para o gene *bla_{CTX-M-15}*. Os resultados mostraram que 38 amostras (88%) foram determinadas como CTX-M-15 para *K. pneumoniae* (Figura 8) e 6 amostras (100%) para *E. coli* (Figura 10).

Tabela 10. Grupos de genes *bla*_{CTX-M} encontrados de acordo com as espécies da Família *Enterobacteriaceae*

Espécies bacterianas	Grupo filogenéticos de CTX-M				Total amostras
	CTX-M -1 n (%)	CTX-M -2 n (%)	CTX-M -8 n (%)	CTX-M -9 n (%)	
<i>K. pneumoniae</i>	43 (73)	7 (12)	4 (7)	5 (8)	59
<i>E. cloacae</i>	8 (53)	-	-	7 (47)	15
<i>E. coli</i>	6 (55)	1 (9)	4 (36)	-	11
<i>P. mirabilis</i>	1 (9)	10 (91)	-	-	11
<i>S. marcescens</i>	-	1 (25)	2 (50)	1 (25)	4
<i>M. morgani</i>	-	1 (100)	-	-	1
<i>E. aerogenes</i>	-	1 (100)	-	-	1
<i>P. stuartii</i>	-	1 (100)	-	-	1
<i>C. freundii</i>	-	-	-	1 (100)	1
<i>S. rubidaea</i>	-	1 (100)	-	-	1
<i>K. oxytoca</i>	-	1 (100)	-	-	1
Total amostras (%)	58 (55)	24 (23)	10 (9)	14(13)	106

Legenda: n= n° de amostras

Quanto aos perfis de genes codificadores de beta-lactamases presentes nas espécies de enterobactérias isoladas, foram detectados sete diferentes perfis. O perfil **CTX-M+**, **SHV+**, **TEM+** foi o mais prevalente com 42 amostras (35%), seguidos pelos perfis **CTX-M+**, **SHV+** e **CTX-M+**, **TEM+** com 27 amostras (22%) cada um. Em uma amostra de *K. pneumoniae* não foi evidenciada a presença dos genes pesquisados (Tabela 11).

Tabela 11. Perfis dos genes codificadores de beta-lactamases presentes nas espécies da Família *Enterobacteriaceae* isoladas

Perfis de genes de beta-lactamases	Espécie bacteriana											
	<i>Kp</i>	<i>Ecl</i>	<i>Ec</i>	<i>Pm</i>	<i>Sm</i>	<i>Mm</i>	<i>Eaer</i>	<i>Ps</i>	<i>Cf</i>	<i>Sr</i>	<i>Koxy</i>	Total
	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n	n (%)
CTX-M+,SHV+,TEM+	32	4	2	3	-	-	-	-	-	-	1	42/121 (35)
CTX-M+,SHV+	22	3	2	-	-	-	-	-	-	-	-	27/121 (22)
CTX-M+,TEM+	-	7	5	7	3	1	1	1	1	1	-	27/121 (22)
SHV+,TEM+	2	-	1	-	2	-	-	-	-	-	-	5/121 (4)
CTX+	5	1	2	1	1	-	-	-	-	-	-	10/121 (8)
SHV+	1	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	4/121 (3)
TEM+	-	1	2	-	1	1	-	-	-	-	-	5/121 (4)
NEGATIVO	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/121 (0,8)

Legenda: *Kp*, *Klebsiella pneumoniae*; *Ecl*, *Enterobacter cloacae*; *Ec*, *Escherichia coli*; *Pm*, *Proteus mirabilis*; *Sm*, *Serratia marcescens*; *Mm*, *Morganella morganii*; *Eaer*, *Enterobacter aerogenes*; *Ps*, *Providencia stuartii*; *Cf*, *Citrobacter freundii*; *Sr*, *Serratia rubidaea*; *Koxy*, *Klebsiella oxytoca*; n= n° de amostras

OBS: Um (1) isolado apresentou-se negativo para os genes CTX-M,TEM e SHV.

As 11 amostras que apresentaram *bla*_{KPC} foram detectados em três dos cinco hospitais que participaram do estudo. A maioria deles (7 amostras; 64%) apresentou também *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, enquanto em duas amostras foram verificadas a presença simultânea de *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} (18%). Em uma amostra foi detectada também *bla*_{CTX-M}, *bla*_{TEM} e em outra *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} (Tabela12).

Tabela 12. Perfis dos genes codificadores de beta-lactamases em *K. pneumoniae* portadoras de *bla*_{KPC} isoladas em três hospitais sentinelas do Rio de Janeiro

Perfis de genes de beta-lactamases	Hospitais			
	HFB	HUAP	HUPE	Total amostras
	n	n	n	
KPC+, CTX-M+,SHV+,TEM+	3	1	3	7
KPC+,CTX-M+,SHV+	1	1	-	2
KPC+,CTX-M+,TEM+	-	-	1	1
KPC+, SHV+,TEM+	1	-	-	1
Total de amostras	5	2	4	11

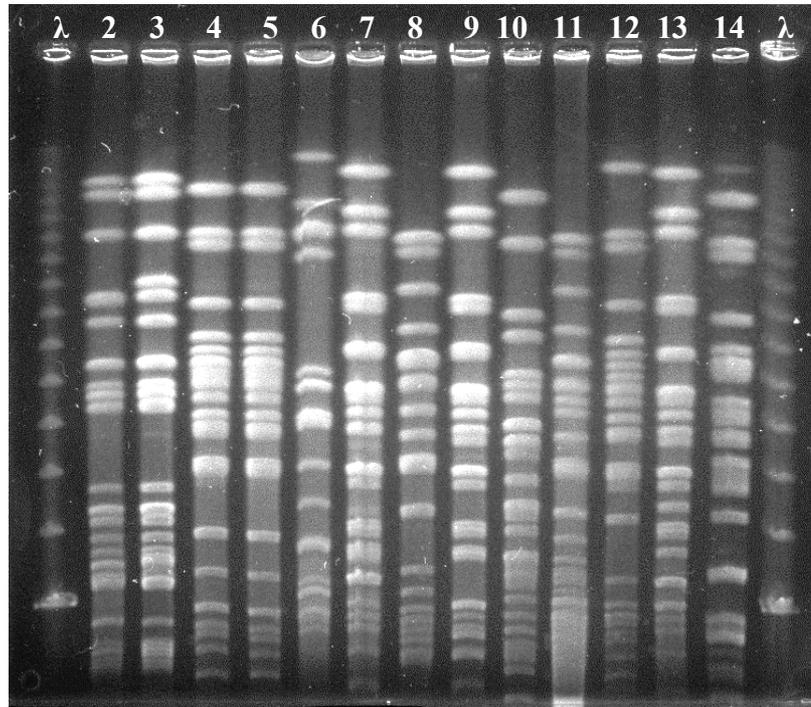
Legenda: n= n° de amostras; HFB, Hospital Federal de Bonsucesso; HUAP, Hospital Universitário Antônio Pedro e HUPE, Hospital Universitário Pedro Ernesto.

5.5. ANÁLISE DO PERFIL DE FRAGMENTAÇÃO DO DNA CROMOSSÔMICO ATRAVÉS DE ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE DE CAMPO PULSADO (PFGE)

A diversidade genômica das amostras de enterobactérias foram avaliadas através da técnica de PFGE. Para está análise foram selecionadas as amostras produtoras de ESBL.

A Figura 7 corresponde à fotografia de um gel de agarose com perfis de fragmentação em amostras de *K.pneumoniae*, após a digestão com a enzima *Xba*I e eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE).

Figura 7. Perfis de fragmentação em amostras de *K. pneumoniae*, após a digestão com a enzima *Xba*I e eletroforese de campo pulsado em gel de agarose (PFGE).



Legenda: Linha 1: Peso molecular (λ); Linha 2: 3868CCBH; Linha 3: 3911CCBH; Linha 4: 3506CCBH; Linha 5: 3508CCBH; Linha 6: 3551CCBH; Linha 7: 3788CCBH; Linha 8: 3800CCBH; Linha 9: 3814CCBH; Linha 10: 3893CCBH; Linha 11: 4060CCBH; Linha 12: 4402CCBH; Linha 13: 3796CCBH; Linha 14: 4081CCBH; Linha 15: Peso molecular (λ)

O dendograma apresentado na Figura 8, demonstra os 26 genótipos do DNA cromossômico, das 63 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL. Estes perfis foram nomeados de A-Z, onde os perfis com $\geq 80\%$ de similaridade foram considerados do mesmo genótipo. Os resultados para *K. pneumoniae* mostram que das 63 amostras, 33 (52%) pertenciam a quatro genótipos predominantes A (n=8), B (n=10), C (n=9) e D (n=6) mas não relacionados geneticamente. O genótipo A (8 amostras) e os genótipos D, H e J (uma amostra cada) apresentaram amostras com *bla*_{KPC}. Considerando a distribuição dos genótipos, em *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em relação aos cinco hospitais estudados, o genótipo C foi encontrado em quatro hospitais (HUAP, HFB, HUPE e HNMD) e o genótipo A (HUAP, HFB e HUPE) e B (HUAP, HUPE e HNMD) em 3 hospitais cada um. Os genótipos G, H, I, J, F e D em 2 hospitais cada um. Quanto à relação dos genótipos com a presença do gene *bla*_{CTX-M} observa-se que o grupo CTX-M-1 foi encontrado em quinze genótipos (A, B, C, D, F, H, J, K, R, S, T, V, Y, W e Z) e estava presente nos 5 hospitais que participavam do estudo tanto em 2007 quanto em 2008. Entre essas amostras do grupo CTX-M-1, o gene CTX-M-15 foi

encontrado em dez desses genótipos (38 amostras; 88%). Somente cinco genótipos (K, H, R, S e V) foram negativos para o gene CTX-M-15. O grupo CTX-M-2 foi encontrado em seis genótipos (E, M, N, O, P e X) em 3 hospitais (HUAP, HFB e HUPE) em 2007 e 2008. Já o grupo CTX-M-8 foi detectado em quatro genótipos (L, H, I e Q), em 3 hospitais (HUAP, HFB e HUPE), em 2007 e 2008. O grupo CTX-M-9 foi encontrado também em quatro genótipos (E, G, I e J), nos hospitais HFB, HUPE e HSE, em 2007 e 2008.

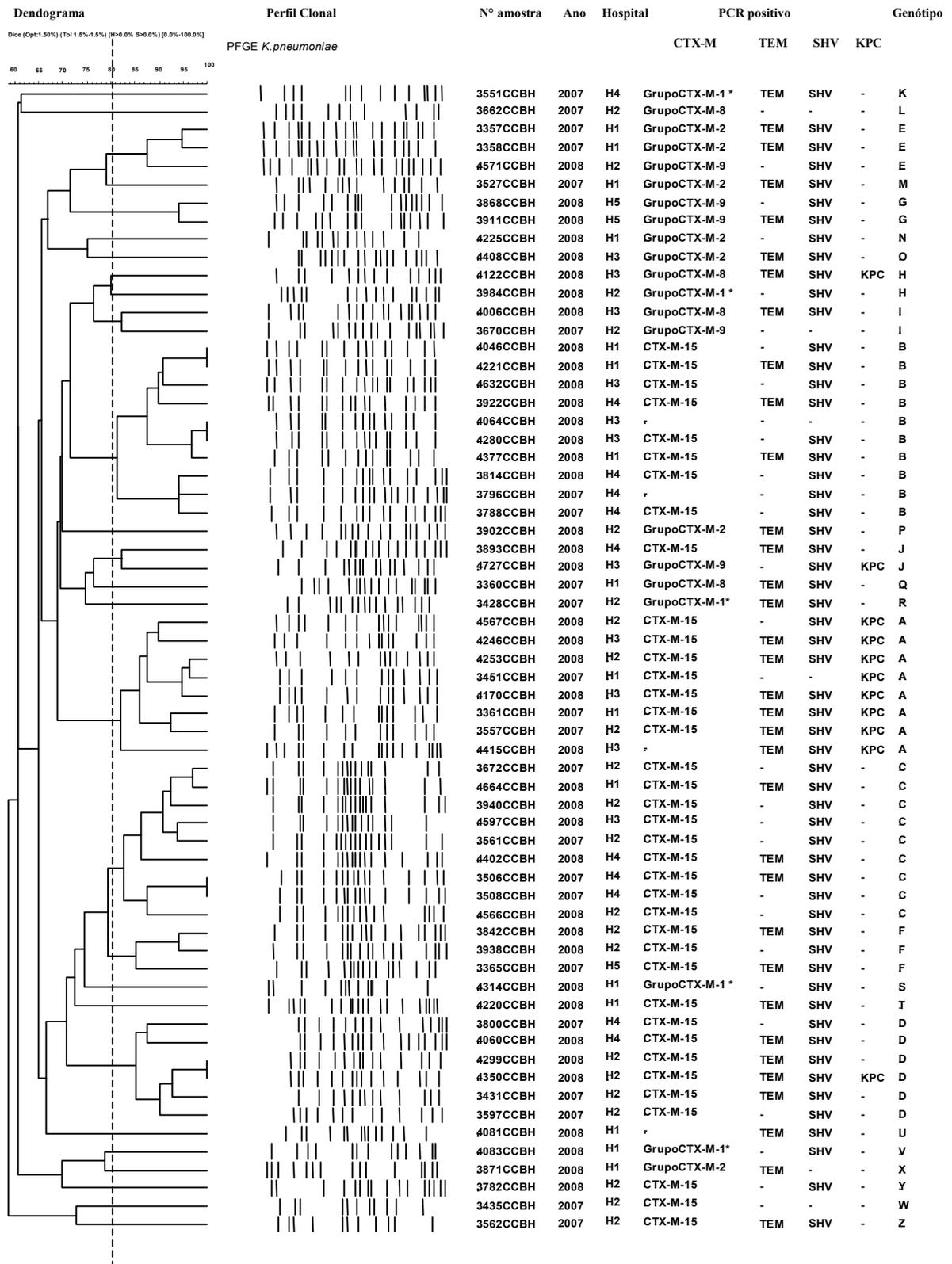
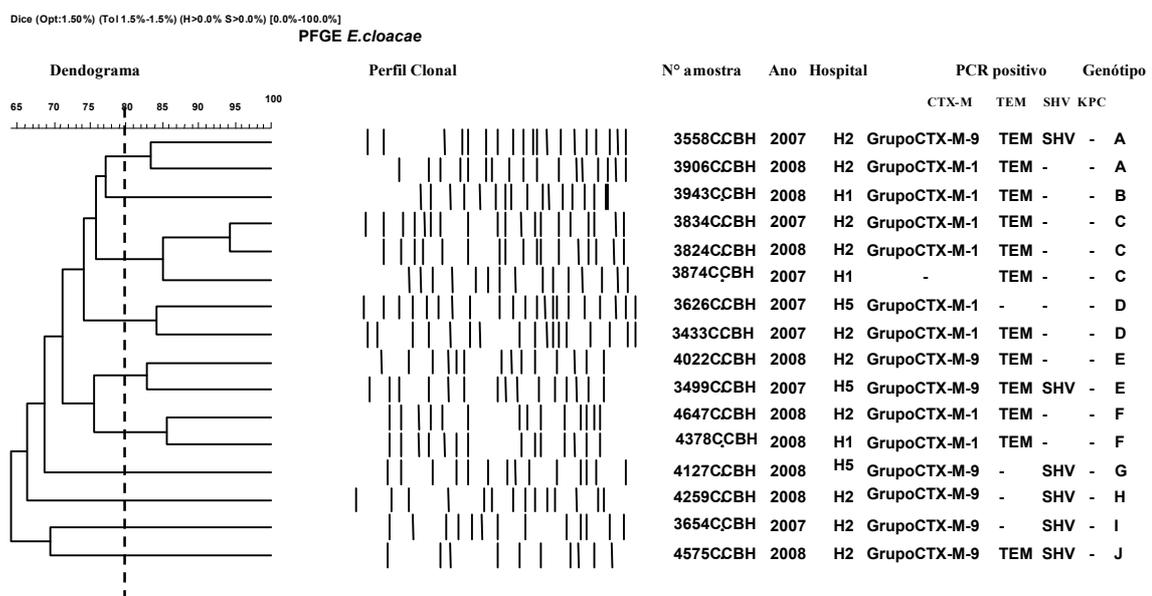


Figura 8. Dendograma das 63 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL

Legenda: H1: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); H2: Hospital Federal de Bonsucesso (HFB); H3: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); H4: Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e H5: Hospital dos Servidores do Estado (HSE).

Na análise do polimorfismo genético das 16 amostras de *E. cloacae* produtoras de ESBL foram encontradas 10 perfis de fragmentação, conforme mostrado na Figura 9. Entre os genótipos encontrados destacam-se o genótipo C (3 amostras) detectados em 2 hospitais (HUAP e HFB) e os genótipos A (hospital HFB), D, E (hospitais HFB e HSE) e F (hospitais HUAP e HFB), com 2 amostras de cada um. Quanto à relação dos genótipos com a presença do gene *bla*_{CTX-M} foi observado que o grupo CTX-M-1 (8 amostras; 50%) foi encontrado em 5 genótipos (A, B, C, D, F), em 3 hospitais (HUAP, HFB, HSE) tanto em 2007 quanto em 2008. O grupo CTX-M-9 (7 amostras; 44%) foi detectado em 6 genótipos (A, E, G, H, I e J), em 2 hospitais (HFB e HSE) em 2007 e 2008. Não foi detectado o gene *bla*_{CTX-M} em uma amostra de *E. cloacae*.

Figura 9. Dendograma das 16 amostras de *E. cloacae* produtoras de ESBL

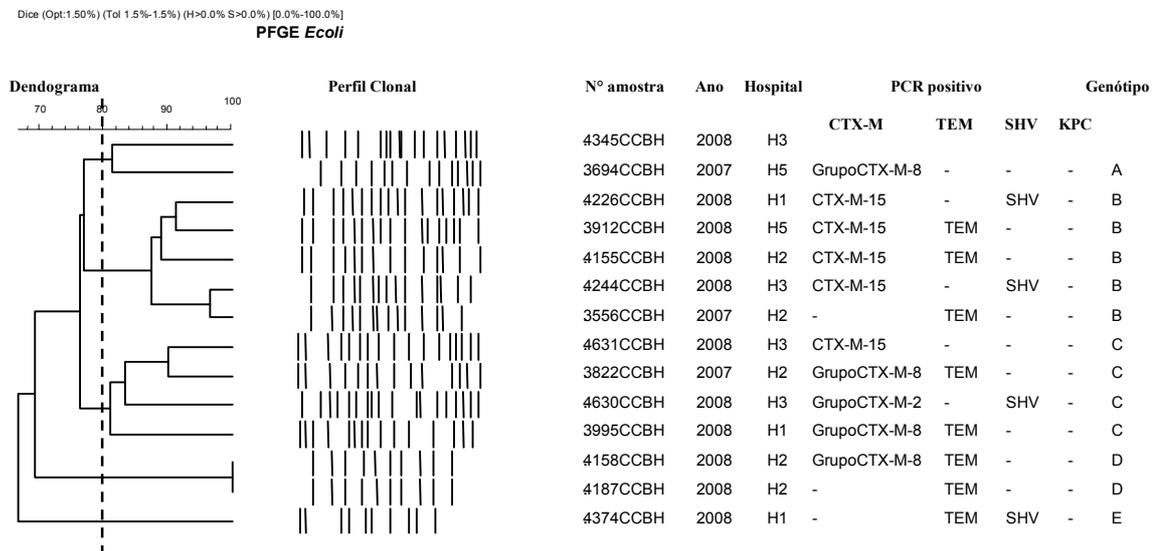


Legenda: H1: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); H2: Hospital Federal de Bonsucesso (HFB); H3: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); H4: Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e H5: Hospital dos Servidores do Estado (HSE).

Na Figura 10, verifica-se 5 perfis de fragmentação em 14 amostras de *E. coli* produtoras de ESBL, sendo 2 genótipos predominantes o B (5 amostras) e C (4 amostras) encontrados em 4 e 3 hospitais, respectivamente. Quanto à relação dos genótipos com a presença do gene *bla*_{CTX-M}, o grupo CTX-M-1 foi encontrado nos genótipos A, B e C em 4 hospitais (HUAP, HFB, HUPE e HSE) em 2008. Desses, todos foram positivos para o gene CTX-M-15. O grupo CTX-M-2 foi detectado em uma amostra do genótipo C no hospital HUPE em 2008. Para as amostras do grupo CTX-M-8 foram encontrados os genótipos A, C e

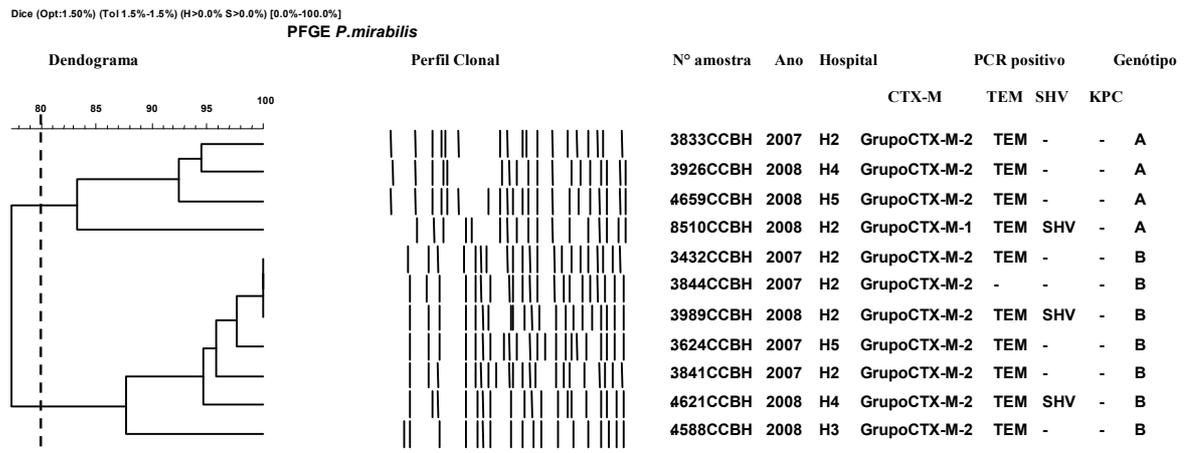
D em 3 hospitais (HUAP, HFB e HSE) em 2007 e 2008. Não foi detectado o gene *bla*_{CTX-M} em 3 amostras de *E. coli*.

Figura 10. Dendograma das 14 amostras de *E. coli* produtoras de ESBL



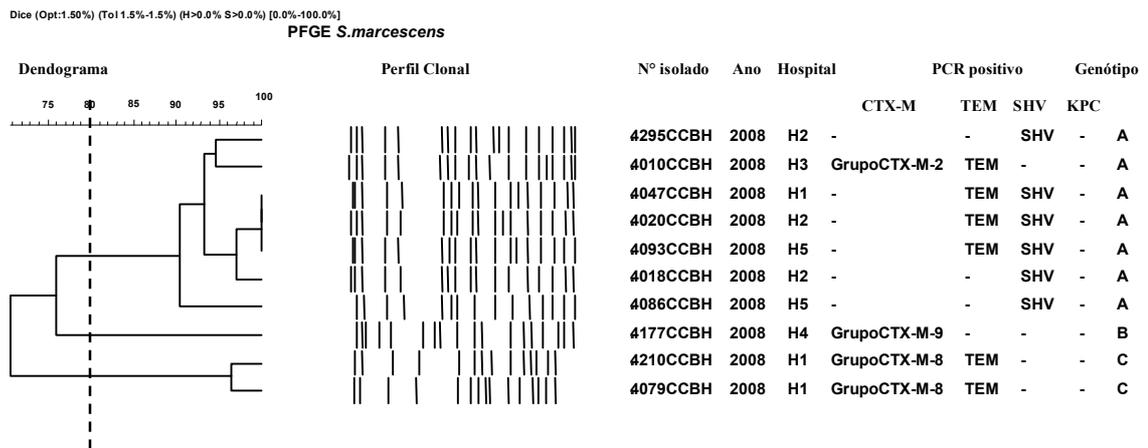
Legenda: H1: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); H2: Hospital Federal de Bonsucesso (HFB); H3: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); H4: Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e H5: Hospital dos Servidores do Estado (HSE).

Utilizando a enzima de restrição *Sma*I, foram encontrados em 11 amostras de *P. mirabilis* produtoras de ESBL 2 genótipos predominantes o A (4 amostras) em 3 hospitais (HFB, HNMD e HSE) e o B (7 amostras) em 4 hospitais (HFB, HUPE, HNMD e HSE), conforme apresentado no dendograma da Figura 11. Quanto à relação dos genótipos com a presença do gene *bla*_{CTX-M} podemos relatar que o grupo CTX-M-1 foi encontrado em uma amostra do genótipo A no hospital HFB em 2008 e o grupo CTX-M-2 foi predominante nos genótipos A e B em 4 hospitais (HFB, HUPE, HNMD e HSE) em 2007 e 2008.

Figura 11. Dendograma das 11 amostras de *P.mirabilis* produtoras de ESBL

Legenda: H1: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); H2: Hospital Federal de Bonsucesso (HFB); H3: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); H4: Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e H5: Hospital dos Servidores do Estado (HSE).

Entre as 10 amostras de *S. marcescens* foram encontradas 3 genótipos, sendo o genótipo A presente em 7 amostras e em 4 hospitais (HUAP, HFB, HUPE e HSE), conforme a Figura 12. Quanto à relação dos genótipos com a presença do gene *bla*_{CTX-M} podemos relatar que o grupo CTX-M-2 foi encontrado no genótipo A, no hospital HUPE em 2008. O grupo CTX-M-8 foi encontrado no genótipo C, no hospital HUAP em 2008 e o grupo CTX-M-9 no genótipo B, no hospital HNMD em 2008. Não foi detectado o gene *bla*_{CTX-M} em 6 amostras de *S.marcescens*.

Figura 12. Dendograma das 10 amostras de *S.marcescens* produtoras de ESBL

Legenda: H1: Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP); H2: Hospital Federal de Bonsucesso (HFB); H3: Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE); H4: Hospital Naval Marcílio Dias (HNMD) e H5: Hospital dos Servidores do Estado (HSE).

6. DISCUSSÃO

Bactérias produtoras de ESBL são um problema mundial, particularmente em países da América Latina e especialmente no Brasil, onde elevadas taxas de enterobactérias produzindo ESBL tem sido encontradas (SUPERTI et al, 2009).

Devido à escassez de dados na literatura brasileira, este estudo foi realizado a fim de se obter informações consistentes e representativas a respeito das características genotípicas e epidemiológicas das enterobactérias produtoras de ESBL, em hemocultura, isoladas em hospitais sentinelas da ANVISA, localizados no Rio de Janeiro.

A prevalência das amostras pertencentes à Família *Enterobacteriaceae* produzindo ESBL avaliados no presente estudo foi de 41%, uma porcentagem maior do que a descrita anteriormente no Brasil, que foi de 29% em um estudo multicêntrico realizado no Rio Grande do Sul (MENDES et al, 2000) e de 24% em um estudo em Curitiba (NOGUEIRA et al., 2006). A prevalência de ESBL em enterobactérias no Brasil é considerada elevada quando comparada com outras partes do mundo, como na Polônia (11,1%) (EMPEL et al, 2008), na Itália (7,4%) (LUZZARRO et al, 2006) e na França (1,7%) (GALAs et al, 2008).

Estes resultados são relevantes, pois o grande número de amostras de hemocultura evidência os riscos associados às infecções por esses micro-organismos, pois muitos autores relacionam a bacteremia por micro-organismos produtores de ESBL à maior mortalidade, permanência nos hospitais e elevados custos (TUMBARELLO et al, 2007; TUMBARELLO et al, 2010). Os relatos da presença de ESBL em amostras clínicas de pacientes com infecções são importantes para adequar o tratamento e reduzir a mortalidade (SCHWABER; CARMELI, 2007; MARCHAIM et al, 2010).

A prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL, no presente estudo foi de 52%, sendo considerada mais elevada do que nos estudos do programa SENTRY que foi de 48% (SADER et al., 2001) e nos relatos de amostras clínicas dos hospitais no Rio Grande do Sul e no Maranhão que foram 44% e 50%, respectivamente (WOLLHEIM, et al, 2011; ABREU et al, 2011). No Brasil, esta espécie é frequentemente encontrada produzindo ESBL, com uma frequência de aproximadamente de 50%, ao contrário dos 5% nos Estados Unidos e Japão, 15-20% na Europa e 20-50% nos países asiáticos (SADER et al,2001; NOGUEIRA et al, 2006; TURNER, 2005; GALES; SADER; JONES, 2002; VILLEGAS et al, 2008).

Uma comparação entre os resultados da resistência à ceftazidima, cefotaxima e aztreonam revelaram que a cefotaxima foi a droga mais sensível para detectar a produção de ESBL, como encontrada em outro trabalho realizado no Brasil (DIAS et al, 2008). O elevado

percentual de resistência à cefotaxima reforça os resultados da grande produção de CTX-M neste estudo, onde esta enzima é caracterizada pela maior capacidade de hidrolisar a cefotaxima, do que a ceftazidima (MATSUMOTO et al, 1988). Segundo Drieux e colaboradores, em 2008, se a cefotaxima é um melhor indicador de produção de CTX-M, a ceftazidima é melhor para outras ESBLs. Isso mostra a importância de se usar as duas cefalosporinas para detecção de todos os tipos de ESBL, já que os substratos preferidos pelas enzimas diferem significativamente.

A resistência à cefoxitina detectada em algumas amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* sugere a produção de β -lactamase do tipo AmpC plasmidial, pois esta tem sido frequente nestas espécies, sendo a cefoxitina usada como um marcador, onde o antibiótico é degradado pela AmpC, mas não pelas ESBL. No entanto, é difícil afirmar somente pelo teste fenotípico, sendo necessários estudos genotípicos posteriores para uma conclusão final. Outros mecanismos também são prováveis para resistência à cefoxitina como a redução da permeabilidade ou hiperprodução de β -lactamases de pequeno espectro (NIKAIDO, 2003; BLACK; MOLAND; THOMSON, 2005; MARTINEZ-MARTINEZ, 2008). Quanto as amostras de *E. cloacae* e *S. marcescens*, todas apresentaram resistência à cefoxitina. Isto se deve ao fato dessas espécies serem hiperprodutoras intrinsecamente de beta-lactamases do tipo AmpC cromossômicas, quando induzidas.

A inclusão da cefepima no teste fenotípico como substrato para detecção de ESBL, ao lado da ceftazidima e cefotaxima, é um fator importante, pois altos níveis de expressão de AmpC têm efeito mínimo na atividade de cefepima, o que faz dessa droga um agente de detecção de ESBL na presença de AmpC (LIVERMORE, 1995; HO et al, 2009; TOWNE et al, 2010). No presente estudo, apesar de terem sido encontradas amostras sensíveis à cefepima em cepas possivelmente produtoras de AmpC (*E. cloacae* e *S. marcescens*), foi observado, a produção de pelo menos uma das beta-lactamases do tipo CTX-M, SHV e TEM.

Todas as espécies de enterobactérias produtoras de ESBL apresentaram alta porcentagem de resistência ao sulfamethoxazol-trimetoprim (86.8%), ciprofloxacina (77.7%) e gentamicina (45.5%), exceto para as amostras de *S. marcescens* que mostraram maior resistência para amicacina ao invés da gentamicina. A co-resistência para outras classes de antimicrobianos que não os beta-lactâmicos entre os micro-organismos produtores de ESBL e KPC tem sido relatada em muitos outros estudos e pode ser devido à simultânea transferência de genes de resistência via plasmídeos e integrons (MINARINI et al, 2008). Assim, a produção de ESBL é frequentemente acompanhada por multirresistência as outras classes de antibióticos, de forma que diminuam bastante as opções de tratamento em pacientes com

infecções com estas enzimas (MARTINS et al, 2006).

Neste estudo, o tipo predominante de ESBL foi o CTX-M, presente em 87% das amostras de ESBL positivas. O grupo CTX-M se disseminou primeiramente na América do Sul (RADICE et al., 2002) sendo o tipo prevalente no Brasil, segundo trabalhos realizados em São Paulo e no Rio Grande do Sul (TOLLENTINO et al, 2011; WOLLHEIM et al, 2011; ABREU et al, 2011) e em outros países da América Latina (VILLEGAS et al, 2008). Atualmente, é também o tipo predominante em outras regiões do mundo (GOVINDEN et al., 2007; CANTON; COQUE, 2006), sendo considerado um grupo crescente de ESBLs, inclusive em infecções ambulatoriais (ROSSOLINI; D'ANDREA; MUGNAIOLI, 2008). É provável que esta frequência elevada se deva à disseminação de plasmídeos codificadores de CTX-M situados em elementos genéticos móveis (TOLLENTINO et al, 2011).

Entre os tipos de CTX-M houve uma predominância do gene CTX-M-15 na maioria dos genótipos, das amostras de *K. pneumoniae* e de *E. coli*, em mais de um hospital no Rio de Janeiro e em diferentes períodos. Esse fato é muito preocupante, pois este gene tem sido frequentemente associado a surtos em hospitais e na comunidade, em muitos continentes e países como a Rússia, o Reino Unido, a Índia, a Espanha, a Áustria, o Canadá, os EUA e a Suécia, devido a um clone epidêmico em *E.coli*, representado pela sequência tipo 131 (ST131) e sorotipo O25:H4 (NICOLAS-CHANOINE et al, 2008; PEIRANO; PITOU, 2010). Em *K. pneumoniae*, o CTX-M-15 também tem sido associado a clones epidêmicos resistentes à ciprofloxacina na Hungria, Espanha e Coreia, representados pelo ST11 e ST15 (DAMJANOVA et al, 2008; OTEO et al, 2009; SHIN; KIM; KO, 2011). Na América do Sul, o CTX-M-15 foi relatado pela primeira vez em 2004, em amostras de *E. coli* no Peru, na Bolívia e na Colômbia (PALLECCHI et al, 2004; VALENZUELA et al, 2006). No Brasil, o CTX-M-15 foi identificado em amostras clínicas de *K. pneumoniae* e de *E. coli* em São Paulo (TOLLENTINO et al, 2011; CERGOLE-NOVELLA et al, 2010). No Rio de Janeiro este gene foi encontrado relacionado a um clone dominante, em *E. coli*, pertencente ao ST410 e também ao ST131, mas este último não estava associado a um genótipo dominante. (PEIRANO et al, 2011). A alta detecção do gene CTX-M-15 neste trabalho pode estar atribuída provavelmente a disseminação clonal desse gene de resistência que se tornou endêmico e que estão circulando entre os hospitais no Rio de Janeiro.

A predominância do grupo CTX-M-2 em amostras de *P. mirabilis* e também em outras espécies de enterobactérias, reforça os frequentes relatos de que este grupo está disseminado pelos países da América do Sul, como Argentina, Bolívia e Peru (QUINTEROS et al, 2003; CELENZA et al, 2006; VILLEGAS et al, 2008) e também no Brasil (GARCIA et al, 2008;

MINARINI et al, 2009; LOPES et al, 2010; TOLENTINO et al, 2011, ANDRADE et al, 2011).

Os grupos CTX-M-8 e CTX-M-9 foram descritos pela primeira vez no Brasil em amostras de *Citrobacter amalonaticus* e *E. cloacae* (BONNET et al, 2000b) e em *K.pneumoniae*, *E. cloacae*, *S. marcescens* e *C.freundii* (BONNET et al, 2001), respectivamente. Apesar dos dados escassos sobre esses grupos foram relatados recentemente em *K. oxytoca* e *K. pneumoniae* em São Paulo (CLÍMACO et al, 2010) e também em *K. pneumoniae* produtora de KPC (PEIRANO et al, 2009).

Quanto ao gene que codifica o tipo SHV, estes foram detectados em 65% do total de amostras, sendo encontradas em seis espécies de enterobactérias, das quais em *K. pneumoniae* a prevalência foi de 90%. Apesar da maioria das enzimas deste grupo serem ESBL, não podemos deixar de comentar de que as espécies de *K. pneumoniae* possuem o gene cromossômico intrínseco de *bla_{SHV-1}*, que não codifica uma ESBL, portanto a elevada porcentagem do tipo SHV em amostras de *K.pneumoniae* pode ser devido ao fato deste gene *bla_{SHV-1}* ser ubiqüitário nesta espécie (TOLENTINO et al, 2011), entretanto em cinco amostras desse micro-organismo não foram detectados o gene *bla_{SHV}*.

Em relação ao gene que codifica o tipo TEM, estes foram detectados também em 65% do total de amostras, presentes em todas as espécies de enterobactérias, das quais em *P.mirabilis* a prevalência foi de 91%. Observamos nesse estudo que o gene TEM geralmente estava presente em associação com os genes SHV e/ou CTX-M, exceto para 5 amostras (*E. cloacae*, *E. coli*, *S. marcescens* e *M. morgani*). Não foi possível afirmar para esse gene do tipo TEM, a responsabilidade para o fenótipo de ESBL, uma vez que nem todas as enzimas deste grupo, codificam genes ESBL.

Experimentos adicionais como sequenciamento dos amplicons de DNA (SHV, TEM e CTX-M) bem como experimentos para avaliar a mobilização de genes codificando ESBL serão necessários para completar a identificação das β -lactamases produzidas pelas amostras na presente investigação.

Neste estudo, observamos que quase todas as amostras carregavam pelo menos um determinante genético pertencendo aos genes das famílias *bla_{CTX-M}*, *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, com exceção de uma amostra de *K. pneumoniae* (CCBH4064) no qual não foram encontrados nenhum desses três genes pesquisados, porém a amostra apresentou resistência às cefalosporinas de 3^o geração e teste fenotípico positivo para ESBL. Nesta bactéria, outros relevantes tipos de ESBLs, como VEB, PER, entre outras enzimas com atividade de espectro estendido ou outros mecanismos de resistência, como a diminuição da permeabilidade da

membrana externa, a hiperexpressão de bomba de efluxo, e a produção de plasmídeo mediando β -lactamases do tipo AmpC podem explicar este resultado (TOLLENTINO et al, 2011).

Em relação as amostras produtoras de KPC, existem relatos de que esta enzima já tem sido descrita mundialmente (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009; CUZON et al, 2010), inclusive no Brasil (MONTEIRO et al, 2009; PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO et al, 2009, SEKI et al, 2011; ANDRADE et al, 2011). Entre as amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC estudadas a maioria foi do genótipo A, denominado clone “*Kp-RJ*”. Este clone recebeu este nome, pois foi descoberto em *K. pneumoniae* e se encontrava disseminado por vários hospitais no Rio de Janeiro (SEKI et al, 2011). Esse clone pertence ao ST437, que é um único locus variante do ST11 e do ST258. O ST258 é um clone globalmente disseminado e associado com a produção de KPC em diferentes países da América do Norte, Europa e Ásia (ANDRADE et al, 2011). Já o ST11 em *K. pneumoniae* foi reportado pela primeira vez na França em 1997 e atualmente é predominante na China, Coreia, Hungria, e também tem sido detectado na Holanda, Noruega, Polônia, Portugal e Espanha (BARANIAK et al, 2009; CUZON et al, 2010; KO et al, 2010; RHEE et al, 2010; TÓTH et al, 2010; QI et al, 2011). Este ST11 tem sido extensivamente associado com diferentes ESBLs, principalmente o tipo CTX-M-15 e CTX-M-14 (OTEO et al, 2009; TÓTH et al, 2010; KO et al, 2010) e mais recentemente com KPC-2 (BARANIAK et al, 2009; SAMUELSEN et al, 2009; QI et al, 2011) e a enzima VIM (KRISTÓF et al, 2010). No Brasil, o ST11 foi descrito inicialmente em Pernambuco e Minas Gerais (CUZON et al, 2010; SEKI et al, 2011), mas dados não publicados do LAPIH relatam que este ST11 esta disseminado por outras cidades brasileiras. Já o clone ST437, descrito primeiramente no Rio de Janeiro e Espírito Santo (SEKI et al, 2011) também está disseminado pelos Estados do Ceará e Santa Catarina e no Distrito Federal (dados não publicados do LAPIH), apresentando um grau de epidemicidade semelhante aos reportados para os outros membros do complexo clonal (CC) 258. Estes achados de KPC, mostram claramente o envolvimento de clones na disseminação e manutenção de patógenos multirresistentes.

Uma observação importante é que os trabalhos descritos no Brasil, em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, têm sido associados com diferentes grupos de CTX-M como o CTX-M-2 (CUZON et al, 2010; MONTEIRO et al, 2009; PEIRANO et al, 2009), CTX-M-1, CTX-M-8 (PEIRANO et al, 2009) e agora o CTX-M-15 encontrados neste estudo. Essa frequente associação de CTX-M com amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC neste e outros estudos parece refletir a aquisição de plasmídeos transmissíveis ou transposons

carreando o gene *bla*_{KPC-2} por amostras locais endêmicas ou por plasmídeos transmissíveis abrigando *bla*_{CTX-M} por clones epidêmicos de bactérias produtoras de KPC (CURIAO et al, 2010). Outra importante observação foi que a enzima KPC esteve presente no mesmo genótipo onde a maioria das amostras não foram produtoras de KPC, mostrando portanto a provável aquisição do gene *bla*_{KPC-2} por amostras endêmicas abrigando o gene CTX-M-15 ou por clones epidêmicos de *K.pneumoniae*.

O gene *bla*_{KPC} não foi detectado em nove amostras de *E. cloacae* resistentes somente ao ertapenem, isto pode ser devido a outros mecanismos de resistência como uma associação entre a produção da enzima CTX-M ou AmpC e a perda da porina, que também é responsável pela diminuição da susceptibilidade aos carbapenemas, como relatado em outro trabalho (YANG; GUO; ZHANG, 2009).

O estudo da diversidade genômica das amostras produtoras de ESBL no presente estudo permitiu observar a ocorrência, ao mesmo tempo, da disseminação de clones resistentes, que conseguiram persistir pelo período estudado no ambiente hospitalar, bem como a transmissão de plasmídeos contendo os genes de resistência. Esse fato é evidenciado com o achado dos mesmos genótipos, em diferentes hospitais. Vale ressaltar que os genótipos não estavam restritos a determinadas áreas hospitalares, estando presentes em Centros de Tratamento Intensivos e também em outras unidades de internação como enfermaria e centro cirúrgico.

Em *K. pneumoniae*, apesar da diversidade de genótipos encontrados, pode-se observar o envolvimento de clones produtores de ESBL e de KPC, com a predominância do gene CTX-M-15, diferentemente dos relatos no Brasil, onde a produção de CTX-M-2 é mais frequente, mostrando assim uma nova tendência para as amostras no Rio de Janeiro.

Em *E.coli*, apesar da diversidade de genótipos, os resultados deste estudo estão de acordo com estudos anteriores, em amostras de *E.coli* no Rio de Janeiro (PEIRANO et al, 2011), onde o gene CTX-M-15 estava presente em 70% das amostras. Peirano e colaboradores, em 2011 também encontraram outros tipos de CTX-M, o CTX-M-8, CTX-M-3 e CTX-M-2, como evidenciado no presente trabalho onde foram detectados os grupos CTX-M-8 e CTX-M-2, apesar da determinação somente do grupo filogenético.

Para as amostras de *E. cloacae*, a disseminação foi principalmente policlonal, onde o CTX-M dos grupos 1 e 9 foram encontrados. Já para as amostras de *P.mirabilis* e *S. marcescens* o estudo da diversidade genômica mostrou um possível envolvimento de clones destas espécies, disseminados pelos hospitais no Rio de Janeiro. Estes dados são importantes, pois existem poucos relatos no Brasil sobre a epidemiologia molecular dessas espécies.

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que as β -lactamases do tipo CTX-M se disseminaram provavelmente de forma horizontal e também vertical, através da mobilização de elementos genéticos móveis e de clones endêmicos, em várias espécies diferentes de enterobactérias. O gene CTX-M-15 foi predominante nos hospitais estudados, em *E.coli* e *K. pneumoniae*.

As carbapenemases vêm se disseminando entre as enterobactérias e são um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos, mas para as amostras de *E. cloacae* que não apresentaram o gene *bla*_{KPC} e foram resistentes somente ao ertapenem, vários autores relatam a redução da permeabilidade como importante mecanismo de resistência ao ertapenem, principalmente quando associado às β -lactamases, do tipo CTX-M (DOUMITH et al, 2009; LEAVITT et al, 2009; HERNANDEZ; CONEJO; PASCUAL, 2010).

Os dados deste estudo são relevantes para a Saúde Pública, pois permitem o conhecimento da epidemiologia molecular das espécies importantes como a *K. pneumoniae* e *E. coli*, além das outras espécies de enterobactérias que são pouco descritas no Brasil, permitindo assim reforçar o monitoramento e implantar medidas de controle.

O conhecimento dos mecanismos de resistência aplicados ao rápido diagnóstico laboratorial de bactérias multirresistentes é de crucial importância para a antibioticoterapia apropriada, principalmente em amostras de hemocultura, a fim de fornecer a melhor escolha de tratamento e o controle da disseminação da resistência bacteriana.

7. CONCLUSÕES

- A espécie bacteriana produtora de ESBL mais frequentemente isolada em hemocultura foi a *K. pneumoniae*;
- Um total de 28% das enterobactérias isoladas de hemocultura produtoras de ESBL eram de pacientes internados em Centros de Terapia Intensiva;
- A maioria das enterobactérias resistentes às cefalosporinas de espectro estendido apresentou também diminuição de sensibilidade aos sulfametoxazol-trimetoprim, ciprofloxacina e gentamicina;
- A prevalência de CTX-M em enterobactérias foi elevada nos Hospitais estudados no Rio de Janeiro, tendo sido encontrada em diversas espécies de enterobactérias. As cinco espécies com maior prevalência de CTX-M foram *K. pneumoniae*, seguidas de *E. cloacae*, *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. marcescens*;
- A ESBL predominante foi a do tipo CTX-M, principalmente a CTX-M-15. A maioria das amostras produtoras de CTX-M (70%) co-produziram também SHV e/ou TEM;
- O gene CTX-M-15 foi predominante em *K. pneumoniae* e *E. coli* na maioria dos genótipos;
- A carbapenemase do tipo KPC-2 foi encontrada nos hospitais HFB, HUAP e HUPE, tanto em 2007 quanto 2008, sendo a maioria co-produtora também de CTX-M, TEM e SHV;
- A análise do polimorfismo clonal em *K.pneumoniae* evidenciou que as amostras produtoras de KPC eram altamente relacionadas, principalmente o genótipo A, e que além de codificarem a enzima KPC também produziram a enzima CTX-M-15. Quanto as amostras de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL, apesar da diversidade genética, pode-se observar a predominância de determinados clones disseminados pelos hospitais estudados;

- A análise da diversidade clonal para as outras enterobactérias como *E. coli*, *P. mirabilis* e *S. marcescens* evidenciou-se também a presença de clones predominantes disseminados pelos hospitais estudados;

- A presença de clones epidêmicos em amostras produtoras de KPC e de CTX-M-15 disseminados entre os hospitais no Rio de Janeiro são dados importantes para a Saúde Pública no Brasil. O conhecimento da epidemiologia molecular desses patógenos multirresistentes permite a implementação de medidas de controle, a fim de minimizar a disseminação das infecções relacionadas à assistência à saúde.

8. PERSPECTIVAS FUTURAS

- Serão realizados o sequenciamento dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} de todas as espécies de enterobactérias;
- Será realizado sequenciamento do gene *bla*_{CTX-M-15} das outras espécies de enterobactérias;
- As amostras bacterianas resistentes a cefoxitina serão submetidas à pesquisa de beta-lactamases do tipo AmpC;
- Pesquisas como presença de integrons e transposons, análise plasmidial e conjugação serão realizadas a fim de complementar os resultados obtidos;
- A amostra com teste fenotípico positivo e genotípico negativo para a produção dos genes SHV, TEM e CTX-M serão investigadas quanto à presença de outros tipos de ESBLs;
- Tipagem molecular por “Multilocus Sequence Type” (MLST) dos clones predominantes serão realizados a fim de complementar os resultados obtidos;
- O artigo intitulado “ **Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-producing- *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil**” será submetido para avaliação na *Microbial Drug Resistance*.

REFRERÊNCIAS

ABREU, A. G.; MARQUES, S. G.; MONTEIRO-NETO, V.; DE CARVALHO, R. M. L.; GONÇALVES, A. G. Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.4, p.441-446, 2011.

AMBLER, R. P. The structure of β -lactamases. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANDERSON, E. S.; DATTA, N. Resistance to Penicillins and Its Transfer in *Enterobacteriaceae*. **Lancet**, v. 1, n. 7382, p. 407-409, 1965.

ANDES, D.; CRAIG, W. A. Treatment of infections with ESBL-producing organisms: pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 11 Suppl. 6, p. 10-17, 2005.

ANDRADE L. N.; CURIAO, T.; FERREIRA, J. C.; LONGO, J. M.; CLÍMACO, E. C.; MARTINEZ, R.; BELLISSIMO-RODRIGUES F.; BASILE-FILHO, A.; EVARISTO, M. A.; OTHERS AUTHORS. Dissemination of *bla*_{KPC-2} by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7 p.3579-3583, 2011.

ARLET, G.; PHILIPPON, A. Construction by Chain reaction and Intragenic DNA Probes for Three Main Types of Transferable Beta-lactamases (TEM, SHV, CARB). **FEMS Microbiology Letters**, v.66, n. 1 p.19-25,1991.

BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on β -lactamases. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 3, p. 142-156, 2006.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; MANGOLD, P.; AMANN, S.; AKALIN, E.; ANG, O.; BAL, C.; CASSELAS, J. M. Characterization of β -lactamase gene

*bla*_{PER-2}, which encodes an extended-spectrum class A β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, n. 3, p. 616-620, 1996.

BARANIAK, A.; IZDEBSKI, R.; HERDA, M.; FIETT, J.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; FILCZAK, K.; ŁOPACIUK, U. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* ST258 with KPC-2 in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.10, p.4565-4567, Oct, 2009.

BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; BOISSON, K.; SIEBOR, E.; PLÉSIAT, P.; TALON, D. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamase in a French university-affiliated hospital. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 22, n. 2, p. 128-133, 2003.

BLACK, J. A.; MOLAND, E. S.; THOMSON, K. S. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC β -lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 7, p. 3110-3113, 2005.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel class A extended-spectrum β -lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 11, p. 3061-3068, 2000a.

BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M β -lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 7, p. 1936-1942, 2000b.

BONNET, R.; DUTOUR, C.; SAMPAIO, J. L.; CHANAL, C.; SIROT, D.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240-->Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2269-2275, 2001.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933-951, 2001.

BRASIL. Lei n° 8080 de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 20 de setembro de 1990. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 22/04/2008.

BRASIL. Lei n° 9431 de 06 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do país. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 07 de janeiro de 1997. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 22/04/2008.

BRASIL. Portaria n° 2616 de 12 de maio de 1998a. Diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 de maio de 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 22/04/2008.

BRASIL. Portaria n° 3432 de 12 de agosto de 1998b. Estabelece critérios de classificação entre as diferentes Unidades de Tratamento Intensivo-UTI. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 13 de agosto de 1998. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 22/04/2008.

BRASIL. Resolução-rdc n° 48 de 02 de junho de 2000. Roteiro de inspeção do programa de controle de infecção hospitalar. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 06 de junho de 2000. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br>. Acesso em: 22/04/2008.

BRASIL. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde – Rede- RM. Ano III-Edição n° 1 de 10 de julho de 2009.

Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/>
Acesso em: 29/10/2009.

BRASI. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Nota técnica nº 1/2010, de 25 de outubro de 2010. Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes, 2010. Disponível em [http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/serviço de saude](http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/serviço_de_saude). Acesso em: 29 /12/ 2010.

BUSH, K. Classification of β -lactamases: groups 1, 2a, 2b, and 2b'. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 264-270, 1989a.

BUSH, K. Classification of β -lactamases: groups 2c, 2d, 2e, 3, and 4. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 33, n. 3, p. 271-276, 1989b.

BUSH, K.; JACOBY, G. A.; MEDEIROS, A. A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211-1233, 1995.

BUSH, K. Extended-spectrum β -lactamases in North America, 1987-2006. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, Suppl. 1, p. 134-143, 2008.

BUSH, K.; JACOBY, G. A. Updated functional classification of β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p. 969-976, 2010.

CAETANO-ANOLLES, G & GRESSHOFF, P. M. **DNA markers: protocols, applications and overviews**. Editora J. Wiley and Sons, New York, N.Y., p.151-171, 1997.

CAMARGO, C. H; BRUDER-NASCIMENTO, A.; MONDELLI, A. L. ; MONTELLI, A.C; SADATSUNE, T. Detection of SPM and IMP metallo- β -lactamases in clinical specimens of *Pseudomonas aeruginosa* from a Brazilian public tertiary hospital. **Brazilian Journal of Infectious Disease**, v.15, n.5, p.:478-481, 2011.

CANTÓN, R.; COQUE, T. M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.

CANTÓN, R.; NOVAIS, A.; VALVERDE, A.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T.M. Prevalence and spread of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14 Suppl. 1, p. 144-153, 2008.

CARRÈR, A.; POIREL, L.; ERAKSOY, H.; CAGATAY, A. A.; BADUR, S.; NORDMANN, P. Spread of OXA-48 positive carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates in Istanbul, Turkey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.8, p.2950-2954, Aug., 2008.

CARVALHAES, C. G.; PICÃO, R. C.; NICOLETTI, A. G.; XAVIER, D. E.; GALES, A. C. Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal Antimicrobial and Chemotherapy**. 2010; v.65, n.2, p. 249–251, 2010.

CASTANHEIRA, M.; SADER, H. S.; DESHPANDE, L. M.; FRITSCHÉ, T. R.; JONES, R. N. Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase- and Metallo- β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae*: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.2, p.570-573, Feb., 2008a.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R. E.; RHOMBERG, P. R.; JONES, R. N. Rapid Emergence of *bla*_{CTX-M} Among *Enterobacteriaceae* in U.S. Medical Centers: Molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). **Microbial Drug Resistance**, v.14, n.3, p.211-216, 2008b.

CENTRE FOR DISEASE CONTROL (CDC). Standardized Molecular Subtyping of Foodborne Bacterial Pathogens by Pulse-Field Gel Electrophoresis. National Center for Infectious Diseases/Division of Bacterial and Mycotic Diseases Foodborne and diarrheal Diseases Branch. Subtipificación de Patógenos Bacterianos de transmisión Alimentaria-Pulse Net America Latina. Buenos Aires. 5-9 Jul., 2004.

CELENZA, G.; PELLEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Spread of *bla*(CTX-M-type) and *bla*(PER-2) β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p. 975-978, 2006.

CERGOLE-NOVELLA, M. C.; GUTH, B. E. C.; CATANHEIRA, M.; CARMO, M. S.; PIGNATARI, C. C. First Description of *bla*_{CTX-M-14}- and *bla*_{CTX-M-15}-Producing *Escherichia coli* Isolates in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v. 16, n. 3, p. 177-184, 2010.

CHAGAS, T. P.; SEKI, L. M.; DA SILVA, D. M.; ASENSI, M. D. Occurrence of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in hospital wastewater. **Journal of Hospital Infection**, v.77, n. 3, p.281, Mar., 2011.

CHEN, Z., QIU, S.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, S.; WANG, Z.; DU, X. Y.; WANG, J. G.; WANG, Z.; JING YUAN, N. L.; SONG, H.; HUANG, L. Coexistence of *bla*_{NDM-1} with the Prevalent *bla*_{OXA23} and *bla*_{IMP} in Pan-drug Resistant *Acinetobacter baumannii* Isolates in China. **Clinical Infectious Diseases**, v.52, n.5, p. 692-693, 2011.

CORKILL, J. E.; CUEVAS, L. E.; GURGEL, R. Q.; GREENSILL, J.; HART, C. A. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 463-465, 2001.

COSTA, G. A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de enterobactérias. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, p.120,1972

CLÍMACO, E. C.; MINARINI, L. A. R.; DARINI, A. L. C. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 68, n. 2, p. 186-189, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Nineteenth Information Supplement**.

19th ed. Approved standard M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Twentieth Information Supplement**. 20th ed. Approved standard M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA, Jun., 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **Twenty -first Information Supplement**. **21st** ed. Approved standard M100-S21, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2011.

CURIAO, T.; MOROSINI, M. I.; RUIZ-GARBAJOSA, P.; ROBUSTILLO, A.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R. Emergence of *bla*_{KPC-3}-Tn4401a associated with a pKPN3/4-like plasmid within ST384 and ST388 *Klebsiella pneumoniae* clones in Spain. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n. 8, p.1608–1614, 2010.

CUZON, G.; NAAS, T.; BOGAERTS, P.; GLUPCZYNSKI, Y.; HUANG, T. D.; NORDMANN, P. Plasmid-encoded carbapenem-hydrolysing beta-lactamase OXA-48 in an imipenem –susceptible *Klebsiella pneumoniae* strain from Belgium. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.52, n.9, p.3463-3464, 2008.

CUZON, G.; NAAS, T.; TRUONG, H.; VILLEGAS, M. V.; WISELL, K. T.; CARMELI, Y.; GALE, A. C.; VENEZIA, S. N.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.9, p.1349-1356, 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. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**. v.68, n.3, p.337-338, Nov., 2010.

DALMARCO, E. M.; BLATT, S. L.; DE CORDOVA, C. M. M. Identificação Laboratorial de β -Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs) – Revisão. Blumenal: **RBAC**, v. 38, n.3, p.171-177, 2006, Disponível em: www.sbac.org.br/pt/pdfs/rbac/rbac_38_03/rbac3803_09.pdf.

Acesso em 27/07/2010.

DAMJANOVA, I.; TÓTH, A.; PÁSZTI, J.; HAJBEL-VÉKONY, G.; JAKAB, M.; BERTA, J.; MILCH, H.; FÜZI, M. Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005- the new ‘MRSA’s’?. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n.5, p. 978-985, 2008.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-241, 1965.

DE CHAMPS, C.; SAUVANT, M. P.; CHANAL, C.; SIROT, D.; GAZUY, N.; MALHURET, R.; BAGUET, J. C.; SIROT, J. Propective survey of colonization and infection caused by expanded-spectrum-beta-lactamase-producing members of family *Enterobacteriaceae* in an intensive care unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n.12, p.2887-2890, Dec.,1989.

DIAS, R. C. S.; BORGES-NETO, A. A.; FERRAIUOLI, G. I. D. A.; DE-OLIVEIRA, M. P.; RILEY, L.W.; MOREIRA, B. M. Prevalence of AmpC and others β -lactamases in enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infection Disease**,v. 60, n.1 ,79-87, Jan., 2008.

DIENSTMANN, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar, *Jornal Brasileiro de Patologia Medica e Laboratorial*, v. 46, n. 1, p. 23-27, Fev., 2010. Disponível em: www.scielo.br/pdf/jbpm/v46n1/v46n1a05.pdf. Acesso em: 20/10/10.

DRIEUX, L.; BROSSIER, F.; SOUGAKOFF, W.; JARLIER V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14 Suppl. 1, p. 90-103, 2008.

DOUMITH, M.; ELLINGTON, M. J.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 4, p. 659-667, 2009.

EMPEL, J.; BARANIAK, A.; LITERACKA, E.; MRÓWKA, A.; FIETT, J.; SADOWY, E.; HRYNIEWICZ, W.; GNIADKOWSKI, M.; BETA-PL STUDY GROUP. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.7, p.2449-2454, Jul., 2008.

EUZÉBY, J. P. List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature: family Enterobacteriaceae. Disponível em: < <http://www.bacterio.cict.fr/e/enterobacteriaceae.html> >. Acesso em: 27/12/10. 2010.

FRANCO, M. R. G.; CAIAFFA-FILHO, H. H.; BURATTINI, M. N. ; ROSSII, F. Metallo-beta-lactamases among imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in a brazilian university Hospital. **Clinics**, v.65, n. 9, p.825-829, 2010.

FREITAS, M.R. **Análise de custos das infecções hospitalares**. IN: RODRIGUES, E.A.C.; MENDONÇA, J. B. A.; FILHO, M. B. A. F.; GINBAUMR, S.; RICHTMANN, R. **Infecções hospitalares Prevenção e Controle - São Paulo: Sarvier, p.42-45,1997.**

FEVRE, C.; JBEL, M.; PASSET, V.; WEILL, F. X.; GRIMONT, P. A.; BRISSE S. Six groups of the OXY β -lactamase evolved over millions of years in *Klebsiella oxytoca*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3453-3462, 2005.

FROST, L. S.; LEPLAE, R.; SUMMERS, A. O; TOUSSAINT, A. Mobile genetic Elements: The agents of Open Source Evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.9, p.722-732, Sep., 2005.

GALAS, M.; DECOUSSER, J. W.; BRETON, N.; GODARD, T.; ALLOUCH, P. Y.; PINA,

P.; COLLÈGE DE BACTÉRIOLOGIE VIROLOGIE HYGIÈNE (COLBVH) STUDY GROUP. Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.2, p.786-789, Feb., 2008.

GALDBART, J. O.; LÉMANN, F.; AINOUS, D.; FÉRON, P.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; BRANGER, C. TEM-24 extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 6, n. 6, p. 316-323, 2000.

GALES, A. C.; SADER, H. S.; JONES, R. N.; SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.44., n.3, p.289-299, Nov, 2002.

GALES, A. C.; MENEZES, L. C.; SILBERT, S.; SADER, H. S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial. Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p. 699-702, Oct., 2003.

GARCIA, D. O.; DOI, Y.; SZABO, D.; ADAMS - HADUCH, J. M.; VAZ, T. M. I.; LEITE, D.; PADOVEZE, M. C.; FREIRE, M. P.; SILVEIRA, F. P.; PATERSON, D. L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 5, p. 1790-1793, 2008.

GARCIA, C. S.; DE LA GANDARA, M. P.; GARCIA, F. J. Extended-spectrum β -lactamases in enterobacteria other than *Escherichia coli* and *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, Suppl. 1, p. 12-18, 2010.

GISKE, C. G.; SUNDSFJORD, A. S.; KAHLMETER, G., WOODFORD, N.; NORDMANN, P.; PATERSON, D. L.; CANTÓN, R.; WALSH, T. R. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 1, p. 1-4, 2009.

GNIADKOWSKI, M. Evolution of extended-spectrum β -lactamases by mutation. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, Suppl. 1, p. 11-32, 2008.

GOOSSENS, H.; GRABEIN, B. Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum β -lactamase- and AmpC-producing *Enterobacteriaceae* from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 53, n. 4, p. 257-264, 2005.

GOVINDEN, U.; MOCKTAR, C.; MOODLEY, P.; STURM, A. W.; ESSACK S. Y. Geographical evolution of the CTX-M β -lactamase - an update. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 7, p. 831-839, 2007.

108

GÜLMEZ, D.; WOODFORD, N.; PALEPOU, M. F.; MUSHTAQ, S.; METAN, G.; YAKUPOGULLARI, Y.; KOCAGOZ S.; UZUN, O.; HASCELİK G.; LIVERMORE, D. M. Carbapenem-resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from Turkey with OXA-48-like carbapenemases and outer membrane protein loss. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.31, n.6, p.523-526, Jun., 2008.

HARADA, S.; ISHII, Y.; YAMAGUCHI, K. Extended-spectrum beta-lactamases: implications for the clinical laboratory and therapy. **Korean Journal of Laboratory Medicine**. v.28, n.6, p.401-412, Dec., 2008.

HASMAN, H., MEVIUS D.; VELDMAN, K.; OLESEN, I.; AARESTRUP, F. M. Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n.1, p.115-121, 2005.

HAWKEY, P. M. Prevalence and clonality of extended-spectrum β -lactamases in Asia. **Clinical Microbiology Infection**, v. 14, Suppl. 1, p. 159-165, 2008.

HAWKEY P. M.; JONES, A.M. The changing epidemiology of resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, Suppl.1, p.i3-i10, 2009.

HAWSER, S. P.; BOUCHILLON, S. K.; HOBAN, D. J.; BADAL, R. E.; HSUEH, PO-REN; PATERSON, D. L. Emergence of High Levels of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Asia-Pacific Region: Data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program, 2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.8, p.3280–3284, 2009.

HEDGES, R. W.; MATTHEW, M. Acquisition by *Escherichia coli* of plasmid-borne β -lactamases normally confined to *Pseudomonas spp.* **Plasmid**, v. 2, n. 2, p. 269-278, 1979.

HERNANDEZ, J. R.; CONEJO M. L, C.; PASCUAL, A. Comparative activity of ertapenem against extended-spectrum β -lactamase-producing or plasmid-mediated AmpC β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2010.

HIRAKATA, Y.; MATSUDA, J.; MIYAZAKI, Y.; KAMIHIRA, S.; KAWAKAMI, S.; MIYAZAWA, Y.; ONO, Y.; NAKAZAKI, N.; HIRATA, Y.; INOUE, M.; TURNIDGE, J. D.; BELL, J. M.; JONES, R. N.; KOHNO, S.; SENTRY ASIA-PACIFIC PARTICIPANTS. Regional variation in the prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing clinical isolates in the Asia-Pacific region (SENTRY 1998-2002). **Diagnostic of Microbiology and Infectious Disease**, v. 52, n. 4, p. 323-329, 2005.

HO, P. L.; YAM, W. C.; TSANG, K. W.; LAI, W. M. Detection and characterisation of extended-spectrum β -lactamases among blood stream isolates of *Enterobacter* species in Hong Kong. **Hong Kong Medical Journal**, v. 15, Suppl. 9, p. 4-5, 2009.

HOWARD, C.; DAAL, A.; KELLY, G.; SCHOONEVELDT, J.; NIMMO, G.; GIFFARD, P. M. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 659-664, 2002.

HUMENIUK, C.; ARLET, G.; GAUTIER, V.; GRIMONT, P.; LABIA, R.; PHILIPPON, A. β -lactamases of *Kluyvera ascorbata*, probable progenitors of some plasmid-encoded CTX-M types. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 9, p. 3045-3049, 2002.

JACK, G. W.; RICHMOND, M. H. A comparative study of eight distinct β -lactamases synthesized by gram-negative bacteria. **Journal of General Microbiology**, v. 61, n. 1, p. 43-61, 1970.

JACOBY, G. A. β -Lactamase Nomenclatura. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.4, p.1123-1129, 2006.

JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, n.4, p. 867-878, 1988.

JEONG, S. H.; BAE, I. K.; KIM, D.; HONG, S. G.; SONG, J. S.; LEE, J. H.; LEE, S. H. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum beta-lactamases in Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.11, p. 4809-4910, 2005.

JONES, R. N.; CRAIG, W. A.; AMBROSE, P. G.; DUDLEY, M. N.; POTTUMARTHY, S. Reevaluation of Enterobacteriaceae MIC/disk diffusion zone diameter regression scattergrams for 9 beta-lactams: adjustments of breakpoints for strains producing extended spectrum β -lactamases. **Diagnostic Microbiology Infectious Disease**, v. 52, n. 3, p. 235-246, 2005.

KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; PATEL, J. B.; SRINIVASAN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CARMELI, Y.; BROULUND, A.; GISKE, G. Molecular Epidemiology of KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates in the United States: Clonal Expansion of Multilocus Sequence Type 258. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n.8, p. 3365-3370, 2009.

KIM, Y. K.; PAI, H.; LEE, H. J.; PARK, S. E.; CHOI, E. H.; KIM, J. M.; KIM, J. H.; KIM,

E. C. Bloodstream infections by Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in children: Epidemiology and clinical outcome.

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 46, n.5, p. 1481-1491, 2002.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v. 11, n. 6, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, ELMER W.; ALLEN, STEPHEN D.; JANDA, WILLIAM M.; SCHRECKENBERGER, PAUL; WINN JR. Washington. **DIAGNÓSTICO MICROBIOLÓGICO**. 5ªEdição, São Paulo: MEDSI, p.177-261, 2001.

KO, K. S.; LEE, J. Y.; BAEK, J. Y.; SUH, J. Y.; LEE, M. Y.; CHOI, J. Y., YEOM, J. S.; KIM, Y. S.; JUNG, S. I.; SHIN, S. Y.; HEO, S. T.; KWON, K. T.; SON, J. S.; KIM, S. W.; CHANG, H. H.; KI, H. K.; CHUNG, D. R.; PECK, K. R. ; SONG, J. H. Predominance of an ST11 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* clone causing bacteraemia and urinary tract infections in Korea. **Journal of Medical Microbiology**. v.59, pt 7, p.822-828, Jul., 2010.

KRISTÓF, K.; TÓTH, A.; DAMJANOVA, I.; JÁNVÁRI, L.; KONKOLY-THEGE, M.; KOCSIS, B.; KONCAN, R.; CORNAGLIA, G.; SZEGO, E.; NAGY, K.; SZABÓ, D. Identification of a *bla*_{VIM-4} gene in the internationally successful *Klebsiella pneumoniae* ST11 clone and in a *Klebsiella oxytoca* strain in Hungary. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.65, n.6, p.1303-1305, Jun., 2010.

KUMARASAMY, K. K.; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, S.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A.V.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D. L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J.B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M. A.; TURTON, J.; UPADHYAY. S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infectious Diseases**, v.10, n. 9

p.597-602, 2010.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil]. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p. 430-434, 2010.

LAHEY CLINICS- β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β -Lactamases. Disponível em: <http://www.lahey.org/studies>. Acesso em: 07/ 01/12.

LANDMAN, D.; BRATU, S.; KOCHAR, S.; PANWAR, M.; TREHAN, M.; DOYMAZ, M.; QUALE, J. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n.1, p.78-82, 2007.

LEAVITT, A.; CHMELNITSKY, I.; COLODNER, R.; OFEK, I.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S. Ertapenem resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 969-974, 2009.

LINCOPAN, N.; LEIS, R.; VIANELLO, M. A; DE ARAÚJO, M. R. E.; RUIZ, A. S.; MAMIZUKA, E. M. Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, pt. 11, p.1611-1613, Nov., 2006.

LIVERMORE, D. M. Beta-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**,v.8, n.4, p. 557-584, Oct.,1995.

LIVERMORE, D. M.; BROWN, D. F. Detetion of beta-lactamase- mediated resistance. **Journal of Antimicrobial Chemoterapy**, v. 48, suppl. 1 , p. 59-64, 2001.

LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. The β -Lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, n.9, p. 413-420, 2006.

LIVERMORE, D. M.; CANTON, R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G. M.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T. M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; LUZZARO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 165-174, 2007.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14 Suppl 1, n., p. 3-10, 2008.

LIVERMORE, D. M. β -lactamases- the Threat Renews. **Current Protein Peptide Science**, v. 10, n. 5, p. 397-400, 2009.

LOPES, A. C. S.; VERAS, D. L.; LIMA, A. M. S.; MELO, R. C. A.; AYALA, J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.2, p.163-167, 2010.

LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Trends in production of Extended-Spectrum β -Lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the Second Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, n.5, p.1659-1664, 2006.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTÓN, R.; NOVAIS, A.; SOUSA, J. C. BAQUERO, F.; PEIXE, L. High diversity of extended-spectrum β -lactamase among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Portugal. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, n.6, p.1370-1374, 2007.

MARCHAIM, D.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Isolation of imipenem-resistant *Enterobacter* species: emergence of KPC-2 carbapenemase, molecular characterization, epidemiology, and outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.4, p.1413-1418, Apr., 2008.

MARCHAIM, D.; GOTTESMAN, T.; SCHWARTZ, O.; KOREM, M.; MAOR, Y.; RAHAV, G.; KARPLUS, R.; LAZAROVITCH, T.; BRAUN, E.; SPRECHER, H.; LACHISH, T.; WIENER-WELL, Y.; ALON, D.; CHOWERS, M.; CIOBOTARO, P.; BARDENSTEIN, R.;

PAZ, A.; POTASMAN, I.; GILADI, M.; SCHECHNER, V.; SCHWABER, M. J.; KLARFELD-LIDJI, S.; CARMELI, Y. National multicenter study of predictors and outcomes of bacteremia upon hospital admission caused by *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 12, p. 5099-104, 2010.

MARTINEZ-MARTINEZ, L. Extended-spectrum β -lactamases and the permeability barrier. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, Suppl. 1, p. 82-89, 2008.

MARTINS, I. S.; PESSOA-SILVA, C. L.; NOUER, S. A.; DE ARAUJO, E. G. P.; FERREIRA, A. L. P.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M.; THE NURSING TEAM OF UNIVERSITY HOSPITAL CLEMENTINO FRAGA FILHO. Endemic Extended-Spectrum β -Lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an Intensive Care Unit: Risk Factors for Colonization and Infection. **Microbial Drug Resistance**, v. 12, n.1, p.50-58, 2006.

MATSUMOTO, Y.; IKEDA, F.; KAMIMURA, T.; YOKOTA, Y.; MINE, Y. Novel plasmid-mediated β -lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 32, n. 8, p. 1243-1246, 1988.

MENDES, C.; HSIUNG, A.; KIFFER, C.; OPLUSTIL, C.; SINTO, S.; MIMICA, I.; ZOCCOLI, C.; MYSTIC STUDY GROUP. Evaluation of the in vitro activity of 9 antimicrobials against bacterial strains isolated from patients in intensive care units in Brazil: MYSTIC Antimicrobial Surveillance Program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.4, n.5, p.236-244, Oct., 2000.

MENDES, C.; KIFFER C.; SEGURA, A.; RIBEIRO, J.; TURNER, P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v.8, n.1, p.109-111, 2004.

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.

MENDONÇA, N.; LEITÃO, J.; MANAGEIRO, V.; FERREIRA, E.; THE ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE IN PORTUGAL; CANIÇA, M. Spread of Extended-Spectrum β -Lactamase CTX-M-Producing *Escherichia coli* Clinical isolates in Community and Nosocomial Environments in Portugal. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1946-1955, 2007.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L. Prevalence of community-occurring extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**. v. 54, n.5, p.335-341, May., 2007.

MINARINI, L. A. R.; CLÍMACO, E. C.; GUIMARÃES, D. B.; FERREIRA, J. C.; PALAZZO, I. C. V.; MARTINEZ, R.; ARINI, A. L. C. Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v.56, n.6, p.587-591, 2008.

MINARINI, L. A. R.; POIREL, L.; TREVISANI, N. A. C.; DARINI, A. L. C.; NORDMANN, P. Predominance of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamase genes among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 65, n.2, p.202-206, 2009.

MIRIAGOU, V.; CARATTOLI, A.; TZELEPI, E.; VILLA, L.; TZOUVELEKIS, L. S. IS26-associated In4-type integrons forming multiresistance loci in enterobacterial plasmids. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 8, p. 3541-3543, 2005.

MOLAND, E. S.; HANSON, N. D.; BLACK, J. A.; HOSSAIN, A.; SONG, W.; THOMSON, K. S. Prevalence of newer β -lactamases in gram-negative clinical isolates collected in the United States from 2001 to 2002. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3318-3324, 2006.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.1., p.333-334, Jan., 2009.

MULVEY, M. R.; SOULE, G.; BOYD, D.; DEMEZUK, W.; AHMED, R.; MULTI-PROVINCIAL *SALMONELLA* TYPHIMURIUM CASE CONTROL STUDY GROUP. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, n.1, p.460-462, 2003.

MURRAY, PATRICK R., BARON, ELLEN J., JORGENSEN, JAMES H., LANDRY, MARIE L. & PFALLER, MICHAEL A. **Manual of Clinical Microbiology**. Volume 1, 9^a edição; Washington, D.C. (USA), 2007. 649-698p.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI) Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. Acesso em : 20/08/09.

NAVON-VENEZIA, S.; HAMMER-MUNZ, O.; SCHWARTZ, D.; TURNER, D.; KUZMENKO, B.; CARMELI, Y. Occurrence and phenotypic characteristics of extended-spectrum β -lactamases among members of the family Enterobacteriaceae at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and evaluation of diagnostic tests. **Journal Clinical and Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 155-158, 2003.

NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I.; LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; SCHWARTZ, D.; CARMELI, Y. Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.9, p.3098-3101, Sep., 2006.

NEMOY, L. L.; KOTETISHVILI, M.; TIGNO, J.; KEEFER-NORRIS, A.; HARRIS, A. D.; PERENCEVICH, E. N.; JOHNSON, J.A.; TORPEY, D.; SULAKVELIDZE, A.; MORRIS, J. G. J. R.; STINE, O. C. Multilocus Sequence typing versus pulsed –field gel electrophoresis for characterization of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.4, p.1776-1781, Apr., 2005.

NICOLAS-CHANOINE, M. H.; BLANCO, J.; LEFLON-GUIBOUT, V.; DEMARTY, R.; ALONSO, M. P.; CANIÇA, M. M. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, n.2, p.273-281, 2008.

NIJSSEN, S.; FLORIJN, A.; BONTEN, M. J.; SCHMITZ, F. J.; VERHOEF, J.; FLUIT, A. C. Beta-lactam susceptibilities and prevalence of ESBL-producing isolates among more than 5000 European *Enterobacteriaceae* isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 24, n. 6, p. 585-591, 2004.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited.

Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 67, n. 4, p. 593-656, 2003.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; SOUZA, H. A. P. H. M.; COGO, L. L.; DALLA COSTA, L. M. Occurrence of extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 6, p. 390-395, 2006.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase- producing bacteria. **Lancet Infectious Diseases**, v. 9, n.4, p.228-236, 2009.

OLIVE, D. M.; BEAN, P. Principles and Applications of Methods for DNA-Based Typing of Microbiak Organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, n.6, p.1661-1669, Jun., 1999.

OTEO, J.; CUEVAS, O.; LÓPEZ-RODRIGUEZ, I.; BANDERAS-FLORIDO, A.; VINDEL, A.; PÉREZ-VÁSQUEZ, M.; BAUTISTA, V.; ARROYO, M.; GARCÍA-CABALLERO, J.; OTHERS AUTHORS. Emergence of CTX-M-15- producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1,11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.64, n.3, p.524-528, 2009.

OTTO, T. D.; VASCONCELLOS, E. A.; GOMES, L. H.; MOREIRA, A. S.; DEGRAVE, W. M.; MENDONÇA-LIMA, L.; ALVES-FERREIRA, M. ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. **Genetics and Molecular**

Research , v.7, p.861-871, 2008.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; MATTI, C.; GIACOBONE, E.; AMICOSANTE, G.; ROMERO, E.; ROSSOLINI, G. M. Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 1549-52, 2002.

PAHO/WHO. Epidemiological Alert: First finding of carbapenemase of type New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM) in Latin America, de 22 Novembro de 2011, Disponível em: <http://epidemiologia.mspas.gob.gt/vigepi/2011/Oficio%20Circular%2018-2011%20171111.pdf>. Acesso em: 02/01/12.

PALLECHI, L.; MALOSSI, M.; MANTELLA, A.; GOTUZZO, E.; TRIGOSO, C.; BARTOLONI, A.; PARADISI, F.; KRONVALL, G.; ROSSOLINI, G. M. Detection of CTX-M –type β -lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.12 , p.4556-4561, 2004.

PASTERAN, F. G.; OTAEGUI, L.; GUERRIERO, L.; RADICE, G.; MAGGIORA, R.; RAPOPORT, M.; FACCONI, D.; MARTINO, A. D.; GALAS, M. *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n.7, Jul., 2008.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum β -lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2005.

PATERSON, D. L.; ROSSI, F.; BAQUERO, F.; HSUEH, P. R.; WOODS, G. L.; SATISHCHANDRAN, V.; SNYDER, T. A.; HARVEY, C. M.; TEPPLER, H.; DINUBILE, M. J.; CHOW, J. W. In vitro susceptibilities of aerobic and facultative Gram-negative bacilli isolated from patients with intra-abdominal infections worldwide: the 2003 Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.55, n.6, p.965-973, Jun., 2005.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American**

Journal of Medicine, v.119, Suppl. 1, p. S20-28, 2006.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early Dissemination of KPC-2 Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.6, p.2702, Jun., 2009.

PEIRANO, G.; SEKI, L. M.; PINTO, M. C.; GUERRA, L.; VAL PASSOS, V. L.; ASENSI, M. D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.2, p.265-268, Feb., 2009.

PEIRANO, G.; PITOUT, J. D. D. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* producing CTX-M β -lactamases: the worldwide emergence of clone ST131 O25:H4. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 35, n.4, p.316-321, 2010.

PEIRANO, G., ASENSI, M. D., PITONDO-SILVA, A. & PITOUT, J. D. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamase- producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n.7, p. 1039-1043, 2011.

PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. M.; BONOMO, R. A. The continuing challenge of ESBLs. **Current Opinion Pharmacology**, v.7, n.5, p. 459-469, Oct., 2007.

PFALLER, M. A.; ACAR, J.; JONES, R. N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER, H. S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, Suppl. 2, p.S156-167, May, 2001.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v. 42, Suppl. 4, p. S153-63, 2006.

PICÃO, R. C.; POIREL, L.; GALES, A. C.; NORDMANN, P. Diversity of β -lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream

infections in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 9, p. 3908-3913, 2009.

PICÃO, R. C.; SANTOS, A. F.; NICOLETTI, A. G.; FURTADO, G. H.; GALES, A. C. Detection of GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n.4, p. 796-807, 2010.

PITOUT, J. D.; REISBIG, M. D.; VENTER, E. C.; CHURCH, D. L., HANSON, N. D. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **Journal of Clinical and Microbiology**, v. 41, n. 8, p. 3933-3935, 2003.

PITOUT, J. D.; GREGSON, D. B.; CAMPBELL, L.; LAUPLAND, K. B. Molecular Characteristics of Extended-Spectrum- β -Lactamase-producing *Escherichia coli* Isolates causing Bacteremia in the Calgary Health Region from 2000 to 2007: Emergence of Clone ST131 as a Cause of Community-Acquired Infections. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 7, p. 2846-2851, 2009.

PODCSHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, n.4, p. 598-603, Oct., 1998.

POIREL, L.; NAAS, T.; GUIBERT, M.; CHAIBI, E. B.; LABIA, R.; NORDMANN, P. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 3, p. 573-581, 1999.

POIREL, L.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P. Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-15 and of its structurally related β -lactamase CTX-M-3. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 50, n. 6, p. 1031-1034, 2002.

POIREL, L.; HÉRITIER, C.; TOLÜN, V.; NORDMANN, P. Emergence of oxacillinase-

mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p. 15-22, Jan., 2004.

POTTUMARTHY, S.; MOLAND, E. S.; JERETSCHKO, S.; SWANZY, S. R.; THOMSON, K. S.; FRITSCH, T. R. NmcA carbapenem-hydrolyzing enzyme in *Enterobacteriaceae* in North America. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.8, p. 999-1002, 2003.

PRADO, T.; PEREIRA, W. C.; SILVA, D. M.; SEKI, L. M.; CARVALHO, A. P.; ASENSI, M. D. Detection of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in effluents and sludge of a hospital sewage treatment plant. **Letters in Applied Microbiology**. v.46, n.1, p.136-141, Jan., 2008.

QI, Y.; WEI, Z.; JI, S.; DU, X.; SHEN, P.; YU, Y. ST11, the dominant clone of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v.66, n.2, p.307-312, Feb., 2011.

QUALE, J., Global Spread of Carbapenemase Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Microbe**, v.3, n.11, p.516-520, 2008.

QUEENAN, A.M.; SHANG, W.; SCHRECKENBERGER, P.; LOLANS, K.; BUSH, K.; QUINN, J. SME-3, a novel member of the *Serratia marcescens* SME family of carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.10, p.3485-3487, Oct., 2006.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440-458, 2007

QUINTEROS, M.; RADICE, M.; GARDELLA, N.; RODRIGUEZ, M. M.; COSTA, N.; KORBENFELD, D.; COUTO, E.; GUTKIND, G.; OTHERS AUTHORS. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2864-2867, 2003.

RADICE, M.; POWER, P.; DI CONZA, J.; GUTKIND, G. Early dissemination of CTX-M-

derived enzymes in South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 2, p. 602-4, 2002.

RAMPHAL, R.; AMBROSE, P. G. Extended-Spectrum β -Lactamases and Clinical outcomes: Current Data. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, Suppl.4, p.S164-S172, 2006.

RASMUSSEN, B.A.; BUSH, K.; KEENEY, D.; YANG, Y.; HARE, R.; O'GARA, C.; MEDEIROS, A. A. Characterization of IMI-1 beta-lactamase, a class A carbapenem-hydrolyzing enzyme from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.40, n.9, p.2080-2086, Sep., 1996.

RHEE, J. Y.; PARK, Y. K.; SHIN, J. Y.; CHOI, J. Y.; LEE, M. Y.; PECK, K. R.; SONG, J. H.; KO, K. S. KPC-producing extreme drug-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetes mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, n.5, p.2278-2279, May., 2010.

RICE, L. B. Antimicrobial Resistance in gram-Positive Bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, n.6A, p.S11-S19, 2006.

RICHMOND, M. H.; SYKES, R. B. The β -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. **Advances in Microbial Physiology**, v. 9, n., p. 31-88, 1973.

ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14, Suppl. 1, p. 33-41, 2008.

SADER, H.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, n.1, p.200-214, 2001.

SADER, H.; JONES, R. N.; GALES, A.C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C.; AND THE SENTRY PARTICIPANTS GROUP (LATIN AMERICA). SENTRY Antimicrobial

Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001.

Brazilian Journal of Infectious Diseases, v.8, n.1, p.25-79, 2004.

SAMAHA-KFOURY, J. N.; ARAJ, G. F. Recent developments in β -lactamases and extended spectrum β -lactamases. **British Medical Journal**, v.327, n. 7425, p.1209-1213, Nov., 2003.

SAMUELSEN, O.; NASEER, U.; TOFTELAND, S.; SKUTLABERG, D. H.; ONKEN, A.; HJETLAND, R.; SUNDSFJORD, A.; GISKE, C.G. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.4, p.654-658, Fev. 2009.

SANDIUMENGE, A.; DIAZ, E.; RODRIGUEZ, A.; VIDAUR, L.; CANADELL, L.; OLONA, M. RUE, M. RELLO, J. Impacto of diversity of antibiotic use on the development of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, n.6, p.1197-1204, 2006.

SCHWABER, M. J.; RANEY, P. M., RASHEED, J. K.; BIDDLE, J. W.; WILLIAMS, P.; MCGOWAN JR, J. E.; TENOVER, F. C. Utility of NCCLS Guidelines for identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non- *Escherichia coli* and Non- *Klebsiella spp* Of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.1, p. 294-298, 2004.

SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum β -lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 913-920, 2007.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA, M. P. A. H.; CONCEIÇÃO, M. S.; MARQUES, E. A.; PORTO, C. O.; COLNAGO, E. M. L.; ALVES, C. F. M.; GOMES, D.; CARVALHO ASSEF, A. P. D. A.; OTHERS AUTHORS. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.70, n. 2, p. 274-277, 2011.

SENDA, K.; ARAKAWA, Y.; ICHIYAMA, S.; NAKASHIMA, K.; ITO, H.; OHSUKA, S.; SHIMOKATA, K.; KATO, N.; OHTA, M. PCR detection of metallo-Beta-lactamase gene (*bla_{IMP}*) in gram-negative rods resistant to broad-spectrum beta-lactams. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, n.12, p. 2909-2913, Dec.,1996.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. **Critical Review Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 25-32, 2004a.

SHAH, A. A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum β -lactamases. **Research in Microbiology**, v.155, n. 6, p. 409-421, 2004b.

SHEN, P.; WEI, Z.; JIANG, Y.; DU, X.; JI, S.; YU, Y.; LI, L. Novel Genetic Environment of the Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 among *Enterobacteriaceae* in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, n.10, p.4333-4338, Oct., 2009.

SHIN, J.; KIM, D.H.; KO, K. S. Comparison of CTX-M-14 and CTX-M-15-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates from patients with bacteremia. *Journal of Infection*, v.63, n.1, p.39-47, 2011.

SILBERT, S.; PFALLER, M. A.; HOLLIS, R. J.; BARTH, A. L.; SADER, H. S. Evaluation of three molecular typing techniques for nonfermentative Gram-negative bacilli. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 25, n.10, p.847-851, 2004.

SILVER, L.L. Challenges of Antibacterial Discovery. **Clinical Microbiology Reviews**, v.24, n.1, p.71-109, Jan., 2011.

SINGH, A.; GOERING, R.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of Molecular Techniques to the Study of hospital Infection. **Clinical Microbiology Reviews**, v.,19, n.3, p.512-530, Jul., 2006.

STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infection**, v.47, n.4 , p.

273-295, 2003.

SUPERTI, S.V., AUGUSTI, G. & ZAVASCKI, A. P. Risk Factors for and Mortality of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* Nosocomial Bloodstream Infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical em São Paulo**, v. 51, n.4, p. 211-216, 2009.

TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V.; MICKELSEN, P. A.; MURRAY, B. E.; PERSING, D. H.; SWAMINATHAN, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, n.9 p. 2233-2239, Sept., 1995.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine**, v.119, n.6A, p.S3-S10, 2006.

THOMAS, C. M.; NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and Barriers to, Horizontal Gene transfer Between Bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, n.9, p. 711-721, 2005.

THOMSON, K. S.; SANDERS, C. C. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.36, n.9, p. 1877-1882, 1992.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum- β -lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1019-1025, 2010.

TOLLENTINO, F. M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M. L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA E. M.; REMELI, G. A.; DE ALMEIDA, M. T. G.; RÚBIO, F. G.; NOGUEIRA, M. C. L. High prevalence of *bla*_{CTX-M} Extended Spectrum Beta-Lactamase Genes in *Klebsiella pneumoniae* Isolates from a Tertiary Care Hospital: First report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microbial Drug Resistance**, v.17, n.1, p.7-16, 2011.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H. S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among gram-negative rods in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 7, n.6, p. 360-369, 2003.

TÓTH, A.; DAMJANOVA, I.; PUSKÁS, E.; JÁNVÁRI, L.; FARKAS, M.; DOBÁK, A.; BÖRÖCZ, K.; PÁSZTI, J. Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. **European Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v.29, n.7, p.765-769, Jul., 2010.

TOWNE, T. G.; LEWIS, J. S.; HERRERA, M.; WICKES, B.; JORGENSEN, J. H. Detection of SHV-type extended-spectrum β -lactamase in *Enterobacter* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 1, p. 298-299, 2010.

TSAKRIS, A.; KRISTO, I.; POULOU, F.; IKONOMIDIS, A.; POURNARAS, S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 62, n.6, p. 1257-1260, Sept., 2008.

TUMBARELLO, M.; SANGUINETTI, M.; MONTUORI, E.; TRECARICHI, E. M.; POSTERARO, B.; FIORI, B.; CITTON, R.; D'INZEO, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SPANU, T. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 6, p. 1987-1994, 2007.

TUMBARELLO, M.; SPANU, T.; DI BIDINO, R.; MARCHETTI, M.; RUGGERI, M.; TRECARICHI, E. M.; DE PASCALE, G.; PROLI, E. M.; CAUDA, R.; CICCETTI, A.; FADDA, G. Costs of bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and influence of extended-spectrum- β -lactamase production and inadequate initial antibiotic therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 10, p. 4085-4091, 2010.

TURNER, P. J.; GREENHALGH, J. M.; EDWARDS, J. R.; MCKELLAR, J. The MYSTIC (meropenem yearly susceptibility test information collection) programme. **International**

Journal of Antimicrobial Agents, v. 13, n. 2, p. 117-25, 1999.

TURNER, J. P. Extended-Spectrum β -Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, Suppl.4, p.273-275, 2005.

VALENZUELA DE SILVA, E. M.; MANTILLA ANAYA, J.R. ; REGUERO REZA, M. T.; GONZÁLEZ MEJÍA, E. B., PULIDO MANRIQUE, I. Y., DARÍOLERENA, I. Detection of CTX-M-1, CTX-M-15, and CTX-M-2 in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bogota, Colômbia. **Journal Clinical Microbiology**, v.44, n.5 , p.1919-1920, 2006.

VILLEGAS, M. V.; CORREA, A.; PEREZ, F.; ZULUAGA, T.; RADICE, M.; GUTKIND, G.; CASELAS, J. M.; AYALA, J.; LOLANS, K. QUINN, J. P.; COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. CTX-M-12 β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* Clinical isolate in Colombia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.2 , p.629-631, 2004.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; SUAREZ, C. J.; LOPEZ, J. A.; VALLLEJO, M.; QUINN, J. P. First detection of the Plasmid-Mediated ClassA Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n.8, p. 2880-2882, 2006.

VILLEGAS, M. V.; LOLANS, K.; CORREA, A.; KATTAN, J. N.; LOPEZ, J. A.; QUINN, J. P.; COLOMBIAN NOSOCOMIAL RESISTANCE STUDY GROUP. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n. 4, p.1553-1555, Apr., 2007.

VILLEGAS, M. V.; KATTAN, J. N.; QUINTEROS, M. G.; CASELLAS, J. M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 14 Suppl. 1, p. 154-158, 2008.

YANG, D.; GUO, Y.; ZHANG, Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Current Microbiology**, v.58, n.4,

p.366-370, 2009.

YIGIT, H.; QUEENAM, A. M.; ANDERSON, G. J.; DOMENECH-SANCHEZ, A.; BIDDLE, J. W.; STEWARD, C. D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F. C. Novel carbapenem-hydrolyzing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenemase-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n.4, p. 1151-1161, 2001.

YIM, G.; WANG, H. H.; DAVIES, J. The truth about antibiotics. **International Journal of Medical Microbiology**, v.296, n.2-3, p.163-170, Apr, 2006.

WALTHER-RASMUSSEN J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n.3, p.470-482, 2007.

WEI, Z. Q.; DU, X. X.; YU, Y. S.; SHEN, P.; CHEN, Y. G.; LI, L. J. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.51, n.2, p.763-765, Feb., 2007.

WINOKUR, P. L.; CANTON, R.; CASSELLAS, J. M.; LEGAKIS, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, Suppl.2, p. S94-103, May, 2001.

WOLLHEIM, C.; GUERRA, I. M.; CONTE, V. D.; HOFFMAN, S. P.; SCHREINER, F. J.; DELAMARE, A. P.; BARTH, A. L.; ECHEVERRIGARA, Y. S.; DA COSTA, S. O. P. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.15, n.2, p.138-143, 2011.

WOODFORD, N.; ZHANG, J.; WARNER, M.; KAUFMANN, M.E.; MATOS, J.; MACDONALD, A.; BRUDNEY, D.; SOMPOLINSKY, D.; NAVON-VENEZIA, S.; LIVERMORE, D. M. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, n.6, p.1261-1264, Sep., 2008.

WU, T. L.; CHIA, J. H.; SU, L. H.; KUO, A. J.; CHU, C.; CHIU, C. H. Dissemination of extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in pediatric intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 10, p. 4836-8, 2003.

APÊNDICE A - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 25º
CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA



XIII SIMPÓSIO BRASILEIRO DE MICOBACTÉRIAS
III SIMPÓSIO DE COLEÇÕES DE CULTURAS
II SIMPÓSIO DE ESCHERICHIA COLI "LUIZ RACHID TRABULSI"

Certificado

Certificamos que o trabalho "GENOTIPAGEM DE KLEBSIELLA PNEUMONIAE PRODUTORA DE KPC-2 ISOLADAS EM 5 ESTADOS BRASILEIROS: DISSEMINAÇÃO DE UM GENÓTIPO NO RIO DE JANEIRO E ESPÍRITO SANTO" com a autoria de: SEKI, L.M., PEREIRA, P.S., SOUZA, M.P.A.H., CONCEIÇÃO, M.S., SANTOS, L.M., ALVES, C.F.M., COLNAGO, E.M.L., GOMES, D., CARVALHO-ASSEF, ASENSI, M.D. foi apresentado na forma de pôster durante o "25º CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA" em 10 de Novembro de 2009, em Porto de Galinhas-PE.

Porto de Galinhas, 12 de novembro de 2009.

Marina Baquerizo Martinez
Presidente da SBM

Carlos Pelleschi Tabora
1º Secretário da SBM

**APÊNDICE B - CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TRABALHO NO 2º
SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE MICROBIOLOGIA CLÍNICA**



29 de Setembro
a 02 de Outubro
COSTIÃO DO SANNHÓ - SC

2010

SBM SOCIEDADE BRASILEIRA DE MICROBIOLOGIA

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS PRODUTORAS DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) E/OU KPC ISOLADAS DE HEMOCULTURAS EM CINCO HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO. com a autoria de: SEKI, L.M, PEREIRA, P.S., FIGUEIRA, M.F.R.M., ARAUJO, C.F.M., VAL PASSOS, V.L.A., SOUZA, M.J., CARBALLIDO, J.P., OLENDZKI, A.N., MARQUES, E.A., ASENSI, M.D. foi apresentado na forma de pôster durante o 2º Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, em Florianópolis, SC, no período de 29 de setembro a 02 de outubro de 2010.

Florianópolis, 29 de Setembro de 2010


Adalberto Pessoa Junior
Presidente SBM


Carlos Adalberto Neves
1º Secretário da SBM

www.sbmicrbiologia.com.br

APÊNDICE C - ARTIGO PUBLICADO NA REVISTA DIAGNOSTIC MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASE



Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70 (2011) 274–277

DIAGNOSTIC
MICROBIOLOGY
AND INFECTIOUS
DISEASE

www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437[☆]

Liliane M. Seki^a, Polyana S. Pereira^a, Maria da Penha A.H. de Souza^b, Magda de S. Conceição^c, Elizabeth A. Marques^d, Carlos Oliveira Porto^e, Elvira Maria L. Colnago^f, Carlene de F.M. Alves^g, Deize Gomes^h, Ana Paula D.A. Carvalho Assef^a, Ørjan Samuelsen^{i,1}, Marise D. Asensi^{a,*}

^aLaboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Avenida Brasil 4365, 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil

^bLaboratório Central de Saúde Pública do Espírito Santo, Rua Marechal Mascarenhas de Moraes 2025, 29052-121, Vitória, Espírito Santo, Brazil

^cHospital Geral de Bonsucesso, Avenida Londres 616, 21041-030, Rio de Janeiro, Brazil

^dHospital Universitário Pedro Ernesto–UERJ, Avenida Vinte Oito de Setembro 77, 20551-030, Rio de Janeiro, Brazil

^eLaboratório Central de Saúde Pública de Goiás, Avenida Contorno 3556, 74853-120, Goiânia-Goiás, Brazil

^fLaboratório Central de Saúde Pública do Rio de Janeiro, Rua do Resende 118, 20231-092, Rio de Janeiro, Brazil

^gLaboratório Central de Saúde Pública de Minas Gerais, Rua Conde Pereira Carneiro 80, 30510-010, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

^hLaboratório Central de Saúde Pública de Pernambuco, Rua João Fernandes Vieira, 50050-210, Recife, Pernambuco, Brazil

ⁱReference Centre for Detection of Antimicrobial Resistance, Department of Microbiology and Infection Control, University Hospital of North Norway, N-9038 Tromsø, Norway

Received 11 August 2010; accepted 11 January 2011

Abstract

The aim of this study was to investigate the genetic relatedness of 57 KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from 5 states in Brazil, during 2006–2009. Pulse-field gel electrophoresis analysis identified 10 pulsotypes. The pulsotype designated as *Kp-RJ* (*Klebsiella pneumoniae*–Rio de Janeiro) was the dominant clone found in the states of Rio de Janeiro and Espírito Santo. Multilocus sequence typing of *Kp-RJ* assigned it to ST 437. Sequence types ST11, ST16, ST25, ST70, ST101, ST105, ST423, ST442, and ST443 were also identified. These results indicate the dissemination of a successful KPC-producing clone (ST437) in Brazil, which is a single locus variant of ST258. © 2011 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *K. pneumoniae*; KPC-2; PFGE; MLST; Brazil

Klebsiella pneumoniae carbapenemase (KPC) was first reported in a *K. pneumoniae* strain from the USA in 1996 (Yigit et al., 2001), since then it has been described worldwide (Cuzon et al., 2010). In Brazil, the first detection

of KPC-2 in *K. pneumoniae* occurred in 2006 from patients hospitalized in Pernambuco, Rio de Janeiro, and São Paulo states (Monteiro et al., 2009; Pavez et al., 2009; Peirano et al., 2009). In addition, KPC-2 has been reported in *Enterobacter cloacae* and *Escherichia coli* isolated in the states of Rio Grande do Sul and Rio de Janeiro (Leão et al., 2011; Zavascki et al., 2009).

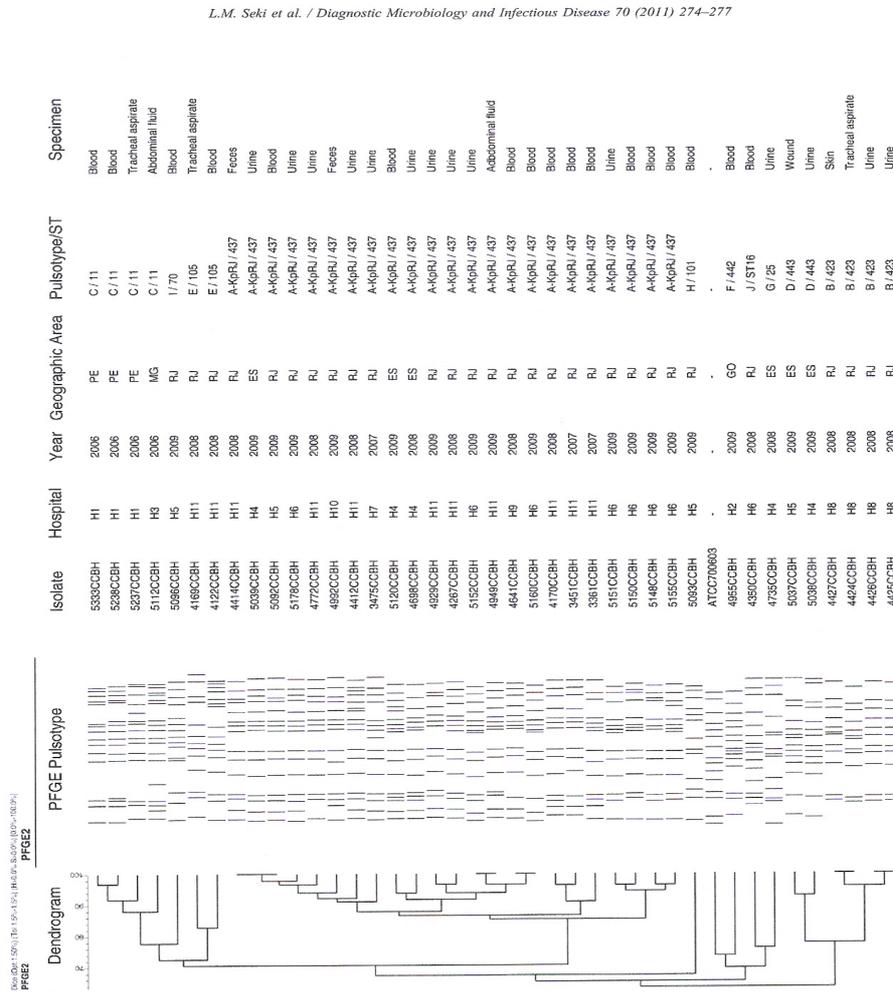
The aim of this study was to investigate the molecular epidemiology of 57 clinical isolates of KPC-2-producing *K. pneumoniae* from hospitalized patients. The isolates were submitted to our laboratory in the period of 2006–2009 from 11 tertiary-care hospitals located in the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas Gerais (Southeastern Brazil), Goiás (Midwestern Brazil), and Pernambuco (Northeastern Brazil), as part of the Bacterial Nosocomial Infection

[☆] This work was supported by Instituto Oswaldo Cruz (IOC), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Organização Pan-Americana de Saúde–Brasil (OPAS-Brasil), and Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

* Corresponding author. Tel.: +55-21-2598-4277x319; fax: +55-21-2270-6565.

E-mail address: marise@ioc.fiocruz.br (M.D. Asensi).

¹ Ø. Samuelsen is supported by a grant from the Northern Norway Regional Health Authority Medical Research Program.



L.M. Seki et al. / Diagnostic Microbiology and Infectious Disease 70 (2011) 274–277

275

Isolate	Hospital	Year	Geographic Area	Pulsotype/ST	Specimen
5333CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Blood
5286CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Blood
5237CCBH	H1	2006	PE	C / 11	Tracheal aspirate
5112CCBH	H3	2006	MG	C / 11	Abdominal fluid
5096CCBH	H5	2009	RJ	I / 70	Blood
4168CCBH	H11	2008	RJ	E / 105	Tracheal aspirate
4122CCBH	H11	2008	RJ	E / 105	Blood
4114CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRU / 437	Feces
5038CCBH	H4	2009	ES	A-KpRU / 437	Urine
5096CCBH	H5	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5176CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Urine
4779CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRU / 437	Urine
4895CCBH	H10	2009	RJ	A-KpRU / 437	Feces
4412CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRU / 437	Urine
3475CCBH	H7	2007	RJ	A-KpRU / 437	Urine
5120CCBH	H4	2009	ES	A-KpRU / 437	Blood
4686CCBH	H4	2008	ES	A-KpRU / 437	Urine
4828CCBH	H11	2009	RJ	A-KpRU / 437	Urine
4837CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRU / 437	Urine
5152CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Urine
4946CCBH	H11	2009	RJ	A-KpRU / 437	Adipocoma fluid
4641CCBH	H9	2008	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5168CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
4179CCBH	H11	2008	RJ	A-KpRU / 437	Blood
3451CCBH	H11	2007	RJ	A-KpRU / 437	Blood
3381CCBH	H11	2007	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5151CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Urine
5192CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5148CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5155CCBH	H6	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
5082CCBH	H5	2009	RJ	A-KpRU / 437	Blood
ATCC700603	-	-	-	H / 101	Blood
4655CCBH	H2	2009	GO	F / 442	Blood
4351CCBH	H6	2008	RJ	J / ST16	Blood
4735CCBH	H4	2008	ES	G / 25	Urine
5037CCBH	H5	2009	ES	D / 443	Wound
5038CCBH	H4	2009	ES	D / 443	Urine
4427CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Skin
4424CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Tracheal aspirate
4426CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Urine
4425CCBH	H8	2008	RJ	B / 423	Urine

Fig. 1. Clinical data and molecular typing of representative isolates of all PFGE pulsotypes of KPC-2-producing *K. pneumoniae* isolates detected in 5 states in Brazil. Kp-RJ = *Klebsiella pneumoniae*-Rio de Janeiro clone.

Resistance Surveillance network (Fig. 1). These isolates were submitted based on resistance or reduced susceptibility for carbapenems (MIC of ≥ 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to ertapenem or MIC of 2–4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to meropenem or imipenem). Species identification was performed with the automated Vitek System (bioMérieux, Marcy, l’Etoile, France).

All isolates were positive by the modified Hodge test. *bla*_{KPC} gene was detected in all isolates by polymerase chain reaction, and sequencing of the amplicons showed 100% sequence identity with *bla*_{KPC-2}. Sequencing and analysis were performed according to Otto et al. (2008). *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, and *bla*_{TEM} were detected in 74%, 91%, and 67% of the isolates, respectively. These findings are in agreement with previous Brazilian reports which described the co-production of *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} in KPC-producing *K. pneumoniae* isolates (Cuzon et al., 2010; Monteiro et al., 2009; Peirano et al., 2009).

Antimicrobial susceptibility testing was performed using Etest (bioMérieux) and disk diffusion. The MIC_{50/90} values for imipenem, meropenem, and ertapenem were 4/32, 8/32, 32/32 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively. Considering the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) breakpoints of January 2010 and June 2010, the percentage of resistance for imipenem, meropenem, and ertapenem was 42/86%, 53/91%, and 95/100%, respectively (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2010a,b). These data demonstrated that the CLSI breakpoints of January 2010 would result in underdetection (phenotypically) of KPC-producing isolates. All isolates were resistant to third-generation cephalosporins and monobactams (aztreonam), while 81% were resistant for ceftipime. In addition, co-resistance for amikacin (28%), ciprofloxacin (97%), gentamicin (49%), colistin (14%; MIC_{50/90}: 2/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and trimethoprim-sulfamethoxazole (81%) was observed. The co-resistance for colistin has been recently reported (Suh et al., 2010; Tóth et al., 2010) which has served to limit the available therapeutic options. Based on the US FDA Enterobacteriaceae breakpoints (≤ 2 , 4, and ≥ 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$), all the isolates were susceptible or showed intermediate susceptibility for tigecycline (MIC_{50/90} value of 2/4 $\mu\text{g}/\text{mL}$) as described previously (Bogaerts et al., 2010).

The pulse-field gel electrophoresis (PFGE) analysis, after digestion with *Xba*I, resulted in 10 pulsotypes (A–J) displaying >80% similarity (Dice coefficient) within each type. The results showed that 68% (39/57) of these isolates were clonally related (pulsotype A), designated as *Kp-RJ* (*Klebsiella pneumoniae*–Rio de Janeiro). The *Kp-RJ* clone was identified in 6 different hospitals in the states of Rio de Janeiro ($n = 36$) from 2007 until 2009 and in 2 hospitals in the state of Espírito Santo ($n = 3$) between 2008 and 2009. The pulsotype C ($n = 5$) from 2006 to 2009 was found in 2 states (Pernambuco and Minas Gerais). The other pulsotypes represented single clones (F, G, H, I, and J) or clones disseminated within the same hospital (B, D, and E) (Fig. 1).

Multilocus sequence typing (MLST) was performed according to the *K. pneumoniae* MLST website (<http://www.pasteur.fr/recherche/genopole/PF8/mlst/Kpneumoniae.html>)

for 18 selected isolates, including all pulsotypes from different hospitals of 5 states in Brazil. The dominant *Kp-RJ* clone was typed to sequence type (ST) 437 (allelic profile: 3-3-1-1-1-1-31). ST437 is a single-locus variant (SLV) of the ST258 (allelic profile: 3-3-1-1-1-1-79) clone that has been associated with the dissemination of KPC worldwide (Fig. 1).

The pulsotype C belonged to ST11 (allelic profile: 3-3-1-1-1-1-4; Fig. 1). ST11 is also a SLV of ST258 (Samuelsen et al., 2009) which has been associated with KPC-producing isolates from South Korea (Rhee et al., 2010), CTX-M-15–producing *K. pneumoniae* isolates from Hungary and Spain (Damjanova et al., 2008; Oteo et al., 2009), as well as colistin-resistant *K. pneumoniae* from South Korea (Suh et al., 2010). Recently, Cuzon et al. (2010) described *bla*_{KPC-2}–positive ST11 isolates from Pernambuco. The genetic relatedness of ST437 and ST11 with ST258 is of concern as these likely represent clones with a large epidemic potential for further dissemination.

ST16, ST70, ST101, ST105, and ST423 were also detected in Rio de Janeiro, as well as ST25, ST442, and ST443 identified in Espírito Santo and Goiás (Fig. 1). This indicates a horizontal gene transfer of *bla*_{KPC} to different clones of *K. pneumoniae* through the transfer of either plasmids or transposons (Tn4401) previously proven to be able to mobilize *bla*_{KPC} mobility (Cuzon et al., 2010; Nordmann et al., 2009).

In conclusion, although several PFGE and MLST types were identified, the dissemination of KPC-producing *K. pneumoniae* in Brazil is dominated by 2 sequence types (ST437 and ST11) that are closely related to the epidemic ST258 clone which has disseminated worldwide. The recognition of a particular KPC clone is an important step toward developing additional targeted strategies to prevent the spread of this pathogen in our country.

Acknowledgments

We thank the Institute Pasteur MLST database curators for coding the MLST alleles and profiles, the Genomic Platform for DNA Sequencing PDTIS (Instituto Oswaldo Cruz), and all the contributing laboratories that provided isolates for this study.

References

- Bogaerts P, Montesinos I, Rodrigues-Villalobos H, Blairon L, Deplano A, Glupczynski Y (2010) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing KPC-2 carbapenemase in Belgium. *J Antimicrob Chemother* 65:361–376.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010a) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement (January 2010), M100–S20. Wayne, PA: CLSI.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2010b) Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: 20th Informational Supplement (June 2010 Update), M100–S20–U. Wayne, PA: CLSI.
- Cuzon G, Naas T, Truong H, Villegas MV, Wisell KT, Carmeli Y, Gales AC, Venezia SN, Quinn JP, Nordmann P (2010) Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces β -lactamase *bla*_{KPC-2} gene. *Emerg Infect Dis* 16:1349–1356.

- Damjanova I, Tóth A, Pászti J, Hajbel-Vékony G, Jakab M, Berta J, Milch H, Fízi M (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005—the new ‘MRSA’s’? *J Antimicrob Chemother* 62:978–985.
- Leão RS, Carvalho-Assef APDA, Correal JCD, Silva RV, Goldemberg DC, Asensi MD, Marques EA (2011) KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* co-infection in a catheter-related infection. *Clin Microbiol Infect* 17:380–382.
- Monteiro J, Santos AF, Asensi MD, Peirano G, Gales AC (2009) First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53:333–334.
- Nordmann P, Cuzon G, Naas T (2009) The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. *Lancet Infect Dis* 9:228–236.
- Oteo J, Cuevas O, López-Rodríguez I, Banderas-Florido A, Vindel A, Pérez-Vásquez M, Bautista V, Arroyo M, García-Caballero J, Marín-Casanova P, González-Sanz R, Fuentes-Gómez V, Oña-Compán S, García-Cobos S, Campos J (2009) Emergence of CTX-M-15-producing *Klebsiella pneumoniae* of multilocus sequence types 1,11, 14, 17, 20, 35 and 36 as pathogens and colonizers in newborns and adults. *J Antimicrob Chemother* 64:524–528.
- Otto TD, Vasconcellos EA, Gomes LH, Moreira AS, Degraive WM, Mendonça-Lima L, Alves-Ferreira M (2008) ChromaPipe: a pipeline for analysis, quality control and management for a DNA sequencing facility. *Genet Mol Res* 7:861–871.
- Pavéz M, Mamizuka EM, Lincopan N (2009) Early dissemination of KPC-2 producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother* 53:2702.
- Peirano G, Seki LM, Val Passos VL, Pinto MC, Guerra LR, Asensi MD (2009) Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J Antimicrob Chemother* 63:265–268.
- Rhee JY, Park YK, Shin JY, Choi JY, Lee MY, Ran Peck K, Song JH, Ko KS (2010) KPC-producing extreme-drug resistant (XDR) *Klebsiella pneumoniae* isolate from a patient with diabetic mellitus and chronic renal failure on hemodialysis in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 54:2278–2279.
- Samuelsen O, Nascier U, Tofteland S, Skutlberg DH, Onken A, Hjetland R, Sundsfjord A, Giske CG (2009) Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. *J Antimicrob Chemother* 63:654–658.
- Suh JY, Song JS, Chung DR, Peck KR, Ko KS, Song JH (2010) Nonclonal emergence of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolates from blood samples in South Korea. *Antimicrob Agents Chemother* 54:560–562.
- Tóth A, Damjanova I, Puskás E, Jánvári E, Farkas M, Dobák A, Böröcz K, Pászti J (2010) Emergence of a colistin-resistant KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST258 clone in Hungary. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 29:765–769.
- Yigit H, Queenam AM, Anderson GJ, Domenech-Sanchez A, Biddle JW, Steward CD, Alberti S, Bush K, Tenover FC (2001) Novel carbapenem-hydrolysing β -lactamase, KPC-1, from a carbapenemase-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 45:1151–1161.
- Zavascki AP, Machado AB, Oliveira KR, Superti SV, Pilger DA, Cantarelli VV, Pereira PR, Lieberknecht AC, Barth AL (2009) KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. *Int J Antimicrob Agents* 34:286–288 (Letter).