

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

Claudia Gladys Flores Sejas

**AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS, A VARIABILIDADE
GENÉTICA E AS RELAÇÕES CLONAIS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E
ESCHERICHIA COLI PRODUTORAS DE ESBL DE CULTURA DE VIGILÂNCIA
DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NO MUNICÍPIO DO RIO DE
JANEIRO**

Rio de Janeiro

2015

Claudia Gladys Flores Sejas

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS, A VARIABILIDADE GENÉTICA E AS RELAÇÕES CLONAIS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORAS DE ESBL DE CULTURA DE VIGILÂNCIA DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

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

Orientadoras: Maysa Beatriz Mandetta Clementino
Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

Rio de Janeiro
2015

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

Flores, Cláudia

Avaliação da resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de ESBL de cultura de vigilância de uma unidade de terapia Intensiva no Município do Rio de Janeiro / Cláudia Gladys Flores Sejas. Rio de Janeiro: INCQS/FIOCRUZ, 2015.

91 f., il.

Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária)– Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2015.

Orientadoras: Maysa Beatriz Mandetta Clementino, Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão

1. Resistência Microbiana a Medicamentos. 2. Infecção Hospitalar. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. *Escherichia coli*. 5. β -Lactamases I. Título.

Evaluation the antibiotic resistance, genetic variability and clonal relations of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* ESBL producers of surveillance culture a intensive care unit in Rio de Janeiro city

Claudia Gladys Flores Sejas

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA AOS ANTIBIÓTICOS, A VARIABILIDADE GENÉTICA E AS RELAÇÕES CLONAIS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* E *ESCHERICHIA COLI* PRODUTORAS DE ESBL DE CULTURA DE VIGILÂNCIA DE UMA UNIDADE DE TERAPIA INTENSIVA NO MUNICÍPIO DO RIO DE JANEIRO

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

Aprovado em: 22 / 05 / 2015

BANCA EXAMINADORA

Ivano Rafaelle Victorio de Filippis Capasso (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Antonio Eugenio Castro Cardoso de Almeida (Doutor)
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Sergio Eduardo Longo Fracalanza (Doutor)
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Maysa Beatriz Mandetta Clementino (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Célia Maria Carvalho Pereira Araújo Romão (Doutora) - Orientadora
Instituto Nacional de Controle de Qualidade e Saúde

Dedicado "*in memorium*" ao meu pai,
Jaime e avó, Emma.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre comigo, dando forças para vencer todos os obstáculos encontrados no caminho;

Em especial in *memorium* ao meu Pai Jaime, a avó e madrinha Emma com seus conselhos, apoiando em tudo o que eu fazia. Vocês sempre estarão no meu coração;

A minha mãe Gladys e amada irmã Ângela, pois tudo o que sou hoje, devo a vocês por terem me incentivado e apoiado a minha escolha e ao meu anjo protetor, Gaia;

Ao meu amor Vinicius por estar ao meu lado nos momentos difíceis;

À amiga Joseane que esteve comigo desde longa data, compartilhando todas as alegrias e tristezas;

Aos amigos da equipe de Microbiologia do HFL Nathalia Brazão, Ana Paula Silva, Eli Pinheiro, Henrique, Thiago e ao Adelmo por acreditarem em mim e a todos do setor da Patologia Clínica obrigada pelos ensinamentos.

A equipe do CCHI Bianca, Ana Lúcia, Rosana e Luis Afonso;

A todos do Laboratório de Microrganismos de Referência, Jandira, Claudia Andrade, Aline, Mariana, Samara e Talita.

A Catia Chaia obrigada por toda sua ajuda e paciência nestes dois anos de mestrado, adorei conviver com você.

À Camila Barreto e Kayo Bianco, um amigo especial e “irmão”, que conquistei durante essa longa jornada, obrigada por toda sua ajuda. Não esquecerei das risadas compartilhadas com vocês.

Ao Dr. Antônio Eugênio, agradeço por toda a compreensão e auxílio na revisão final deste trabalho.

Ao Dr. Ivano de Filippis pelo apoio nesta etapa final.

A Joana Angélica que esteve comigo desde o início.

As Dr.^a Maysa Mandetta e Célia Romão, que me receberam de braços abertos tendo sempre paciência em esclarecer as minhas dúvidas e por terem tornado esta última etapa mais suave. Obrigada pelo aprendizado, pelo exemplo de profissionalismo e dedicação à pesquisa, pois sem vocês não estaria a onde estou.

“Seu trabalho vai ocupar uma grande parte da sua vida. A única maneira de estar verdadeiramente satisfeito é fazendo aquilo que você acredita ser um ótimo trabalho. E o único jeito de fazer um ótimo trabalho é fazendo algo que você ama. ”

Steve Jobs

RESUMO

No ambiente hospitalar, principalmente em UTI, o aumento na incidência de microorganismos multirresistentes é considerado um dos principais problemas no tratamento das infecções hospitalares e de saúde pública global. Uma das rotinas incluídas na prática hospitalar é o monitoramento de pacientes, através de culturas de vigilância nasais, orais e retais. O objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais em isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL. Setenta isolados de *K. pneumoniae* e 47 de *E. coli* foram obtidos através de culturas de vigilância de origem retal na admissão do paciente na UTI de um Hospital Federal no Rio de Janeiro, seguida por controle semanal, entre março de 2013 e março 2014. O perfil de susceptibilidade aos antibióticos (CIM) foi avaliado através do sistema automatizado VITEK II. Foram pesquisados os genes de resistência *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM-1} pela PCR e determinada a diversidade genética entre os isolados (ERIC-PCR). *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram altos percentuais de resistência à cefepime (98% e 94%, respectivamente) e à ceftazidima (100% e 96%, respectivamente). Somente os isolados de *K. pneumoniae* demonstraram resistência a ertapenem (61%), imipenem (54%) e meropenem (43%). Em relação à ciprofloxacina, 69% e 28% dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* foram resistentes, respectivamente. Os genes *bla*_{SHV-1} (69%), *bla*_{TEM-1} (63%), *bla*_{CTX-M-15} (47%), *bla*_{OXA-1} (60%), *bla*_{KPC-2} (57%) e *bla*_{OXA-48} (16%) foram detectados em *K. pneumoniae* e apenas *bla*_{TEM-1} (49%), *bla*_{CTX-M-15} (39%) e *bla*_{OXA-1} (49%) em *E. coli*, entretanto *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM-1} não foram detectados nos isolados. Foram evidenciados, ainda, isolados de *E. coli* carreando até três diferentes genes e *K. pneumoniae* com até seis genes responsáveis pela produção de diferentes β -lactamases. A tipificação molecular indicou uma grande diversidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* (68 perfis / 70 isolados) e de *E. coli* (37 perfis / 47 isolados). Os dados obtidos neste estudo ressaltam a importância de culturas de vigilância como ferramenta preventiva, destacando-se a necessidade de identificação dos mecanismos de resistência e genes envolvidos que poderão colaborar com a prevenção da crescente e relevante multirresistência bacteriana.

Palavras Chave: Infecções hospitalares, cultura de vigilância, *K. pneumoniae*, *E. coli*, enzimas β -lactamases, tipificação.

ABSTRACT

Hospital environment, especially in the intensive care unit (ICU), the increasing incidence rate of multidrug-resistant microorganisms is considered one of the main problems of hospital infections treatment and global public health. One of the hospital routine practices in inpatients wards is the surveillance cultures monitoring of nasal, oral and rectal. The aim of this study was to evaluate the antibiotic resistance, genetic variability and clonal relations of *K. pneumoniae* and *E. coli* ESBL producers. Seventy *K. pneumoniae* and 47 *E. coli* isolates were obtained through weekly rectal surveillance cultures upon patient admission in ICU of Federal Hospital in Rio de Janeiro, between March 2013 and March 2014. The antibiotic susceptibility profiles (MIC) was assessed by automated VITEK II. The resistance genes *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{CTX-M-15}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM-1} were investigated by PCR and genetic diversity among the isolates was established by ERIC-PCR. *E. coli* and *K. pneumoniae* strains showed high resistance rates to cefepime (98% and 94%, respectively) and ceftazidime (100% and 96%, respectively). However, only *K. pneumoniae* isolates were resistant to ertapenem (61%), imipenem (54%) and meropenem (43%). For ciprofloxacin, 69% and 28% of *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates were resistant, respectively. Genes *bla*_{SHV-1} (69%), *bla*_{TEM-1} (63%), *bla*_{CTX-M-15} (47%), *bla*_{OXA-1} (60%), *bla*_{KPC-2} (57%) and *bla*_{OXA-48} (16%) were detected in *K. pneumoniae* and *bla*_{TEM-1} (49%), *bla*_{CTX-M-15} (39%) and *bla*_{OXA-1} (49%) were present in isolates of *E. coli*. On the other hand, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{NDM-1} were not detected in any of the isolates. Additionally, we detected *E. coli* strains containing up to three different genes and *K. pneumoniae* with up to six genes responsible for the production of different β -lactamases. Molecular typing analysis showed high genetic diversity among *K. pneumoniae* (68 profiles / 70 isolates) and *E. coli* (37 profiles / 47 isolates) isolates. Our data underscore the importance of surveillance cultures as a preventive tool, highlighting the need for identification of resistance mechanisms and genes involved that could collaborate with the prevention of increasing and relevant bacterial multidrug resistance.

Key words: Hospital infections, surveillance culture, *K. pneumoniae*, *E. coli*, β -lactamase enzymes, typing analysis.

LISTAS DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BLAST	Basic Local alignment Search Tool
CCIH	Comissões de Controle de Infecção Hospitalar
CDC	Disease Control and Prevention
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Dexoxinucleotídeo trifosfato
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
ERIC-PCR	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR
ESBL	β -lactamases de espectro estendido
ExPEC	Infecções extra-intestinais
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GIPEA	Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
IPCSL	Infecção de corrente sanguínea primária
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
MDR	Multidroga Resistente
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
NDM	“New Delhi” Metallo- β -lactamase
NHSN	National Healthcare Safety Network
OMS	Organização Mundial da Saúde
OXA	Oxacilinase
PBPs	Penicillin Binding Protein
PCIH	Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
POP	Procedimento Operacional Padronizado

RAM	Resistência Antimicrobiana
Rede RM	Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana
SHV	β -lactamase “Sulfhydryl variable”
SNVS	Sistema Nacional de Vigilância Sanitária
SUS	Sistema Único de Saúde
TEM	β -lactamase Temoneira
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Ct	Ciclo threshold
dNTPs	Deoxinucleosídeos tri-fosfato
OD	Oxigênio Dissolvido
g	Grama
pb	Pares de bases
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
µM	Micromolar
nM	Nanomolar
T _m	Temperatura de melting

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. História da Descoberta dos Antibióticos e Desenvolvimento da Resistência	31
Figura 2. Estrutura Básica dos antibióticos β -lactâmicos	32
Figura 3. Modos de Ação dos Antimicrobianos	35
Figura 4. Mecanismo de ação das β -lactamases.	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação Funcional das β -lactamases Fonte: BUSH AND FISHER, 2011.	41
Tabela 2. Nomenclatura das principais β -lactamases. Fonte: JACOBY, 2006.....	42
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados na PCR de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>	52
Tabela 4. Iniciadores selecionados para detecção de β -lactamases.	54
Tabela 5. Perfil de resistência dos isolados de <i>E. coli</i> de acordo com os genes detectados.....	60
Tabela 6. Perfil de resistência dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> de acordo com os genes detectados.	61
Tabela 7. Resistência aos antibióticos e detecção dos genes <i>bla</i> _{KPC-2} e <i>bla</i> _{OXA-48} de <i>K. pneumoniae</i>	63

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Comparação entre o número de isolados identificados como <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i> pelos métodos fenotípico e molecular.....	38
Gráfico 2. Resistência dos isolados de <i>E.coli</i> e <i>K. pneumoniae</i> possivelmente produtores de ESBL.....	39
Gráfico 3. Número de isolados resistentes a cefalosporinas e monobactams (AST-N105).	58
Gráfico 4. Número de isolados resistentes a cefalosporinas (AST-N239).....	58
Gráfico 5. Detecção dos genes resistência aos antibióticos em <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. coli</i>	59
Gráfico 6. Distribuição dos isolados de <i>E. coli</i> em relação aos genes de resistência pesquisados.	60

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. VIGILÂNCIA SANITÁRIA E INFECÇÃO HOSPITALAR	17
1.2. LEGISLAÇÃO NO CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR NO BRASIL	18
1.3. INFECÇÕES HOSPITALARES	20
1.4. EPIDEMIOLOGIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES.....	23
1.5. ENTEROBACTERIACEAE.....	25
1.5.1. <i>Escherichia coli</i>	26
1.5.2. <i>Klebsiella pneumoniae</i>	27
1.6. TIPIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE VIGILÂNCIA.....	29
1.6.1. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR - ERIC-PCR.....	29
1.7. ANTIMICROBIANOS	29
1.8. ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS	31
1.8.1. Mecanismo de ação dos antimicrobianos	34
1.9. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS	37
1.9.1. Alteração do sítio alvo (PBPs - Penicillin Binding Proteins)	38
1.9.2. Bomba de efluxo	38
1.9.3. Diminuição da expressão de porinas (OMPs)	39
1.10. B-LACTAMASES.....	39
1.11. NOMENCLATURA DAS B-LACTAMASES	42
1.11.1. β -lactamases de espectro ampliado (ESBL)	43
1.11.2. Carbapenemases	45
1.11.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemases (KPC)	46
1.11.4. AmpC β -Lactamases.....	48
1.12. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA	48
2. OBJETIVOS	50
3. METODOLOGIA	51
3.1. ASPECTOS ÉTICOS	51
3.2. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS.....	51
3.3. IDENTIFICAÇÃO PRÉVIA E TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS.....	51
3.4. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO NO INCQS.....	52
3.4.1 Provas bioquímicas	52

3.5. EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO	52
3.6. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS ISOLADOS PELA PCR	52
3.7. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS	53
3.8. DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA.....	53
3.9. SEQUENCIAMENTO	55
3.10. CARACTERIZAÇÃO CLONAL DOS ISOLADOS	55
4. RESULTADOS.....	56
4.1. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS	56
4.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO VITEK II..	56
4.3. DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA RELATIVOS ÀS B-LACTAMASE	
58	
4.4. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE RESISTÊNCIA	68
4.5. TIPIFICAÇÃO DAS CEPAS DE <i>K. PNEUMONIAE</i> E <i>E. COLI</i>	68
5. DISCUSSÃO	72
6. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. VIGILÂNCIA SANITÁRIA E INFECÇÃO HOSPITALAR

O Sistema Único de Saúde (SUS), aprovado através da Lei Orgânica da Saúde – Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990, tem como objetivo e atribuição “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 “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”, abrangendo: o controle de bens de consumo que, direta ou indiretamente, se relacionem com a saúde, compreendidas todas as etapas e processos, da produção ao consumo e o controle da prestação de serviços que se relacionam direta ou indiretamente à saúde. Os serviços de atenção à saúde são assim submetidos às ações de vigilância sanitária.

No ambiente hospitalar, principalmente em UTI (Unidade de Terapia Intensiva), devido a vários fatores, dentre eles, o uso excessivo de antibióticos, encontra-se um elevado índice de resistência bacteriana. O aumento na incidência de micro-organismos multirresistentes é considerado um dos principais problemas no tratamento das infecções hospitalares e de saúde pública global (PAIM; LORENZINI, 2013).

Desta forma, se as infecções hospitalares constituem risco significativo à saúde dos usuários dos hospitais, 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 o papel da Vigilância Sanitária no controle das infecções hospitalares (BRASIL, 1998).

O Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), unidade técnico-científica da Fundação Oswaldo Cruz, componente do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS), tem como missão contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, atuando como referência nacional para as questões científicas e tecnológicas relativas ao controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária. Constitui-se num dos alicerces do SNVS, desempenhando importante papel na proteção da

população contra as situações de risco e os fatores nocivos associados à produção e à comercialização de alimentos, medicamentos, cosméticos, saneantes, produtos biológicos, sangue e seus derivados, e outros de uso corrente, atua como laboratório no nível federal, em áreas de ensino, de pesquisa e de tecnologias de laboratório relativas ao controle da qualidade de insumos, produtos, ambientes e serviços sujeitos à ação da Vigilância Sanitária. Age em estreita cooperação com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), com Secretarias estaduais e municipais de Saúde, entre outros parceiros (OMS/OPAS, 2014).

1.2. LEGISLAÇÃO NO CONTROLE DE INFECÇÃO HOSPITALAR NO BRASIL

A assistência à saúde vem, ao longo dos tempos, evoluindo com os avanços científicos e tecnológicos e tem refletido em melhoria nas ações de saúde para a população. Porém, se por um lado se observa o desenvolvimento científico-tecnológico nas ações de saúde, por outro, percebe-se que problemas antigos ainda persistem como é o caso das infecções hospitalares, um grave problema de saúde pública mundial, tanto pela sua abrangência como pelos elevados custos sociais e econômicos. Portanto, o seu controle deixou de ser 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 à saúde (FERREIRA; BEZERRA, 2010).

No Brasil, o problema da infecção hospitalar só foi assumido pelo Estado em 1983, com a publicação da Portaria nº196, de junho de 1983 pelo Ministério da Saúde, que tornou obrigatória a implantação de comissões de infecção hospitalar em todos os hospitais, com atribuições como vigilância epidemiológica com coleta de dados, treinamento em serviço, elaboração de normas técnicas, isolamento de pacientes, controle do uso de antimicrobianos, normas de seleção de germicidas e preenchimento de relatórios (BRASIL, 1983).

Em 1985, a morte do recém-eleito Presidente da República, Tancredo Neves, por septicemia devido a uma infecção pós-cirúrgica, causou grande repercussão nacional, corroborando para que o Ministério da Saúde programasse ações e projetos que mudassem o panorama e os rumos do controle de infecção no país.

Desencadearam-se ações como o levantamento das instituições brasileiras que já tinham as Comissões de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH)

operacionalizadas, capacitação de multiplicadores, intercâmbio de conhecimentos entre os profissionais de saúde, elaboração de manuais e normas técnicas (FERNANDES, 2000), e publicação de legislação específica sobre os desinfetantes hospitalares e esterilizantes químicos.

A Portaria nº 196/83 foi substituída pela Portaria nº 930, de agosto de 1992, que definiu a estrutura de funcionamento e áreas de competência, detalhando em seus anexos, conceito e critérios para o diagnóstico de infecção hospitalar; classificação das cirurgias quanto ao potencial de contaminação; vigilância epidemiológica; normas para limpeza, desinfecção, esterilização e antissepsia. Esta Portaria foi revogada pela Lei 9431 de 1997 que dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um Programa de Infecção Hospitalar e criarem uma (CCIH). Para os efeitos desta Lei, este programa envolve o conjunto de ações desenvolvidas deliberada e sistematicamente com vistas à redução máxima possível da incidência e da gravidade das infecções hospitalares (BRASIL, 1997).

A ANVISA, por meio da Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (GIPEA), coordena o Programa Nacional de Controle de Infecção Hospitalar (PCIH), cujas atividades foram delineadas pela Lei nº 9431 e conta com o auxílio das CCIH. Essas comissões são grupos de ação que trabalham dentro dos hospitais, com o intuito de fiscalizar se as determinações da vigilância sanitária estão sendo cumpridas.

A CCIH do hospital deverá elaborar e implementar um (PCIH) e um regimento interno para a Comissão. Além disso, deverá implantar um Sistema de Vigilância Epidemiológica das Infecções Hospitalares e suas Informações deverão ser avaliadas sistemáticas e periodicamente. Esta vigilância epidemiológica será responsável pelas observações ativas, sistemáticas e contínuas da ocorrência e distribuição das infecções hospitalares, entre pacientes hospitalizados ou não, assim como investigação epidemiológica casos e surtos (BRASIL, 1998).

As diretrizes e normas que viabilizaram o planejamento do Programa de Controle de Infecção Hospitalar foram definidas pela Portaria GM nº 2616, de 12 de maio de 1998. De acordo com esta Portaria, as CCIH coordenam as ações de vigilância epidemiológica das infecções hospitalares, supervisionam normas e rotinas técnico-operacionais relacionadas à prevenção e controle das infecções,

capacitam o quadro de funcionários e profissionais da instituição, desenvolvem ações para o uso racional de antimicrobianos, saneantes e materiais médico-hospitalares e realizam investigação epidemiológica de casos e surtos, implementando medidas imediatas de controle, dentre outras atividades.

A ANVISA publicou em 15 de agosto de 2012 a Portaria nº 1218, instituindo a Comissão Nacional de Prevenção e Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde – CNCIRAS cuja atividade foi a elaboração do Programa Nacional de Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde – PNPCIRAS. O objetivo geral do Programa Nacional é reduzir, em âmbito nacional, a incidência de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana. A responsabilidade de acompanhamento dos Programas de Controle de Infecções Hospitalares nos hospitais é da Vigilância Sanitária, a qual não somente inspeciona como também deve prestar cooperação técnica aos hospitais, orientando para o exato cumprimento e aplicação das diretrizes estabelecidas pela legislação sanitária pertinente (ANVISA, 2012).

É primordial que cada instituição crie estratégias que permitam racionalizar e tornar mais apropriado o uso de antimicrobianos no hospital. A implantação de um sistema de auditoria que deve ser feito pelo médico do CCIH, dinâmico e adaptado às necessidades de cada estabelecimento de saúde é essencial para qualquer programa de controle de antimicrobianos. Neste controle dever-se-ão considerar a eficácia do antimicrobiano, efeitos adversos, custos e padrão de sensibilidade dos micro-organismos prevalentes.

Sendo assim, uma CCHI estruturada e atuante e uma equipe de profissionais comprometida em obter a redução dos índices de infecção trarão melhoria significativa na qualidade da assistência aos pacientes e expressivas reduções de custos.

1.3. INFECÇÕES HOSPITALARES

As infecções hospitalares, denominadas atualmente de forma mais ampla como (IRAS) são aquelas adquiridas após a internação de um paciente em hospital, ou outro estabelecimento de saúde, e que se manifeste durante a internação ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a hospitalização (BRASIL, 1997).

As IRAS têm grande impacto na morbimortalidade, tempo de internação e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Acrescentam-se a isso as repercussões para o paciente, sua família e a comunidade em geral, tal como o afastamento da vida social e do trabalho, com conseqüente comprometimento social, psicológico e econômico (OLIVEIRA et al., 2010). Pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma ampla variedade de micro-organismos patogênicos e muitas vezes ao uso de antimicrobianos de amplo espectro e a procedimentos invasivos.

Um dos agravos das IRAS é que os micro-organismos causadores são, normalmente, endêmicos na instituição, logo pode existir uma pressão seletiva nesses micro-organismos pelo uso de antimicrobianos de espectro estendido levando a disseminação de mecanismos de resistência entre essas bactérias. Na Europa, relatório realizado pelo *European Centre for Disease Prevention and Control* reportou que 41,2% dos isolados de *Staphylococcus aureus* eram resistentes à meticilina (MRSA), 10,2% dos *Enterococos* eram resistentes à vancomicina, 33,4% das enterobactérias eram resistentes às cefalosporinas de terceira geração e produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e 7,6% eram resistentes aos carbapenêmicos. Além disso, 31,8% dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* e 81,2% dos isolados de *Acinetobacter baumannii* foram resistentes aos carbapenêmicos (ECDC, 2012).

Nos últimos anos, as IRAS causadas por micro-organismos multirresistentes têm demonstrado grande importância nos hospitais brasileiros. Sendo que os principais micro-organismos multirresistentes que causam infecções relacionadas à assistência à saúde são: *S. aureus* meticilina resistente (MRSA), *Enterococos* resistentes à vancomicina (VRE), cepas produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL - *Extended-Spectrum β -lactamase*) e bactérias Gram-negativas resistentes aos carbapenêmicos (ANVISA, 2012). Toda esta situação pode gerar insucesso terapêutico e a recidiva de infecções, aumentando assim os custos financeiros, onerando cada vez mais os sistemas públicos de saúde (FIOL et al., 2010).

Segundo o Boletim Informativo de Segurança do Paciente e Qualidade em Serviços de Saúde de março de 2014 da ANVISA, *Staphylococcus coagulase negativo*, *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter* spp., *P. aeruginosa*, constituem

os cinco principais micro-organismos associados a infecções na corrente sanguínea em pacientes internados em UTI adulto de diferentes hospitais brasileiros.

Os antibióticos são essenciais para tratar infecções. O seu uso indevido é observado em grande parte do mundo, principalmente, sob a forma abusiva e desnecessária. O aumento da resistência aos antimicrobianos é, portanto, uma consequência da sua utilização, muitas vezes sem critério. Esta relação é evidente tanto para indivíduos como para populações, tornando-se um dos principais problemas de saúde pública no mundo, afetando diferentes países, desenvolvidos ou não (OMS, 2012).

O risco de se adquirir infecções é determinado pela suscetibilidade do paciente e pelos procedimentos clínicos e invasivos durante a hospitalização. O conhecimento e a conscientização dos vários riscos de transmissão de infecções, das limitações dos processos de desinfecção e de esterilização são imprescindíveis para que se possam tomar as devidas precauções (FERREIRA; BEZERRA, 2010).

As Unidades de Terapia Intensiva (UTI) são unidades destinadas ao atendimento de pacientes clinicamente graves, geralmente com internações prolongadas e em uso de procedimentos invasivos (cateteres venosos centrais, sondas vesicais de demora e ventilação mecânica). Os pacientes admitidos de UTI são mais suscetíveis ao desenvolvimento de IRAS, chegando a representar cerca de 25% de todas as infecções desenvolvidas nos hospitais, especialmente por bactérias multidroga resistentes (MDR) (OLIVEIRA et al., 2010).

Por representarem uma ameaça significativa para os pacientes, os serviços de saúde devem fazer esforços para minimizar os riscos para IRAS e diminuir os efeitos adversos quando estas ocorrerem (ANVISA, 2013a). A identificação, a prevenção e o controle dessas infecções representam fundamentos para a intervenção sobre o risco em serviços de saúde, antes que o dano alcance o paciente (ANVISA, 2013b).

Vale ressaltar, o papel e a importância dos laboratórios de saúde pública, unidades técnico-científicas que têm por atribuição a realização de ensaios analíticos que visam contribuir para a promoção e recuperação da saúde e prevenção de doenças, no âmbito do controle da qualidade de produtos, ambientes e serviços vinculados à Vigilância Sanitária. Esses laboratórios fazem parte do

Sistema Nacional de Vigilância Sanitária (SNVS) e atuam tanto na área de medicina laboratorial como em controle da qualidade de produtos de interesse para a saúde.

1.4. EPIDEMIOLOGIA DE BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES

No ambiente hospitalar, principalmente em UTI no Brasil, devido ao uso excessivo de antibióticos, são observados elevados índices de resistência bacteriana. O conhecimento do perfil de resistência da microbiota hospitalar frente aos antibióticos é fundamental para a prevenção e controle de infecções hospitalares (PAIM et al, 2013).

O tratamento com antibióticos favorece a colonização dos pacientes com germes multirresistentes, uma vez que a microbiota, barreira contra micro-organismos exógenos é afetada pela terapia antimicrobiana. Desta forma, os micro-organismos infectantes, resistem aos antimicrobianos, e fazem uso desta vantagem para colonizar melhor o hospedeiro. Entretanto, o tratamento antimicrobiano promove, tanto colonização quanto infecção, por micro-organismos multirresistentes, que não são capazes de competir com a microbiota quando esta é presente (MARTÍNEZ ; BAQUERO, 2002).

No Brasil dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde (Rede RM) em 2012 mostraram que 25,3% dos isolados de *K. pneumoniae* eram resistentes a cefalosporinas e carbapenêmicos; entretanto, 35,3% foram resistentes apenas às cefalosporinas. Enquanto isso, 26,7% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a cefalosporinas e 6,3% foram resistentes a cefalosporinas e carbapenêmicos. Isolados de *Enterobacter* spp. e *Serratia* spp. apresentaram um percentual de 32,9% e 37,5% de resistência a cefalosporinas e para ambas as drogas, foram encontrados percentuais de 11,4% e 7,2% resistentes, respectivamente em infecção de corrente sanguínea primária (IPCSL) em pacientes adultos hospitalizados em UTI.

Gales e colaboradores no período de 2008 a 2010 avaliaram a prevalência de bactérias causadoras de infecções em hospitais de países da América Latina em diferentes sítios. Em infecções pulmonares, *K. pneumoniae* foi o quarto micro-organismo mais isolado (10,2%), seguido de *Enterobacter* spp. (5,1%), *E. coli* (4,7%) e *Serratia marcescens* (3%). Enquanto em infecções na pele e tecidos moles, *E. coli* foi o segundo mais isolado (19,7%) e *K. pneumoniae*, o quarto (10,4%). Em

infecções da corrente sanguínea, *E. coli* foi o segundo micro-organismos mais isolado (19%), seguido de *K. pneumoniae* (12,3%) (GALES et al, 2012).

Um estudo realizado no hospital universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) em Florianópolis, entre janeiro de 2006 a dezembro de 2010 demonstrou a prevalência de micro-organismos causadores de IRAS onde foi observado 40% de enterobactérias, 18,6% de *P. aeruginosa* e 9,2% de *Staphylococcus* spp. Entretanto, esse mesmo estudo demonstrou que no Hospital Regional Homero de Miranda Gomes, também na mesma região, a prevalência foi de 41,2% de enterobactérias, 18,9% de *Staphylococcus* spp. e 7,9% de *P. aeruginosa*. Isso demonstra que apesar de serem hospitais que pertencem à mesma região possuem características epidemiológicas diferentes e conseqüentemente, as medidas de controle e prevenção não serão as mesmas (PARUCKER, 2010).

A segurança do paciente é um grave problema de saúde pública mundial. O risco de infecções associadas ao cuidado de saúde de alguns países em desenvolvimento é de até 20 vezes maior que nos países desenvolvidos. No mundo, 1,4 milhões de pessoas sofrem de infecções adquiridas em hospitais (WHO, 2014). Esses números levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a reconhecer a Resistência Antimicrobiana (RAM) como uma crise de saúde pública global (WHO, 2012).

Um estudo de vigilância realizado em hospitais americanos no período de 2009 a 2010 pela *National Healthcare Safety Network* (NHSN), do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) mostrou que cinco gêneros de *Enterobacteriaceae* estavam entre os 10 micro-organismos mais frequentemente isolados de infecções hospitalares. *E. coli* foi o terceiro mais isolado (11,5%), *Klebsiella* spp. foi o sexto (8%), *Enterobacter* spp. encontrava-se em oitavo lugar (4,7%), seguido de *Proteus* spp. (2,5%) e *Serratia* spp. (2,1%) (SIEVERT et al., 2013).

Os países da América Latina apresentam altos níveis de resistência bacteriana em comparação à Europa e Estados Unidos, especialmente entre bacilos gram-negativos não-fermentadores e enterobactérias produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (GALES et al., 2008; CASELLAS, 2011).

Para trazer a atenção internacional para uma ameaça crescente de saúde pública, a OMS escolheu a resistência antimicrobiana como tema para o Dia Mundial da Saúde em 2011. A resistência antimicrobiana não é um problema novo. Em 1998, a Assembleia Mundial da OMS aprovou uma resolução instando os Estados-Membros a tomarem medidas contra o fenômeno da resistência bacteriana. Em 2001, a OMS publicou uma estratégia global para contenção da resistência antimicrobiana, juntamente com uma série de recomendações destinadas a países que permitiam definir e programar políticas nacionais em resposta à resistência antimicrobiana. Assim, as intervenções estratégicas para controlar a resistência aos antibióticos já são conhecidas há algum tempo. Até agora, porém, as respostas nacionais e globais têm sido inadequadas (BRASIL, 2010).

1.5. Enterobacteriaceae

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grande grupo de bacilos Gram negativos, não esporulados, com motilidade variável, fermentadores de glicose com ou sem a formação de gás. Crescem na presença ou ausência de oxigênio, em sua maioria são catalase positiva, exceto *Shigella dysenteriae*, e oxidase negativa, exceto *Plesiomonas*, gênero recentemente incorporado na classificação da família *Enterobacteriaceae* e *Aeromonas* spp., além de em sua maioria reduzirem o nitrato a nitrito (MURRAY, 2014). Atualmente, são classificados em 44 gêneros, 176 espécies e 4 grupos entéricos ainda não nomeados. Estão amplamente distribuídas na natureza sendo facilmente encontradas no solo, água e produtos de origem animal e vegetal (ANVISA, 2013).

Desta forma, as enterobactérias representam o maior e mais heterogêneo grupo de bacilos Gram-negativos de importância clínica. Espécies como *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp., *Enterobacter* spp., entre outras vêm sendo associadas a doenças diarreicas, infecções nos tratos urinários e respiratórios, em feridas e queimaduras, além de casos de septicemia e meningite. Esses micro-organismos são considerados os principais causadores de infecções hospitalares, isolados em aproximadamente 99% dos casos (COQUE et al., 2008; WINN et al., 2008; ANVISA, 2013).

A via de transmissão e contaminação das enterobactérias ocorre de pessoa a pessoa, através das mãos de profissionais de saúde ou de reservatórios ambientais, para os pacientes. Esta disseminação, como já foi documentada, promove surtos

causados por *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia rettgeri* e *Serratia sp.* produtoras de ESBL, em Unidades de Tratamento Intensivo (BONTEN et al., 1999).

Vale ressaltar que a Sociedade Americana de Doenças Infecciosas considerou os bacilos Gram-negativos como sendo um desafio no tratamento de doenças infecciosas, pela facilidade com que adquirem elementos genéticos associados a múltiplos determinantes de resistência à maioria das classes de antibióticos (BOUCHER et al., 2009; BUSH, 2010).

1.5.1. *Escherichia coli*

E. coli é um habitante comum do intestino de vários animais, incluindo os seres humanos. De maneira geral, *E. coli* aparece como um micro-organismo comensal, no entanto frequentemente causam infecções extra-intestinais (ExPEC) (DA SILVA AND MENDONÇA, 2012). Em uma escala global, ExPEC são responsáveis por 70 a 95 % dos casos de Infecção do trato urinário (ITU) comunitários e com aproximadamente 50% nas UTI hospitalares, representando uma substancial morbi-mortalidade (FOXMAN, 2010).

A aquisição de elementos genéticos móveis, tais como: fagos, plasmídeos, desempenham um papel importante na evolução de diferentes clones de *E. coli* comensais que levam ao aparecimento das *E. coli* patogênicas, associadas a quadros específicos. A partir destas modificações são conhecidos dois grupos de *E. coli* (diarreio gênico e extra-intestinal) (AHMED et al., 2008).

O tratamento de infecções por este micro-organismo é agora ameaçado pela ocorrência de resistência aos antibióticos β -lactâmicos, como as chamadas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), que conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e monobactâmicos. A disseminação da resistência é associada a elementos genéticos móveis tais como os plasmídeos, transposons e integrons que podem ser transferidos para diferentes cepas ou espécies bacterianas. (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

A resistência as fluoroquinolonas frequentemente utilizadas para tratar pacientes com ITU, está associada a alguns mecanismos de resistência, como: alterações nas enzimas alvo (DNA girase, topoisomerase IV) ou mudanças na expressão de porinas ou através das bombas de efluxo, prejudicando a chegada do antibiótico ao seu alvo (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

A resistência aos antibióticos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* particularmente em *K. pneumoniae* é amplamente estudada, diferentemente da resistência destes em *E. coli* (GOREN et al., 2010). No entanto, essa resistência deve ser cuidadosamente monitorada devido ao seu potencial em dispersar-se em ambiente hospitalar e comunitário.

Vale ressaltar que *E. coli* é uma das espécies mais versáteis devido ao seu alto grau de plasticidade genômica, pela facilidade de perdas ou ganhos de genes através da transferência horizontal. Nos últimos anos observou-se um aumento no número de relatos sobre a aquisição de resistência aos antimicrobianos em cepas de *E. coli* (RASKO et al., 2008).

1.5.2. *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella* foi assim denominado por Edwin Klebs, microbiologista alemão no final do século XIX. O bacilo, conhecido na atualidade como *Klebsiella*, também foi descrito por Carl Friedlander, e durante muitos anos o “bacilo de Friedlander” foi associado como agente de uma pneumonia grave, e com frequência, fatal (KONEMAN, 2008). Está presente na natureza podendo ser encontrado no ambiente natural (água, esgoto e solo) e em mucosas de seres humanos e animais. Os sítios comuns de colonização nos humanos são o trato gastrointestinal, respiratório e geniturinário (TRABULSI, 2009).

Considerado como um patógeno oportunista responsável por muitas infecções hospitalares, incluindo septicemia, pneumonias e infecções do trato urinário (ITU), especialmente em indivíduos imunocomprometidos (ZAO et al., 2010). Sua virulência está associada à presença de cápsula polissacarídica, a qual é também responsável pelo fenótipo mucoide da colônia e o sistema de captação de ferro (SCARPATE; COSSATIS, 2009).

Dados globais mostram que a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL foi de 44% na América do Sul, 33% na Europa, 22% na Ásia e 12% nos Estados Unidos (EJAZ et al., 2013).

A prevalência de β -lactamase de espectro estendido (ESBL) em *K. pneumoniae* é crescente ao redor do mundo. As infecções causadas por este micro-organismo estão associadas ao aumento de morbi-mortalidade principalmente nos ambientes hospitalares (GUNTER et al., 2014). A aquisição de mecanismos de

resistência aos antimicrobianos tem levado as enterobactérias, principalmente *K. pneumoniae* a alcançar notoriedade entre os patógenos causadores de surtos em todo o mundo (ARDUNAY, 1998).

Considerando o principal mecanismo de resistência a produção de ESBL, temos como a hipótese mais aceita é que este micro-organismo adquire resistência a partir da transferência vertical/horizontal de genes codificadores de enzimas que metabolizam os antibióticos, como os genes de β -lactamase *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{KPC} que apresentam uma alta prevalência em *Klebsiella*, sendo encontrados frequentemente associados aos plasmídeos (STALER et al., 2012; LUO et al., 2011; ELGORRIAGA et al., 2012).

No Brasil, 30 a 60% das *Klebsiella* spp. são produtoras de β -lactamases de espectro estendido (ESBL). Estudos demonstraram a alta prevalência do gene *bla*_{CTX-M} em diferentes clones de *K. pneumoniae*, provavelmente devido à localização destes genes em plasmídeos e integrons de classe 1, o que permite a transferência e expressão dos genes entre diferentes isolados de *K. pneumoniae* (MUNOZ-PRICE et al., 2013).

A maior preocupação, porém, está nas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases. A primeira *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (tipo KPC) foi isolada em 1996, nos EUA e tem sido responsável por muitos surtos em todo o mundo. As carbapenemases são encontradas em várias espécies de enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Além de produzir resistência a todos os β -lactâmicos disponíveis, esta carbapenemase tem uma alta capacidade de se disseminar, uma vez que estes genes também estão associados aos plasmídeos e/ou à presença de elementos genéticos móveis (NASS et al., 2013).

Em 2006, foi descrita a primeira detecção do gene *bla*_{KPC-2} no Brasil (MONTEIRO et al., 2009) e desde então, diversos estudos epidemiológicos têm sido realizados, associando estes fenótipos a genótipos e clones específicos (principalmente ST11 e ST437) e sua capacidade de disseminação (PEREIRA et al., 2013).

Mais recentemente, foi descoberta uma nova carbapenêmicos, isolada em *K. pneumoniae*, de um paciente que esteve em Nova Delhi, Índia, chamada de NDM-1

que rapidamente se espalhou para outros países (FUURSTED et al., 2012). No Brasil, a primeira NDM-1 foi isolada no Rio de Janeiro, em 2013, porém em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

1.6. TIPIFICAÇÃO DAS CULTURAS DE VIGILÂNCIA

1.6.1. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR - ERIC-PCR

A ERIC-PCR utiliza sequências pequenas e repetitivas de DNA e conservadas, encontradas no genoma bacteriano (VERSALOVIC et al., 1991). Esta metodologia permite obter resultados rápidos quando comparadas a outras técnicas de tipificação como o PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*). Possui boa reprodutibilidade, fácil execução e implementação e baixo custo (SILBERT et al., 2004). Segundo Eckert e colaboradores (2004), essa técnica tem sido especialmente útil como método de tipificação de cepas de *Enterobacteriaceae* multirresistente e de rápida detecção de clones específicos de *E. coli* e posteriormente para diferenciação de várias espécies bacterianas. Pesquisadores chamam a atenção para questões técnicas pois a amplificação de fragmentos ERIC-PCR é extremamente influenciada pelas condições de reação, principalmente pela temperatura de ligação dos iniciadores, podendo muitas vezes levar à amplificação de sequências inespecíficas, não sendo necessariamente sequências ERIC (GILLINGS; HOLLEY, 1997).

Uma outra metodologia designada *multilocus sequencing typing* (MLST) desenvolvido por Maiden e colaboradores (1998), é um método de tipificação baseado no sequenciamento do DNA genômico, que permite a detecção de variações em genes constitutivos chamados “housekeeping genes” utilizados preliminarmente para a identificação de grupos (“clusters”) de isolados com genótipos idênticos ou altamente relacionados, chamados de clones ou complexos clonais. Os dados gerados são acessíveis pela internet, através de bancos de dados virtuais para comparação dos perfis genéticos permitindo o monitoramento da circulação de clones epidêmicos em todo o mundo..

1.7. ANTIMICROBIANOS

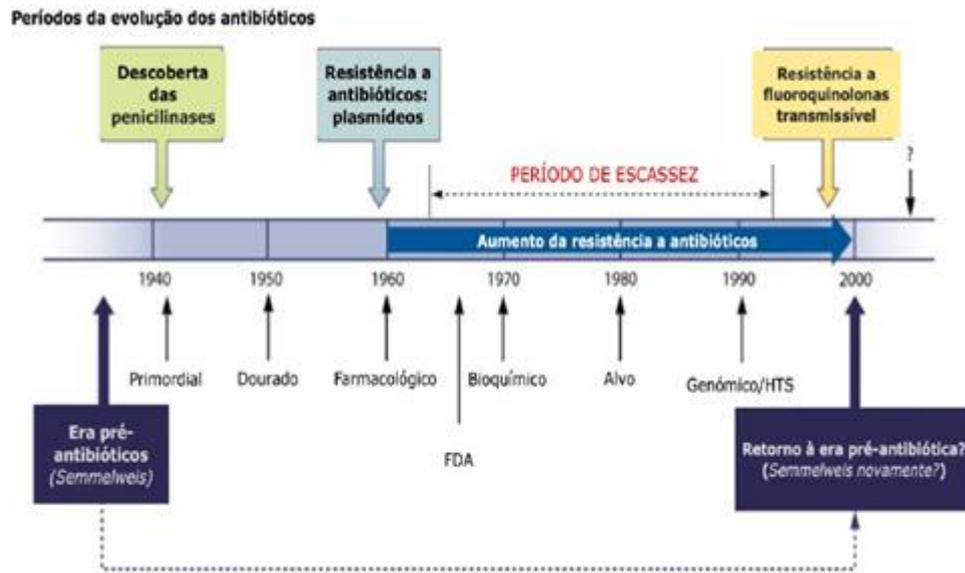
Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos

(glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas, etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES et al., 2010).

Geralmente estas drogas apresentam largo espectro de ação, ou seja, eles atuam em vários micro-organismos. As diferentes classes de antibióticos apresentam diferentes mecanismos de ação, atua na parede celular ou ribossomos, membrana citoplasmática, ácidos nucleicos e no metabolismo bacteriano De acordo com o mecanismo de ação, algumas destes fármacos não são seletivas é também atuam sobre as células humanas, causando efeitos adversos (RANG et al., 2012).

Vale ressaltar, que uso excessivo e generalizado de antibióticos na nossa sociedade (em medicina humana, veterinária e agricultura) faz com que bactérias sofram alterações ao longo dos tempos. Tal fato origina alguma resistência aos efeitos farmacológicos destas moléculas. Logo o uso adequado e inadequado, tanto profilático quanto empírico, doses subterapêuticas e duração prolongada, bem como a indicação para febre de origem desconhecida sem diagnóstico definido e infecções virais, são equívocos comuns que resultam em seleção bacteriana e aumento da resistência bacteriana ao longo dos tempos (CARNEIRO et al., 2011). Na figura 1 observamos o início da descoberta e o desenvolvimento da resistência das principais classes de antibióticos (DAVIES ; DAVIES, 2010).

Figura 1. História da Descoberta dos Antibióticos e Desenvolvimento da Resistência. Primordial: o advento da quimioterapia através das Sulfonamidas. Dourado: os anos dourados quando a maioria dos antibióticos utilizados atualmente foram descobertos. Farmacológico: Foram feitas tentativas para entender e melhorar o uso de antibióticos, vias de administração, dosagem, entre outros; Bioquímico: Ações bioquímicas dos antibióticos e mecanismos de resistência levou a estudos de modificação química para evitar resistência. Alvo: Modo de ação e estudos genéticos levaram a esforços para projetar novos compostos. Genômica / HTS (High - throughput assays): Metodologias de sequenciamento genômico. Fonte: DAVIES AND DAVIES (2010) – Adaptado por Sara Dias Costa (2013).

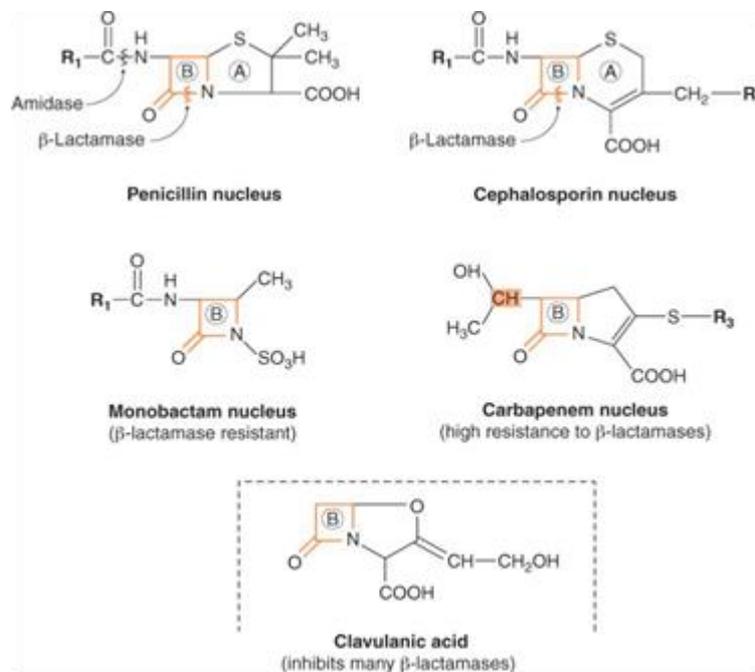


1.8. ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS

Os β -lactâmicos são, provavelmente, um dos grupos de antibacterianos mais utilizados na terapêutica em todo o mundo. O uso é extenso em infecções comunitárias ou hospitalares, devido ao seu amplo espectro de atividade e baixa toxicidade (MURRAY et al., 2014).

O anel β -lactâmico é a estrutura comum a todos os antimicrobianos dessa classe e esta estrutura que se ligará ao sítio ativo na célula bacteriana. Este anel está ligado a outro radical, geralmente outro anel, formando estruturas complexas de acordo com as quais os β -lactâmicos são classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (Figura 2). Pequenas alterações nas estruturas de cada grupo darão as características dos antimicrobianos, como espectro de atividade, afinidade por receptores e resistência as β -lactamases (KONG et al., 2010; NOGUEIRA, 2011).

Figura 2. Estrutura Básica dos antibióticos β -lactâmicos



Fonte: Rang; Dale and Ritter
(2012).

A penicilina foi o primeiro antibiótico a ser descoberto pelo escocês Alexander Fleming em 1928, o que representou uma vitória no tratamento de infecções bacterianas. A penicilina, após setenta anos de uso, ainda é uma alternativa para o tratamento de diversas infecções bacterianas e continua sendo hoje um dos melhores antibacterianos disponíveis se considerarmos sua alta atividade em bactérias sensíveis e sua baixa toxicidade para o ser humano. Era considerada a droga mais eficaz frente aos cocos e bacilos Gram-positivos, cocos Gram-negativos e espiroquetas, não apresentava atividade frente aos bacilos Gram-negativos. Entretanto, resistência crescente em *Staphylococcus* spp. e *Enterobacteriaceae*, por produção de β -lactamases capazes de degradar a penicilina, diminui a sua indicação clínica (LIVERMORE, 2012).

No intuito de contornar as resistências emergentes, várias modificações na estrutura dessa molécula foram adicionadas. Existem diferentes penicilinas com espectros de ação variáveis, como: penicilina G, penicilina V, oxacilina, ampicilina, amoxicilina, carbenicilina, entre outras (RANG et al., 2012).

As cefalosporinas foram descobertas por Giuseppe Brotzu, em 1948, quando estudava a microbiota presente em esgoto, na costa da Sardenha com o intuito de descobrir a ocorrência de β -lactâmicos naturais produzidas por fungos pertencentes ao antigo gênero *Cephalosporium*, hoje, *Acremonium*. Esse medicamento foi introduzido na prática clínica na década de 1960 e atualmente estão disponíveis mais de vinte compostos (GREENWOOD, 2000; SAGA ; YAMAGUCHI, 2009; PATERSON ; BONOMO, 2005). São classificadas de acordo com seu espectro de atividade em: cefalosporinas de primeira geração (cefalotina, cefazolina e cefalexina, segunda geração (cefuroxima, cefotetam e cefoxitina, terceira geração (cefepodoxima, cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima) e quarta geração (cefepime) (CLARCK et al., 2013).

A descoberta de cefalosporinas de terceira geração na prática clínica nos anos 80 foi uma grande vitória contra bactérias produtoras de β -lactamases, principalmente pela *K pneumoniae*. Além de serem efetivos contra esses micro-organismos esses novos antimicrobianos ainda apresentavam menores efeitos nefrotóxicos quando comparados aos aminoglicosídeos e polimixinas.

Os carbapenêmicos são antibióticos que também tiveram sua origem na natureza, produzidos por diferentes espécies de *Streptomyces*. Foram descobertas em 1976, mas somente em 1979 foram disponibilizadas para uso clínico, passando a ser sintetizadas em laboratório (SAGA; YAMAGUCHI, 2009). Possui ação contra bactérias gram-positivas, gram-negativas, e também contra anaeróbios. Essas drogas penetram com facilidade pelos canais porínicos nas bactérias gram-negativas e atuam por meio de sua ligação com proteínas fixadoras de penicilina (PBPs), presentes na parede bacteriana, causando a lise osmótica da bactéria (RANG et al., 2012). Os carbapenêmicos e os monobactâmicos foram desenvolvidos para agir contra Gram-negativos produtores de β -lactamases resistentes à penicilina.

O principal membro da classe dos monobactâmicos é o aztreonam. Possui atividade antimicrobiana contra as *Enterobacteriaceae*, mas também ativo contra outros bastonetes gram-negativos aeróbios, incluindo *P. aeruginosa* e inativos contra gram-positivos. Além disso, essa classe é resistente à hidrólise mediada por várias β -lactamases (CLARCK et al., 2013).

Os carbapenêmicos são considerados a terapia de escolha por sua estabilidade, espectro de ação e boa tolerância pelos pacientes, sendo os efeitos adversos mais comuns referentes às complicações no sítio de infusão e toxicidade gastrointestinal (MOHR,2008). Atualmente fazem parte deste grupo: imipenem, o meropenem, o ertapenem e o doripenem. Estas drogas têm atividade contra cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e bactérias anaeróbias, com exceção de *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus* metilina resistentes e *Stenotrophomonas maltophilia* (RANG *et al.*, 2012). São úteis no tratamento de septicemias hospitalares, peritonites pós-operatória, infecções urinárias e pneumonia associada ao uso de respiradores artificiais (MURRAY *et al.*, 2014).

Casos de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias nos anos 90, nas últimas duas décadas, como resultado da pressão seletiva, a resistência a estes antibióticos tem aumentado de maneira considerável por todo o mundo (GALES *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2011; ANVISA, 2013c). Devido à sua ubiquidade e frequente aquisição de elementos genéticos móveis, aliadas a utilização não criteriosa dos carbapenêmicos, temos hoje a disseminação de enterobactérias resistentes a estes antibióticos o que representa uma ameaça emergente (GRUNDMANN *et al.*, 2010; ANVISA, 2013d).

Os inibidores das β -lactamases, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, são usados associados a penicilinas hidrolisáveis e têm conseguido escapar à ação hidrolítica das β -lactamases plasmídicas clássicas. As associações utilizadas são: ácido clavulânico + amoxicilina, sulbactam + ampicilina, tazobactam + piperacilina e ácido clavulânico + ticarcilina. Esta capacidade de inibição é devido às semelhanças da sua estrutura química com as β -lactamases, que ao permitirem a sua ligação, protegem as penicilinas da ação das β -lactamases (à exceção das β -lactamases cromossômicas induzidas, produzidas por *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Serratia* spp.) (MOSQUITO *et al.*, 2011).

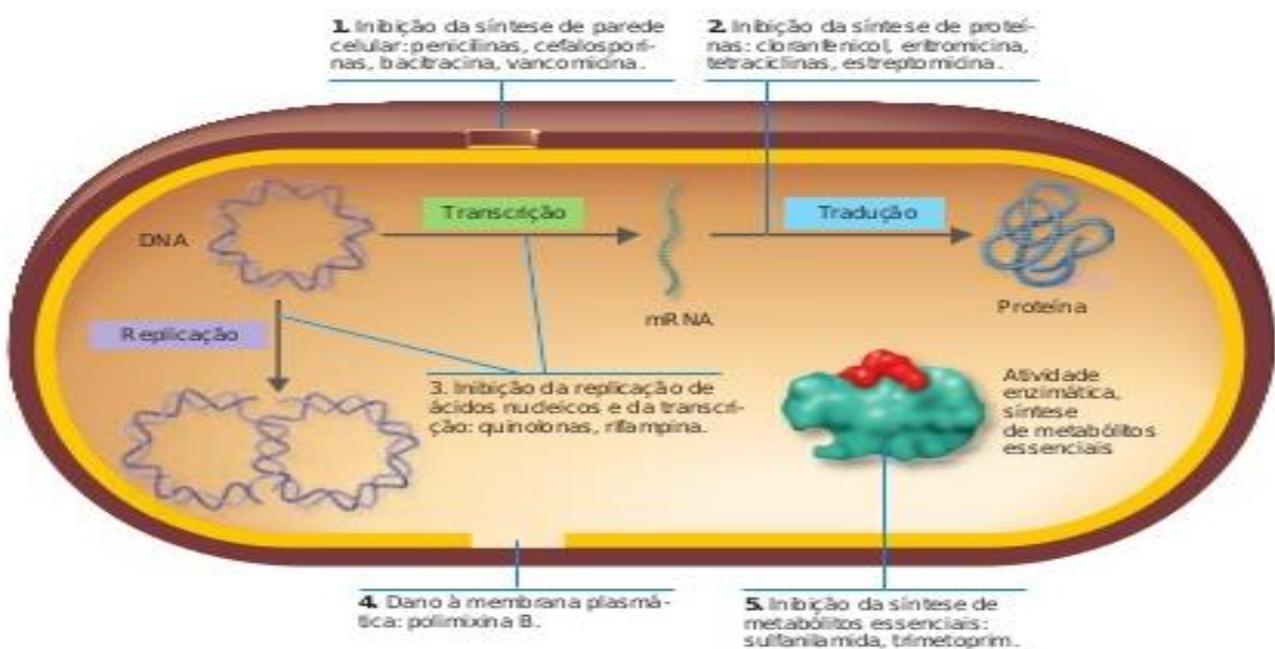
1.8.1.Mecanismo de ação dos antimicrobianos

Agentes antimicrobianos são fármacos ativos no tratamento de infecções em razão de sua toxicidade seletiva, podem ser bactericidas ou bacteriostáticos, sem afetar as células do hospedeiro. Em muitos casos, a toxicidade seletiva não é absoluta, exigindo que a concentração do antimicrobiano seja controlada cuidadosamente, de modo a afetar o micro-organismo em níveis toleráveis para o

hospedeiro. Além disso, os antimicrobianos devem ser capazes de atravessar a parede celular bacteriana de modo a encontrar seu alvo na célula. Devem ser compatíveis com o estado clínico do paciente, ser o mais econômico e menos tóxico possível, não ser alergênico, ter boa distribuição entre os fluidos do organismo e ter meia vida longa (NOGUEIRA ; MIGUEL, 2009; VERMELHO et al., 2008).

A grande maioria das drogas antimicrobianas pode ser classificada com base em seu mecanismo de ação (Figura 3).

Figura 1. Modo de Ação dos Antimicrobianos



Fonte: TORTORA (2013).

1.8.1.1. Inibidores da Síntese de Proteínas

Os aminoglicosídeos, tetraciclinas e glicilciclinas inibem o início da síntese proteica e se ligam na subunidade 30S do ribossomo. Cloranfenicol e os macrolídeos ligam-se ao 50S bloqueando a reação peptidil transferase. A estrutura do ribossomo bacteriano é diferente do ribossomo eucariótico, assim inibem o crescimento bacteriano sem interferir nas células eucarióticas (SHAIKN et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

1.8.1.2. Inibidores da Síntese de Ácidos Nucleicos

Quinolonas e a rifampicina são antibióticos que agem inibindo a síntese de ácidos nucleicos. Esses efeitos são mediados pela habilidade desses compostos em estabilizar e inibir as enzimas bacterianas topoisomerases do tipo II (DNA girase) e topoisomerase tipo IV, importantes no processo de replicação e transcrição do DNA (SHAIKN et al., 2014; TORTORA et al., 2012).

1.8.1.3. Inibidores da Síntese de Metabólitos Essenciais

Sulfonamidas (ex. sulfametoxazol) e Trimetoprim inibem a via de síntese do ácido para-aminobenzóico (PABA) imprescindível à síntese de ácido fólico nas bactérias (o ácido fólico é necessário para a síntese de precursores de DNA e RNA) (SHAIKN et al., 2014).

1.8.1.4. Inibidores da Função Celular

O principal local de ação é a membrana citoplasmática de bactérias Gram-positivas, ou a membrana interna de bactérias Gram-negativas. As moléculas de polimixinas (Polimixina E e a Polimixina B) consistem em uma estrutura química de ciclopeptídeo associado a uma cauda hidrofóbica longa, que ao interagir especificamente com os fosfolípidios, aumenta a permeabilidade da membrana, causando perda de material citoplasmático (SHAIKN et al., 2014).

1.8.1.5. Inibidores da Síntese da Parede Celular

Os antibióticos β -lactâmicos agem interferindo na síntese do peptideoglicano da parede celular bacteriana, pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas – penicillin binding protein (PBPs). Estes antibióticos atuam bloqueando a transpeptidação, ligação covalente das cadeias lineares de fragmentos precursores

do peptidoglicano, composto mais importante da parede celular bacteriana, catalisada pelas transpeptidases (também chamadas PBPs) (LARA et al., 2012; MURRAY et al., 2014).

1.9. RESISTÊNCIA BACTERIANA AOS ANTIBIÓTICOS

Desde 1940, o desenvolvimento de fármacos efetivos e seguros para os casos de infecções bacterianas e outras revolucionou o tratamento médico, e a morbidade e a mortalidade associadas a estas doenças foram drasticamente reduzidas. O desenvolvimento de fármacos antibacterianos efetivos vem sendo acompanhados pela emergência de organismos resistentes aos fármacos (RANG et al., 2012). A resistência a agentes antimicrobianos não é um fenômeno recente. A detecção das β -lactamases, tanto em bactérias Gram-positivas quanto em Gram-negativas, remonta-se ao início dos anos 40, antes mesmo da liberação do uso da penicilina para a prática médica (ABRAAM ; CHAIN, 1940; KIRBY, 1944).

Entende-se por resistência bacteriana a capacidade de um micro-organismo de se multiplicar e crescer *in vitro* na presença de determinado antibiótico com concentrações mais altas do que a maior concentração alcançada pelo fármaco no sítio da infecção. Este mecanismo se dá pela lei da sobrevivência do mais apto, onde a bactéria cria mecanismos de resistência para se adaptar a diversos meios de pressão Seletiva (QUEIROZ et al., 2012).

Os mecanismos de resistência podem ser divididos em intrínsecos ou adquiridos. Uma bactéria pode ser intrinsecamente resistente a certos antimicrobianos ou pode se tornar resistente a determinados antimicrobianos através de mutações espontâneas ou aquisição de genes a partir de outros micro-organismos (BLAIR et al., 2015). Na resistência adquirida, micro-organismos primariamente suscetíveis tornam-se resistentes pela incorporação de materiais genéticos por meio de plasmídeos (moléculas circulares de DNA dupla fita capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico), *transposons* (sequências de DNA capazes de se movimentar de uma região para a outra no genoma de uma célula) e integrons (elementos genéticos que podem capturar e expressar genes de outras fontes) ou através das mutações espontâneas (FERNANDEZ et al., 2011; FERNANDEZ ; HANCOCK, 2012). A partir de mutações espontâneas, a bactéria pode passar a expressar sistemas de efluxo, modificar seu sítio-alvo, produzir uma via metabólica alternativa para driblar a ação da droga ou diminuir a expressão de genes que sinalizam a produção de

porinas, para evitar que a droga penetre na célula e alcance seu alvo intracelular (ex.: *ompF* produzida pela *E. coli*).

A partir da aquisição de genes de resistência, a bactéria pode produzir enzimas (ex: β -lactamases) capazes de inativar o antimicrobiano. Os mecanismos de trocas genéticas incluem a conjugação, transdução e transformação. Em cada um desses processos, os transposons podem participar facilitando a incorporação dos genes de resistência no genoma do hospedeiro ou em plasmídios. Através destes mecanismos de trocas genéticas, muitas bactérias tornaram-se resistentes a múltiplas classes de antimicrobianos e essas amostras multirresistentes são causa de grande preocupação, particularmente em hospitais e outras instituições de saúde, onde ocorrem com maior frequência (TENOVER, 2006).

Uma vez adquiridos, os genes de resistência não são perdidos facilmente. Na verdade, eles tornam-se uma parte relativamente estável do genoma bacteriano. Além disso, outros determinantes de resistência também podem ser passados junto com o gene de resistência, ampliando ainda mais o fenótipo multirresistente e diminuindo as opções terapêuticas (DZIDIC et al., 2008). As bactérias podem desenvolver resistência aos antibacterianos por meio de alguns mecanismos já bem difundidos na literatura. Esses mecanismos incluem:

1.9.1. Alteração do sítio alvo (PBPs - Penicillin Binding Proteins)

O sítio alvo dos β -lactâmicos são as PBPs. Alterações nessas proteínas podem causar a diminuição da afinidade dos beta-lactâmicos ao seu sítio-alvo, fazendo assim, com que aumente a resistência da bactéria a esse antimicrobiano. Devido ao uso extenso da penicilina desde a sua descoberta, algumas espécies bacterianas, como *Staphylococcus* spp., *Neisseria* spp. e *Streptococcus* spp. desenvolveram resistência a partir da síntese de PBPs mutantes (DRAWZ ; BONOMO, 2010).

1.9.2. Bomba de efluxo

O aumento da expressão de bombas de efluxo pode ser tanto um mecanismo intrínseco como adquirido. Desse modo, quando esse fenômeno ocorre, o antimicrobiano pode ser bombeado diretamente para fora da célula bacteriana antes que atinja seu alvo intracelular, ocasionando resistência aos beta-lactâmicos como em muitas bactérias Gram-negativas, particularmente em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter*

spp. Em isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* as proteínas AcrAB-Tolc, AcrEF-Tolc e EmrB têm sido apontadas com as de maior relevância, causando resistência à quinolonas, cloranfenicol e tetraciclina (DRAWZ ; BONOMO, 2010; SOTO, 2013).

1.9.3. Diminuição da expressão de porinas (OMPs)

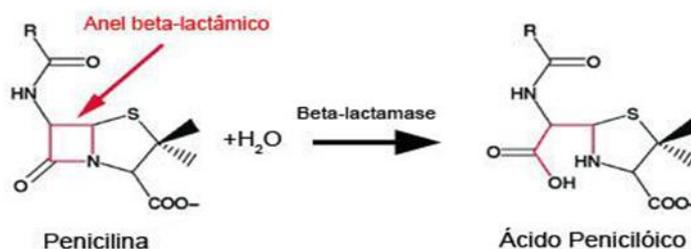
Para atingirem seu alvo intracelular, os antimicrobianos necessitam atravessar a parede celular através das porinas localizadas na membrana externa da parede celular das bactérias Gram-negativas. Devido à diminuição da expressão das porinas ou produção de porinas mutantes o antimicrobiano simplesmente não consegue penetrar na célula bacteriana e atingir seu alvo, ocasionando resistência aos antimicrobianos dessa classe. Algumas espécies de *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter* spp., *K. pneumoniae* e *E. coli*) podem apresentar resistência aos carbapenêmicos devido à perda dessas porinas. Em Gram-negativos não-fermentadores de glicose, como *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, a resistência aos carbapenêmicos geralmente está associada a perda das porinas CarO e OprD, respectivamente (DRAWZ ; BONOMO, 2010).

1.10. β -LACTAMASES

O complexo mecanismo de resistência em relação aos antimicrobianos β -lactâmicos envolve vários fatores como a permeabilidade da membrana externa e a quantidade e tipo de β -lactamases produzidas pelas bactérias, bem como a penetração do antimicrobiano no sítio de infecção e a estabilidade da droga diante das variedades enzimáticas (PELEG ; HOOPER, 2010).

A hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos pela ação de β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes. Isso porque essa classe de antibióticos é, geralmente, o tratamento de escolha para doenças infecciosas causadas por esses micro-organismos e a expressão dessas enzimas é um impedimento crítico na seleção da terapia medicamentosa. As penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos são as principais opções terapêuticas para muitas doenças infecciosas. A presença e característica dessas enzimas representam papel crítico para a seleção de apropriada terapia (Figura 4) (BUSH ; JACOBY, 2010).

Figura 2. Mecanismo de ação das β -lactamases.



Fonte: <http://www.wiley.com>

O uso de antimicrobianos β -lactâmicos vem aumentando a pressão seletiva nas bactérias, promovendo a sobrevivência de micro-organismos com múltiplas β -lactamases. Atualmente, mais de 850 β -lactamases já foram identificadas, o que é um problema mundial (DRAWZ ; BONOMO, 2010).

Até o momento, as β -lactamases de interesse clínico e que apresentam espectro de ação distinto sobre os fármacos β -lactâmicos são quatro: β -lactamase de espectro estendido (ESBL), *K. pneumoniae* carbapenemase (KPC), metalo- β -lactamase (MBL) e β -lactamase classe C (AmpC).

A diversidade de enzimas β -lactamases, no que diz respeito à sua estrutura e perfil de substrato, criou vários esquemas de classificação propostos para categorizá-las desde os anos 1960.

Estas classificações envolvem três abordagens principais: A primeira classificação fenotípica, amplamente aceita, foi proposta por Richmond & Sykes (1973) que dividiram as β -lactamases em grupos de acordo com o perfil do substrato enzimático. A segunda classificação foi realizada por Ambler (1980) baseada na sequência de aminoácidos, agrupando as beta-lactamases em quatro classes (A, B, C e D). As classes A, C, D são serina β -lactamases e possuem um aminoácido serina no sítio ativo da enzima, enquanto a classe B ou metalo- β -lactamases utiliza zinco para sua ação na quebra da ligação amida no anel β -lactâmicos. A classificação mais recente e atualmente mais utilizada foi proposto por BUSH, JACOBY e MEDEIROS em 1995 e posteriormente revisado e atualizado por BUSH e JACOBY (2010). Esse esquema baseia-se em características bioquímicas e funcionais da enzima que incluem o perfil de substratos e seus inibidores (Tabela 1) (HEESEMAN, 1993; DROPA, 2013).

Tabela 1. Classificação Funcional das β -lactamases Fonte: BUSH AND FISHER,

Grupo Funcional (Bush-Jacoby)	Classe Molecular (Ambler)	Exemplos	Características
1	C	AmpC de <i>P.aeruginosa</i> e <i>E.coli</i> ; CMY-2, FOX-1, MIR-1.	Enzimas cromossômicas e plasmidiais produzidas por bactérias Gram-negativas. Confere resistência a todos os β -lactâmicos, exceto os carbapenemas. Não são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
1e	C	GC1, CMY-37.	Enzimas que promovem a hidrólise de penicilinas, cefamicinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2 ^a	A	PC1 e outras penicilinas de <i>Staphylococcus</i> sp.	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. Conferem altos níveis de resistência à penicilina. Inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2b	A	SHV-1, TEM-1, TEM-2, TEM-90.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2be	A	ESBLs: CTX-M-15, CTXM- 44, PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26.	Conferem resistência às penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos.
2br	A	TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26.	Enzimas que possuem hidrólise eficiente de penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, entretanto não são bem inibidas por ácido clavulânico.
2ber	A	TEM-50, TEM-68, TEM-89.	Promovem a hidrólise de penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
2c	A	PSE-1, CARB-3.	Enzimas que hidrolisam penicilinas e carbenicilina, inibidas por ácido clavulânico.
2d	D	OXA-1, OXA-10.	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina, levemente inibidas por ácido clavulânico.
2de	D	OXA-11, OXA-15.	Hidrólise de penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2df	D	OXA-23, OXA-48.	Hidrolisam carbapenemas e cloxacilina, pouco inibidas por ácido clavulânico.
2e	A	CepA.	Cefalosporinas inibidas por ácido clavulânico e tazobactam, mas não por aztreonam.
2f	A	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2.	Enzimas que hidrolisam carbapenemas e possuem uma serina no seu sítio ativo. Tais enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3a	B	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1.	Hidrólise de todos os beta-lactâmicos exceto monobactâmicos. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.
3b	B	CphA, Sfh-1.	Hidrólise preferencial de carbapenemas. Inibidas por EDTA e quelantes de metais, não inibidas por ácido clavulânico e tazobactam.

A classificação quanto a localização do gene codificador de β -lactamases (plasmidial ou cromossômico) não é mais utilizada com frequência, pois os genes *bla* podem ser integrados em plasmídeos ou transposons, como também o inverso está cada vez mais sendo descritos (TOLEMAN et al., 2006 ; COELHO et al., 2010 ; CANTON et al., 2012). Os três tipos ou grupos de β -lactamases considerados de maior importância clínica são: cromossômicas induzíveis (AMPc), β -lactamases plasmidiais de espectro estendido (ESBL) e β -lactamases capazes de degradar os carbapenêmicos (tipo KPC, OXA – carbapenêmicos e metallo- β -lactamases).

1.11. Nomenclatura das β -lactamases

Inicialmente as β -lactamases foram designadas pelo nome da cepa de origem ou plasmídeo. Em 1975, a aplicação da técnica de focalização isoelétrica, um grande número de enzimas foi descoberto, surgindo assim, uma diversidade de formas de nomeá-las (Tabela 2) (JACOBY, 2006). Existem β -lactamases denominadas segundo a preferência de substrato, as propriedades químicas, peculiaridades na sequência, localidade ou nome do hospital, localização do gene no cromossomo, cepa ou nome do paciente e incluindo o nome do investigador (HMS) (BUSH ; JACOBY, 1997; <http://www.lahey.org/studies>).

Tabela 1. Nomenclatura das principais β -lactamases. Fonte: JACOBY, 2006.

β - lactamase	Derivação
ADC	Acinetobacter derived cephalosporinase
BES	Brasil extended spectrum
<i>BlaB</i>	β -Lactamase class B
<i>BlaF</i>	β -Lactamase from <i>Mycobacterium fortuitum</i>
CARB	Ativa em carbenicillin
CAZ	Ativo em <i>ceftazidime</i>
CAZ-lo	Ativo em <i>ceftazidime</i> com baixa atividade
CAZ-hi	Ativo em <i>ceftazidime</i> com alta atividade
CEP	Ativo em cefalosporinas
CTX	Ativo em Cefotaxima
CTX-M	Ativo em cefotaxima, Primeira vez isolado em munique
ESP	β -lactamase espectro estendido
FOX	Ativo e cefoxitin
GES	Guiana-extended spectrum
GIM	German imipenemase
IMP	Active on imipenem
KPC	<i>K. pneumoniae</i> carbapenemase
Mbl	Metallo- β -lactamase
OXA	Ativo em Oxacilina
OHIO	Descoberto no Estado de Ohio

PER	Pseudomonas extended resistant and also the initials of its discoverers: Patrice, Esthel, and Roger
POX	<i>Pseudomonas oxacillinase</i>
SPM	Sao Paulo metallo- β -lactamase
SHV	Sulfhydryl reagent variable
TEM	Named after the patient (Temoneira) providing the first sample; in the early literature also termed RTEM or to emphasize its R plasmid origin
Toho	From Toho University School of Medicine
VEB	Vietnam extended-spectrum β -lactamase
VIM	Verona integron-encoded metallo β -lactamase

1.11.1. β -lactamases de espectro ampliado (ESBL)

A evolução destas β -lactamases tem sido tão grande que foi criada uma base de dados sobre β -lactamases, organizada por Karen Bush e George Jacoby, cujo objetivo é tentar monitorizar e documentar todos os desenvolvimentos sobre os tipos mais comuns de β -lactamases com relevância clínica, e inserir as novas descobertas. Para caracterizar uma nova ESBL é necessário descobrir novas modificações, como mudanças na região promotora, e/ou substituições nucleotídicas, que funcionalmente devem ser “silenciosas” (OVERDEST et al., 2011).

As β -lactamases do tipo ESBL pertencem ao grupo 2be e classe molecular A na classificação proposta por BUSH, JACOBY e MEDEIROS em 1995. São resultados de mutações que alteram a sequência de aminoácidos das primeiras β -lactamases (TEM e SHV) (BUSH AND JACOBY, 2010). São capazes de hidrolisar β -lactâmicos de amplo espectro como cefalosporinas de terceira (ceftazidima, ceftriaxona e cefotaxima) e quarta geração (cefepime), monobactâmicos (aztreonam), mas não cefamicinas (cefoxitina e cefotetan) e carbapenêmicos (ertapenem, imipenem e meropenem). São bloqueadas por inibidores de β -lactamases como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (GARCIA, GÁNDARA ;GARCIA, 2010).

As espécies bacterianas produtoras de ESBL mais comuns são *E coli* e *K. pneumoniae*, embora a detecção destas enzimas já se tenha observado em outras espécies de *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonaceae* (LIVERMORE, 2012).

A primeira ESBL descrita foi a SHV-2, encontrada em uma amostra de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha em 1983. Ela possuía capacidade de hidrolisar cefotaxima e, em menor grau, ceftazidima. Após o sequenciamento desse gene, foi visto que essa β -lactamase diferia da SHV-1 através da modificação de uma glicina por uma serina na posição 238. Essa mutação sozinha aumentou o espectro de hidrólise dessa enzima (PATERSON; BONOMO, 2005).

Grande parte dos derivados das enzimas tipo SHV possuem fenótipo ESBL e são encontrados em *Klebsiella pneumoniae*, sendo encontrados, também, em *Citrobacter diversus*, *Escherichia coli* e *P. aeruginosa* (BRADFORD, 2001; PATERSON ;BONOMO, 2005).

A presença da enzima TEM-1 foi relatada em 1965 em *E. coli*, proveniente de uma paciente da Grécia, cujo nome era Temoniera. A primeira ESBL do tipo TEM descrita foi isolada em Liverpool, Inglaterra, em 1982 em uma amostra de *Klebsiella oxytoca* em uma unidade neonatal. Após o uso de ceftazidima em larga escala para o tratamento das infecções durante o surto, apareceram isolados de *K. oxytoca* produtora de uma nova β -lactamase tipo TEM, exemplificando a emergência de ESBL como decorrência da pressão seletiva das cefalosporinas de terceira geração (PATERSON ; BONOMO, 2005; ZEBA, 2005).

As ESBL do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 não tem ação frente as cefalosporinas de amplo espectro e é inibida por ácido clavulânico. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico, entretanto difere de TEM-1, pois tem um promotor mais ativo e difere no ponto isoelétrico. A TEM-2, derivada da TEM-1, porém apresenta apenas uma única substituição de aminoácidos em relação à β -lactamase original, o que causou mudanças no ponto isoelétrico, mas não modificou o perfil de substrato. A TEM-13 tem um perfil hidrolítico semelhante a TEM-1 e TEM-2, e também não faz parte das ESBL (BUSH et al.,1995).

Em 1989, foi descoberta na Alemanha a CTX-M1 em um isolado clínico de *Escherichia coli*. Trata-se de um grupo de enzimas muito heterogêneo que compartilha menos de 40% de identidade com os tipos TEM e SHV, os quais tenham provavelmente evoluído de beta-lactamases cromossômicas de diferentes espécies ambientais de *Kluyvera* da família *Enterobacteriaceae* (BONNET, 2004).

Os organismos que produzem β -lactamases CTX-M tornaram-se o tipo mais prevalente de produtores de ESBL, especialmente em países da Europa e América do Sul. As β -lactamases CTX-M são reconhecidas como uma importante causa de resistência bacteriana a cefotaxima, em *Enterobacteriaceae*. São consideradas como uma nova família de ESBL, mediada por plasmídios, que preferencialmente, hidrolisam cefotaxima (BRADFORD, 2001; PATERSON ; BONOMO, 2005).

Estas enzimas podem ser divididas em cinco grupos com base na semelhança de aminoácidos: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M8, CTX-M9 e CTX-M25 (PITOUT AND LAUPLAND, 2008; KANAMORI *et al.*, 2011). Estas β -lactamases não se limitam apenas às infecções nosocomiais provocadas por *Klebsiella* spp., e o seu potencial de disseminação ultrapassa o ambiente hospitalar, o que conduz a uma enorme preocupação de saúde pública (BRADFORD, 2001; DZIERZANOWSKA *et al.*, 2010).

O gene *bla*_{CTX-M} tem sido observado em diferentes isolados de BGN, principalmente, nas enterobactérias, tais como, *Escherichia coli*, *Shigella sonnei*, *Proteus mirabilis*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* e *Enterobacter aerogenes*. A forma de disseminação mais prevalente desse gene entre mesmas espécies ou entre espécies diferentes é a horizontal, via plasmídeo (ROSSOLIN *et al.*, 2008).

Existem 158 variantes alélicas de CTX-M e a mais disseminada no mundo é a CTX-M15 (CANTON AND COQUE, 2008; JACOBY, 2015). Em 2008, amostras de *E. coli* pertencentes ao clone ST131, determinado pela técnica de *Multilocus sequence typing* - MLST, produtoras de CTX-M15 foram identificadas simultaneamente em nove países diferentes, englobando três continentes. Portanto, acredita-se que a disseminação intercontinental desse clone tenha contribuído muito para a disseminação da CTX-M15 em nível mundial (PEIRANO *et al.*, 2014).

1.11.2. Carbapenemases

Nos últimos anos tem havido um grande alarme e preocupação pela grande dispersão dos bacilos Gram-negativos resistentes aos carbapenêmicos pela produção das β -lactamases capazes de hidrolisar este grupo de antimicrobianos o qual se tem associado a elementos genéticos transferíveis (MIRIAGOU *et al.*, 2010; WALSH, 2010).

No grupo das OXA (Classe D de Ambler e 2df de Bush e Jacoby) também se encontra variantes que hidrolisam os carbapenêmicos. Entre elas destacam-se as variantes dos subgrupos OXA-23, OXA-24, OXA-58, OXA-143 e, menos relevante, a OXA-51 descritas em *Acinetobacter* spp. e a OXA-48 sendo a mais frequente em enterobactérias (QUEENAN ; BUSH, 2007).

As carbapenemases da classe D são as chamadas oxacilinases (OXAs) caracterizadas como penicilinases capazes de hidrolisar oxacilina e cloxacilina e fracamente inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam e EDTA. A OXA-48 possui uma notável atividade hidrolítica contra os carbapenem. A primeira descrição foi em 2004 na Turquia e posteriormente começou a se espalhar pela Europa e Oriente Médio (PFEIFER et al., 2011). Tem sido encontrada, na maioria das vezes, em *P. aeruginosa*. A maioria das OXA-ESBL conferem resistência a ceftazidima. A enzima OXA-17 confere resistência a cefotaxima e ceftriaxona, e não são inibidas pelo ácido clavulânico, com exceção da enzima OXA-18 (BRADFORD, 2001).

1.11.3. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC)

O primeiro relato sobre carbapenemase do tipo KPC foi descrita através de um projeto de vigilância (ICARE- “Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology”), em uma amostra de *K. pneumoniae* proveniente da Carolina do Norte em 1996 para monitoramento da resistência a antibióticos em UTIs (YIGIT et al., 2001).

KPC é uma β -lactamase pertencente à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush (BUSH AND JACOBY, 2010). Essa enzima confere resistência a todos os β -lactâmicos e aos carbapenêmicos. Essa última classe de antimicrobianos é de amplo espectro, com uso frequente no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Desse modo, para o tratamento de micro-organismos produtores de KPC, restam escassas opções terapêuticas. Essa característica, juntamente do fato da KPC ter alto potencial de disseminação, devido à sua localização plasmidial, a qual facilita a transferência do gene interespecies, tem sido motivo de preocupação em hospitais e instituições de saúde em todo o mundo. (CAI et al., 2012).

As carbapenemases ocorrem mais frequentemente em enterobactérias, sendo predominantes nos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Salmonella*, *Proteus* e *Morganella* (NORDMANN et al., 2012). As carbapenemases mais prevalentes em enterobactérias são codificadas por genes dos

grupos *bla*_{KPC}, *bla*_{IMP}, *bla*_{VIM}, *bla*_{NDM} e *bla*_{OXA} (LASCOLS et al., 2012) entre as quais, a produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) tem se tornado um mecanismo emergente.

Atualmente já foram descritas 19 variantes (KPC2 a KPC20) (BUSH AND JACOB, 2014; LAHEY, 2015). Em 2005 foi isolada pela primeira vez uma cepa produtora de KPC fora dos EUA. Um paciente, atendido na França, relatou que recebera tratamento cirúrgico em dezembro de 2004 em um hospital de Nova York (EUA). Com base neste trabalho, foi demonstrado que possivelmente a presença da bactéria produtora de KPC na França tenha sido resultado da transferência intercontinental de um clone a partir dos EUA (NAAS et al., 2008).

Del Peloso e colaboradores, em 2010 descreveram um caso de sepse por *S. marcescens* produtora de KPC e Andrade e colaboradores, mostraram a presença de KPC em *C. freundii*, *S. marcescens* e *E. cloacae* em amostras isoladas no Rio de Janeiro e em São Paulo. Mais recentemente foi relatada a presença de KPC em uma amostra de *K. oxytoca* isolada em Recife (ALMEIDA et al., 2013). Esta enzima também já foi descrita em *P. aeruginosa* e *Pseudomonas putida* (ALMEIDA et al., 2012; JACOME et al., 2012).

Em 2010, foram relatados com grande repercussão na mídia, surtos de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2 em vários estados brasileiros como: Alagoas, Amazonas, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Santa Catarina, Mato Grosso do Sul, Paraíba e Recife, causando grande apreensão na comunidade médica e científica.

Assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) divulgou, através de uma nota técnica, medidas para o controle da disseminação de bactérias multirresistentes incluindo enterobactérias produtoras de KPC, importantes no contexto hospitalar mundial (ANVISA, 2014). Sua pesquisa é relevante a fim de limitar sua disseminação, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas, em que é imprescindível a vigilância microbiológica, juntamente com ação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) (DIENSTMANNI et al., 2010).

1.11.4. AmpC β -Lactamases

Além das β -lactamases referidas acima, pode-se citar a AmpC, que é capaz de hidrolisar penicilinas, monobactâmicos e cefalosporinas até terceira geração.

O gene que codifica a AmpC pode sofrer uma desrepressão quando a bactéria é submetida a tratamento com antimicrobianos β -lactâmicos (principalmente a cefoxitina), resultando em resistência aos mesmos (COOKSEY, 1997; JACOBY, 2009). São encontradas naturalmente em *Enterobacteriaceae* do grupo CESP (Citrobacter, Enterobacter, Serratia e Providencia). Nas bactérias deste grupo, ocorre a produção constitutiva das β -lactamases cromossômicas do tipo AmpC que conferem diminuição de sensibilidade ou resistência a penicilinas associadas com inibidores de β -lactamases, cefalosporinas de 1ª geração e cefamicinas. A expressão desta enzima combinada com uma mudança na permeabilidade na membrana por conta de alterações nas porinas pode resultar em resistência aos carbapenêmicos. Esse mecanismo foi descrito em bactérias dos gêneros: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Providencia*, *Citrobacter*, *Escherichia*, *Shigella*, *Yersinia* e das espécies: *Buttiauxella agrestis*, *Edwardsiella tarda*, *Erwinia rhapontici*, *Hafnia alvei*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* e *Serratia marcescens* (JACOBY, 2009).

1.12. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

A emergência e disseminação de enzimas β -lactamases, especialmente as ESBL nas Bactérias Gram Negativas têm sido descritas mundialmente como emergência clínica devido à grande frequência desses isolados em infecções relacionadas com a assistência em saúde, principalmente no tecido sanguíneo em pacientes hospitalizados. As frequências entre os genes responsáveis pela produção de ESBL e carbapenêmicos variam entre si e entre as espécies bacterianas. Essas variações fazem com que cada região tenha características próprias, com algumas espécies bacterianas prevalecendo juntamente com um determinante genético (BAYRAN ; BALCI, 2006).

Para isso, uma das rotinas incluídas na prática hospitalar é a busca de pacientes colonizados e/ou infectados através da coleta de materiais clínicos, como por exemplo *swabs* nasais, orais e retais de pacientes das diversas unidades de internação (UTI e enfermarias), na sua admissão e durante o tratamento, denominadas de culturas de vigilância, e assim evitar a disseminação destes agentes. Quando houver suspeita de colonização e/ou infecção por multirresistente (principalmente as produtoras de

carbapenemases) deve ser comunicada ao setor de Comissão/Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH/SCIH) do estabelecimento de saúde onde devem ser instituídas de imediato medidas de precaução de contato (ANVISA, 2013d).

Diante da importância do tema, este estudo foi desenvolvido em Unidade Hospitalar Federal do Município do Rio de Janeiro, no Setor de Microbiologia Clínica), em colaboração com CCHI e em parceria com INCQS/FIOCRUZ. Os resultados alcançados irão colaborar com a identificação de possíveis fontes de contaminação e poderão contribuir para a realização de comparações futuras em distintos âmbitos hospitalares e em diferentes localidades geográficas. Por outro lado, as informações servirão de base aos profissionais de saúde, para que suas práticas possam ser reavaliadas e se for necessário, novos procedimentos possam ser adotados para a antibioticoterapia e condutas de enfermagem e médicas.

2. OBJETIVOS

GERAL

Avaliação da resistência aos antibióticos, a variabilidade genética e as relações clonais de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de ESBL de cultura de vigilância de uma unidade de terapia Intensiva no município do Rio de Janeiro.

ESPECÍFICOS

- Isolar cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli* possíveis produtoras de ESBL a partir de swabs retais provenientes de pacientes internados em UTI de unidade Hospitalar Federal do Rio de Janeiro do período de março de 2013 a março de 2014.
- Identificar e determinar a susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados pelo sistema automatizado VITEK II;
- Confirmar a identidade dos isolados pela amplificação de genes espécie específicos através da PCR;
- Pesquisar os genes de resistência *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{CTX-M15} e *bla*_{OXA-1}, *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} pela PCR
- Estabelecer as relações clonais dos isolados por meio da técnica ERIC-PCR.

3. METODOLOGIA

3.1. ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Oswaldo Cruz (CEP/FIOCRUZ), sendo aprovado sob o número 346.653 (Apêndice 1).

3.2. COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram coletadas, pela equipe técnica do hospital, amostras de material retal com *swabs* estéreis de 123 pacientes, adultos e pediátricos, internados na UTI de um Hospital Federal no Rio de Janeiro, durante o período de março/2013 a março/2014. Os *swabs* de vigilância foram semeados diretamente em meio CHROMagar ESBL (PLAST LABOR), destinado à detecção de bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL; as placas foram incubadas a 36 ± 1 °C por 24 a 48 h. Os isolados obtidos foram repicados para meio ágar MacConkey (PLAST LABOR).

3.3. IDENTIFICAÇÃO PRÉVIA E TESTE DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIBIÓTICOS

A identificação e o antibiograma foram realizados pelo sistema automatizado VITEK II® (BioMérieux). Foram utilizados os cartões GN Test Kit do VITEK II para identificação de Gram-negativos e para o antibiograma os cartões AST 239 e AST-105 conforme instruções do fabricante. As suspensões bacterianas foram preparadas a partir de colônias puras e a turbidez foi ajustada em um turbidímetro (DensiCheck™, BioMérieux) com solução de cloreto de sódio a 0,45%, à turbidez equivalente a 0,50 a 0,63 da escala Mc Farland. Os cartões foram preenchidos e selados por meio de um sistema a vácuo.

Os testes de identificação primária e antibiograma foram realizados no laboratório de microbiologia do mesmo Hospital que forneceu as cepas bacterianas. Em seguida, as culturas foram encaminhadas ao Laboratório de Micro-organismo de Referência no INCQS para a confirmação da identidade, pesquisa de genes de resistência e caracterização clonal.

3.4. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO NO INCQS

3.4.1 Provas bioquímicas

As colônias isoladas do ágar MacConkey foram coradas pelo método de Gram e às provas bioquímicas convencionais: determinação da mobilidade e produção de indol e H₂S em meio SIM; utilização de citrato como fonte única de carbono em meio citrato de Simmons; hidrólise de ureia, utilização de glicose através dos testes de vermelho de metila e Voges-Proskauer (VM/VP). Procedimento Operacional Padronizado INCQS nº 65.3210.008 (INCQS, 2013).

3.5. EXTRAÇÃO DNA GENÔMICO

Após a certificação da pureza dos isolados em meio de cultura sólido, uma alça bacteriológica do crescimento foi submetida à extração do DNA genômico conforme as instruções do manual *Dnaesy Blood & Tissue Handbook* (QIAGEN®). Para verificar a integridade do DNA extraído, o mesmo foi visualizado num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 1% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 0,3 ng/mL de brometo de etídio. A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare). Em seguida o DNA foi quantificado em equipamento Qubit® 2.0 Fluorometer (INVITROGEN) conforme o manual do fabricante.

3.6. CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DOS ISOLADOS PELA PCR

A confirmação da identidade dos isolados foi realizada através da amplificação da região intergênica dos genes 16S-23S rRNA e do gene *uidA*, para *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente, utilizando-se iniciadores específicos (Tabela 3).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na PCR de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Micro-organismo / Iniciador	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
<i>K. pneumoniae</i> (Pf/Pr2)	ATTTGAAGAGGTTGCAA CGATCGAAGATGTTTCACTTCTGATT	56	260	LIU et al., 2008
<i>E. coli</i> (UAL-754/UAR-900)	AAAACGGCAAGAAAAAGCAG ACGCGTGGTTACAGTCTTGCG	52	156	BEJ et al., 1991

O volume da mistura de cada PCR por amostra totalizou 50 µL contendo os seguintes reagentes: 50 pmol/µL de cada iniciador, 1,5 mM de MgCl₂, 200 µM de cada deoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs - dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1 U de *Taq* DNA polimerase nativa, solução-tampão da PCR 1X (20mM Tris-HCl-pH8.4, 50mM KCl), ~20ng de DNA genômico e água deionizada estéril q.s.p 50 µL (INVITROGEN®) (LIU et al., 2008; BEJ et al.,1991). O DNA das cepas de referência *K. pneumoniae* INCQS 00147/ATCC 13883 e *E. coli* INCQS 00033/ATCC 25922 foram utilizadas como controles positivo e negativo dos isolados e uma alíquota de água deionizada estéril foi empregada para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura da PCR. O processo de amplificação foi realizado no termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF) nas seguintes condições: um ciclo inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 min, temperatura ótima de anelamento (Tabela 3) e 72°C por 2 min mais um ciclo final de extensão a 72°C por 10 min. Os produtos da PCR foram visualizados num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 2% em tampão Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 0,3 ng/mL de brometo de etídio. O primeiro poço foi reservado para a adição do padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN). A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

3.7. PRESERVAÇÃO DOS ISOLADOS

Após a identificação fenotípica e molecular, os isolados foram preservados por liofilização e armazenados na Coleção de Micro-organismos de Referência em Vigilância Sanitária (CMRVS) do INCQS/FIOCRUZ.

3.8. DETECÇÃO DE GENES DE RESISTÊNCIA

A mistura para a reação PCR teve o volume final de 25 uL contendo 1X de PCR Master Mix (PROMEGA); 15 pmol de cada iniciador; cerca de 20 ng de DNA molde e água Gibco® completando o volume. As condições de ciclo consistem de um passo inicial de 95°C durante 5 min, e 35 ciclos de amplificação a 95°C durante 1 minuto, temperatura de anelamento adequado (Tabela 4) durante 1 minuto e 72°C durante 1 minuto. E um alongamento final a 72°C durante 6 minutos. A amplificação foi realizada em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF). Os produtos da PCR foram visualizados num gel de agarose (SIGMA-ALDRICH) a 2% em tampão Tris-

Acetato-EDTA 1X (TAE) corado com 0,3 ng/mL de brometo de etídio. O primeiro poço foi reservado para a adição do padrão de peso molecular (100 bp DNA Ladder, INVITROGEN). A análise foi realizada no equipamento de vídeo documentação ImageQuant 300 (GE Healthcare).

Tabela 3. Iniciadores selecionados para detecção de β -lactamases.

Gene	Sequência (5'-3')	Anelamento (°C)	Tamanho do produto (pb)	Referência
<i>bla</i> _{KPC-2}	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	55	863	YIGIT et al., 2001
<i>bla</i> _{OXA-48}	TGTTTTTGGTGGCATCGAT GTAAMRATGCTTGGTTCCGC	58	177	MONTEIRO et al., 2012
<i>bla</i> _{SHV-1}	ATTTGTGCGCTTCTTTACTCGC TTTATGGCGTTACCTTTGACC	55	1080	JEMINA et al., 2008
<i>bla</i> _{CTX-M15}	GGTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	54	863	BARGUIGA et al., 2011
<i>bla</i> _{TEM-1}	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATCA	55	1051	
<i>bla</i> _{IMP}	GAAGGCGTTTATGTTTCATAC GTACGTTTCAAGAGTGATGC	58	587	PITOUT et al., 2005
<i>bla</i> _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC AATGCGCAGCACCAGGATAG	58	389	
<i>bla</i> _{OXA-1}	CGCAAATGGCACCAGATTCAA C TCCTGCACCAGTTTTCCATA CAG	60	464	MULVEY et al., 2011
<i>bla</i> _{NDM-1}	GGTGCATGCCCGGTGAAATC ATGCTGGCCTTGGGGAACG	58	660	

Utilizou-se como cepas controle *K. pneumoniae* INCQS 00628/ATCC BAA 1705, *E.coli* INCQS 00325/ATCC 35218 e *K. pneumoniae* INCQS P4475 foram utilizadas como controle positivos na detecção dos genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{SHV-1} e *bla*_{NDM-1} respectivamente. Além disso, também foi adicionada uma alíquota de água deionizada estéril (Gibco®) para avaliar a ausência de DNA contaminante na mistura de PCR. Após confirmar a amplificação, os produtos foram purificados utilizando kit QIAquick® PCR Purification (QIAGEN), de acordo com o manual do fabricante.

3.9. SEQUENCIAMENTO

Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento com objetivo de confirmar a identidade dos fragmentos amplificados. Em cada poço foi adicionado 3,2 μ M dos respectivos iniciadores (Tabela 3) e cerca de 200 ng dos produtos foram distribuídos em placa de 96 poços *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (APPLIED BIOSYSTEMS). A placa foi submetida a uma reação de amplificação em termociclador *Mastercycler EP* (EPPENDORF), nas seguintes condições: 40 ciclos de 94°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. As reações de sequenciamento foram realizadas usando o kit *Big Dye Terminator* por eletroforese capilar em aparelho *ABI 3730 DNA Analyzer* (*Applied Biosystems, Foster City CA, USA*) (Plataforma PDTIS/FIOCRUZ). Os cromatogramas obtidos foram convertidos para o formato “fasta” através do software *Sequencher 5.0* (Gene Codes Corporation, Ann Harbor, MI). As sequências que apresentaram score maior ou igual a 20 foram incluídas nas análises subsequentes.

A análise de similaridade das sequências foi realizada pelo programa BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), no GenBank (National Center for Biotechnology Information - NCBI).

3.10. CARACTERIZAÇÃO CLONAL DOS ISOLADOS

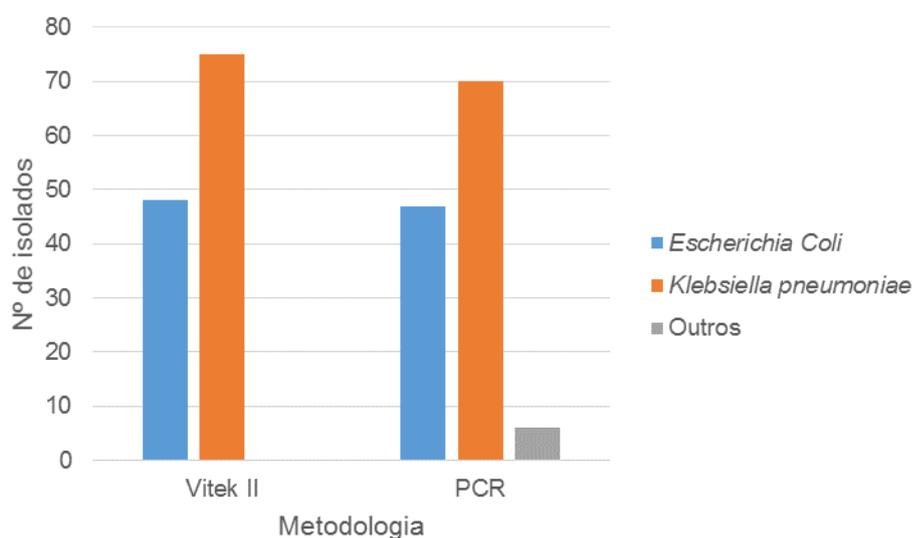
A análise de tipificação dos isolados foi realizada através da *Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus PCR* (ERIC-PCR). Essa técnica foi utilizada no estudo para a análise do polimorfismo do DNA das amostras bacterianas com o objetivo de avaliar a similaridade genética entre os isolados. Foi utilizado o iniciador ERIC-2 (5'-AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG-3') e as condições de amplificação de acordo com protocolo previamente descrito (VERSALOVIC *et al.*, 1991). Os produtos da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de 1,5% de agarose em tampão TBE 0,5X por 1 hora, a 60 V acrescido brometo de etídio (3 mg / mL). O gel foi fotografado e analisado utilizando ImageQuant 300 imagens digitalizador (GE). Padrões de bandas foram analisados com o programa BioNumerics versão 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Bélgica). O dendograma foi construído com a utilização do índice de Dice e o método “unweighted pair group method with arithmetic average” (UPGMA) (VAN BELKUM *et al.*, 2007). Amostras que apresentaram perfis de banda idênticos foram classificadas em um mesmo genotipo.

4. RESULTADOS

4.1. IDENTIFICAÇÃO DE ISOLADOS

Foram obtidos no 123 isolados bacterianos de pacientes internados na UTI adulto e pediátrico de um hospital federal no Município do Rio de Janeiro entre março de 2013 e março de 2014 (1 isolado por paciente). Foram identificados 75 isolados como *K. pneumoniae* e 48 como *E. coli* (Sistema VITEK II). A seguir foi realizada a confirmação da identificação através da PCR, sendo 57% (70/123) confirmados como *K. pneumoniae*, 38% (47/123) como *E. coli* e 5% (6/123) como outros microorganismos (Gráfico 1). Os resultados obtidos com as provas bioquímicas, feitas pelas metodologias convencionais (INCQS/ FIOCRUZ) foram em 99% similares aos obtidos pela PCR. Foi considerada em neste estudo a identificação obtida pela PCR.

Gráfico 1. Comparação entre o número de isolados identificados como *K. pneumoniae* e *E. coli* pelos métodos fenotípico e molecular.



4.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS PELO VITEK II

Os perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli* foram analisados de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute* de 2014 (CLSI, 2014). Segundo o CLSI, isolados que apresentem resistência para cefpodoxime ou ceftazidima ou aztreonam ou cefotaxima ou ceftriaxona são considerados possíveis produtores de ESBL.

Os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* apresentaram altos percentuais de resistência à ampicilina (100%), ampicilina/sulbactam (100%), cefepime (98% e 94%, respectivamente) e ceftazidima (100% e 96%, respectivamente). Em relação à ciprofloxacina, 69% dos isolados de *K. pneumoniae* apresentaram resistência, mas somente 28% dos isolados de *E. coli* foram resistentes a esse antibiótico. Foi verificado que 11% dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes à amicacina, enquanto todos os isolados de *E. coli* foram sensíveis. Foi observada resistência à gentamicina em 21% e 49% e à colistina em 2% e 9% dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae*, respectivamente. Em relação aos antibióticos carbapenêmicos, foi observado um percentual de resistência de 61% para ertapenem, 54% para imipenem e 43% para meropenem nos isolados de *K. pneumoniae*, entretanto a maioria dos isolados de *E. coli* apresentou um baixo percentual de resistência aos carbapenêmicos (Gráfico 2).

Durante o estudo, os cartões de sensibilidade VITEK II - Gram Negativo AST-105 foram substituídos pelo cartão AST-N239, no qual há substituição dos antibióticos aztreonam, cefalotina e cefotaxima por ceftriaxona e cefuroxima. Desta forma, foi avaliada a resistência a aztreonam, cefalotina e cefotaxima em somente 23 dos isolados de *E. coli* e 27 isolados de *K. pneumoniae*. Os demais foram testados frente à ceftriaxona e cefuroxima (Gráfico 3 e 4). As cefalosporinas cefepime, cefotaxitina e ceftazidima foram realizadas para todos os isolados estudados (Gráfico 2).

Gráfico 2. Resistência dos isolados de *E.coli* e *K. pneumoniae* possivelmente produtores de ESBL

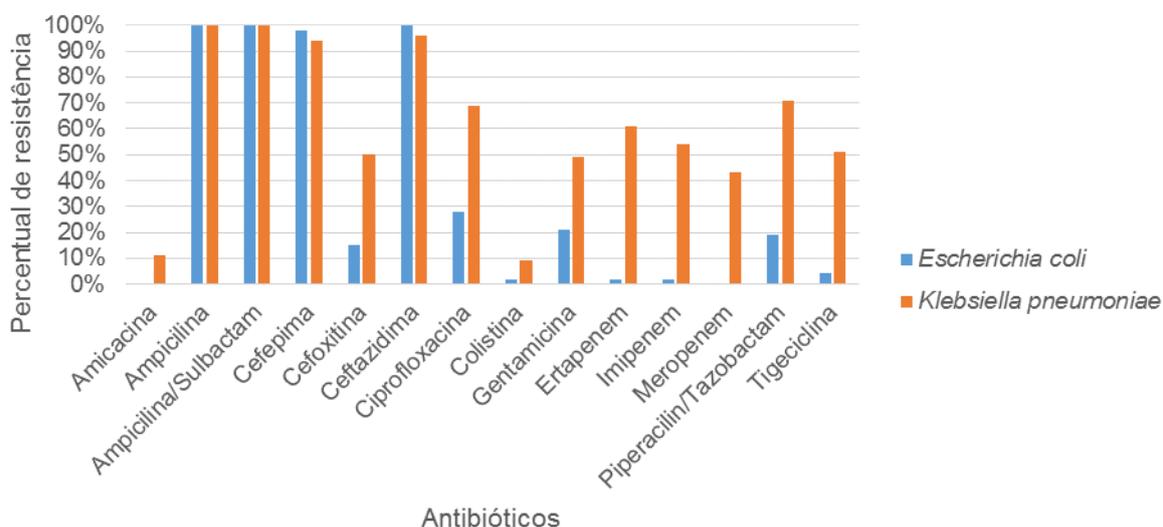


Gráfico 4. Número de isolados resistentes a cefalosporinas e monobactams (AST-N105).

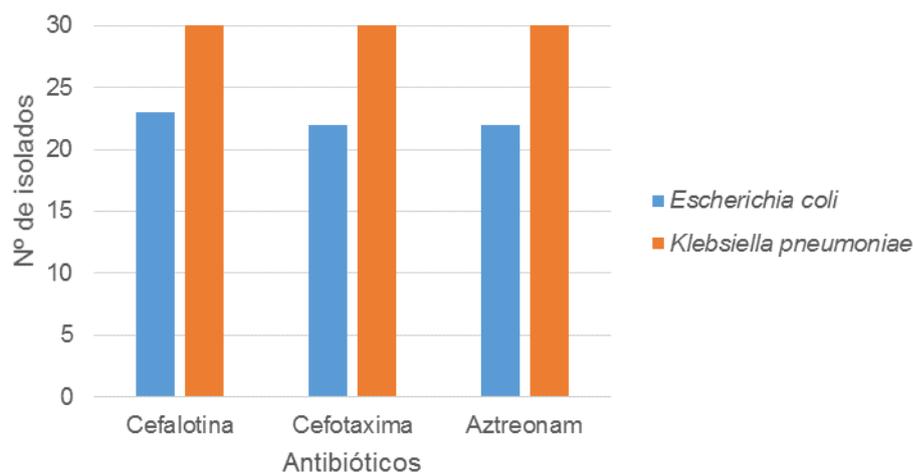
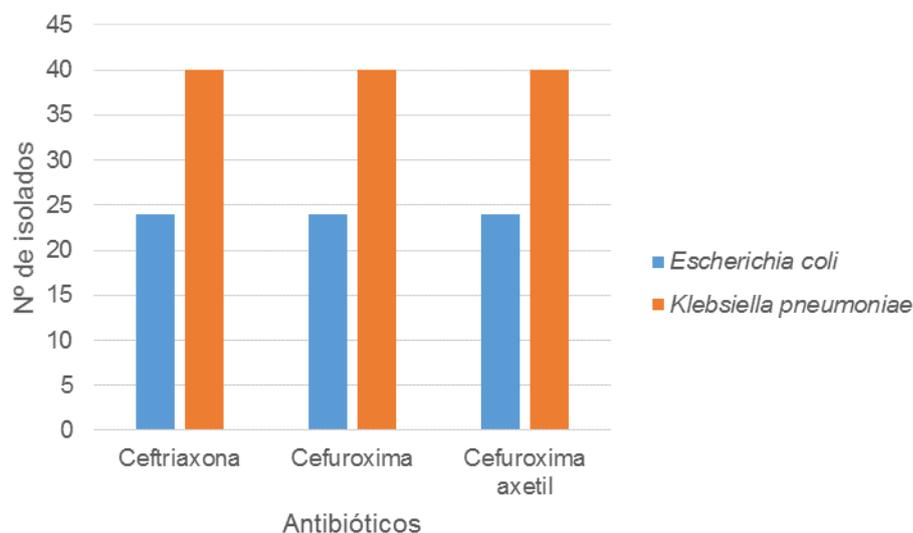


Gráfico 3. Número de isolados resistentes a cefalosporinas (AST-N239).



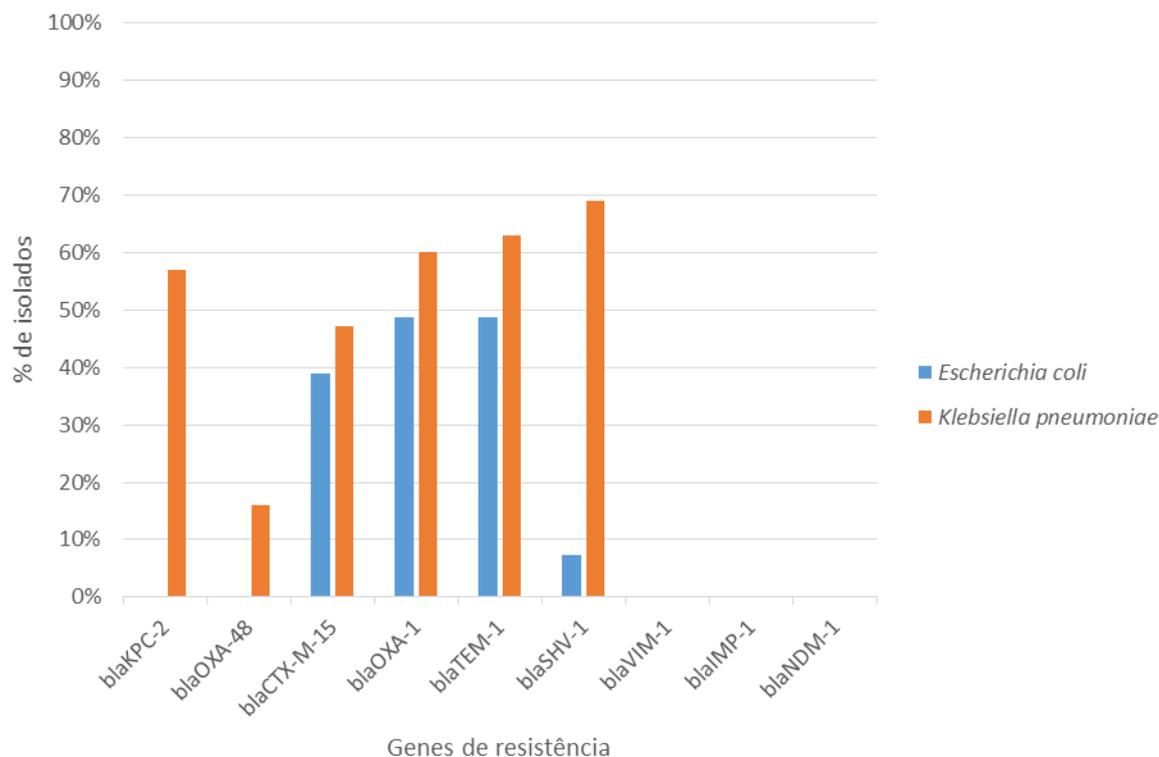
4.3. DETECÇÃO DOS GENES DE RESISTÊNCIA RELATIVOS ÀS β -LACTAMASE

Foram pesquisados os seguintes genes de resistência: *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-48}, *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{VIM-1}, *bla*_{IMP-1} e *bla*_{NDM-1}. O gene *bla*_{TEM-1} foi detectado em 63% e 49% dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. coli*, respectivamente. Dos isolados de *K. pneumoniae*, 69% apresentaram o gene *bla*_{SHV1}, enquanto apenas 7% estavam presentes nos isolados de *E. coli*.

Os genes *bla*_{KPC2}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{OXA-48} foram encontrados em 56%, 60% e 16% dos isolados de *K. pneumoniae*, respectivamente. Destes genes, apenas o gene *bla*_{OXA-1} foi detectado nos isolados de *E. coli* (49%). Dentre os isolados de *K. pneumoniae*, 47% apresentaram o gene *bla*_{CTX-M15} e dentre os isolados de *E. coli*, 39% apresentaram esse gene (Gráfico 4). Os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{NDM} não foram

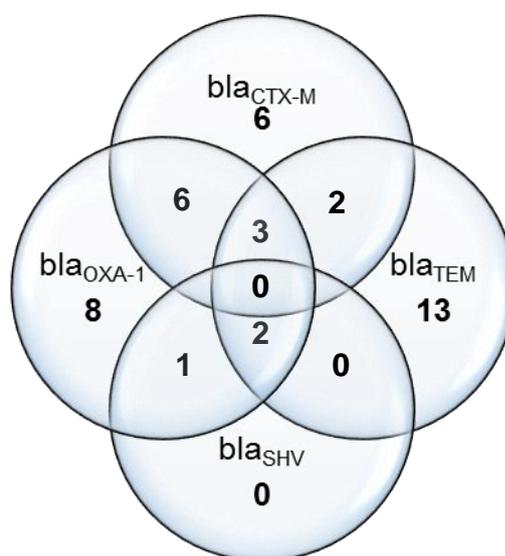
encontrados em nenhum isolado. Vale ressaltar que oito isolados, dois de *K. pneumoniae* e seis de *E. coli*, não apresentaram nenhum dos genes pesquisados.

Gráfico 5. Detecção dos genes resistência aos antibióticos em *K. pneumoniae* e *E. coli*.



Dos 47 isolados de *E. coli*, 57% (27/47) apresentaram apenas um dos genes pesquisados, 19% (9/47) dois genes, 11% (5/47) três genes de resistência e 13% (6/47) dos isolados não apresentaram nenhum dos genes pesquisados (Gráfico 6).

Gráfico 6. Distribuição dos isolados de *E. coli* em relação aos genes de resistência pesquisados.



Os 47 isolados apresentaram oito perfis em relação aos genes de resistência pesquisados com diferentes percentuais (Tabela 5).

Tabela 4. Perfil de resistência dos isolados de *E. coli* de acordo com os genes detectados.

Perfil de Resistência	Genótipo de resistência	Nº de Isolados / %
I	Nenhum gene	06 (12,8%)
II	<i>bla</i> _{OXA-1}	08 (17%)
III	<i>bla</i> _{TEM-1}	13 (27,6%)
IV	<i>bla</i> _{CTX-M15}	06 (12,8%)
V	<i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	06 (12,8%)
VI	<i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (2,1%)
VII	<i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{CTX-M15}	02 (4,3%)
VIII	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (4,3%)
IX	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	03 (6,4%)
TOTAL		47

Dos 70 isolados de *K. pneumoniae*, 17% (12/70) apresentaram apenas um gene pesquisado, 22% (15/70) dois genes, 17% (12/70) três genes, 19% (13/70) apresentaram quatro genes de resistência, 20% (14/70) cinco genes e 3% (2/70) dos isolados apresentaram os seis genes pesquisados. Vale ressaltar que 3% (2/70) não apresentaram nenhum dos genes pesquisados. Foram observados 28 perfis em relação aos genes de resistência pesquisados com diferentes percentuais entre os 70 isolados de *K. pneumoniae* (Tabela 6).

Tabela 5. Perfil de resistência dos isolados de *K. pneumoniae* de acordo com os genes detectados.

Perfis de resistência	Genótipo de resistência	Nº de isolados / %
I	Nenhum gene	02 (2,9%)
II	<i>bla</i> _{SHV-1}	03 (4,3%)
III	<i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)
IV	<i>bla</i> _{KPC-2}	06 (8,6%)
V	<i>bla</i> _{TEM-1}	01 (1,4%)
VI	<i>bla</i> _{KPC-2} e <i>bla</i> _{SHV-1}	02 (2,9%)
VII	<i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{SHV-1}	07 (10%)
VIII	<i>bla</i> _{KPC-2} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
IX	<i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{OXA-48}	03 (4,3%)
X	<i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
XI	<i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
XII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{SHV-1}	02 (2,9%)
XIII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
XIV	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{CTX-M15}	01 (1,4%)
XV	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
XVI	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	01 (1,4%)
XVII	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-48}	01 (1,4%)
XVIII	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{CTX-M15}	01 (1,4%)
XIX	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)
XX	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)

XXI	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)
XXII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{OXA-1} e <i>bla</i> _{OXA-48}	02 (2,9%)
XXIII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)
XXIV	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	03 (4,3%)
XXV	<i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{OXA-1} e <i>bla</i> _{OXA-48}	02 (2,9%)
XXVI	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	02 (2,9%)
XXVII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} e <i>bla</i> _{OXA-1}	13 (18,6)
XXVIII	<i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{OXA-1} e <i>bla</i> _{OXA-48}	01 (1,4%)
XXVIII	<i>bla</i> _{KPC-2} , <i>bla</i> _{TEM-1} , <i>bla</i> _{SHV-1} , <i>bla</i> _{CTX-M15} , <i>bla</i> _{OXA-1} e <i>bla</i> _{OXA-48}	02 (2,9%)
TOTAL		70

Os isolados de *K. pneumoniae* mostraram diferentes perfis de resistência associados à presença dos genes *bla*_{KPC-2} e/ou *bla*_{OXA-48} (Tabela 3). Observa-se os isolados Kp 6, Kp 9, Kp 26, Kp 1 apresentaram ambos os genes. Entretanto, alguns isolados não apresentaram os referidos genes, porém foram resistentes a pelo menos um dos antibióticos carbapenêmicos (Kp 60, Kp 64, Kp 65, Kp 51, Kp 45 e Kp 27).

Tabela 6. Resistência aos antibióticos e detecção dos genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{OXA-48} de *K. pneumoniae*

Isolados	Genes		Antibióticos Resistência Fenotípica	
	<i>bla</i> _{KPC-2}	<i>bla</i> _{OXA-48}	Não β-lactâmicos	β-Lactâmicos
Kp.6	+	+	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP
Kp.9	+	+	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.26	+	+	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP
Kp.1	+	+	AK; GEN; CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.2	+	-	AK; CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.3	+	-		AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.4	+	-	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP

Kp.7	+	-	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP
Kp.8	+	-	CIP	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.10	+	-	CIP; TIG; COL	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.11	+	-	CIP; TIG; COL	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.12	+	-		AMP; CRX; CFO; CRX; CAZ; COM; CRO; ERT; IMP; MER
Kp.13	+	-	CIP; TIG	AMP; CRX; CFO; CRX; CAZ; CRO; ERT; MER
Kp.14	+	-	GEN; CIP; TIG	AMP; CRX; CFO; CRX; CAZ; COM; CRO; ERT; IMP; MER
Kp.15	+	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.16	+	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; CRX; ERT; IMP; MER

Kp.17	+	-	CIP; TIG	AMP; CRX; CFO; CRX; CAZ; COM; CRO; ERT; IMP
Kp.20	+	-	AK; GEN; CIP; TIG; COL	AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX; IMP
Kp.28	+	-	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP
Kp.30	+	-	GEN; CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.48	+	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.55	+	-	CIP; TIG	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT
Kp.56	+	-	CIP	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT
Kp.57	+	-	CIP; TIG	AMP; CRX; CFO; CRX; CAZ; CFO; CRO; ERT; IMP; MER
Kp.58	+	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CRX; CRX; ERT; IMP; ERT; MER
Kp.59	+	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; CRX; ERT;

				IMP; MER
Kp.61	+	-		AMP; CAZ; CRO; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.62	+	-	AK; CIP; GEN	AMP; COM; CFO; CAZ; CRO; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.63	+	-	COL	AMP; CRO; CRX; ERT; IP; MER
Kp.34	-	+	GEN; CIP	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.35	-	+	CIP; TIG	AMP; CFL; CFO; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP; MER
Kp.40	-	+	GEN	AMP; CRX; CAZ; COM; CRO; ERT; CRX
Kp.42	-	+	GEN; CIP; TIG	AMP; CRX; CFO; CAZ; CRX; COM; CRO; ERT; IMP; MER
Kp.49	-	+	CIP; NOR; NIT; SUT; NAL	AMP; CRX; CFL; CRX; COM; CRO; ERT; MER
Kp.66	-	+	GEN; TIG	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; ERT; IMP; MER
Kp.50	-	+	CIP; NOR; SUT; NAL	AMP; CRX; CFL; CRX;

				COM; CRO; ERT; MER
Kp.5	+	-	GEN; CIP; TIG;	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM
Kp.18	+	-	GEN; CIP	AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX
Kp.19	+	-	CIP; TIG;	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; CRX
Kp.21	+	-	GEN	AMP; CRO; CFO; CRX; CAZ; COM; CRX
Kp.22	+	-	GEN; CIP	AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX
Kp.23	+	-		AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX
Kp.24	+	-	GEN; CIP; TIG;	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM
Kp.25	+	-	GEN	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM
Kp.29	+	-	GEN	AMP; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM
Kp.60	-	-	CIP; GEN; TIG	AMP; COM; CFO; CAZ; CRO; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.64	-	-	CIP; TIG; COL	AMP; CRO; CRX; CFO; CAZ; COM; ERT; IP; MER

Kp.65	-	-	CIP; TIG	AMP; CRO; CRX; CFO; CAZ; COM; ERT; IP; MER
Kp.51	-	-	AK; CIP	AMP; CRO; CRX; CAZ; COM; CRX; ERT; IMP; MER
Kp.45	-	-	GEN; TIG	AMP; CRX; CFO; CAZ; CRX; COM; CRO; MER
Kp.27	-	-	CIP; TIG	AMP; CFO; CFL; CTX; CAZ; COM; ATM; ERT; IMP

Kp – *Klebsiella pneumoniae*

Ampicilina/Sulbactam (AMS); Piperacilin/Tazobactam (PIT); Ampicilina (AMP); Aztreonam (ATM); Cefalotina (CFL); Cefepima (COM); Cefotaxima (CTX); Cefoxitina (CFO); Ceftazidima (CAZ); Ciprofloxacina (CIP); Colistina (COL); Gentamicina (GEN); Ertapenem (ERT); Imipenem (IMP); Meropenem (MER); Tigeciclina (TIG); Cefuroxima (CRX); Cefuroxima;Axetil (CRX); Ceftriaxona (CRO); Cefepima (COM); Amicacina(AK); GEN (Gentamicina); Ciprofloxacina (CIP); Tigeciclina (TIG); Colistina (COL).

4.4. ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES DE RESISTÊNCIA

Após o sequenciamento dos genes de resistência, a análise das sequências pelo BLASTn apresentou percentuais de identidade entre 98-99% com os genes *bla*_{KPC-2}, *bla*_{OXA-1}, *bla*_{CTX-M15}, *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{OXA-48}.

4.5. TIPIFICAÇÃO DAS CEPAS DE *K. pneumoniae* e *E. coli*

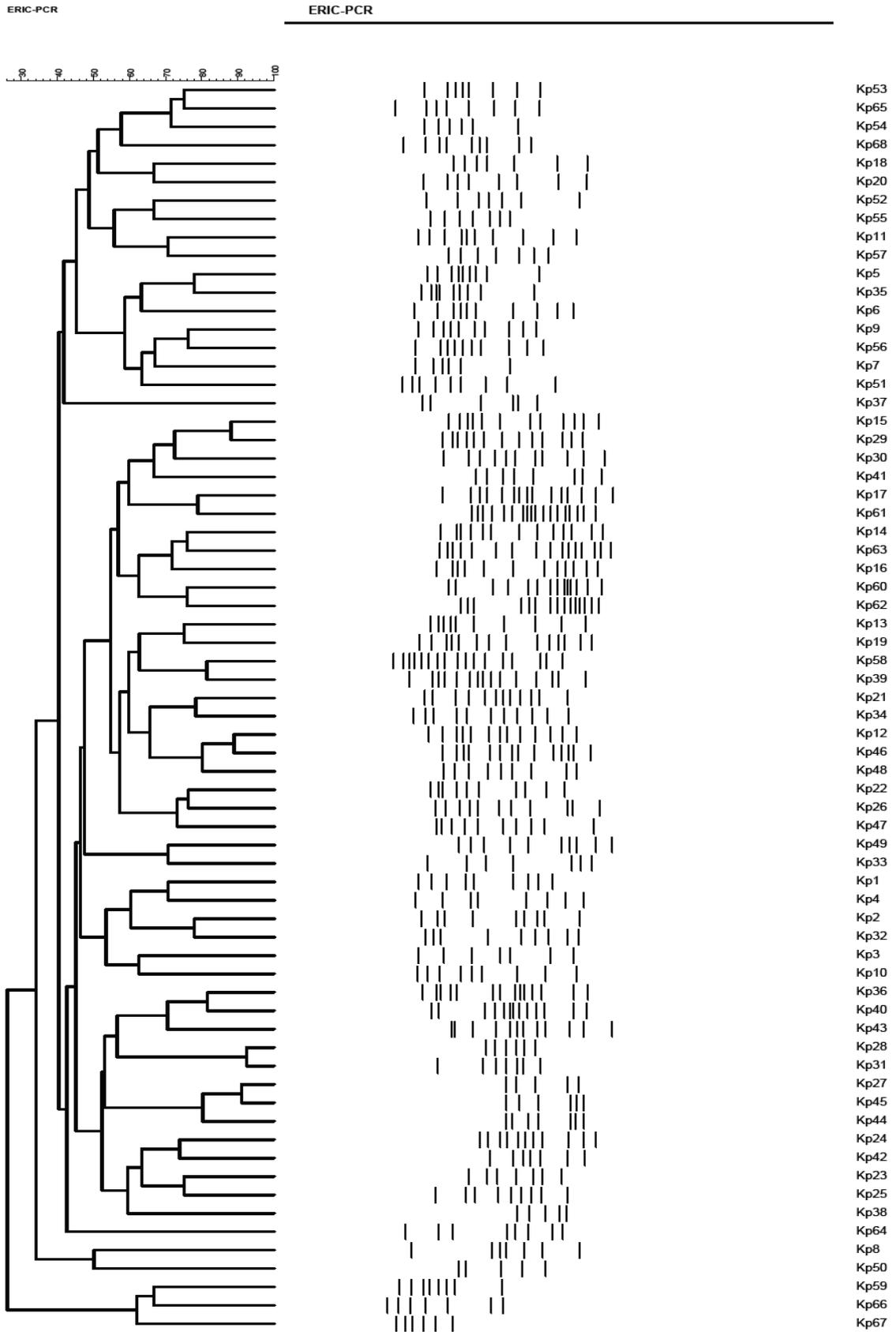
A diversidade genética através da técnica ERIC-PCR foi avaliada somente para os isolados que apresentaram pelo menos um gene de resistência aos antimicrobianos. Foram avaliados, portanto, um total de 109 isolados, sendo 68 *K. pneumoniae* e 41 de *E. coli*.

No nosso estudo, através da ERIC-PCR, verificou-se uma grande variabilidade genética entre os isolados, mostrando que não há uma relação epidemiológica entre eles, devido ao grande polimorfismo genético observado. Entretanto, em *K. pneumoniae*, evidenciou-se cepas com percentual de identidade acima de 90% (KP15

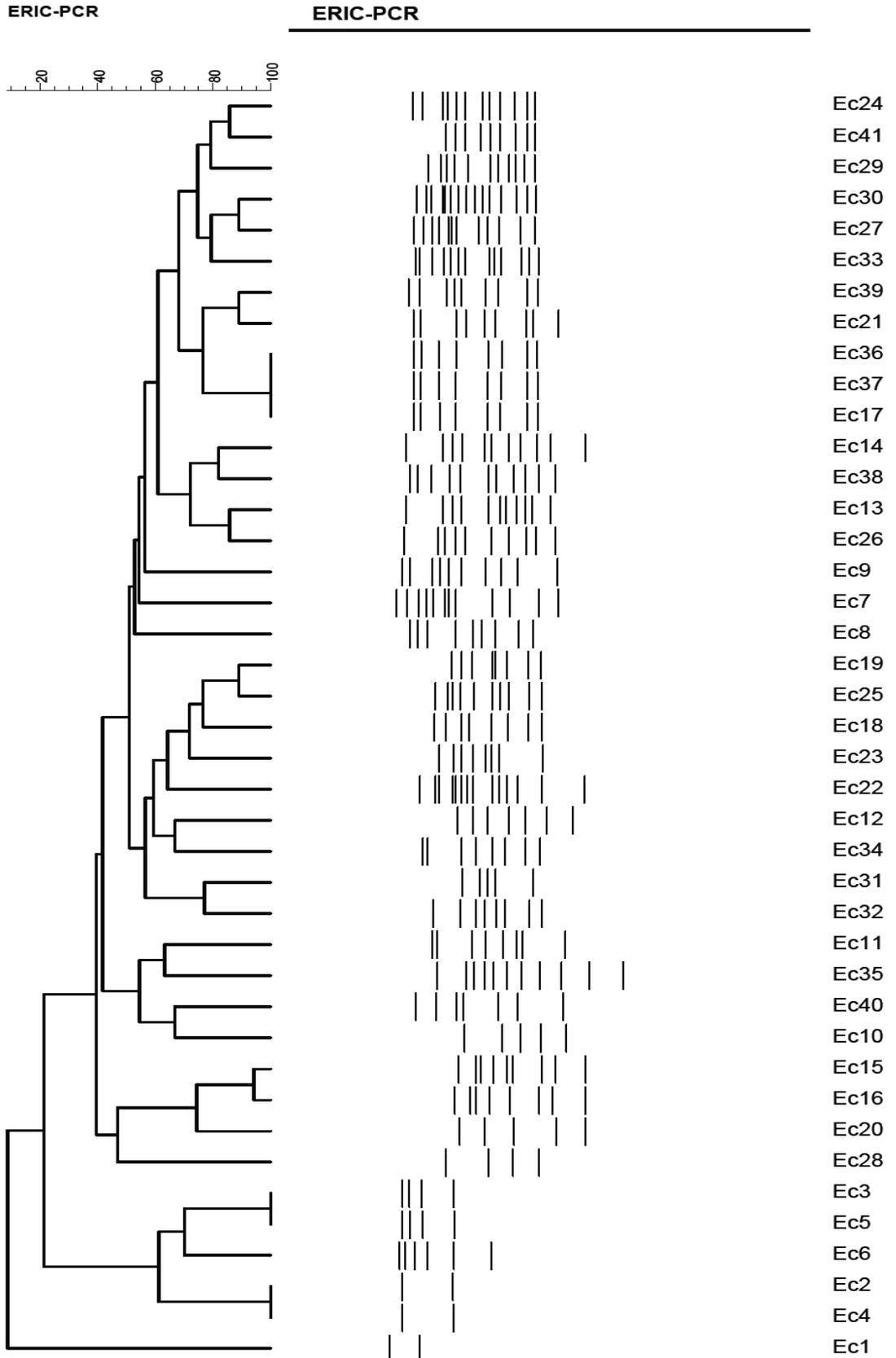
e KP29; KP12 e KP46; KP31 e KP28; KP27 e KP 45). Apesar das cepas possuírem similaridade de 90%, mostraram características distintas em relação à susceptibilidade aos antibióticos e ao perfil de genes de resistência (Dendograma 1).

Em relação a *E. coli*, os isolados analisados, no presente estudo, também mostraram grande diversidade genética. Foram detectados 37 perfis genótipos pela ERIC-PCR. Entretanto, o perfil P1 (Ec36, Ec37 e Ec17); P2 (Ec3 e Ec5); P3 (Ec4 e Ec2) e P4 (Ec15 e EC16) possuem cepas idênticas e, portanto, formam pequenos clones. Em relação a P1 (Ec36, Ec37 e Ec17), Ec36 e EC37 apresentam somente *bla*_{TEM-1}, enquanto Ec17 apresenta também CTX-M15 e mostram perfis de resistência idênticos, à exceção de EC17 que apresenta também resistência à ciprofloxacina. As cepas do Perfil P2 (Ec3 e Ec5) apresentam somente *bla*_{TEM-1} e os perfis de resistência similares com exceção da resistência também à ciprofloxacina em Ec5. Já os perfis P3 e P4 mostraram resistência aos antimicrobianos mais variáveis entre as cepas de cada um (Dendograma 2).

Dendograma 1. *K. pneumoniae* produtoras de β -Lactamases (ESBL).



Dendograma 2. *E. coli* produtoras de β -Lactamases (ESBL).



5. DISCUSSÃO

E. coli e *K. pneumoniae* são importantes agentes de infecções estando presentes em diversos serviços das unidades de assistência à saúde. No presente estudo foram avaliadas cepas de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, isoladas a partir de culturas de vigilância. Uma pesquisa realizada no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) evidenciou a distribuição heterogênea de espécies bacterianas entre as diferentes unidades. No Pronto Socorro, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *P. aeruginosa* foram as mais frequentes. Enquanto na Clínica Médica, *K. pneumoniae* foi a espécie prevalente, seguida por *Acinetobacter baumannii* e *E. coli* e na UTI a espécie predominante foi *A. baumannii*. Esses dados mostram que os vários setores do HC-UFG estão colonizados por pelo menos três espécies, cada um deles com espécies predominantes distintas (METZKER, 2013).

Moosavian e Deiham (2011) avaliaram 420 isolados clínicos de Enterobacteriaceae onde foram identificados 271 de *E. coli* (64.5%) e 84 (20%) de *K. pneumoniae*, destacando a importância dessas espécies, muitas vezes, carreadoras de genes de resistência a várias classes de antibióticos

Um dado relevante do presente estudo, foi a confirmação da identidade de 95% dos isolados caracterizados fenotipicamente, pela PCR, o que demonstra a eficiência de sistemas automatizados nas rotinas laboratoriais clínicas. Em um estudo realizado por Ling et al (2001), um total de 281 amostras de diversos membros da família *Enterobacteriaceae*, *P. aeruginosa*, e outras bactérias Gram-negativas também foram avaliada pelo VITEK II. Assim como em nosso estudo, 95% dos isolados foram corretamente identificados até a espécie, havendo discrepância em somente 5% entre as espécies de bactérias não fermentadoras da glicose. O sistema VITEK II alcança taxas de identificação para fermentadores e não fermentadores de 99,6% versus 95,9%, respectivamente (NOWAKONSKI et al., 2015). Estes dados da literatura, fortalecem nossos resultados, o que nos permite sugerir que a adoção de esquema polifásico, incluindo métodos fenotípicas e moleculares, possibilita uma identificação mais acurada e a obtenção de resultados mais confiáveis.

As infecções nosocomiais são frequentemente causadas por micro-organismos multirresistentes. Na prática clínica diária, o médico enfrenta um dilema quando se defronta com infecções graves: ou prescreve antibióticos de amplo espectro e

contribui para o aumento da resistência, ou utiliza antibióticos de espectro mais restrito e coloca o prognóstico do paciente em risco (CORTES et al., 2010, DEL FIOLE et al., 2010). O consumo excessivo de antibióticos favorece o desenvolvimento de muitos patógenos multidroga resistentes, inclusive daqueles da microbiota normal dos pacientes (CORTES et al., 2010; CURCIO, 2011).

Diante da disseminação de bactérias multirresistentes é necessária a adoção de programas de vigilância que são fundamentais na prevenção e controle desses organismos que envolvam, entre outras medidas, a avaliação do perfil de susceptibilidade aos antibióticos empregando-se metodologias recomendadas por órgãos de referência (ALMEIDA et al., 2007; SILVA et al., 2012).

Para evitar o avanço dos casos de contaminação e colonização por bactérias resistentes e aumentar a segurança do paciente, a ANVISA tem proposto estratégias para contenção da resistência microbiana como: medidas de controle de infecção relacionado à assistência à saúde, desenvolvimento de protocolos terapêuticos para infecções prevalentes, normas para prescrição e dispensação de antimicrobianos a fim de controlar o uso indiscriminado dos mesmos pela população, controle de qualidade de laboratórios de análises microbiológicas e autorização de comercialização somente para antibióticos que atendem a padrões internacionais de eficácia, segurança e qualidade (ANVISA, 2013d).

O isolamento precoce de pacientes, possivelmente colonizados por micro-organismos multirresistentes, pode minimizar sua disseminação, reduzindo os casos de infecção hospitalar e os custos associados (CATANEO et al., 2011, DAROUK et al., 2014). Sendo assim, a cultura de vigilância tem sido apontada como a abordagem mais sensível para identificação de pacientes colonizados. Alguns estudos recomendam sua realização em todos os pacientes admitidos no hospital, independentemente da avaliação dos critérios de risco. Porém, o tempo despendido para a realização dos testes microbiológicos e o alto custo do procedimento têm dificultado a implementação dessa rotina na maioria dos hospitais, sendo a utilização de critérios clínicos (regras de predição clínica) uma alternativa, de menor custo, em relação à cultura de vigilância (MORGAN et al., 2010).

Desta forma, é de suma importância implementar medidas de prevenção que devem ser realizadas por toda equipe multi-profissional, como higienização das mãos,

medidas de precauções de contato, realização de coleta de *swab* retal, oral e nasal para detectar os pacientes colonizados. Ainda, deve haver cautela em relação às medidas de descolonização por uso de antibióticos, como polimixina, neomicina, ácido nalidíxico, colistina, tobramicina ou norflaxacino, que podem selecionar bactérias resistentes, já que alguns outros estudos demonstram que boa parte das cepas produtoras de ESBL apresentaram resistência a quinolonas e a aminoglicosídeos, quando estes são usados para descolonização (BRADFORD, 2001; REESE et al., 2005).

No presente estudo foi avaliado o perfil de susceptibilidade aos antibióticos dos isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* de culturas de vigilância ESBL positiva. Foi realizada também a pesquisa de genes que codificam ESBL. Os sistemas automatizados, embora eficientes, apresentam limitações em relação aos mecanismos envolvidos na resistência microbiana, principalmente os mecanismos de resistência induzíveis, que demandam maior tempo para sua expressão. Esses sistemas muitas vezes necessitam de complementação por outros testes fenotípicos e/ou genotípicos, para a determinação dos mecanismos de resistência (NOWAKONSKI et al., 2015).

Altos percentuais de resistência às cefalosporinas de terceira e quarta geração foram demonstrados neste estudo, tanto em *E. coli* como em *K. pneumoniae*, o que não ocorreu em relação aos carbapenêmicos, somente detectados em *K. pneumoniae*. Outros estudos, como o de Carvalho e Gontijo (2008) também demonstraram a presença de resistência a cefalosporinas de terceira geração em 58% dos isolados do grupo *Klebsiella-Enterobacter*, em um hospital de Minas Gerais. Numa outra investigação retrospectiva em 13.761 amostras clínicas de diversas naturezas foi verificada resistência a inúmeros antibióticos, destacando-se, penicilina em 83% dos isolados, seguido de cloranfenicol (77,8%), ampicilina (78,6%), roxitromicina, (66,7%), cefotaxima (64,7%), ceftazidima (63,0%) e cefepime (62,9%) em enterobactérias (PAIM; LORENZZINI, 2014). Desta forma, os resultados alcançados no presente estudo se destacam, uma vez que evidenciaram altas taxas de resistência em culturas de monitoramento preventivo que fazem parte das medidas de controle de infecções em estabelecimentos de assistência à saúde.

Em relação aos antibióticos carbapenêmicos, observamos percentuais de resistência elevados em *K. pneumoniae*, ertapenem (61%), imipenem (54%)

meropenem (43%). Em um outro estudo, isolados de vigilância de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos foram revelados em 37% (79/215) de pacientes internados na UTI, sendo 69 espécimes perianal e 10 de escarro. É importante ressaltar, que a presença de colonização por *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos foi mais frequentemente detectada pela cultura de vigilância do que pela cultura clínica. Além disso, culturas de vigilância realizadas na admissão do paciente e semanalmente (58%, 62/107) foram superiores àquelas onde as culturas de vigilância foram realizadas apenas na admissão (15%, 10/68), demonstrando assim a importância dessas culturas no Programa de Vigilância Hospitalar (CALFEE et al., 2008)

Dentre os diversos mecanismos de resistência, a produção de enzimas β -lactamases constitui um dos principais em enterobactérias. Inúmeros pesquisadores têm detectado essas enzimas nas mais diversas partes do mundo, como por exemplo em Trindade e Tobago, em isolados clínicos de *E. coli* onde foram identificados os genes *bla*_{TEM} (100%), *bla*_{SHV} (4,1%) e *bla*_{CTX-M} (37,5%) e similarmente em *K. pneumoniae*, *bla*_{TEM} (84,3%), *bla*_{SHV} (34,5%) e *bla*_{CTX-M} (58,8%) (AKPAKA et al, 2010). Isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas em um hospital no Irã, demonstraram a presença dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em 87,5%, 12,4% e 24,8% dos isolados, respectivamente (GHAFOURIAN et al., 2010). Estudos de Moosavian e Deiham (2011) com enterobactérias de origem clínica, revelaram que entre os isolados de *E. coli* produtoras de ESBL, 91% apresentaram *bla*_{TEM} enquanto este gene estava presente em 48,5% de *K. pneumoniae*. Encontraram, ainda, *bla*_{SHV} dos isolados de *E. coli* (3%) e de *K. pneumoniae* (23%). Ambos os genes, *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} foram detectados em 6% de *E. coli* e 28,5% em *K. pneumoniae*. Os percentuais de *bla*_{TEM} foram significativamente superiores aos encontrados em nosso estudo, *E. coli* (49%) e *K. pneumoniae* (63%). Em relação à presença desses 2 genes simultaneamente, nosso estudo revelou *E. coli* (5%) e *K. pneumoniae* (47,1%), o que nos permitiu sugerir que essas diferenças podem ser atribuídas aos antibióticos utilizados na prática hospitalar. Por outro lado, percentuais inferiores aos nossos de *bla*_{SHV-1}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{CTX-M1} foram observados em isolados de *K. pneumoniae*. É interessante ressaltar que, assim como nos estudos citados anteriormente, não foram investigadas a presença de *bla*_{KPC} e *bla*_{OXA-48}, apesar dos percentuais significativos de

resistência aos antibióticos carbapemêmicos, imipenem (36%) e meropenem (51%) (KHOSRAVI et al., 2013).

Na América Latina, *K. pneumoniae* e *E.coli* produtoras de ESBL foram encontradas em percentuais de 50% e 26%, respectivamente. Embora altos, esses percentuais estão abaixo dos detectados na Índia (80%) e na China (60%) em média para as duas espécies juntas (GALES et al., 2012; LIVERMORE, 2012).

No Rio de Janeiro, um estudo realizado em UTI do Instituto Nacional de Cardiologia (INC) demonstrou que as espécies mais frequentemente isoladas foram *E. coli* 9/41 (21,95%) e *K. pneumoniae* 14/41 (34,1%). Em relação à presença de ESBL, estas foram evidenciadas em 58% nos isolados de swab retal (24/41). Os genes mais prevalentes nestes isolados produtores de ESBL foram: *bla*_{TEM} 13/24 (54%), AmpC 12/24 (50%), *bla*_{SHV} 6/24 (25%) e *bla*_{CTX-M1} 7/24 (29%) (VASQUES et al., 2011).

A presença do gene *bla*_{CTX-M15} nos isolados de *K. pneumoniae* (47%) e *E. coli* (39%) em nossos resultados, confirma a rápida propagação dessa enzima em isolados de *E.coli* e de outras enterobactérias no Rio de Janeiro, a partir de 2007 (PERIANO et al., 2011; SEKI et al., 2013). É importante ressaltar que os resultados do presente estudo foram obtidos unicamente de culturas de vigilância, não necessariamente de pacientes portadores de doenças infecciosas

A propagação de genes codificadores de ESBL em representantes da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *E. coli* e *K. pneumoniae* representa um desafio importante na prática clínica, o que leva a necessidade do desenvolvimento de novos antimicrobianos, como por exemplo os antibióticos carbapenêmicos. Porém, o uso contínuo deste grupo de antibióticos levou a propagação de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos (ERC) como a *Klebsiella* produtora de carbapenemases (KPC). Assim, o aumento da prevalência de ERC é especialmente importante devido as altas taxas de mortalidade associadas a infecções causadas por KPC (HARRIS et al., 2015; GRUPTA et al., 2011). Segundo Schechenr e colaboradores (2012), somente culturas de rotina não são suficientes para detectar a maioria dos casos de portadores de enterobactérias resistentes aos antibióticos carbapenêmicos, reforçando a necessidade de monitoramento constante.

No Brasil, a primeira evidência de *K. pneumoniae* produtora de *bla*_{KPC} foi em 2006 e, desde então, a incidência desses micro-organismos tem aumentado. Monteiro e colaboradores detectaram os genes *bla*_{SHV} (69%), *bla*_{TEM} (63%), *bla*_{OXA-1} (60%), *bla*_{KPC} (57%) e *bla*_{OXA-48} (16%) em *K. pneumoniae*. Em *E. coli*, os autores encontraram *bla*_{TEM} (49%) e *bla*_{OXA-1} (49%). SEKI e colaboradores (2011) demonstraram a presença de *bla*_{KPC} em isolados de *K. pneumoniae* em cinco estados brasileiros (Rio de Janeiro, Espírito Santo, Minas gerais e Pernambuco) no período de 2006 a 2009, como parte dos estudos da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, coordenado pela ANVISA.

No presente estudo, os genes *bla*_{KPC2}, *bla*_{OXA-1} e *bla*_{OXA-48} foram evidenciados em 56%, 60% e 16% dos isolados de *K. pneumoniae*, respectivamente. No entanto, seis isolados (8,6%) apresentaram resistência aos carbapenêmicos e ausência dos genes *bla*_{KPC2} e *bla*_{OXA-48}. Essa resistência, muito provavelmente, deve estar associada a outros mecanismos como a perda ou alteração de porinas de membrana externa. É importante citar que a presença de *K. pneumoniae* resistentes ao ertapenem foi atribuída à interrupção da expressão do gene *ompK35* e à presença de uma porina variante *OmpK36* (POLOU *et al.*, 2013). Os genes *bla*_{KPC2} e *bla*_{OXA-48} não foram detectados nos isolados analisados neste estudo, apesar de já ter sido detectado em *E. coli* de origem clínica, em um hospital do Rio de Janeiro (D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2010).

Um estudo comparativo entre isolados provenientes de *swab* retal de culturas de vigilância em unidades de alto risco (51,9%) e de origem clínica de outras fontes do hospital (48,1%) revelou a prevalência de carbapenemase *bla*_{KPC} (48,5%), *bla*_{OXA-48} (3%) e *bla*_{NDM-1} (2%) nos isolados de vigilância. Comparando-se o grupo de isolados de amostras clínicas e o grupo de isolados de culturas de vigilância, foi demonstrada uma positividade significativamente superior de carbapenemases nos isolados de vigilância (66,9%) em relação aos isolados de material clínico (38,9%) (PINTO *et al.*, 2014).

Os genes *bla*_{VIM1}, *bla*_{IMP1} e *bla*_{NDM} não foram encontrados em nenhum isolado, na presente investigação. Vale ressaltar que os perfis de resistência conferidos por esses genes (resistência a penicilinas, carbapenêmicos, aminoglicosídeos) e susceptível ao aztreonam não foi detectado. Entretanto, enterobactérias produtoras de *bla*_{NDM} tem se propagado rapidamente na cidade de Brasília, onde foi

primeiramente detectada no Brasil. A emergência desse gene em nosso país é de grande preocupação, uma vez que leva a uma séria limitação para a antibiótico terapia (CARVALHO-ASSEF et al., 2013; ROZALES et al., 2014). Por outro lado, a detecção dos genes *bla*_{imp} e *bla*_{vim} permanece escassa no continente sul americano. O gene *bla*_{IMP1} foi descrito, pela primeira vez, em *K. pneumoniae* na América Latina em um isolado clínico de um hospital em São Paulo, 2003 (LINCOPAN et al., 2005). Penteadó e colaboradores (2009) reportaram, pela primeira vez, na Colômbia a emergência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de VIM. No Brasil, *bla*_{VIM} foi detectado em seis isolados clínicos distintos geneticamente (CABRAL et al., 2012). Desta forma, o monitoramento de outras linhagens bacterianas é justificado, considerando a conhecida associação de *bla*_{VIM} com elementos genéticos móveis, o que poderia levar à emergência de cepas de *K. pneumoniae* coproduzindo KPC e VIM, como descrito na Grécia (GIAKKOUPÍ et al., 2009; MONTEALEGRE et al., 2011).

Na presente investigação, foram detectadas cepas de *E. coli* carreando três diferentes genes e *K. pneumoniae* com até quatro genes responsáveis pela produção de diferentes beta-lactamases. Resultados similares foram observados em 24 cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, em Recife. Onze isolados carreavam até três genes de resistência e dois isolados apresentavam *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M-2} e *bla*_{KPC} simultaneamente. O acúmulo de genes provoca limitações às opções terapêuticas disponíveis para infecções causadas por *K. pneumoniae* e *E. coli* (CABRAL et al., 2012).

O monitoramento visando o controle da transmissão de bactérias relacionadas com surtos de infecções hospitalares inclui a identificação de genótipos predominantes a fim de verificar a presença de grupos clonais (JALALUDDIN et al. 1998), que servem não só para uma avaliação epidemiológica, mas também para a detecção das fontes de contaminação ou ainda avaliação da endemicidade microbiana em determinado ambiente. Diversos estudos epidemiológicos têm sido realizados associando fenótipos resistência aos genótipos, clones específicos e sua capacidade de disseminação (TOSIN et al., 2003; PEREIRA et al., 2013).

Neste estudo, foi determinada a avaliação da diversidade genética, pela ERIC-PCR em isolados que apresentaram pelo menos um gene de resistência aos antimicrobianos (68 *K. pneumoniae* e 41 de *E. coli*).

Análises pela ERIC-PCR apresentaram poder discriminatório satisfatório, durante a investigação de surtos de *K. pneumoniae* e *E. faecium* produtores de ESBL (CARTELLE *et al.*, 2004; VALENZUELA *et al.*, 2010). Como não existem recomendações universais para a interpretação dos padrões de identidade gerados pela ERIC-PCR, como para o PFGE, alguns autores consideraram todas as informações fenotípicas e genotípicas relacionadas aos isolados de *K. pneumoniae* durante a interpretação do dendograma derivado dos perfis de ERIC-PCR, para uma avaliação epidemiológica mais segura (TENOVER *et al.*, 1995; TOLENTINO, 2009).

Em nosso estudo, verificamos uma grande variabilidade genética entre os isolados de *K. pneumoniae*, demonstrando pequena relação epidemiológica entre eles. Os 68 isolados de *K. pneumoniae* foram distribuídos em seis grandes grupos, demonstrando perfis genéticos distintos com no máximo 50% de similaridade, o que sinaliza a presença de alterações relacionadas à ocorrência de pelo menos três eventos genéticos independentes. Apesar disso, verificamos cepas com percentual de similaridade acima de 90% (KP15 e KP37; KP12 e KP34; KP43 e KP28; KP27 e KP45), apesar de apresentarem similaridade mostraram características distintas em relação à susceptibilidade aos antibióticos e ao perfil de genes de resistência.

Um estudo com 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, realizado em Recife, em 2012, revelou também grande diversidade entre cepas de *K. pneumoniae*. Foram observados perfis com no máximo 60% de similaridade em 18 isolados analisados. Contudo, seis cepas apresentaram o mesmo padrão por ERIC-PCR, indicando disseminação clonal no hospital onde foi desenvolvida a pesquisa (CABRAL *et al.*, 2012). Por outro lado, Melo (2013) não detectou relação clonal entre com 44 isolados de *K. pneumoniae*, porém, muitos dos isolados apresentaram o mesmo perfil de resistência aos antibióticos. Do mesmo modo, Lim e colaboradores (2009) observaram grande diversidade e heterogeneidade entre isolados hospitalares de *K. pneumoniae*, na Malásia.

A ERIC-PCR classificou nossos isolados de *E. coli* em 37 perfis distintos, mostrando significativa diversidade genética. Entretanto, o perfil P1 (Ec36, Ec37 e Ec17); P2 (Ec3 e Ec5); P3 (Ec4 e Ec2) e P4 (Ec15 e EC16) possuem cepas idênticas e, portanto, formam quatro clones com dois ou três isolados. Os isolados Ec36 e EC37 apresentaram somente *bla*_{TEM-1}, enquanto Ec17 apresentou também *bla*_{CTXM-15}, além de perfis de resistência idênticos, exceto EC17 que apresentou resistência à

ciprofloxacina. As cepas do Perfil P2 (Ec3 e Ec5) apresentam somente *bla*_{TEM-1} e os perfis de resistência similares com exceção da resistência à ciprofloxacina em Ec5. Já os perfis P3 e P4 mostraram resistência aos antimicrobianos mais variável entre as cepas de cada um.

Recentemente, Durmaz e colaboradores (2015) estudando 42 isolados de *E. coli* de origem clínica produtoras de ESBL e também resistentes a quinolonas, evidenciaram, através de ERIC-PCR 5 a 6 grupos clonais e a presença dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}. Esses autores ressaltaram, ainda, que a maioria das cepas que carregavam CTX-M, também apresentavam SHV e TEM. Inúmeros padrões de bandas em cepas clínicas de *E. coli* também foram observadas em 230 isolados onde 187 (81,3%) mostraram perfis únicos (RAMAZANZADEH et al., 2013).

Os dados obtidos no presente estudo ressaltam a importância de culturas de vigilância como ferramenta preventiva, destacando-se a necessidade de identificação de mecanismos de resistência e genes envolvidos, que poderão colaborar com a prevenção da crescente e relevante multirresistência bacteriana.

Finalmente, a adoção de medidas de controle e prevenção de IRAS na admissão de pacientes e em culturas semanais, é destacada como ferramenta valiosa na detecção precoce e monitoramento não só surtos, mas também na rotina hospitalar, incluindo a capacitação constante dos profissionais, com o apoio das Comissões de Controle de Infecção Hospitalar.

6. CONCLUSÃO

As abordagens fenotípica e molecular utilizadas nesse estudo foram de fundamental importância na caracterização das culturas de vigilância de *E. coli* e *K. pneumoniae*.

Os isolados bacterianos apresentaram altos níveis de resistência aos antibióticos, inclusive às cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos carbapenêmicos o que mostra a relevante contribuição deste estudo para a adoção das medidas de prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde.

Um dos dados mais relevantes desta pesquisa é a revelação da situação atual das culturas de vigilância em relação à resistência aos antibióticos e variabilidade genética de *E. coli* e *K. pneumoniae*, apresentando diferentes perfis gênicos de resistência, em um hospital no Rio de Janeiro.

As técnicas moleculares permitiram a detecção de inúmeros genes codificantes de resistência a antibióticos de amplo espectro utilizados na prática médica. Esses dados alertam para a necessidade urgente de medidas preventivas quanto à disseminação de organismos multidroga resistentes no ambiente hospitalar, assim como para a manutenção das práticas de monitoramento e vigilância.

O presente estudo mostrou grande diversidade genotípica em *E. coli* e *K. pneumoniae*, sugerindo a presença de alta plasticidade genômica, possivelmente mediada pela transferência lateral de genes de resistência.

Apesar de algumas limitações em relação ao número de genes pesquisados, até onde é de nosso conhecimento, este é o primeiro estudo envolvendo a resistência e a variabilidade genética de culturas de vigilância de origem fecal, no Rio de Janeiro.

Como conclusão final, destacamos a necessidade de medidas mais eficientes quanto ao uso racional de antibióticos o que trará benefícios econômicos e qualidade de vida ao paciente.

REFERÊNCIAS

- ABRAAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Rev Infect Dis**, v. 146, p. 837, 1944.
- AHMED,N.; DOBRINT,U.; HACKER,J.; HASNAIN,E.S. Genomic fluidity and pathogenic bacteria: Applications in diagnostics, epidemiology and intervention. **Nat Rev Microbiol**, v. 6, n. 5, p. 387- 394, 2008.
- AKPAKA,P.E.; LEGALL,B.; PADMAN,J. Molecular Detection and Epidemiology of Extended-Spectrum β -lactamase Genes Prevalent in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *E coli* from Trinidad and Tobago. **West Indian Med J**, v.59, n.6, 2010.
- ALMEIDA,M.I.; BEDENDOLL,J.; DANGUY,E.; CAVASINLL,A.; TOGNIM,B.C.M. Prevalência e perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* isoladas de casos clínicos de infecções hospitalares. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.9, n.2, p. 489-95, 2007.
- ALMEIDA,A.C.; CAVALCANTI,S.L.P.; WILLMES,M.B.M.; VILELA,A.M.; GALES,C.A.; MORAIS,A.M.; MORAIS,C.M.M. First description of KPC-2-producing *Klebsiella oxytoca* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**,v.57,n.8, p. 4077-8,2013.
- ALMEIDA,A.C.; CAVALCANTI,S.L.P.; WILLMES,M.B.M.; VILELA,A.M.; GALES,C.A.; MORAIS,A.M.; MORAIS,C.M.M. First description of KPC-2-producing *Pseudomonas putida* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.4, p. 2205-6, 2012.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Uso Racional de Medicamentos – temas selecionados 2012 .Brasília,DF. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Pos+++Comercializacao++Pos+-+Uso/Fiscalizacao/Assunto+de+Interesse/Propaganda/Propaganda+antigo/Assunto+de+Interesse/Publicacoes>. Acesso em 20 jan. 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano IV Edição nº 7 de 10 de março de 2014. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/8337fd8046dcee9992abfe2e64280806/Boletim+9+vers%C3%A3o+alterada+em+08+01+2014.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 jan. 2015.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobacterias Multirresistentes.Nota Técnica nº01/2013. Brasília,DF.Disponível em:
[http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013\(1\).pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/ea4d4c004f4ec3b98925d9d785749fbd/Microsoft+Word+-+NOTA+T%C3%89CNICA+ENTEROBACTERIAS+17+04+2013(1).pdf?MOD=AJPERES). Acesso em 20 jan. 2015.

ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Assistência segura: uma reflexão teórica aplicada à prática. Série: Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Brasília, DF. Disponível em: http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/livros/Livro1-Assistencia_Segura.pdf. Acesso em 20 jan. 2015.

ANVISA- Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Critérios diagnósticos de infecção relacionada à assistência à saúde. Série: Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Brasília, 2013b. Brasília, DF. Disponível em: http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/0SEGURANCA_DO_PACIENTE/modulo3.pdf>. Acesso em 20 jan. 2015.

ANVISA. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Medidas de prevenção de infecção relacionada à assistência a saúde. Série: Segurança do paciente e qualidade em serviços de saúde. Brasília, 2013c. Brasília, DF. Disponível em: <http://www20.anvisa.gov.br/segurancadopaciente/images/documentos/livros/Livro4-MedidasPrevencaoIRASaude.pdf> . Acesso em 20 jan. 2015.

ANVISA. Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde- Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica. 2013d. Brasília, DF. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/Anvisa+Portal/Anvisa/Inicio/Servicos+de+Saude/Assunto+de+Interesse/Aulas+Cursos+Cartazes+Publicacoes+e+Seminarios/Controle+de+Infeccao+em+Servicos+de+Saude/Manuais/Manual+de+Microbiologia+Clinica+para+o+Controle+de+Infeccao+Relacionada+a+Assistencia+a+Saude>. Acesso em 20 jan. 2015.

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Comunicado de Risco no 001/2013, de 3 de dezembro de 2013. Circulação de micro-organismos com mecanismo de resistência denominado "New Delhi Metalobetalactamase" ou NDM, na região das Américas, Brasília, DF, 2013. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/b659c2004f8f0958835ff79a71dcc661/Comunicacao%20de+Risco+n+1+2013+sobre+NDM-1%5B1%5D.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 20 jan. 2015.

ARDANUY,C.; LIÑARES,J.; DOMINGUEZ,M.A.; HERNANDEZ.A.S.; BENEDI,V.J.; MARTINEZ.M.L. Outer membrane profiles of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates from clinical samples and activities of cephalosporins and carbapenems. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.42, p.1636-40, 1998.

BARGUIGUA, A.; OTMANI, F., TAIMI, M.; REGUIG, A.; JAMALIL,L.; ZEROUALI,K.; MOHAMMED,T. Prevalence and genotypic analysis of plasmidmediatedb-lactamases among urinary *Klebsiella pneumoniae* isolates in Moroccan community. **The Journal of Antibiotics**, v.66, p.11–16, 2013.

BAYRAM,A.; BALCI,A. Patterns of antimicrobial resistance in a surgical intensive care unit of a university hospital in Turkey. **BMC Infect Dis**,v. 6,p.155,2006.

BEJ, K.A.; DICESARE, L.J.; HAFF, L.; ATLAS,M.R. Detection of *Escherichia coli* and *Shigella*. In Water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid .**Applied and environmental microbiology**,v.57,n.4,p.1013-1017,1991.

- BLAIR,A.M.J.; WEBER,A.M.; BAYLAY,J.; OGBOLU,O.D.; PIDDOCK,V.J.L.
Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v.13, p.42–5, 2015.
- BONNET,R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48,p.1-14, 2004.
- BONTEN,M.J.M.; HARIHARAN,R.; WEISNTEIN,R.A. *Enterobacteriaceae*. In: Mayhall CG (ed). **Hospital Epidemiology and Infection Control**, p.407-430,1999.
- BOUCHER,H.W.; ALBOT,G.H.; BRADLEY,J.S.; EDWRDS,J.E.; GILBERT,D.; RICE,L.B.; SCHELD,M.; SPELLBERG,B.; BARLETT,J. Bad bugs, no drugs:no ESKAPE! An update from the Infectious Diseases Society of America. **Clin Infect Dis**, v.48, n.1, p.1-12, 2009.
- 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. Ministério da Saúde. Portaria nº 196, de 24 de junho de 1983. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 24 jun. 1983.Disponível em:
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2012/prt0196_6_02_2012.html
Acesso em 20 jan. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Lei nº 9.431, de 6 de janeiro de 1997. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção de programa de controle de infecções hospitalares pelos hospitais do País. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, jan. 1997. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/Leis/L9431.htm . Acesso em 20 jan. 2015.
- BRASIL. Lei nº 8.080, de 19 de setembro de 1990. Dispõe sobre as condições para a promoção, proteção e recuperação da saúde, a organização e o funcionamento dos serviços correspondentes e dá outras providências. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 19 set. 1990. Disponível em:
http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/l8080.htm.
Acesso em 20 jan. 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº. 2.616, de 12 de maio de 1998. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, mai. 1998. Disponível em: http://www.saude.mg.gov.br/images/documentos/portaria_2616.pdf.
Acesso em 20 jan. 2015.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. Nomenclature of TEM β -lactamases.**Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.39, p.1-3,1997.
- BUSH, K. Alarming β -lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Current Opinion in Microbiology**, v.13, p.558–564, 2010.

BUSH,K.; JACOBY,A.G. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant β –Lactamases.Lahey Clinic. Disponível em: <http://www.lahey.org/Studies/other.asp>. Acesso em 20 jan. 2015.

BUSH,K.; JACOBY,A.G. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969-76, 2010.

BUSH,K.; JACONY,G.; MEDEIROS,A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial agents and chemotherapy**,v. 39,n.6,p1211-1233,1995.

CABRAL,B.A.; MELO,V.A.M.; LOPES,S.C.A. Multidrug resistance genes, including *bla*_{KPC} and *bla*_{CTX-M-2}, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**,v.45,n.5,p. 572-578, 2012.

CAI,J.C.; YANG,W.; HU,Y.Y.; ZHANG,R.; ZHOU,H.W.; CHEN.G.X. Deteccion of KPC-2 and qnrS1 in clinical isolates of *Morganella morganii* from China. **Diagn Microbiol and Infect Dis**,v.73,n.2,p. 207-9,2012.

CALFEE, D.; JENKINS, S.G. Use of active surveillance cultures to detect asymptomatic colonization with carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in intensive care unit patients. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 10, May, p. 966-8, 2008.

CÂNDIDO, R.B.R.; SOUZA, A.W.; PODESTÁ, C.M.H.M.; ROCHA, R.J.; SIQUEIRA, S.M.V.; SOUZA,M.V.;SOUZA,C.W.; PEREIRA,S.A.C.; FERREIRA,B.E. Avaliação das infecções hospitalares em pacientes críticos em um Centro de Terapia Intensiva. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 10, n.2, p.148-163, 2012.

CANTON,R.; COQUE,T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**,v.9,n.5,p. 466-75,2008.

CANTON,R.; GONZALES-ALBA,J.M.; GALAN,J.C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Front Microbiol**,v.3, n.110,p.1-19,2012.

CARNEIRO,M.; FERRZ,T.; BUENO, M.; KOCK ,B.E.; FORESTI ,C.; LENA, V.F, MACHADO,J.;RAUBER,J.M.; KRUMMENAUER,E.C.; LAZAROTO,D.M. Antibiotic prescription in a teaching hospital: a brief assessment .**Revista da Associação Médica Brasileira**,v.57,n.4,p. 421-4,2011.

CARTELLE,M.; DEL MAR,T.; PERTEGA,S.; BECEIRO,A.; DOMINGUEZ,M.A.; VELSCO,D.; MOLINA,F.; VILLANUEVA,R.; BOU,G. Risk factors for colonization and infection in a hospital outbreak caused by a strain of *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins. **J Clin Microbiol**, v. 42,n. 9, p. 4242-9, 2004.

CARVALHO,R.H.; GONTIJO,F. Epidemiologically relevant antimicrobial resistance phenotypes in pathogens isolated from critically ill patients in a Brazilian University Hospital. **Braz. J. Microbiology**,v.39,n.4,p. 623-30,2008.

CARVALHO-ASSEF,AP.; PEREIRA,P.S.; ALBANO,R.M.; BERIÃO,G.C.; CHAGAS,T.P.; TIMM,L.N.; DA SILVA,R.C.; FALCI,D.T.; ASENSI,M.D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in **Brazil**. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.12, p.2956-2957, 2013.

CASELLAS, J.M. Resistencia a los antibacterianos en América Latina: consecuencias para la infectología. **Rev Panam Salud Publica. Washington**, v.30, n.6, p.519-528, 2011.

CATANEO, C.; CANINILL,S.M.R.S.; OLIVEIRA.T.P.; HAYASHIDAL,M.; ELUCIDIR,G. Avaliação da sensibilidade e da especificidade dos critérios para isolamento de pacientes admitidos em um hospital especializado em oncologia. **Rev. Latino-Am. Enfermagem**, v.19, n.5, p.1072-1079, 2011.

CLARK, A.M.; FINKEL,R.; REY,A.J.; WHALEN,K. Farmacologia Ilustrada. 5ed. Editora Artmed ,2013.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S24CLSI, Wayne, PA, 2014.

COELHO,A.; GONZALEZ-LOPES,J.J.; MIRO,E.; ALONSO- TARRES,C.; MIRELIS.B.; LARROSA,M.N.; BARTOLOMÉ.R.M.; ANDREU,A.; NAVARRO,F.; JOHNSON,J.R.; PRATS,G. Characterization of the CTXM-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area plasmid diversity and chromosomal integration.**Int J.Antimicrob Agents**,v.36,p.73-78,2010.

COOKSEY,R.C. Mechanisms of Resistance to Antibacterial Agents. **Principles of Medical Biology**,v.9,p. 199-214,1997.

COQUE, T. M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe.**Eurosurveillance**, v. 13, n 47, p. 1-11, 2008.

CORTES,J.A.; GARZÓN,D.C.; NAVARRETE,J.A.; CONTRERAS,K.M. Impact of inappropriate antimicrobial therapy on patients with bacteremia in intensive care units and resistance patterns in Latin America. **Revista Argentina de Microbiología**, v.42,p. 230-234,2010.

COSTA, M.M; SILVA, M.S; SPRICIGO, D.A; WITT, N.M; MARCHIORO, S.B; KOLLING, L.; VARGAS, A.P.C. Caracterização epidemiológica, molecular e perfil de resistência aos antimicrobianos de *Escherichia coli* isoladas de criatórios suínos do sul do Brasil. **Pesq Vet Bras**, n.26, p.5-8, 2006.

COSTA,D.A.I.S. Disseminação Horizontal de Genes que Codificam para β -Lactamase de Espectro Alargado em Isolados de *Enterobacteriaceae* de Origem Hospitalar.2013. 67f. Tese (Mestre em Ciências Farmacêuticas)-Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, 2013.

CURCIO,D.J. Antibiotic prescription in intensive care units in Latin America. **Revista Argentina de Microbiologia**, v.43,n.3,p. 203-11,2011.

DA SILVA, G.; MENDONCA, N. J. Association between antimicrobial resistance and virulence in *Escherichia coli*. **Virulence**, v.3, n.1, p.18-28. 2012.

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

DAROUKH,A.; DELAUNAY,C.; BIGOT, S.; CECI, J.M.; SIDDHOUN ,N BUKREYEVA,I.; PORCHERET,H.; MAISONNEUVE,L.; BOUDOUYRE,M.A. Characteristics and costs of carbapenemase-producing enterobacteria carriers. **Médecine et maladies infectieuses**,v. 44 ,p. 321–326, 2014.

DAVIES, J.; DAVIES D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**.v. 74,n. 3, p. 417-33, 2010.

DELFIOL,F.S.; LOPES,L.C.;TOLEDO,M.I.;BARBERATO-FILHO,S.Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43,n.1, p. 68-72, 2010.

DIENSTMANNI, R.; PICOLI, S. U.; MEYER, G.; SCHENKEL, T.; STEYER,J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v.46 n.1,2010.

DRAWZ,S.M.; BONOMO,R.A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev**,v.23,n.1,p.160-201,2010.

DROPA,M. Disseminação da resistência a antimicrobianos em cepas clínicas e ambientais de *Enterobacteriaceae* identificação e mapeamento do ambiente genético de genes codificadores de ESBL. 2013.106 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública)– Faculdade de Saúde Pública da USP , São Paulo,2013.

DURMAZ,S.; BUYUKUNAL,B.E.; GUNAYDIN,M.; YULA,E.; PERCIN,D. Detection of β -lactamase genes, ERIC-PCR typing and phylogenetic groups of ESBL producing quinolone resistant clinical *Escherichia coli* isolates.**Biomedical Research**,v.26,n.1,p. 43-50,2015.

DŽIDIĆ, S.; ŠUŠKOVIĆ, J.; KOS. B .Antibiotic Resistance in Bacteria. **Food Technol Biotechnol**, v.46,n.1,p. 11–21,2008.

DZIERZANOWSKA, D et al. Carriage of genes for various extended-spectrum β -lactamases: a novel resistance strategy of *Klebsiella pneumoniae* in Poland, **International Journal of Antimicrobial Agents**,n 35,p 392-395,2010.

ECDC, EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Point prevalence survey of health care associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals: 2011-2012**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>. Acesso em 20 jan. 2015.

ECKERT,C.; GAUTIER, V.; SALDIN-ALLARD,M.; HIDRI,N.; VERDET,C. Dissemination of CTX-M-type beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Paris, France. **Antimicrob. Agents. Chemother**, v.48,p. 1249-1255,2004.

EJAZ,I.U.H.; SAQUIB,M.; AIZZA,Z.; MUHAMMAD,M.J. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Comparison of phenotypic characterization methods. **Pak J Med Sci**,v.29,n.3,2013.

ELGORRIAGA-I,E.; GUGGIANA-N.P.; DOMINGUEZ-Y,M.; GONÇALEZ-R.G.; MELLA-M.S.; LABARCA-L.J.; GARCIA.C.P.; BELLO,T.H. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinant aac (6')-Ib-cr among ESBL producing enterobacteria isolates from Chilean hospitals. **Enferm Infec Microbiol Clin**,v.30,p. 466–468,2012.

FERNANDES, A.T. Infecção Hospitalar e suas Interfaces na Área da Saúde.1ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FERNANDEZ, L.; BREIDENSTEIN,E.B.; HANCOK,R.E. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug Resist Updat**, v.14, n.1, p.1-21. 2011.

FERNANDEZ, L.HANCOCK, R. E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clin Microbiol Ver**, v.25, n.4, p.661-681. 2012.

FERREIRA,R.S.; BEZERRA,C.M.F. Atuação da comissão de controle infecção hospitalar (CCIH) na redução da infecção: Um estudo no Hospital da Criança Santo Antônio. **Norte Científico-Periódico de divulgação científica do IFRR**, v.5, n.1, dez,2010.

FOXMAN, B. The epidemiology of urinary tract infection. **Nat Rev Urol**,v.7,p. 653-60,2010.

FUURSTED,K.; SCHOLER,L.; HANSEN,F.; DM,K.; BOJER,M.S.; HAMMERUM,A.M.; DAGNAES- HANSEN,F.; OLSEN,A.; JASEMIAN,Y.; STRUVE,C. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo- β lactamase-1 (NDM-1). **Microbes Infect**, v.14, n.2, p.155-158. 2012.

GALES,A.C.; CASTANHEIR,M.; JONES,R.N.; SADER,H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**,v.73,n.4,p. 354-60,2012.

GARCIA,C.S.; GÁNDARA,M.P.; GARCIA,F.J.C. β -lactamases de espectro extendido em enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica**,v.28,n.1,p.12-18,2010.

GHAFOURIAN,S.; NOUKHODA,S.; SEKAWI,Z.; NEELA,K.V. Antimicrobial Pattern and Clonal Dissemination of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella* spp Isolates. **American Journal of Infectious Diseases**,v. 6 ,n.4,p. 110-121, 2010.

GIAKKOUI, P.; PAPP, O.; POLEMIS, M.; VATOPOULOS, A. C. Emerging *Klebsiella pneumoniae* Isolates Coproducing KPC-2 and VIM-1 Carbapenemases. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53,n. 9, p. 4048–4050, 2009.

GILLINGS,M.; HOLLEY,M. Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. **Letters in Applied Microbiology**,v.25,p. 17–21,1997.

- GOREN,M.G.; CARMELLI,Y.;SCHWABER,M.J.;CHMELNITSKY,I.; SCHECHNER,V.;NAVON-VEZEZI,S. Transfer of Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to Escherichia coli in Patient. **Emerg Infect Dis**,v.16,n.6,p. 1014–1017,2010.
- GREENWOOD,D. Antimicrobial Chemotherapy.**Journal of antimicrobial chemotherapy**,v.47,p.731-733, 2000.
- GRUPTA,N.; LIMBAGO,B.M.; PATEL,J.B.; KALLEN,A.J. Carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: epidemiology and prevention. **Clin Infect Dis**,v.53,n.1,p.60-7,2011.
- GUIMARÃES,O.D.; MOMESSO,S.L.; PUPPO,T.M. Antibióticos:importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Quím. Nova**,v.33, n.3, 2010.
- GUNTER,S.; KOHLER,C.; STEINMETZ,I.;PFEIFER,Y.; ELLER,C.; GASTMEIER,P.; SCHWAB,F.; LEISTNE.R. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-positive *Klebsiella pneumoniae* from bloodstream infections and risk factors for mortality. **J Infect Chemother**,v.20.n.12,p. 817-9,2014.
- HARRIS,A.N.P.; TAMBYAH,A.P.; PATERSON,L.D. β -lactam and β -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum β -lactamase producing Enterobacteriaceae: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options?. The **Lancet Infectious Diseases**, V.15,n.4,p. 475-485,2015.
- HEESEMAN,J. Mechanisms of resistance to β -lactam antibiotics. **Infection**, 21, S4–S9,1993.
- INCQS – Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde. 2013. MANUAL DA QUALIDADE. Pesquisa de Patógenos em Produtos não Estereis.rev.18. in: Manual da Qualidade. Rio de Janeiro: INCQS / FIOCRUZ,2013. Seção 10 (65.3210.008).
- JACOB,G. β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. Disponível em: [http://www.lahey.org/studies/Lahey Clinic](http://www.lahey.org/studies/Lahey%20Clinic). Acesso em 20 jan. 2015.
- JACOBY, G. A. β -Lactamase Nomenclature – Minireview. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.4, p.1123-1129, 2006.
- JACOBY,G.A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol**, v.22, n.1, p.161-82,2009.
- JACOME,P.R.; ALVES,L.R.; CABRAL,A.B. ;LOPES,A.C.S.; MACIEL,M.A.V. First report of KPC-producing *Pseudomonas aeruginosa* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother** ,v.56, n.9, 2012.
- JALALUDDIN,S.; DEVASTER,S.; DEVASTER,J.M.; SHEEN,R. ;GERARD,M.; JEAN-PAUL,B. Molecular epidemiological study of nosocomial Enterobacter aerogenes isolates in a belgian hospital. **J Clin Microbiol**,n. 36,p. 1846-1852, 1998.
- JEMINA,S.A.; VERGHESE,S. Multiplex PCR for *bla*(CTX-M) & *bla*(SHV) in the extended spectrum beta lactamase (ESBL) producing gram-negative isolates. **Indian J Med Res**,v.128,n.3,p. 313-7,2008.

- KANOMORI,H.; NAVARRO,R.B.; YAHO,H.; SOMBRERO,L.T.; CAPEPING,M.R.; LUPISAN,S.P.; OLVEDA,R.M.; ARAI,K.;KUNISHIMA,H.; HIRAKATA,Y.; KAKU,M. Molecular characteristics of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae from the Philippines. **Acta Tropical**,n 120, p.140-145,2011.
- KHOSRAVI, D.A.; HOVEIZAVI, H.; MEHDINEJAD, M. Prevalence of *Klebsiella pneumoniae* Encoding Genes for Ctx-M-1, Tem-1 and Shv-1 Extended-Spectrum Beta Lactamases (ESBL) Enzymes in Clinical Specimens. **Jundishapur J Microbiol**,v.6,n.10, 2013.
- KIRBY, W.M.M. Extraction of a highly potent penicillin inactivator from penicillin resistant staphylococci. **Science**,v. 99,p.452-453, 1944.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M .Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido 6 ed. Rio de Janeiro: Medisi; 2008.
- KONG, K. F.; SCHNEPER,L.; MATHEE,K.Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v.118, n.1, p.1-36. 2010.
- LARA, F.; OLMO-IRUELA, M. D.; CRUCES-BLANCO, C.; QUESADA MOLINA, C.; GARCIA-CAMPANA, A. M. Advances in the determination of β -lactam antibiotics by liquid chromatography. **Trends in Anal Chem**,v.38,p.52-55,2012.
- LASCOLS,C.; HACKEL,M.; HUJER,A.M.; LASCOLS,C.; HACKEL,M.; HUJER,A.M.; MARSHALL,S.; BOUCHILLON,S.K.; HOBAN,D.J.; HAWSER,S.P.; BADAL,E.R.; BONOMOC ,R.A. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel β -lactamases: a snapshot of extended-spectrum b-lactamases trough the world. **J Clin Microbiol**,v.50,n.5,p.1632-9,2012.
- LIM ,K.T.; YASIN, R.; YEO, C.C.; PUTHUCHEARY, S.;THONG, K.L. Characterization of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolates from hospitals in Malaysia. **J. Biomed. Biotechnol**, 2009.
- LINCOPAN, N.; MCCULLOCH, J.A.; REINERT, C.; CASSETTARI, V.C.; GALES, A.C.; MAMIZUKA, E.M. First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in **Brazil**. **J. Clin. Microbiol**,v.43,p. 516–519,2005.
- LIU,C.; ZHENG,W.; YU,J.; GAO,Q.; HOU,Y.; HUANG,X. PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S–23S internal transcribed spacer. **International Journal of Food Microbiology**,v.125,p.230–235,2008.
- LIVERMORE,D.M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**,v.39,n.4,p. 283-94,2012.
- LUI,Y.; YANG,J.; ZHANG,Y.; YE,L.; WANG,L.; GUO,L. Prevalence of β -lactamases and 16S rRNA methylase genes amongst clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying plasmid-mediated quinolone resistance determinants. **Int J Antimicrob Agents**,v.37,p. 352–355,2012.
- MAIEN,M.C.J.; BYGRAVES,J.A.; FEIL,E.; MORELLI.; RUSSEL,J.E.; URWIN,R.; ZHANG,Q.; ZHOU,J.; ZURTH,K.; CAUGANT,D.A.; FEAVERS,I.M.; ACHTMAN,M.;

SPRATT,B.G. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 95, p. 3140–3145, 1998.

MARTINEZ,J.; BARQUERO,F. Interactions among Strategies Associated with Bacterial Infection: Pathogenicity, Epidemicity, and Antibiotic Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, p 647-679,2002.

METZKER,S.F. Análise molecular da frequência dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC} em Bactérias Gram Negativas isoladas de hemoculturas de pacientes do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás. 2013.51 f. Tese (Mestrado em Medicina Tropical e Saúde Pública)- Universidade Federal de Goiás, Goiás,2013.

MIRIAGOU,V.; CORNAGLIA,G.; EDELSTEIN,M.; GNIDKOWSKI,M.; MALAMOU-LADA,E.; MARTINEZ,L.; NAVARRO,F.; NORDMANN,P.; PEIXE,L.; POURNARAS,S.; ROSSOLINI,G.M.; TSAKRIS,A.; VATAPOULOS,A.; CANTON,R. Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clin Microbiol Infect**, v.16,n.2,p. 112-22,2010.

MOHR,J.F. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. **Clinical Infectious Disease**,v.15,N.9,P.41-45,2008.

MONTEALEGRE, M.C.; CORREA, A.; BRICENO, D.F.; ROSAS, N.C.; DE LA, C.E.; RUIZ, S.J.; MOJICA,M.F.;CAMARGO, R.D.; ZULUAGA, I.; MARIN, A.;QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V. Novel VIM metallo-beta-lactamase variant, VIM-24, from a *Klebsiella pneumoniae* isolate from Colombia. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, p. 2428–2430, 2011.

MONTEIRO,J.; SANTOS,A.F.; ASENSI,M.D.; PEIRANO,G.; GALES,A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**,v. 53,p 333–4,2009.

MOOSAVIAN,M.; DEIHAN,B. Distribution of TEM, SHV and CTX-M Genes among ESBL-producing Enterobacteriaceae isolates in Iran. **African Journal of Microbiolog**, v. 6,n.26,p. 5433-5439, 2012.

MORGAN,D.J.; DAY,H.R.; FURUNO,J.P.; YOUNG,A.; JOHNSON,J.K.; BRADHAM,D.D.; PERENCEVICH,E.N. Improving efficiency in active surveillance for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* or vancomycin-resistant *Enterococcus* at hospital admission. **Infect Control Hosp Epidemiol**,v.31,n.12,p.1230-5,2010.

MOSQUITO,S.; RUIZ,J.; BAUER,J.L.; OCHOA,T. Mecanismos Moleculares de Resistencia Antibiótica en *Escherichia coli* Asociadas a Diarrea. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v.28 n.4, 2011.

MULVEY,M. R.;GRANT, J. M.;PLEWES,K.,ROSCOE,D.;BOYD,D. A. New Delhi Metallo-β-Lactamase in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*,Canada. **Emerging Infectious Diseases** ,v.17,n.1,2011.

MUNOZ-PRICE,L. et al. Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect Dis**, v.13, n.9, p.785-796. 2013.

MURRAY,P.R.;ROSENTHAL,K.S.;PFALLER,M.A. Microbiologia Médica. 7ed. Editora Elseier,2014.

NAAS,T.; CUZON,G.; VILLEGAS,M.V.; LARTIGUE,M.F.; QUINN,J.P.;
NORDMANN,P. Genetic structures at the origin of acquisition of the β -lactamase *bla_{KPC}* gene. **Antimicrob Agents Chemother**,v. 52.p. 1257–63,2008.

NOGUEIRA, KEITE DA SILVA. Prevalência e Caracterização Molecular de β -lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em Enterobactérias isoladas no Hospital das Clínicas em Curitiba. [tese]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2011.

NOGUEIRA,R.M.J.; MIGUEL.S.F.L. Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde. **EPSJV,IOC**, v.4,p.221,2009.

NORDMANN,P.; GIRLICH,D.; POIREL,L. Detection of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* by use of a novel screening medium. **J Clin Microbiol**.v.50,n.8,p. 2761-6,2012.

NOWAKONSKI,V.A. et al. Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial. Recomendações da Sociedade Brasileira de Patologia Clínica/Medicina Laboratorial (SBPC/ML) :boas práticas em microbiologia clínica, 2015. Disponível em:
<http://www.sbpc.org.br/upload/conteudo/Microbiologia.pdf>. Acesso em 20 jan. 2015.

OLIVEIRA,A.C.; CARDOSO,C.S.; MASCARENHAS,D. Precauções de contato em Unidade de Terapia Intensiva: fatores facilitadores e dificultadores para adesão dos profissionais. **Rev Esc Enferm USP**,v.44,n.1.p. 161-165,2010.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS)/ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE (OPAS). Disponível em:
http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=269:vigilancia-sanitaria&Itemid=0. Acesso em 20 jan. 2015.

OVERDEST,I.; WILLEMSSEN,I.;ELBERTS.; VERHULST,C.; KLUYTAMAN,J. Laboratory Detection of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Enterobacteriaceae: Evaluation of Two Screening Agar Plates and Two Confirmation Techniques. **Journal of Clinical Microbiology**,n.49,p. 519-522,2011.

PAIM,P.S.R.; LORENZINI,E. Incidência Bacteriana e Resistencia Antimicrobiana de uma Instituição Hospitalar de Médio Porte da Região Nordeste do Rio Grande do Sul. **Biblioteca Lascasas**.v.9,n.3,2013.

PARUCKER, L. M. B. B. Epidemiologia das Infecções relacionada à Assistência à Saúde na grande Florianópolis, com ênfase em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2006. 177 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte,2010.

PATERSON,L.D.; BONOMO,A.L. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update. **Clinical Microbiology Reviews**,v.18,n.4.p. 657–686 ,2005.

PEIRANO,G.; VAN DER BIJ,A.K.; FREEMAN,J.L.; POIREL,L.; NORDANN,P.; COSTELLO,M.; TCHESNOKOVA,V.L.; PITOUT,J. The characteristics of *Escherichia coli* ST131 that produce extended-spectrum β -lactamases: global distribution of the H30-Rx sublineage. **Antimicrob Agents Chemother**,v.58,n.7,p3762-3767,2014.

PELEG,Y.A.; HOOPER,M.D. Hospital-Acquired Infections Due to Gram-Negative Bacteria.**N Engl J Med**, n.362,v.19,p. 1804–1813,2010.

PENTEADO, A.P.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.; GUIMARAES, T.; MAMIZUKA, E.M.; GALES,A.C. Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. **Diagn.Microbiol. Infect. Dis**, v. 63,n.1,p. 87-91, 2008.

PEREIRA,S.P.; ARAUJO,M.F.C.; SEKI,M.L.; ZAHNER,V.; CARVALHO-ASSEF,A. P.; ASENSI,D.M. Update of the molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brazil: spread of clonal complex 11(ST11, ST437 and ST340). **J Antimicrob Chemother**,v.68,n.2,p. 312–316,2013.

SCHLATTERER,K.; ENGELMANN,E.; SCHILLER,R.A.; FRANGENBERG,H.R.; STIEWE,D.; HOLFELDER,M.; WITTE,W.; NORDMANN,P.; POIREL,L. Emergence of OXA-48-Type Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae* in German Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p. 2125–2128,2011.

SIMAS.D.M.; BALDI,C.P.; LIMBERGER,I.I.; DA SILVA.R.C.F.; ANTOCHEVIS,L.C.; VIEIRA,F.J.; RIBEIRO,V.B.; MAGAGNIN,C.M.; ROZALES,F.P.; FALCI,D.R. Prevalência de carbapenemase em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clin Biomed Res**,v.34,n.1,2014.

PITOUT,J.; LAUPLAND,K. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**,n. 8, p. 159-166,2008.

POULOU, A.; VOULGARI, E.; VRIONI, G.; KOUMAKI, V.;XIDOPOULOS,G.; CHATZIPANTAZI,V.;MARKOU,F.;TSAKRIS,A.Outbreak Caused by an Ertapenem-Resistant, CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* Sequence Type 101 Clone Carrying an OmpK36 Porin Variant. **J Clin Microbiol**, v. 51,n. 10, p.3176–3182, 2013.

QUEENAN,M.A.; BUSH,K. Carbapenemase: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**.p. 440–458,2007.

QUEIROZ, R.; DA SILVA,L.M.; PIETRO,R.C.L.R.; SALGADO,H.R.N.S. Multirresistência microbiana e opções terapêuticas disponíveis. **Rev Bras Clin Med**, São Paulo.v.10,n.2,p. 132-8,2012.

RAMAZANZADEH,R.; ZAMANI,S.; ZAMINI,S. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)–PCR technique in Sanandaj hospitals. **Iranian jornal microbiology**, v. 5, n. 2,p. 126-131,2013.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. Farmacologia. 7.ed. São Paulo: Elsevier, 2012.

- ROSOVITZ, M.J.; MYRES, G.S.; MONGODIN, E.F.; FRICKE, W.F.; GAJER, P.; CRABTREE, J.; SEBAIHIA, M.; THOMSON, N.R.; CHAUDHURI, R.; HENDERSON, I.R.; SPERANDIO, V.; RAVEL, J. The pangenome structure of *Escherichia coli*: comparative genomic analysis of *E. coli* commensal and pathogenic isolates. **J Bacteriol**, v.190, n.20, p.6881-6893, 2008.
- REESE, A.M.; FREI, C.R, Burgess DS. Pharmacodynamics of intermittent and continuous infusion piperacillin/tazobactam and cefepime against extended-spectrum beta-lactamase-producing organisms. **Int J Antimicrob Agents**, v.26, n2, p.114-9, 2005.
- ROZALES, F. P.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M.; PAGANO, M.; LUTZ, L.; FALCI, D. R.; MACHADO, A.; BARTH, A L.; ZAVASCKI, A P. Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 25, p. 79–81, 2014.
- SAGA, T.; YAMAGUCHI, K. History of antimicrobial agents and resistant bacteria. **JMAJ**, v.52, n.2, p.103-108, 2009.
- SCARPATE, E.D.; COSSATIS, J. J. A presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde e Ambiente**, v.4, n.1, p.1-11. 2009.
- SEKI, L.M.; PEREIRA, P.S.; DE SOUZA, P.H.; CONCEIÇÃO, M.S.; MARQUES, E.A.; PORTO, C.O.; COLNAGO, E.M.; ALVES, C.F.; GOMES, D.; ASSEF, A.P.; ASENSI, M.D. Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagn Microbiol Infect Dis**.v. 70, p 274–7, 2011.
- SHAIKN, S.; FATIMA, J.; SHAKIL, S.; MOHD, S.; RIZVI, D.; KAMAL, A.M. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v.22, p.90–101, 2014.
- SIEVERT, D.M.; RICKS, P.; EDWARDS, J.R.; SCHNEIDER, A.; PTEL, J.; SRINIVASAN, A.; KALLEN, A.; LIMBAGO, B.; FRIDKIN, S. National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention. v.34, n.1, p.1-14, 2013.
- SILBERT, S.; BOYKEN, L.; HOLLINS, R.J.; PFALLER, M.A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.47, n.4, p.619-21, 2003.
- SILVA, A.R.; WERNECK, L.; HENRIQUES, T.C. Dinâmica da circulação de bactérias multirresistentes em unidades de terapia intensiva pediátrica do Rio de Janeiro. **Rev Epidemiol Control Infect**, v.2, n.2, p.41-45, 2012.
- SILVA, J.; GATICA.; AGUILAR, C.; BECERRA, Z.; GARZA-RAMOS, U.; VELAZQUEZ, M.; MIRANDA, G.; LEAÑOS, B.; SOLÓRZANO, F.; ECHÁNIZ, G. Outbreak of infection with Extended Spectrum Beta lactamase- Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Mexican Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, 39, n.9, p-3193-6, 2001.

STALDER,T.; BARRAUD,O.; CASELLA,M.; DAGOT,C.; PLOY,M.C. Integron involvement in environmental spread of antibiotic resistance. **Front Microbiol**,v.3,p. 3:119,2012.

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. 2233–9,1995.

TENOVER,F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control**,v.34,n.5,p.3-10,2006.

TOLEMAN,M.A.; BENNETT,P.M.; WALSH,T.R. ISCR Elements: Novel Gene-Capturing Systems of the 21st Century?. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, p. 296–316,2006.

TOLENTINO,M.F. Detecção e Identificação dos genes de beta-lactamases *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo. 2009, 66 f. Tese (Mestrado em Microbiologia)- Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, Campus São José do Rio Preto, São Paulo,2009.

TORTORA,J.G.;FUNKE,R.B.;CASE,L.C.Microbiologia.10 ed;artmed,2012.

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.**The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.360-369. 2003.

TOUCHON,M.; HOEDE,C.; TENAILION,O.; BARBE,V.; BAERISWYL,S.; BIDET,P.; BINGEN,E.; BONACORSI,S.; BOUCHIER,C.; BOUVET,O.; CALTEAU,A.; CHIAPELLO,H.; CLERMONT,O.; CRUVEILLER,S.; DANCIN,A.; OTHERS AUTHORS .Organised genome dynamics in the *Escherichia coli* species results in highly diverse adaptive paths. **PLoS Genetics**, v.5,n.1,2009.

TRABULSI ,L.R.;ALTERTHUM,F.; COMPERTZ,O.F.;CANDEIAS,J.A.N. Microbiologia. 6 ed. Editora Elsevier,2009.

TZELEPI,E.; MAGANA,C.; PLTSOUKA,E.; SOFIANOU,D.;PANIARA,O.; LEGAKIS,N.J.; VATOPOULOS,A.C.; TZOUVELEKIS,L.S. . Extended-spectrum [β]-lactamase types in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* in two Greek hospitals. International Journal of Antimicrobial Agents,v.21,n.3,p. 285-8,2003

VALENZUELA, A. S.; BENOMAR, N.; ABRIOUEL, H.; CAÑAMERO, M. M.; GALVEZ,A. Isolation and identification of *Enterococcus faecium* from seafoods: antimicrobial resistance and production of bacteriocin-like substances. **Food microbiology**,v. 27,n.7,p. 955–61,2010.

VAN BELKUM, A.; TASSIOS, P.T.; DIJKSHOORN, L.; HAEGGMAN, S.; COOKSON, B.; FRY, N.K.; FUSSING, V.; GREEN, J.; FEIL, E; GERNER-SMIDT, P.; BRISSE, S.; STRUELENS, M. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. **Clin. Microbiol. Infect Dis**, v. 13, p. 1–46, 2007.

VASQUES,M.R.G.; BELLO,A.R.; LAMAS,.C.; CORREA,J.; PEREIRA,J.A.A. β -lactamase producing enterobacteria isolated from surveillance swabs of patients in a cardiac intensive care unit in Rio de Janeiro. **Brazil. Braz J Infect Dis**, v.15, n.1, 2011.

VERMELHO, A. B.; BASTOS, M. F.; SÁ, M. H. B. Bacteriologia geral. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

VERSALOVIC,J.; KOEUTH,T.; LUPSKI,J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes.Nucleic **Acids Research**, v. 19, n. 24,p. 6823 -6831,1991.

WALSH.T. Emerging carbapenêmicoses: a global perspective. **Int.J.Antimicrob, Agents**.v.36,n.3,p. 8-14,2010.

WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em 20 jan. 2015.

WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action 2012. Disponível em: <http://www.who.int/patientsafety/implementation/amr/publication/en/> . Acesso em 20 jan. 2015.

WINN,W.C.JR.; ALLE,S.D.; JANDA,W.; KONEMAN,E .; PROCOP,G .; SCHRENBERGER,P.C.; WOOD,G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6^oed,p.211-302,2006.

YIGIT,H.; QUEENAN,A.M.; ANDERSON,G.J.; DOMENECH-SANCHEZ,A.; BIDDLEW,J.W.; STEWARD,C.D.; ALBERTI,S.; BUSH,K.; TENOVER,F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase,KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.45,p.1151–1161,2001.

ZEBA, B .Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. **African JBiotechnol**,n 4,p. 1559-1562,2005.

ZHAO,F.; BAI,J.; WU,J.; LIU,J.; ZHOU,M.; XIA,S.; WANG,S.; XIAODING,Y.; HUIGUANG,Y.; MEILI,L.; SHENGJIE,G.; TIELI,Z.; ZUYUAN,X.; YUXIN,N.; BAO,Q. Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **Plos one**, v.5, n. 4,2010.