

Caetana Paes Zamparette

DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BETA-LACTAMASES DE ESPETRO ESTENDIDO EM *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. DE PACIENTES INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO (HU/UFSC)

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Concentração em Análises Clínicas – da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Mestre em Farmácia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Lucy Maria Bez Birolo Parucker.

Florianópolis

2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Zamparette, Caetana Paes

Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. em pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago/ Caetana Paes Zamparette; orientadora: Thaís Cristine Marques Sincero; co-orientadora: Lucy Maria Bez Birolo Parucker – Florianópolis, 2014.

128p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina – Centro de Ciências da Saúde – Programa de Pós Graduação em Farmácia.

Inclui referências

1. Farmácia. 2. ESBL. 3. Enterobactérias. 4. PCR multiplex. 5. RAPD – PCR. I. Sincero, Thaís Cristine Marques. II. Universidade Federal de Santa Catarina Programa de Pós Graduação em Farmácia. III. Título.

**“DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA
DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO EM Escherichia coli, Klebsiella
pneumoniae e Enterobacter spp. DE PACIENTES
INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO
THIAGO (HU/UFSC)”**

POR

Caetana Paes Zamparette

Dissertação julgada e aprovada em
sua forma final pelo(a)
Orientador(a) e membros da
Banca Examinadora, composta
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:



Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira (UFMG – Membro Titular)



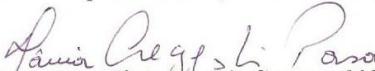
Prof. Dr. Caio Maurício de Mendes Cordova (FURB – Membro Titular)



Prof. Dr. Eduardo Monguilhott Dalmarco (UFSC - Membro Titular)



Profa. Dra. Thaís Marques Sincero (UFSC – Orientadora)



Profa. Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Florianópolis, 26 de março de 2014.

Dedico este trabalho ao meu pai,
Albertino de Souza Zamparete,
que sempre esteve presente em
todos os momentos da minha vida,
que sempre me apoiou e me
incentivou a dar este grande passo.
Obrigada, pai!

Agradecimentos

Agradeço primeiramente ao meu pai, que é o grande responsável por eu ter chegado até aqui. É a pessoa que sempre me apoiou e incentivou a ir sempre mais longe e sempre esteve ao meu lado.

À minha irmã, Helena, que esteve sempre ao meu lado, me aguentou nos momentos de estresse e tristeza, esteve comigo em todos os momentos e é a minha melhor amiga.

À minha mãe que mesmo longe, sempre me deu apoio.

À minha orientadora, Thaís Cristine Marques Sincero, por acreditar em mim, por todo o empenho e sabedoria, pela liberdade e confiança na realização deste trabalho e principalmente pela amizade e compreensão nos momentos difíceis. Muito obrigada!

À Lucy Maria Bez Birolo Parucker, minha co-orientadora e idealizadora deste projeto, que desde o primeiro momento me acolheu e acreditou em mim.

Ao professor Celso Spada que me deu a oportunidade de iniciar este projeto.

À professora Helena Cristina Franz pelo apoio e incentivo.

Às minhas “pupilas” Nathália e Ariella por toda a ajuda nos experimentos e pela amizade.

À todos os colegas e amigos do laboratório, Clarice, Juliana, Elizandra, Larissa e Cristina pelo companheirismo, amizade e apoio em todos os momentos.

Ao Laboratório de Biotecnologia/MIP e ao Laboratório de Biologia Molecular/HU que muitas vezes cederam o espaço e equipamentos para a realização dos experimentos.

Aos amigos que fizeram parte de vários momentos em minha vida, ajudando e incentivando sempre!

À UFSC, ao PGFAR e a CAPES agradeço por possibilitar a realização deste trabalho e por todos os recursos colocados à disposição.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação, um importante momento da minha vida. Obrigada!

Resumo

As enterobactérias são patógenos oportunistas responsáveis por cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias. Além disso, têm se tornado um desafio no tratamento de doenças infecciosas, principalmente em hospitais, devido à facilidade com que adquirem genes de resistência. A produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) é o mecanismo de resistência mais importante das enterobactérias. Dentre as diversas ESBLs descritas na literatura, as do tipo TEM, SHV e CTX-M são as mais disseminadas mundialmente. O objetivo deste estudo foi avaliar por meio de métodos fenotípicos e genotípicos, o perfil de resistência de estirpes de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. produtoras de ESBL isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago. Foram identificadas 145 amostras isoladas de sangue, urina, secreção traqueal e de ferida cirúrgica de pacientes internados. Foram realizados testes de suscetibilidade aos antimicrobianos e detecção fenotípica de ESBL pelo Teste de Disco Aproximação. A pesquisa genotípica de ESBLs foi feita para os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} por duas reações de PCR multiplex. E a identidade dos produtos amplificados de cada gene foi confirmada por sequenciamento. A avaliação da similaridade genética entre os isolados foi realizada por meio de RAPD-PCR. Do total de isolados, foram identificados 66,9% de *E. coli*, 25,5% de *K. pneumoniae*, 4,1% de *Enterobacter cloacae* e 3,4% de *Enterobacter aerogenes*. Além disso, 73% das amostras de urina foram de *E. coli*, 22% de *K. pneumoniae*, 1,7% de *E. cloacae* e 3,4% de *E. aerogenes*. Das amostras de sangue 57,1% foram de *E. coli*, 28,6% de *K. pneumoniae*, 7,1% de *E. cloacae* e 7,1% de *E. aerogenes*. E de ferida, 25% dos isolados foram de *E. coli*, 50% de *K. pneumoniae* e 25% de *E. cloacae*. A prevalência de ESBL nos isolados foi de 27,6%, sendo que 32,5% dos isolados foram de *E. coli*, 60% de *K. pneumoniae* e 7,5% de *E. cloacae*. O gene *bla*_{TEM} foi detectado em 82,5% (33) das amostras, *bla*_{SHV} 60% (24) dos isolados e *bla*_{CTX-M} em 42,5% (17), 17,5% (7) e 12,5% (5) para CTX-M Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 9, respectivamente. Além disso, 77% dos isolados ESBL positivos expressavam mais de uma enzima. O sequenciamento confirmou a identidade de todos os produtos amplificados. Na genotipagem por RAPD, as amostras de *K. pneumoniae* foram mais semelhantes entre si que os isolados de *E. coli*, e duas das três estirpes de *E. cloacae* possuíam o mesmo perfil eletroforético. Entretanto, apesar de algumas diferenças pontuais, a maioria dos isolados foram classificados

pelo menos como “possivelmente relacionados” segundo os critérios de Tenover. Portanto, com os resultados obtidos nesse estudo, sugere-se a existência de uma estirpe de *K. pneumoniae* endêmica no HU/UFSC, disseminada por todos os setores, situação semelhante à observada com as estirpes de *E. coli*.

Palavras-chave: ESBL, Enterobactérias, Disco Aproximação, PCR multiplex, RAPD.

Abstract

Enterobacteriaceae are opportunistic pathogens responsible for approximately 70% of urinary infections and 50% of septicemia. Furthermore, it has become a challenge in the treatment of infectious diseases, especially in hospitals, due to the easiness with which acquire resistance genes. The production of Extended Spectrum β -lactamase (ESBL) is the most important mechanism of resistance of Enterobacteriaceae. Among the several ESBLs described in the literature, ESBL like TEM, SHV and CTX-M are the most widespread worldwide. The aim of this study was to evaluate by phenotypic and genotypic methods, the resistance profile of strains of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter* spp. ESBL-producing isolates from inpatients at the University Hospital Professor Polydoro Ernani San Thiago. 145 strains isolated from blood, urine, tracheal aspirates and wound inpatients were identified. Antimicrobial susceptibility test and phenotypic ESBL detection by Disk Approximation Test were performed. ESBLs Genotypic survey were taken for *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} and *bla*_{CTX-M} genes by two multiplex PCR reactions. And the identity of the amplified product of each gene was confirmed by sequencing. The genetic similarity of isolates was performed by RAPD-PCR. The total isolates, 66.9% were *E. coli*, 25.5% were *K. pneumoniae*, 4.1% were *Enterobacter cloacae* and 3.4% were *Enterobacter aerogenes*. In addition, 73% of the urine samples were *E. coli*, 22% were *K. pneumoniae*, 1.7% were *E. cloacae* and 3.4% were *E. aerogenes*. Blood samples were 57.1% of *E. coli*, 28.6% of *K. pneumoniae* 7.1% of *E. cloacae* and 7.1% of *E. aerogenes*. And wound, 25% of the isolates were *E. coli*, 50% were *K. pneumoniae* and 25% were *E. cloacae*. The ESBL prevalence in isolates was 27.6% and 32.5% of these were *E. coli*, 60% were *K. pneumoniae* and 7.5% were *E. cloacae*. The *bla*_{TEM} gene in 82.5% (33) samples, *bla*_{SHV} was detected in 60% (24) isolates and *bla*_{CTX-M} was detected in 42.5% (17) 17.5% (7) and 12.5% (5) for CTX-M group 1, group 2 and group 9, respectively. Additionally, 77% of ESBL-positive isolates expressing more than one enzyme type. The sequencing confirmed the identity of all PCR products. RAPD genotyping, *K. pneumoniae* samples were more similar to each other

than *E. coli* isolates, and two of the three *E. cloacae* stems had the same electrophoretic profile. However, despite some slight differences, most isolates were classified at least as "possibly related" according to the criteria of Tenover. Therefore, the results obtained in this study suggest the existence of a strain of *K. pneumoniae* endemic in HU / UFSC, spread across all sectors, similar to that observed with strains of *E. coli* situation.

Keywords: ESBL, Enterobacteriaceae, disk approximation, multiplex PCR, RAPD

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: MECANISMOS DE RESISTÊNCIA MAIS COMUMENTE ENCONTRADOS EM MICRORGANISMOS GRAM NEGATIVOS.	33
FIGURA 2: PRINCIPAIS ESTRUTURAS DOS ANTIBIÓTICOS B-LACTÂMICOS E INIBIDORES DE B-LACTAMASES.	35
FIGURA 3: ESQUEMA DO MECANISMO DE AÇÃO DAS B-LACTAMASES....	37
FIGURA 4: ESQUEMA ILUSTRATIVO DA CLASSIFICAÇÃO DAS B-LACTAMASES..	41
FIGURA 5: FOTO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS DE CADA INICIADOR. .	60
FIGURA 6: DISTRIBUIÇÃO DOS ISOLADOS CLÍNICOS POR MICRORGANISMOS ISOLADOS EM CADA SETOR DE INTERNAÇÃO. .	65
FIGURA 7: DISTRIBUIÇÃO DOS MICRORGANISMOS ISOLADOS POR SÍTIO ANATÔMICO.....	66
FIGURA 8: TESTE POSITIVO PARA ESBL COM O TESTE DE DISCO APROXIMAÇÃO.	76
FIGURA 9: FOTO REPRESENTATIVA DAS REAÇÕES DE PCR MULTIPLEX. .	79
FIGURA 10: PREVALÊNCIA DOS TIPOS DE ESBL ENCONTRADAS NESTE ESTUDO.....	79
FIGURA 11: MONTAGEM REPRESENTATIVA DOS GÉIS DAS REAÇÕES DE RAPD DE ALGUNS ISOLADOS DE <i>K. PNEUMONIAE</i> (1-7), <i>E. COLI</i> (8-10) E <i>E. CLOACAE</i> (11 E 12).	84
FIGURA 12: DENDOGRAMA E PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>E. COLI</i>	87
FIGURA 13: DENDOGRAMA E PERFIL ELETROFORÉTICO DOS ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>K. PNEUMONIAE</i>	91

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: PONTOS DE CORTE PARA OXIMINO-CEFALOSPORINAS E AZTREONAM.....	48
QUADRO 2: SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS NA PESQUISA DE ESBL.....	58
QUADRO 3: DISTRIBUIÇÃO DOS GENES AMPLIFICADOS POR ISOLADO. ..	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: CRITÉRIOS INTERPRETATIVOS PARA OS PADRÕES DE PFGE SEGUNDO (TENOVER ET AL., 1995).....	63
TABELA 2: DISTRIBUIÇÃO DAS ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE INFECÇÃO HOSPITALAR NO PERÍODO DE JANEIRO DE 2009 A JULHO DE 2013, COM DESTAQUE PARA AS PRODUTORAS DE ESBL.	67
TABELA 3: PERFIL DE SENSIBILIDADE DE <i>E. COLI</i> AOS ANTIMICROBIANOS, ENTRE 2009 E 2013.....	69
TABELA 4: PERCENTUAL DE CEPAS DE <i>K. PNEUMONIAE</i> SUSCETÍVEIS AOS ANTIMICROBIANOS ENTRE 2009 E 2013.....	71
TABELA 5: PERCENTUAL DE CEPAS DE <i>ENTEROBACTER</i> SPP. SUSCETÍVEIS AOS ANTIMICROBIANOS ENTRE 2009 E 2013.....	72
TABELA 6: PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE <i>E. COLI</i> , <i>K. PNEUMONIAE</i> E <i>E. CLOACAE</i> PRODUTORES DE ESBL.....	74

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- A. baumannii* - *Acinetobacter baumannii*
Ác. Clavulânico - Ácido Clavulânico
AC - Ácido Clavulânico
AC-V - Ácido Clavulânico variável
AMC - Amoxicilina+Clavulanato
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATM - Aztreonam
Carb - Carbapenêmico
CA-SFM - *Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology*
CAZ - Ceftazidime
CC I - Clínica Cirúrgica I
CC II - Clínica Cirúrgica II
CCIH - Comissão de Controle de Infecção Hospitalar
CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*
Cef - Cefalosporinas
CIM - Concentração Inibitória Mínima
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute*
CM I - Clínica Médica I
CM II - Clínica Médica II
CM III - Clínica Médica III
COM - Cefepime
CRO - Ceftriaxone
CTX - Cefotaxime
dNTP - desoxinucleotídeos trifosfatados
E. aerogenes - *Enterobacter aerogenes*
E. cloacae - *Enterobacter cloacae*
E. coli - *Escherichia coli*
ECDC - *European Centre for Disease Prevention and Control*
EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE-Cef - Cefalosporinas de Espectro Estendido
ESBL - β -lactamase de Espectro Estendido
EUCAST - *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*
H. influenzae - *Haemophilus influenzae*
HU/UFSC - Hospital Universitário Ernani Polydoro de São Thiago
IrAS - Infecção relacionada à Assistência à Saúde
ITU - Infecção do Trato Urinário

K. oxytoca - *Klebsiella oxytoca*
K. pneumoniae - *Klebsiella pneumoniae*
LCF - *Lahey Clinic Foundation*
MDR - multidroga-resistente
MLST - *Multilocus Sequence Typing*
MRSA - *S. aureus* resistentes à meticilina
MS -: Ministério da Saúde
N. gonorrhoeae - *Neisseria gonorrhoeae*
P. aeruginosa - *Pseudomonas aeruginosa*
P. mirabilis - *Proteus mirabilis*
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase
Pen - Penicilina
PFGE - Eletroforese de Campo Pulsado
PLP - Proteína Ligadora de Penicilina
RAPD - Random Amplified Polymorphic
S. aureus - *Staphylococcus aureus*
SCN - *Staphylococcus* coagulase negativa
SENTRY - *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program*
SINAIS - Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde
SMART - *Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends*
TEST - *Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*
TSA - Teste de Suscetibilidade a Antimicrobianos
UPGMA - *Unweighted Pair Group Method*
UTI - Unidade de Terapia Intensiva
WHO - *World Health Organization*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	23
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	25
2.1 IrAS no Brasil: Histórico e Legislação.....	25
2.2 Família Enterobacteriaceae	27
2.2.1 <i>Escherichia coli</i>	27
2.2.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	28
2.2.3 <i>Enterobacter</i> spp.	30
2.3 Resistência Bacteriana: Visão Geral	31
2.4 Antibióticos β -lactâmicos.....	34
2.5 β -lactamases	36
2.5.1 Classificação das β -lactamases.....	37
2.5.2 β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	43
2.5.3 Distribuição geográfica das ESBLs.....	45
2.5.4 Coexistência de β -lactamases.....	47
2.5.5 Detecção fenotípica de ESBL.....	47
2.5.6 Detecção Molecular de ESBL e Genotipagem Bacteriana	50
3 OBJETIVOS	53
3.1 Objetivo Geral.....	53
3.2 Objetivos específicos.....	53
4 METODOLOGIA	55
4.1 Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)	55
4.2 Amostras bacterianas.....	55
4.3 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA).....	55
4.4 Teste de disco aproximação	57
4.5 Amplificação dos genes codificadores de ESBL.....	57
4.5.1 Extração do DNA	57
4.5.2 Iniciadores	58
4.5.3 Reações de PCR	59
4.5.4 Sequenciamento	60
4.5.5 Genotipagem por RAPD	61
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
5.1 Perfis de suscetibilidade dos isolados	68

5.2 Detecção fenotípica de ESBL	75
5.3 Amplificação dos genes bla _{TEM} , bla _{SHV} e bla _{CTX-M}	78
5.4 Variabilidade genética dos isolados	83
5.4.1. <i>Escherichia coli</i>	85
5.4.2 <i>Klebsiella pneumoniae</i>	89
5.4.3 <i>Enterobacter cloacae</i>	93
5.5 Considerações sobre a dispersão de bactérias multirresistentes	93
6 SUMÁRIO DE RESULTADOS	97
7 CONCLUSÃO	99
8 PERSPECTIVAS	101
9 REFERÊNCIAS	103

1 Introdução e justificativa

Infecções relacionadas à assistência à saúde (IrAS) adquiridas no hospital, anteriormente nomeadas como infecções hospitalares (RASKO et al., 2008), podem ser definidas como infecções adquiridas pelo paciente durante a sua hospitalização, que podem se manifestar durante ou após a alta e estão relacionadas com a internação ou com procedimentos médico-hospitalares (ANVISA, 2004b). É considerado IrAS quando manifestações clínicas de infecção ocorrem 72h após admissão, no entanto pode-se considerar um período de 48h quando a IrAS estiver relacionada com algum procedimento invasivo (ANVISA, 2004b; NOGUEIRA et al., 2009).

Um estudo de Klevens e colaboradores (2007) estimou que em 2002, 1,7 milhão de IrAS ocorreu nos hospitais dos EUA e que aproximadamente 99 mil pacientes foram à óbito (KLEVENS et al., 2007). Estima-se que no Brasil 5 a 15% dos pacientes hospitalizados adquiram algum tipo de IrAS (ANVISA, 2004a; LEISER et al., 2007) e este número aumenta para 25 a 35% quando se trata de pacientes internados em unidades de terapias intensivas (LEISER et al., 2007). Na Europa, a prevalência de IrAS em hospitais terciários é de 7,2% (ECDC, 2013).

As IrAS podem agravar o estresse emocional e adicionar a incapacidade funcional, comprometendo a recuperação e a qualidade de vida do paciente. Além disso, o aumento da permanência hospitalar, os custos do tratamento com antimicrobianos e cuidados adicionais elevam os custos da doença de base, sobrecarregando os sistemas de saúde (WHO, 2002).

Alguns fatores predisponentes e procedimentos médico-hospitalares podem contribuir para a aquisição de IrAS, tais como: idade, sendo que os mais propensos são crianças e idosos; estado imunológico, doença subjacente, tais como: tumores, leucemia, diabetes, insuficiência renal; intervenções diagnósticas e terapêuticas como exames endoscópicos, cateterismo, intubação e ventilação mecânica (ANVISA, 2004b; INWEREGBU et al., 2005; VINCENT et al., 1995; WHO, 2002).

Os sítios anatômicos mais comumente associados a IrAS são o trato respiratório, corrente sanguínea, trato urinário e feridas cirúrgicas (ANVISA, 2004b; ECDC, 2013; KLEVENS et al., 2007; WHO, 2002). É esperado que as IrAS acometessem geralmente esses sítios, pois os mesmos estão relacionados com dispositivos médico-hospitalares como

cateteres, sondas, ventilação mecânica e com a manipulação dessas áreas para limpeza e troca de curativos.

A prevalência dos microrganismos nas IrAS depende do sítio anatômico e da epidemiologia de cada hospital, de cada país e do perfil dos pacientes daquela instituição (WHO, 2002). Porém, de maneira geral, os microrganismos mais prevalentes entre os Gram-positivos estão *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e *Enterococcus* spp. e entre os Gram-negativos estão as enterobactérias em geral e os bacilos não fermentadores de glicose, como *Acinetobacter* spp e *Pseudomonas aeruginosa* (ANVISA, 2004b; ECDC, 2013; HOTA, 2004; WHO, 2002).

Um estudo epidemiológico realizado por Parucker (2010), em hospitais da região da Grande Florianópolis, mostrou que no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) a prevalência dos microrganismos causadores de IrAS foi: 40% de enterobactérias, 18,6% de *Pseudomonas aeruginosa* e 9,2% de *Staphylococcus* spp. Entretanto, esse mesmo estudo demonstrou que no Hospital Regional Homero de Miranda Gomes a prevalência foi: 41,2% de enterobactérias, 18,9% de *Staphylococcus* spp e 7,9% de *Pseudomonas aeruginosa*. Isso demonstra que apesar de serem hospitais que pertencem à mesma região possuem epidemiologias diferentes e consequentemente as medidas de controle e prevenção não serão as mesmas (PARUCKER, 2010).

Um dos agravos das IrAS é que os microrganismos causadores são, normalmente, endêmicos na instituição, logo já existe uma pressão seletiva nesses microrganismos pelo uso de antimicrobianos de espectro estendido e ocorre a disseminação de mecanismos de resistência entre essas bactérias. Na Europa, em relatório realizado pelo ECDC (2013), foi reportado 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% das *Pseudomonas aeruginosa* e 81,2% dos *Acinetobacter baumannii* eram resistentes aos carbapenêmicos (ECDC, 2013).

O uso excessivo e desmedido de antibióticos aumentou a pressão de seleção de estirpes multirresistentes, reduzindo drasticamente a possibilidade de tratamento das infecções, afetando o curso das doenças e aumentando o risco de complicações capazes de levar o paciente a óbito (LIVERMORE, 1995).

Até o ano 2000, a maioria das β -lactamases de espectro estendido (ESBL) eram encontradas em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp., isoladas no ambiente hospitalar, decorrentes da mutação das enzimas TEM e SHV. Atualmente, as enzimas predominantes em enterobactérias são CTX-M, presentes também em outras espécies e não somente em ambientes hospitalares, passando a ser encontradas em infecções comunitárias (LIVERMORE et al., 2007; PITOUT; LAUPLAND, 2008). Estima-se que a ESBL do tipo CTX-M seja a mais amplamente distribuída e o tipo predominante em muitas regiões do mundo (LIVERMORE, 2012; PEREZ et al., 2007; TZOUVELEKIS et al., 2000). Por isso, compreender a epidemiologia local de bactérias resistentes é tão importante, pois auxilia no planejamento de medidas de prevenção e controle das infecções causadas por esses agentes. Além disso, a utilização de técnicas moleculares permite determinar a natureza clonal de microrganismos, seus mecanismos de resistência e outros determinantes moleculares, constituindo-se ferramenta importante para traçar e compreender o seu modo de disseminação (LEVY; MARSHALL, 2004).

Poucos trabalhos foram realizados em Santa Catarina e no Brasil, para elucidar a situação das bactérias multidrogas-resistentes produtoras de β -lactamases. Considerando a escassez de dados sobre a epidemiologia de infecções causadas por essas estirpes bacterianas, este estudo poderá colaborar para suprir esta deficiência, fornecendo subsídios aos programas de prevenção e controle de IrAS, auxiliando na redução da morbidade e letalidade desses agravos.

2 Revisão da literatura

2.1 IrAS no Brasil: Histórico e Legislação

As primeiras notícias sobre infecção hospitalar, no Brasil, surgiram na década de 50, uma publicada em 1956 que se tratava de um artigo sobre esterilização de materiais hospitalares e outro em 1959 sobre o uso inadequado de antibióticos (OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; QUEIROS; GUIMARÃES, 2008). No entanto, apenas em 1963 a primeira Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH/HU) foi criada no Hospital Ernesto Dorneles, no Rio Grande do Sul. Em 1970, Comissões Multidisciplinares foram criadas, principalmente em Hospitais com vínculos educacionais (QUEIROS; GUIMARÃES, 2008; ROSA et al., 2000).

Em 1983, o Ministério da Saúde (MS), com a Portaria nº 196, estabeleceu os conceitos e parâmetro para a criação das CCIHs e determinou que todos os hospitais do país deveriam criar esta comissão. Em 1985, foi criado o “Manual de Controle de Infecção Hospitalar” com o intuito de traçar medidas de prevenção e controle das infecções hospitalares nos hospitais brasileiros (BRASIL, 1983).

Com a Portaria nº 930 de 1992, o MS visou maior profissionalização na prática do controle de infecção, determinou, em todos os hospitais os Serviços de Controle de Infecção Hospitalar e manteve a exigência das CCIHs (BRASIL, 1992).

A criação da Lei Federal nº 9341 de 6 de janeiro 1997 pelo MS obrigou os hospitais a manter um Programa de Infecção Hospitalar e estabeleceu a vigilância epidemiológica para identificar ocorrências, determinar causas e propor medidas de controle de infecção (BRASIL, 1997).

Em 1998, foi publicada a Portaria nº 2616, de 12 de maio de 1998, pelo MS, que vigora até hoje e que revogou a Portaria nº 930 de 1992. Além de reafirmar a importância da CCIH, ampliou suas atribuições no hospital e estabeleceu as competências da CCIH, na qual a Farmácia possui um papel importante (BRASIL, 1998).

No ano de 1999, foi criada a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Lei Federal 9.782 que tem como competência legislar e fiscalizar o programa nacional de controle de infecções hospitalares (BRASIL, 1999). Em 2003, foi criada a Portaria nº 385 que regulamenta a estrutura da ANVISA e cria a Gerência de Investigação e Prevenção das Infecções e dos Eventos Adversos (BRASIL, 2003). Com a iniciativa da ANVISA, em 2004, foi criado o Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde (SINAIS), que oferecia aos hospitais de gestores de saúde um instrumento para melhorar as ações de controle e prevenção das IrAS (ANVISA, 2007a). Porém, em 2009 foi suspensa a manutenção do sistema por falta de adesão por parte dos serviços de saúde (ANVISA, 2009).

Por ter ocorrido um aumento significativo de enterobactérias multirresistentes no Brasil, principalmente de *K. pneumoniae*, em 2010 a ANVISA publicou a Nota Técnica 1/2010 que estabelecia medidas de identificação, prevenção e controle de IrAS por microrganismos multirresistentes, onde ficaram estabelecidos os pontos de corte para a interpretação dos Testes de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA) para enterobactérias (ANVISA, 2010). Em 2013 foi publicada a Nota Técnica 1/2013 que substituiu a de 2010 e determinou testes fenotípicos

para a detecção de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias. Até o momento é o último documento técnico publicado para o controle de infecção de enterobactérias multirresistentes (ANVISA, 2013b).

2.2 Família *Enterobacteriaceae*

A família *Enterobacteriaceae* é composta de mais de 176 espécies distribuídas em aproximadamente 44 gêneros. Os membros dessa família são bacilos Gram-negativos de tamanho médio, variando de 0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0µm, não esporulados, de mobilidade variável, fermentadores da glicose e anaeróbios facultativos (ANVISA, 2013a; O'HARA C, 2005).

Esses microrganismos podem ser responsáveis por todo tipo de doença infecciosa em humanos, como podem ser isolados dos mais diversos sítios no organismo (SCHWABER et al., 2004). Representam cerca de 70% das infecções urinárias e 50% das septicemias (ANVISA, 2013a).

Algumas espécies são consideradas enteropatogênicas, como é o caso da *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Yersinia pestis* e alguns sorogrupos de *Escherichia coli*, enquanto outras como, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli* e *Proteus* spp. são membros da microbiota intestinal, porém podem ser responsáveis por infecções oportunistas (ANVISA, 2013a; NOGUEIRA, 2011).

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

No presente estudo, foi avaliado a produção de β-lactamases, que conferem resistência aos antibióticos β-lactâmicos de três espécies de enterobactérias: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp.

2.2.1 *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 microrganismo comensal, no entanto frequentemente causam infecções extraintestinais. (DA SILVA; MENDONÇA, 2012).

Estirpes desse microrganismo podem ser divididas em patogênicas intestinais e patogênicas extraintestinais. O último grupo está envolvido numa série de doenças, sendo a mais comum delas as infecções do trato urinário (ITU), que são responsáveis por mais de 7 milhões de consultas médicas e de 1 milhão de internações hospitalares por ano nos EUA (RON, 2010). Ainda, essas estirpes estão comumente relacionadas com meningite neonatal, infecções do trato respiratório, feridas e infecções cirúrgicas (JOHNSON et al., 2004; JOHNSON; RUSSO, 2002; SMITH et al., 2007). É uma importante causa de infecção de corrente sanguínea, principalmente em pacientes hospitalizados e crianças (BIZZARRO et al., 2008; MELZER; PETERSEN, 2007; ORTEGA et al., 2007; RON, 2010).

O seu principal mecanismo de resistência, assim como para todos os membros da família *Enterobacteriaceae*, é a produção de enzimas que conferem 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 (DA SILVA; MENDONCA, 2012). A resistência às fluoroquinolonas, comumente utilizadas no tratamento de ITU se dá principalmente por 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; MENDONCA, 2012; HOOPER, 1999; PATERSON, 2006). Resistência aos carbapenêmicos em *E. coli* era mais rara e geralmente estava associada a produção de β -lactamase com a diminuição da expressão dos canais de porinas (PATERSON, 2006; POIREL et al., 2004a), no entanto, em 2010 foi publicado o primeiro relato de *E. coli* produtora de carbapenemase (KPC-2) no Brasil (D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF et al., 2010).

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 (RASKO et al., 2008).

2.2.2 *Klebsiella pneumoniae*

K. pneumoniae é um importante causador de pneumonia adquirida na comunidade (KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007; PODSCHUN; ULLMANN, 1998). No entanto, é um patógeno oportunista em ambientes hospitalares, responsáveis por infecções graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou com doenças graves adjacentes (PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SAHLY

et al., 2004; SAHLY et al., 2008). Sua virulência está associada à presença de cápsula polissacarídica, sistema de captação de ferro, fenótipo mucóide e lipopolissacarídeo tóxico (SCARPATE; COSSATIS, 2009).

Nos seres humanos estão presentes como saprófitas na nasofaringe e no trato gastrointestinal. Estima-se que a taxa de portadores nas fezes varie de 5 a 38% e na nasofaringe entre 1 a 6% (DE CHAMPS et al., 1991; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; ROSENTHAL; TAGER, 1975). No entanto, em pacientes hospitalizados essas taxas podem aumentar drasticamente, podendo ser encontrada em até 77% nas fezes de pacientes, 19% na faringe e 42% nas mãos (DAVIS; MATSEN, 1974; PODSCHUN; ULLMANN, 1998; SELDEN et al., 1971).

O principal mecanismo de resistência de *K. pneumoniae* é a produção de ESBL (KEYNAN; RUBINSTEIN, 2007; PATERSON et al., 2004; SAHLY et al., 2008). Essas enzimas estão frequentemente localizadas em plasmídeos, que também abrigam genes distintos que conferem resistência aos aminoglicosídeos, sulfonamidas e, algumas vezes, às fluoroquinolonas (DU et al., 2002; PATERSON, 2006). Além disso, todas as estirpes de *Klebsiella* possuem a β -lactamase SHV 1 constitutiva e normalmente em baixos níveis, conferindo resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina (LIVERMORE, 1995).

Estima-se que a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL seja de 12% nos Estados Unidos, 33% na Europa, 28% na Ásia e 52% na América Latina (JONES et al., 2005).

A maior preocupação, porém, está nas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras que carbapenemases. A primeira *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (tipo KPC) foi isolada em 1996, nos EUA, mas hoje se encontra disseminada em vários países não só em *Klebsiella*, mas em várias espécies de enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Mais recentemente foi descoberta uma nova carbapenemase, isolada primeiramente em *Klebsiella pneumoniae*, de um paciente que esteve em Nova Delhi, Índia, chamada de NDM-1 (YONG et al., 2009) 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, em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

2.2.3 *Enterobacter* spp.

O gênero *Enterobacter* inclui 14 espécies que são classificadas de acordo com as características bioquímicas e similaridades genômicas (BERTONA et al., 2005). *E. cloacae* e *E. aerogenes* são os patógenos mais comumente isolados, principalmente no ambiente hospitalar, afetando principalmente pacientes das Unidades de Terapia Intensiva (NOGUEIRA et al., 2009; PEREZ et al., 2012; SANDERS; SANDERS, 1997).

São frequentemente encontrados no trato gastrointestinal, que é, geralmente, a fonte da infecção. Estes organismos são responsáveis por inúmeras infecções como septicemia, ITU, infecções do trato respiratório, infecções de feridas e meningite, embora esta última seja mais rara (PEREZ et al., 2012).

A frequência de bacteremia causada por *Enterobacter* spp. pode chegar a 1 em cada mil admissões em hospitais universitários ou hospitais de nível terciário. Geralmente, a taxa de mortalidade em bacteremia associada a essa espécie é alta, podendo chegar de 20 a 35% dos casos (NOGUEIRA et al., 2009; SANDERS; SANDERS, 1997)

Embora estejam relacionados com IrAS, são muito menos isolados que *E. coli* e *K. pneumoniae* (MCGOWAN, 1985). No entanto, surtos hospitalares com estirpes multirresistentes de *Enterobacter* spp. estão se tornando cada vez mais frequentes (PEREZ et al., 2012).

Espécies de *Enterobacter* spp., principalmente de ambientes hospitalares, são altamente resistentes a várias classes de antibióticos (DAVIN-REGLI et al., 2008). O principal mecanismo de resistência é a expressão de uma cefalosporinase, AmpC cromossomomal, levando à falha terapêutica quando cefalosporinas de 3ª geração são administradas. Do mesmo modo que a frequência elevada na produção e expressão de ESBL tornou-se importante causa de resistência às cefalosporinas de amplo espectro (HO et al., 2005; JACOBY, 2009; NOGUEIRA et al., 2013). O mecanismo de barreira via mudança na permeabilidade da membrana através dos canais de porinas e a expressão de bombas de efluxo também contribuem para o aumento da resistência aos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos e outras classes de antibióticos como fluoroquinolonas e cloranfenicol (LAVIGNE et al., 2012; NIKAIDO, 2003; PAGES et al., 2008)

2.3 Resistência Bacteriana: Visão Geral

A pesquisa por antibióticos no meio ambiente é baseada na ideia de que alguns compostos inibem o crescimento de microrganismos patogênicos (WAKSMAN; WOODRUFF, 1940). Com isso se levou a pensar que os antibióticos, no ambiente natural, tinham a função de inibir o crescimento de microrganismos concorrentes, que seria a ideia darwiniana de “luta pela vida”. Em contrapartida, microrganismos produtores de antibiótico possuem determinantes de resistência ao antimicrobiano que produz. Portanto, os mecanismos de resistência devem ser elementos que evoluíram para evitar a atividade daquele antibiótico (BENVENISTE; DAVIES, 1973).

Se o papel que os antibióticos desempenham é apenas de matar concorrentes, os genes de resistência deveriam apenas proporcionar resistência. O que se observa, no entanto, é que os mecanismos de resistência desempenham outros papéis na fisiologia bacteriana além de torná-la resistente a determinado antibiótico (NODWELL, 2007). Um exemplo disso são as bombas de efluxo, presentes em todos os organismos e que podem tanto expulsar antibióticos para fora da célula quanto compostos tóxicos provenientes do seu metabolismo (RAMOS et al., 2002; SANCHEZ et al., 2005; SILVER; PHUNG, 1996). Portanto, a aquisição de mecanismos de resistência deve ser analisada de maneira global para compreender as causas genéticas e o papel fisiológico que desempenham. A função fisiológica pode ser um fenômeno adaptativo a condições estressantes, sendo que a pressão seletiva pelo uso indiscriminado dos antibióticos pode ser um dos principais responsáveis (MARTINEZ et al., 2009).

Existem três tipos principais de resistência aos antibióticos, resistência intrínseca, adquirida e adaptativa.

A resistência intrínseca compreende todas as propriedades inerentes que limitam a ação dos antibióticos em um determinado microrganismo (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). Neste caso, todas as estirpes daquela espécie bacteriana serão igualmente resistentes (TENOVER, 2006).

Na resistência adquirida, microrganismos 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 (BAQUERO, 2001; FERNANDEZ et al., 2011; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012).

Já na resistência adaptativa, há uma alteração no gene ou na expressão de proteínas como resultado da exposição a uma determinada condição, por exemplo, estresse, condições nutricionais, estado de crescimento e níveis subinibitórios do próprio antibiótico. Este tipo de resistência é de natureza transitória e, geralmente reversível se houver a remoção da condição que a induziu (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012).

A resistência adquirida é a mais preocupante, pois populações de bactérias inicialmente susceptíveis tornam-se resistentes a um agente antimicrobiano, proliferam-se e difundem-se sob a pressão seletiva promovida pela utilização desse agente. Através deste mecanismo muitas bactérias tornam-se resistentes a mais de uma classe de antibiótico, então chamadas de multidroga-resistentes (MDR) (TENOVER, 2006). Este fato é especialmente alarmante em hospitais e outras instituições da saúde, onde pacientes podem sucumbir a um microrganismo multirresistente. Além de afetar o curso de outras doenças infecciosas coexistentes e aumentar o risco associado à imunossupressão e procedimentos médico-hospitalares (LEVY; MARSHALL, 2004; MARTINEZ et al., 2009).

Quando a resistência adquirida se desenvolve em decorrência da seleção e mutação cromossômica é chamada de evolução vertical e a resistência que se desenvolve por recombinação de material genético a partir de outros organismos resistentes é denominada evolução horizontal (ANDERSSON; HUGHES, 2010; MARTINEZ et al., 2009).

A recombinação desempenha um papel importante na transferência horizontal de genes (THOMAS; NIELSEN, 2005) e pode ocorrer através de vários mecanismos: transformação, conjugação e transdução (TENOVER, 2006). A primeira ocorre quando estirpes bacterianas suscetíveis adquirem e incorporam segmentos de DNA que carregam genes de resistência pertencentes a bactérias resistentes que sofreram lise celular. A segunda ocorre por meio da transferência de plasmídeo contendo genes de resistência entre microrganismos adjacentes. E a terceira acontece quando genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra através dos bacteriófagos (ANDERSSON; HUGHES, 2010; TENOVER, 2006).

A resistência bacteriana ocorre por diversos mecanismos, porém, os mais comuns em bacilos Gram-negativos são a alteração da permeabilidade da membrana celular através da diminuição/alteração na expressão dos canais de porinas, as bombas de efluxo e a produção de

enzimas que inativam os antibióticos (ANDERSSON; HUGHES, 2010; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012), conforme ilustrado na Figura 1.

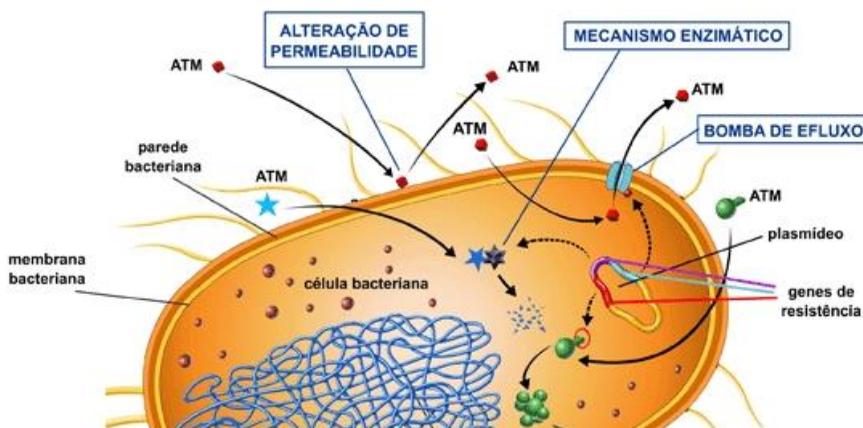


Figura 1: Mecanismos de resistência mais comumente encontrados em microrganismos Gram negativos. Fonte: Adaptado de ANVISA, 2013.

A redução da permeabilidade dos canais de porinas está associada à baixa suscetibilidade aos β -lactâmicos em *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (ANVISA, 2007b; HANCOCK; BRINKMAN, 2002; NIKAIDO, 2003). Microrganismos da família Enterobacteriaceae podem apresentar uma mudança no tipo de porina que expressam e/ou uma redução na expressão dos canais de porina que podem conferir a baixa suscetibilidade às cefalosporinas e aos carbapenêmicos (PAGES et al., 2008).

A permeabilidade limitada é responsável ainda pela resistência intrínseca de bacilos Gram-negativos à Eritromicina, Clindamicina e Vancomicina e pela resistência de *P. aeruginosa* ao Trimetoprim (ANVISA, 2007b).

Para evitar o acúmulo de compostos tóxicos no espaço intracelular, sistemas dependentes de energia evoluíram nas bactérias para expulsar essas moléculas da célula (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012). A primeira bomba de efluxo descoberta foi em 1978, em *E. coli*, a qual diminuía o acúmulo de tetraciclina (LEVY; MCMURRY, 1978). As bombas de efluxo podem apresentar um ou múltiplos componentes. Em bactérias Gram-negativas, muitas bombas possuem uma organização tripartida que consistem de membrana interna, membrana

externa e uma proteína de fusão de membrana situada no periplasma (FERNANDEZ; HANCOCK, 2012).

As bombas de efluxo podem variar tanto na sua especificidade quanto no mecanismo (WEBBER; PIDDOCK, 2003). Algumas são específicas para cada fármaco, outras são inespecíficas podendo expulsar uma grande variedade de fármacos estruturalmente não relacionados, as chamadas bombas de efluxo MDR (DZIDIC et al., 2008). Esse mecanismo afeta todas as classes de antibióticos, mas especialmente macrolídeos, tetraciclina e fluoroquinolonas (DZIDIC et al., 2008; FERNANDEZ; HANCOCK, 2012).

A produção de enzimas que degradam ou inativam antibióticos é o mecanismo de resistência mais importante e frequente, principalmente em bactérias Gram-negativas (BONNET, 2004; DELMAS et al., 2008). Muitos antibióticos possuem grupo ésteres ou amidas que os tornam suscetíveis a essas enzimas (DZIDIC et al., 2008). A produção β -lactamases é o mecanismo mais importante das enterobactérias, principalmente a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBL) que conferem resistência às oximino-cefalosporinas (DALLENE et al., 2010) e será o foco deste trabalho.

2.4 Antibióticos β -lactâmicos

Desde a descoberta da Penicilina por Fleming, em 1928, sua utilização na clínica em 1941 e mais recentemente o desenvolvimento das gerações de cefalosporinas e carbapenêmicos (BIONDI et al., 2011), a classe dos antibióticos β -lactâmicos constituem a maior família de antimicrobianos, amplamente utilizada na prática clínica, para o tratamento de infecções comunitárias ou hospitalares (TOLLENTINO et al., 2011). Essa classe compartilha uma estrutura e o mecanismo de ação comum (PETRI, 2005).

O anel β -lactâmico é a estrutura comum a todos os antimicrobianos dessa classe e é esta estrutura que se ligará ao sítio ativo na célula bacteriana. O anel β -lactâmico 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 é o que dará as características dos antimicrobianos (espectro de atividade, afinidade por receptores, etc.) (KONG et al., 2010; NOGUEIRA, 2011).

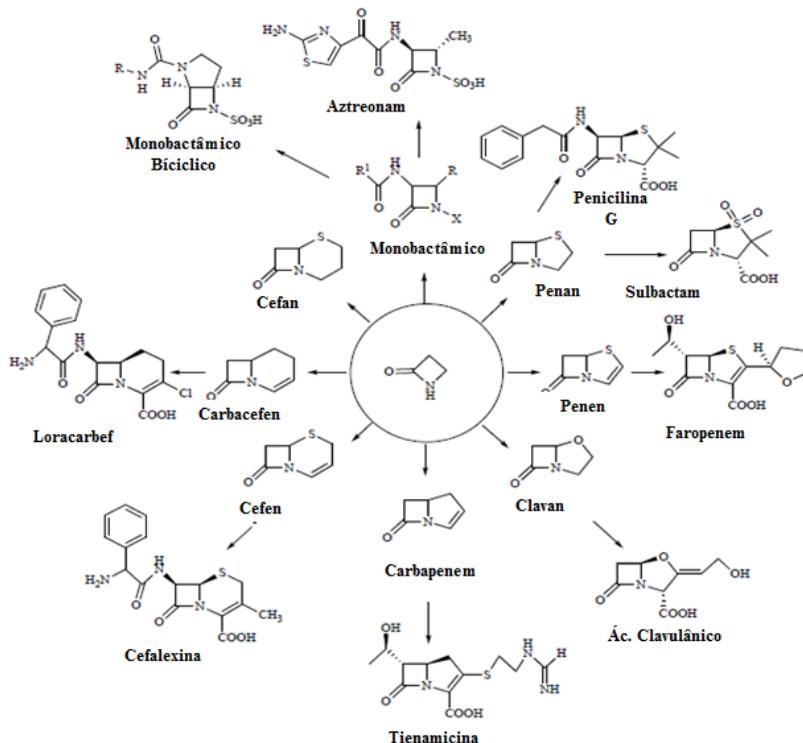


Figura 2: Principais estruturas dos antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases. Fonte: Adaptado de (BIONDI et al., 2011)

Os β -lactâmicos inibem o crescimento do microrganismo interferindo na reação de transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana. A parede celular bacteriana é uma camada externa rígida que envolve por completo a membrana citoplasmática, tem como função manter a forma e a integridade celular, assim como impedir a sua lise em consequência da pressão osmótica. É constituída de um complexo polímero polissacarídeo e peptidoglicano. O polissacarídeo contém aminoaçúcares alternados, N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico. Existe um peptídeo de cinco aminoácidos ligados ao açúcar do ácido N-acetilmurâmico que termina em D-alanil-D-alanina. A proteína ligadora de penicilina (PLP) remove a alanina terminal no processo de formação de uma ligação cruzada com o peptídeo adjacente, conferindo à parede celular a sua rigidez estrutural. Os antibióticos β -

lactâmicos, análogos estruturais do substrato D-Ala-D-Ala, ligam-se covalentemente ao local ativo da PLP, inibindo a reação de transpeptidação, interrompendo a síntese de peptidoglicano, promovendo a lise celular (CHAMBERS, 2010; PETRI, 2005).

A resistência aos betalactâmicos acontece principalmente por quatro mecanismos: inativação do antibiótico por betalactamases, modificação das PLP-alvo, alterações na permeabilidade da célula e por bombas de efluxo. (BABIC et al., 2006; CHAMBERS, 2010; PETRI, 2005). A produção de betalactamases é o mecanismo mais importante em enterobactérias e será o foco deste trabalho.

2.5 β -lactamases

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 microrganismos e a expressão dessas enzimas é um impediente crítico na seleção da terapia medicamentosa (BUSH; JACOBY, 2010).

As β -lactamases possuem um parentesco estrutural com a PLPs que lhes permite ligar-se aos antibióticos, acilar e hidrolisar o anel β -lactâmico, inativando o fármaco (MASSOVA; MOBASHERY, 1998). O mecanismo de ação dessas enzimas se dá primeiramente com a ligação não covalente com o antibiótico. Então, o anel β -lactâmico se liga à enzima pela hidroxila livre na cadeia lateral de um resíduo de serina, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e o fármaco é hidrolisado e inativado (Figura 3). A maioria das β -lactamases utiliza a porção terminal do éster de serina para hidrolisar os β -lactâmicos, mas algumas β -lactamases utilizam íons de zinco (LIVERMORE, 1995).

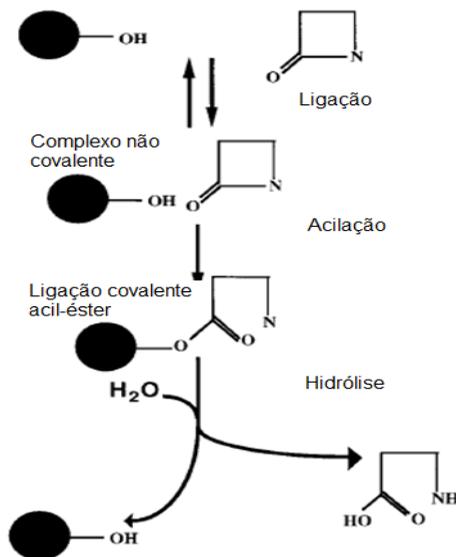


Figura 3: Esquema do mecanismo de ação das β-lactamases. Fonte : Adaptado de LIVERMORE, 1995.

As β-lactamases são codificadas pelo gene *bla* e são produzidas de maneira constitutiva ou induzidas. Os genes podem ser encontrados no cromossomo bacteriano, plasmídeos, transposons (BABIC et al., 2006) e integrons (WELDHAGEN, 2004).

2.5.1 Classificação das β-lactamases

A primeira classificação foi proposta por Jack e Richmond, em 1970 e foi expandida por Richmond e Sykes (LIVERMORE, 1995). Essa classificação era baseada no perfil do substrato de cada enzima, dividindo-as em cinco grupos principais (BUSH et al., 1995).

Em 1980, Ambler propôs a primeira classificação molecular, quando apenas eram conhecidas sequências de quatro aminoácidos das β-lactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995). Nesta classificação, as β-lactamases são divididas em quatro grandes grupos, onde nos grupos A, C e D estão as serinas β-lactamases e no grupo B as enzimas que possuem íons de zinco na sua porção terminal, as metalobetalactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1989, devido às deficiências das classificações existentes, Bush reorganizou a classificação das β -lactamases, correlacionando substrato e propriedades inibidoras com a estrutura molecular (BUSH, 1989). Essa classificação, de 1995 (BUSH et al., 1995), é a mais utilizada até hoje, e a última atualização foi feita em 2009 (Figura 4) (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 1 da classificação de Bush e Jacoby (2010) estão as cefalosporinas codificadas no cromossomo de muitas espécies de enterobactérias, as chamadas AmpC, pertencentes à classe C da classificação de Ambler. São mais ativas contra cefalosporinas e geralmente não são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH; JACOBY, 2010).

No grupo 2 estão as serinas β -lactamases, incluindo as classes A e D de Ambler. Este é o maior grupo devido ao aumento de ESBLs. Este grupo está subdividido em 12 subgrupos. O subgrupo 2a representa um pequeno número de β -lactamases que apresentam atividade hidrolítica reduzida, chamadas penicilinas, comumente encontradas em cocos Gram-positivos. O subgrupo 2b compreende β -lactamases que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas e são fortemente inibidas pelo Ácido Clavulânico e incluem as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1. O primeiro e grande subgrupo 2be corresponde às ESBLs, β -lactamases de espectro estendido, que mantêm atividade contra penicilinas, oximino-cefalosporinas (Ceftazidima, Cefotaxima e Aztreonam). Nesse grupo estão as ESBLs do tipo TEM, SHV, CTX-M. Estas enzimas geralmente são sensíveis ao Ácido Clavulânico, um recurso válido para detecção fenotípica em laboratórios clínicos (BUSH; JACOBY, 2010). Enzimas do subgrupo 2br (β -lactamases de espectro restrito) e do subgrupo 2ber (ESBL) são enzimas que não são inibidas pelo Ácido Clavulânico (BABIC et al., 2006).

As enzimas do subgrupo 2c hidrolisam Carbenicilina ou Ticarcilina tão rápido quanto Benzilpenicilina, enquanto a Cloxacilina ou Oxacilina são hidrolisadas mais lentamente. Geralmente são inibidas pelo Ácido Clavulânico e Tazobactam. O subgrupo 2ce foi descrito recentemente e possui atividade expandida contra Cefepime e Cefpiroma (BUSH; JACOBY, 2010).

As β -lactamases do subgrupo 2d hidrolisam Cloxacilina ou Oxacilina melhor que a Benzilpenicilina e, portanto, são conhecidas como enzimas OXA. No subgrupo 2de estão as oxacilinas de espectro estendido, que inclui oximino-cefalosporinas, mas não carbapenêmicos. O novo subgrupo 2df são oxacilinas que hidrolisam carbapenêmicos e

que foram divididas em nove grupos de acordo com a homologia de aminoácidos (BUSH; JACOBY, 2010)

O subgrupo 2e compreende cefalosporinas com capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e são inibidas por Ácido Clavulânico e Tazobactam. Elas podem ser confundidas com o grupo das AmpCs ou ESBLs, porque podem ser encontradas nos mesmos microrganismos e apresentam perfis de resistência comparáveis. As serino carbapenemases da classe molecular A pertencem ao subgrupo 2f e os carbapenêmicos são os substratos distintos. São melhor inibidas pelo Tazobactam (BUSH; JACOBY, 2010).

O grupo 3 é representado pelas metalobetalactamases. Diferem-se estruturalmente das outras β -lactamases pela presença de um íon de zinco no sítio ativo. São distinguidas principalmente por hidrolisarem carbapenêmicos. Possuem pouca atividade hidrolítica contra os monobactâmicos e não são inibidas pelo Ácido Clavulânico ou pelo Tazobactam, porém são inibidas pelo EDTA, Ácido Dipicolínico ou o-fenantrolina. São subdivididas estruturalmente em B1, B2 e B3 e funcionalmente em 3a, 3b (BUSH; JACOBY, 2010). Um resumo da classificação dessas enzimas está exposto abaixo na Figura 4.

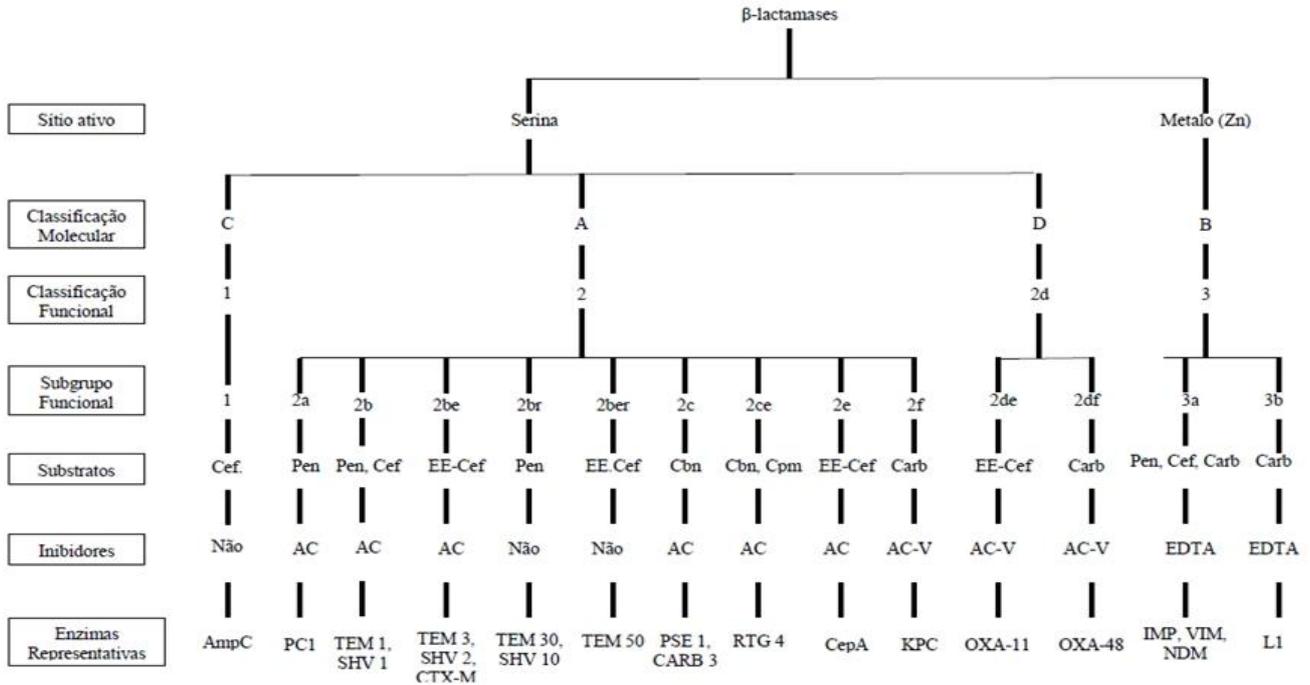


Figura 4: Esquema ilustrativo da classificação das β-lactamases. Legenda: AC- Ác. Clavulânico; AC-V- Ác. Clavulânico variável; Carb- Carbapenêmico; Cbn- Carbenicilina, Cef- Cefalosporinas; Com- Cefeime, EE-Cef- Cefalosporinas de Espectro Estendido; EDTA- Ácido etilenodiamino tetra-acético; Pen- Penicilina. Fonte: Adaptado de (BUSH, 2012; BUSH; JACOBY, 2010).

2.5.2 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

Conceitualmente, as ESBLs são β -lactamases capazes de inativar penicilinas, cefalosporinas de terceira e quarta geração e Aztreonam, porém não hidrolisam cefamicinas ou carbapenêmicos e a grande maioria é inibida pelos inibidores de β -lactamases como o Ácido Clavulânico (BRADFORD, 2001; ESCMIC, 2012; LIVERMORE, 2008; NAAS et al., 2008).

O fato das ESBL serem inibidas pelo Ácido Clavulânico é o que as diferencia das β -lactamases do tipo AmpC (Classe C de Ambler ou Grupo 1 de Bush e Jacoby), enzimas cromossômicas produzidas por microrganismos como *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Serratia* spp., *Hafnia* spp. e que não são inibidas por Ácido Clavulânico. Com exceção das ESBL do tipo OXA, que estão classificadas na Classe D de Ambler, o restante das ESBLs pertence à Classe A (ANVISA, 2013; PATERSON; BONOMO, 2005).

Na classificação de Bush e Jacoby, a maioria se enquadra no grupo 2be. As mutações no sítio ativo as tornaram capazes de inativar β -lactâmicos de espectro estendido, porém são menos eficientes na hidrólise de penicilinas, como as enzimas originais (BUSH; JACOBY, 2010). Há outros grupos de ESBLs, como 2d, 2e e 2f, no entanto, o grupo 2e possui a capacidade de hidrolisar cefotaxima, mas não possui atividade contra penicilinas e aztreonam e o grupo 2f possui atividade contra carbapenêmicos e é fracamente inibida pelo ácido clavulânico (PATERSON; BONOMO, 2005).

A maioria das ESBLs encontradas nos isolados clínicos pertence aos tipos SHV, TEM e CTX-M, no entanto, há vários outros tipos, menos comuns de ESBL, como SFO, BES, BEL, GES, VEB (BRADFORD, 2001; PITOUT et al., 2005)

A. ESBL do tipo SHV

Em 1983, foi encontrada a primeira ESBL tipo SHV, a SHV 2. Foi descoberta em um isolado de *K. ozaenae*, na Alemanha. Possuía atividade contra Cefotaxima e, em menor grau, contra Ceftazidima (KNOTHE et al., 1983). O sequenciamento revelou que uma substituição de glicina por serina na posição 238 deu a esta enzima propriedades de espectro estendido, diferenciando-a da sua progenitora SHV 1 (PATERSON; BONOMO, 2005). A SHV 1 é a enzima mais comumente encontrada em *K. pneumoniae* e está ligada a resistência

intrínseca dessa bactéria à ampicilina (BRADFORD, 2001; LIVERMORE, 1995).

Segundo *Lahey Clinic Foundation* (2014) hoje há mais de 183 β -lactamases tipo SHV e mais de 50 delas foram classificadas como de espectro estendido (LCF, 2014). É amplamente encontrada em isolados de *Enterobacteriaceae*, porém pode ser encontradas também em *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. (BRADFORD, 2001; HUANG et al., 2004; POIREL et al., 2004b).

B. ESBL do tipo TEM

A primeira β -lactamase descrita foi a do tipo TEM, em 1965, em um isolado clínico de *E. coli*, em Atenas. Esta enzima foi denominada TEM 1 (DATTA; KONTOMICHALOU, 1965), capaz de hidrolisar Ampicilina em uma taxa maior que a Carbenicilina, Oxacilina ou Cefalotina, e apresenta baixa atividade contra cefalosporinas de amplo espectro. A enzima TEM 2 possui o mesmo perfil da primeira e todas as ESBL do tipo TEM são derivadas dela (LIVERMORE, 1995; PATERSON; BONOMO, 2005)

A primeira ESBL do tipo TEM foi encontrada na França em 1987, um isolado de *K. pneumoniae* que carregava um gene plasmidial que codificava resistência a Cefotaxima. Primeiramente foi chamada de CTX 1, porém por haver diferença de apenas dois aminoácidos de TEM 2, foi denominada TEM 3 (SOUGAKOFF et al., 1988).

TEM 1 é a β -lactamase mais encontrada em bactérias Gram-negativas. Até 90% da resistência à ampicilina de *E. coli* é devido a expressão de TEM 1. Esta enzima está associada à resistência à ampicilina e penicilina de *H. influenzae* e *N. gonorrhoeae* (BROWN et al., 2009; LIVERMORE, 1995).

Atualmente estão descritos 216 tipos de TEM, sendo que mais de 100 são classificadas como ESBL (LCF, 2014). São mais comumente encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae*, porém estão sendo encontradas em outras espécies de enterobactérias e em não fermentadores (BERTRAND et al., 2003; BRADFORD, 2001; GALDBART et al., 2000; PAGANI et al., 2002).

C. ESBL do tipo CTX-M

No mesmo período em que surgiram as ESBLs TEM e SHV, foram descritas enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, porém apresentavam maior atividade contra a Cefotaxima do

que contra a Cefotaxima, então, foram denominadas CTX-M (MATSUMOTO et al., 1988).

As enzimas deste grupo não são derivadas das do tipo TEM e SHV, pois exibem 40% ou menos de identidade com as primeiras ESBLs (TZOUVELEKIS et al., 2000). Existe uma forte homologia entre as β -lactamases cromossomais de espécies de *Kluyvera* e as ESBLs do tipo CTX-M, por isso tem-se identificado a *Kluyvera* como potencial fonte das enzimas do tipo CTX-M, principalmente os tipos CTX-M 1, CTX-M 2 e CTX-M 9 (OLSON et al., 2005; RODRIGUEZ et al., 2004).

De acordo com Lahey Clinic Foundation (2014) estão descritas 150 ESBLs tipo CTX-M, as quais muitas delas são endêmicas em muitos países, sendo um problema de saúde pública (LIVERMORE et al., 2007).

2.5.3 Distribuição geográfica das ESBLs

As ESBLs são encontradas principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, sendo que a padronização de métodos fenotípicos para detecção dessas enzimas foi realizado para esses microrganismos. (BRADFORD, 2001).

Um Estudo de Monitoramento de Tendências da Resistência Antimicrobiana (SMART) foi publicado em 2013 sobre a suscetibilidade *in vitro* de bacilos Gram-negativos em todo o mundo. Foi demonstrado que *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis* foram predominantemente os microrganismos que apresentaram maior prevalência de ESBLs e carbapenemases (MORRISSEY et al., 2013).

A prevalência de ESBLs na Ásia de amostras intra-abdominais em 2002 era de aproximadamente 17% e em 2011 ultrapassou 40%. Na América Latina, em 2002, era 20% e em 2011, 28%. Na Europa, a prevalência em 2002 girava em torno de 5% e em 2011 um pouco mais que 12%. E a América do Norte possui a menor prevalência, em 2002 era de 5% e em 2011 em torno de 8%. Em amostras de urina, no ano de 2011, os resultados seguiram a mesma tendência, mostrando que a Ásia apresenta a maior prevalência com 45% das amostras produtoras de ESBL, seguida da América Latina com 28%, Europa e América do Norte com os menores resultados, 23% e 5%, respectivamente. Neste mesmo estudo eles relataram a dominância da CTX-M 15 como ESBL mais prevalente (MORRISSEY et al., 2013).

Outro estudo, realizado na região da Ásia e Pacífico, com amostras intra-abdominais coletadas em 2008 e 2009, mostrou que *E.*

coli, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* foram os microrganismos produtores de β -lactamases mais prevalentes. Além disso, as ESBLs tipo CTX-M foram as mais prevalentes, seguidas de SHV e TEM. As CTX-M 15 e 14 foram os tipos dominantes em enterobactérias e SHV 12 a variante de SHV mais frequente em *E. coli* e *K. pneumoniae*. A ESBL do tipo CTX-M 14 foi dominante na China, Coréia do Sul e Taiwan, enquanto CTX-M 15 foi na Índia, Malásia, Filipinas, Singapura, Austrália, Nova Zelândia e Tailândia. A ESBL do tipo SHV foi mais prevalente em Taiwan e Filipinas e dois terços eram do tipo SHV 2 (SHENG et al., 2013).

No Brasil, os estudos de prevalência de ESBL são escassos e as publicações são mais pontuais.

Um estudo realizado em um hospital de Ribeirão Preto mostrou que 19,8% dos isolados de *K. pneumoniae* e 25,8% de *K. oxytoca* eram produtoras de ESBL, onde 90% desses isolados expressavam o gene *bla*_{TEM} e 39% das estirpes de *K. pneumoniae* expressaram a ESBL do tipo CTX-M 2 (MINARINI et al., 2008a).

Um segundo estudo realizado em um hospital público em São Paulo detectou o gene *bla*_{SHV} em 63% das amostras, 33,9% de *bla*_{CTX-M} e 17,3% de *bla*_{TEM} (DROPA et al., 2009).

Outro trabalho realizado em Curitiba encontrou ESBL em 24% dos isolados, e uma prevalência de 57,4% em *K. pneumoniae*, 21,4% em *K. oxytoca* e 7,2% em *E. coli* (NOGUEIRA et al., 2006). Por outro lado, em Passo Fundo foi encontrado 46,2% de *E. coli* produtoras de ESBL, seguida de 30,3% de *Enterobacter* spp. e apenas 2,4% de *Klebsiella* spp (LAGO et al., 2010).

Tollentino e colaboradores (2011) encontraram, em um hospital terciário de São Paulo, como ESBL mais prevalente a do tipo CTX-M, sendo a CTX-M 2 mais frequente, juntamente com as variantes CTX-M 59 e CTX-M 15. Nesse mesmo estudo também foram encontradas as ESBLs do tipo SHV 12, SHV 31 e SHV 38 (TOLLENTINO et al., 2011).

Em 2011, Nogueira encontrou 24,02% de enterobactérias produtoras de ESBL em 1827 isolados provenientes de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba. Dessas, 74,3% eram do tipo CTX-M (sendo a mais prevalente a variante CTX-M 2), e 22% eram do tipo SHV, (sendo que 95% eram SHV 12) (NOGUEIRA, 2011).

2.5.4 Coexistência de β -lactamases

É cada vez mais comum observar microrganismos produtores de ESBL que expressam outras β -lactamases. Alguns estudos relatam a expressão de β -lactamases TEM 1 ou SHV 1 no mesmo microrganismo que expressa CTX-M (CARATTOLI, 2009; NOGUEIRA, 2011; OLIVEIRA; MARUYAMA, 2008; SHENG et al., 2013), outros, a coexistência de ESBL e AmpC (ANSSOUR et al., 2009; SHENG et al., 2013). Em 2011, Nogueira relatou a presença de duas ESBLs em uma mesma estirpe bacteriana, CTX-M 2 e CTX-M 9 (NOGUEIRA, 2011).

2.5.5 Detecção fenotípica de ESBL

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* são os dois comitês mais aceitos e empregados nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos mundialmente, embora alguns países, como a França, possuem seu próprio comitê, *Antibiogram Committee of the French Society for Microbiology (CA-SFM)*. No Brasil, os pontos de corte utilizados nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos (TSA) são seguidos conforme as normas de CLSI; porém, em 2010, a ANVISA publicou a Nota Técnica nº1/2010, que dispunha Medidas para Identificação e Controle de IrAS, onde passou a utilizar padrões de suscetibilidade a alguns antimicrobianos como Cefepime, Ceftazidime, Aztreonam, Ertapenem, Polimixina B e Tigeciclina do EUCAST (ANVISA, 2010). Em 2013, essa nota foi substituída pela Nota Técnica nº 1/2013 que dispõe de Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes, com foco na resistência aos carbapenêmicos (ANVISA, 2013b).

Em geral, os pontos de corte para a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para resistência do EUCAST são mais baixos que os considerados pelo CLSI, principalmente em se tratando de microrganismos Gram-negativos e, na maioria das vezes, no EUCAST, a zona de suscetibilidade intermediária não existe (WOLFENSBERGER et al., 2013).

Até 2009 tanto CLSI quanto EUCAST recomendavam que fossem reportados nos laudos como resistentes à penicilina, cefalosporinas e monobactâmicos as bactérias produtoras de ESBL que fossem suscetíveis ou que apresentassem resistência intermediária a algum desses antibióticos. Ou que modificassem o resultado de

suscetível para intermediário e de intermediário para resistente no TSA para penicilina, cefalosporinas e monobactâmicos (HOMBACH et al., 2013a). Nos últimos documentos publicados, essa recomendação foi retirada (CLSI, 2013; EUCAST, 2014). No entanto houve mudanças significativas nos pontos de corte dos diâmetros da zona de inibição das cefalosporinas, primeiramente adotadas pelo EUCAST e posteriormente pelo CLSI (HOMBACH et al., 2013a; HOMBACH et al., 2013b). Além disso, as últimas versões desses documentos não recomendam mais fazer testes fenotípicos para a confirmação da produção de ESBL como testes de rotina. Mas faz-se necessária a realização desses testes para fins epidemiológicos e de controle de infecção (CLSI, 2013; EUCAST, 2014).

A detecção de ESBL é baseada na diminuição da suscetibilidade às oximino-cefalosporinas e/ou aztreonam e na suscetibilidade aos inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (BRADFORD, 2001; DRIEUX et al., 2008). No Quadro 1 estão os pontos de corte para as cefalosporinas conforme as recomendações do CLSI (2014) e EUCAST (2014).

Quadro 1: Pontos de corte para Oximino-cefalosporinas e Aztreonam

Antimicrobianos	CLSI 2013						EUCAST 2014			
	CIM ($\mu\text{g/ml}$)			Disco-Difusão (mm)			CIM ($\mu\text{g/ml}$)		Disco-Difusão (mm)	
	S	I	R	S	I	R	S	R	S	R
Cefotaxime*	≤ 1	2	≥ 4	≥ 26	23-25	≤ 22	≤ 1	≥ 2	≥ 20	≤ 17
Ceftriaxone	≤ 1	2	≥ 4	≥ 23	20-22	≤ 19	≤ 1	≥ 2	≥ 23	≤ 20
Ceftazidime**	≤ 4	8	≥ 16	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 1	≥ 4	≥ 22	≤ 19
Cefepime	≤ 2	4-8	≥ 16	≥ 25	19-24	≤ 18	≤ 1	≥ 4	≥ 24	≤ 21
Aztreonam	≤ 4	8	≥ 16	≥ 21	18-20	≤ 17	≤ 1	≥ 4	≥ 24	≤ 21

*Concentração do disco = 5 μg (EUCAST, 2014); **Concentração do disco = 10 μg (EUCAST, 2014); S: Suscetível; I: Intermediário; R: Resistente.

Fonte: (CLSI, 2014; EUCAST, 2014).

Segundo o CLSI, é indicativo de produção de ESBL se amostras de *E. coli*, *K. pneumoniae* ou *K. oxytoca* apresentarem os seguintes

halos de inibição no teste de suscetibilidade pelo método da disco difusão: Ceftazidime ≤ 22 mm, Cefpodoxime ≤ 17 mm, Aztreonam ≤ 27 mm, Cefotaxime ≤ 27 mm e Ceftriaxone ≤ 25 mm (CLSI, 2013).

Inúmeros testes fenotípicos para a detecção de ESBL estão descritos, a maioria deles são baseados na metodologia de Kirby-Bauer ou disco-difusão (BAUER et al., 1966), como o teste de disco aproximação ou dupla difusão, teste do disco combinado e E-test®. Porém a detecção fenotípica pode ser realizada pela metodologia das diluições ou método automatizado, como o Vitek® (bioMérieux).

O teste de disco aproximação foi descrito a primeira vez em 1988 (JARLIER et al., 1988). Essa metodologia consiste na colocação de discos de Ceftazidime (30 μ g), Cefotaxime (30 μ g), Cefpodoxime (10 μ g), Cefepime (30 μ g) e Aztreonam (30 μ g) distantes centro a centro (30 mm) de um disco contendo Ácido Clavulânico. A produção de ESBL é indicada pela deformação nos halos de inibição ao redor dos discos dos β -lactâmicos ou pelo aparecimento da “zona fantasma” (DRIEUX et al., 2008; GARREC et al., 2011). No entanto, se a distância for de 20 a 30 mm a sensibilidade da metodologia pode aumentar (GARREC et al., 2011; LIVERMORE; BROWN, 2001).

O teste do disco combinado é a metodologia recomendada pelo CLSI na detecção de ESBL. A técnica é baseada na diferença de inibição de halo na presença de um inibidor, então se utiliza discos contendo apenas os antibióticos Ceftazidime e Cefotaxime e discos contendo os antibióticos adicionados de ácido clavulânico (Ceftazidime + Ác. Clavulânico e Cefotaxime + Ác. Clavulânico). Se houver o aparecimento de um halo de inibição ≥ 5 mm ao redor dos discos contendo o inibidor comparando com os disco sem ele, então é indicativo que a bactéria produza ESBL (CLSI, 2013).

O Etest® consiste de uma fita plástica disponível comercialmente, impregnada com concentrações crescentes de antimicrobiano. Esse teste é baseado na junção da metodologia das diluições com a de disco-difusão. Na pesquisa de ESBL, por ESBL Etest®, a fita contém em uma das extremidades uma cefalosporina de amplo espectro (Ceftazidima, Cefotaxima, Cefepima) e do outro lado o mesmo antibiótico associado a uma concentração fixa (2 μ g/ml) de Ácido Clavulânico, sendo possível avaliar a CIM do antibiótico sozinho ou com o inibidor. Se a razão entre a CIM do antibiótico com a CIM do antibiótico mais o inibidor for ≥ 8 é indicativo de produção de ESBL. Algumas vezes pode haver o aparecimento da “zona fantasma” também (CORMICAN et al., 1996; GARREC et al., 2011).

Dentre as metodologias automatizadas, o Vitek2[®] (bioMérieux) é a mais utilizada. O cartão do Vitek2[®] para a detecção de ESBL utiliza diluição em caldo de Cefotaxima e Ceftazidima sozinhas (0,5µg/ml) e em combinação com Ác. Clavulânico a 4µg/ml. Após a inoculação das placas contendo quatro cavidades do teste Vitek2[®] ESBL a análise é realizada automaticamente, depois que o controle de crescimento alcança o limite definido (de 4 a 15h de incubação). A redução do crescimento no poço que tenha o antibiótico e o inibidor comparado com o nível de crescimento no poço que só tenha o antibiótico é indicativa da produção de ESBL (LEVERSTEIN-VAN HALL et al., 2002; SANDERS et al., 1996; SPANU et al., 2006)

As metodologias de detecção de ESBL foram padronizadas para a detecção dessas enzimas em *E. coli* e *Klebsiella* spp., por isso em bactérias que produzem β-lactamases cromossômicas induzíveis, como AmpC em *Enterobacter* spp., a detecção de ESBL pode apresentar resultados falso negativos, já que essas enzimas são resistentes aos inibidores de β-lactamases. No entanto algumas medidas podem ser tomadas para contornar esse problema. Na realização dos métodos de disco aproximação ou disco combinado, pode-se utilizar os inibidores Tazobactam ou Sulbactam que são menos indutores de AmpC que o Ác. Clavulânico e incluir o Cefepime nos testes fenotípicos, pois as AmpCs possuem menor efeito sobre esse antimicrobiano (GARCÍA et al., 2010; THOMSON, 2001). Ou ainda, incluir inibidores de AmpC, como a Cloxacilina, no Ágar Muller-Hinton, afim de inibir a expressão dessas enzimas (GARCÍA et al., 2010; GARREC et al., 2011; THOMSON, 2001).

2.5.6 Detecção Molecular de ESBL e Genotipagem Bacteriana

A detecção molecular de ESBL oferece maior potencial diagnóstico e informações epidemiológicas mais precisas, principalmente no controle de surtos. O método molecular mais comum para a detecção de ESBL é a PCR, onde iniciadores específicos são desenhados para amplificar e detectar um ou mais genes de ESBL. Esses iniciadores geralmente são escolhidos para se ligar a regiões que não sofrem mutações pontuais, não discriminando qual variante daquela ESBL específica a bactéria possui (PATERSON; BONOMO, 2005; SHAH et al., 2004).

Devido à variedade de enzimas existentes e a possibilidade dos microrganismos expressarem mais de uma enzima, a PCR multiplex é a ferramenta mais utilizada nas pesquisas de vigilância epidemiológica

(DALLENE et al., 2010). Vários estudos desenvolveram metodologias de PCR multiplex para a detecção de ESB, metalobetalactamases e carbapenemases (CHIA et al., 2005; DALLENE et al., 2010; ELLINGTON et al., 2007; POIREL et al., 2011; WOODFORD et al., 2006).

Compreender a distribuição e a similaridade genética entre os microrganismos é de suma importância para determinar a epidemiologia das infecções nosocomiais e auxiliar nos programas de prevenção e controle da disseminação do patógeno. Existem inúmeras metodologias para genotipagem bacteriana e dentre as mais utilizadas estão a Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE), considerada a metodologia padrão ouro e *Multilocus Sequence Typing* (MLST) (GARCIA, et al., 2014; KARAMI, et al., 2013; PIRES, et al., 2014; RAFEI, et al., 2014; SCHUMANN; PUKALL, 2013). Entre os métodos de genotipagem baseados em PCR, o Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) é amplamente utilizado em estudos epidemiológicos por ser simples, rápido, reprodutível e de baixo custo (MATHIS, et al., 2011; NANVAZADEH et al., 2013; REZK, et al., 2012)

A técnica de RAPD é uma variação do PCR comum. Nela se utiliza um único iniciador com aproximadamente dez oligonucleotídeos que se ligará aleatoriamente no DNA gerando um padrão de produtos que serão visualizados em gel de agarose ou poliacrilamida (BARDAKCI, 2001; LEUZZI et al., 2004).

A metodologia de genotipagem bacteriana considerada padrão ouro é a Eletroforese de Campo Pulsado (PFGE). Essa técnica foi desenvolvida em 1984, por Schwartz e Cantor, originalmente utilizada na separação do cromossomo de *Saccharomyces cerevisiae* (SCHWARTZ; CANTOR, 1984). A metodologia de PFGE utiliza uma enzima de restrição específica para quebrar o DNA em locais determinados, conhecidos como sítios de restrição. Essas enzimas são selecionadas para gerar um número pequeno de pedaços de DNA que podem ser separados com base no seu tamanho. Antes de ser tratado com a enzima de restrição, o DNA bacteriano passa por uma série de tratamentos e finalmente é colocado em pequenos blocos de agarose. Uma vez nesses blocos, o DNA é tratado com a enzima de restrição e preparado para a eletroforese em gel de agarose. Diferentemente de uma eletroforese convencional, a PFGE separa os fragmentos de restrição de tamanhos grandes através de um campo elétrico que muda de direção e intensidade dos pulsos elétricos em diferentes espaços de tempo, gerando um padrão de bandas que será o padrão cromossômico daquela amostra, ou uma espécie de impressão digital daquele microrganismo

(CANTOR et al., 1988; CDC, 2013). Esse método é amplamente utilizado na genotipagem de bactérias e existe uma série de publicações atuais com a aplicação da técnica em enterobactérias (CHANG et al., 2013; DHANJI et al., 2011; HAN et al., 2013; PASANEN et al., 2013; RADU et al., 2001; THOMAS et al., 2013; WATABE et al., 2008; WELINDER-OLSSON et al., 2004).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Estudar, por métodos fenotípicos e genotípicos, o perfil de resistência de cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. produtoras de ESBL (β -lactamases de espectro estendido) isoladas de pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

3.2 Objetivos específicos

- Executar testes de suscetibilidade aos antimicrobianos pelo método de Kirby-Bauer e determinar os perfis de suscetibilidade das amostras estudadas;
- Realizar o teste fenotípico de Disco Aproximação para a detecção da produção de ESBL;
- Padronizar uma PCR multiplex para detecção simultânea dos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}*;
- Determinar a prevalência dos genes *bla_{TEM}*, *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* nas amostras estudadas.
- Avaliar a variabilidade genética dos isolados por RAPD;
- Relacionar os dados fenotípicos e genotípicos das bactérias isoladas.

4 Metodologia

4.1 Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)

O Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC) é um hospital de médio porte, conta com 302 leitos e atua nos três níveis de assistência: o básico, o secundário e o terciário. É referência estadual para patologias complexas, clínicas e cirúrgicas e atende adultos e crianças da Grande Florianópolis e de todo o Estado de Santa Catarina. O Laboratório de Análises Clínicas do HU é o responsável pelo suporte laboratorial do hospital.

4.2 Amostras bacterianas

Foram coletados isolados bacterianos de 145 amostras provenientes de infecções de corrente sanguínea, do trato urinário, do trato respiratório e de ferida cirúrgica de pacientes internados no Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina (HU/UFSC) no período de agosto de 2012 a julho de 2013.

O isolamento e a identificação dos microrganismos foram realizados pelo Setor de Microbiologia do Serviço de Análises Clínicas do HU/UFSC. A identificação das bactérias foi realizada no equipamento Vitek 2[®] (bioMérieux, Basingstoke, Reino Unido). Este sistema automatizado utiliza cartões com reagentes colorimétricos, que são inoculados com uma suspensão bacteriana de cultura. Cada cartão possui 64 poços, cada um contendo um substrato de teste. Esses substratos medem as diversas atividades metabólicas bacterianas, como: edificação, alcalinização, hidrólise enzimática (BIOMÉRIEUX, 2013).

Para não haver a identificação dos pacientes, os isolados foram nomeados aleatoriamente, contendo apenas informações cabíveis: nome da bactéria, tipo de amostra e setor de internação.

As bactérias isoladas foram conservadas em BHI com 30% de glicerol (V/V) e acondicionadas a -20°C até o processamento.

4.3 Teste de Suscetibilidade aos Antimicrobianos (TSA)

A determinação da suscetibilidade aos antimicrobianos foi efetuada pelo sistema Vitek 2[®] (bioMérieux, Basingstoke, Reino Unido) Para cada tipo de amostra foi utilizado um cartão padrão de antibióticos

(os nomes sublinhados indicam as diferenças nos cartões). Para amostras de urina o cartão utilizado foi o N238 e os antibióticos testados foram: Amicacina, Amoxicilina/Ácido clavulânico, Ampicilina, Cefalotina, Cefepime, Ceftriaxone, Cefuroxima, Ciprofloxacino, Ertapenem, Gentamicina, Meropenem, Ácido Nalidíxico, Nitrofurantoína, Norfloxacina, Piperacilina/Tazobactam e Trimetoprim/Sulfametoxazol. Para amostras de sangue, secreção traqueal e ferida cirúrgica foi utilizado o cartão N239 com os antibióticos: Amicacina, Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Aztreonam, Cefalotina, Cefepime, Cefotaxime, Ceftazidime, Ciprofloxacina, Colistina, Ertapenem, Gentamicina, Imipenem, Meropenem, Piperacilina/Tazobactam, Tigeciclina. Ambos os cartões realizam teste fenotípico do Disco Combinado para a detecção de ESBL. Esses cartões possuem seis poços contendo Cefepime (1,0 µg/ml), Cefotaxime (0,5 µg/ml) e Ceftazidime (0,5 µg/ml) sozinhos e associados com Ácido Clavulânico (10, 4 e 4 µg/ml, respectivamente). A redução proporcional do crescimento nos poços contendo as cefalosporinas associadas com o inibidor comparadas com o crescimento nos poços contendo apenas as cefalosporinas é indicativo da produção de ESBL (SPANU et al., 2006)

A fim de estabelecer um perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos, foram realizados testes adicionais com outros antibióticos. A metodologia utilizada foi a de Kirby-Bauer (BAUER et al., 1966). Os antibióticos testados foram: Cefazolina (DME[®], Lote: 2059CFZ), Ticarcilina/Ácido Clavulânico (DME[®], Lote: 2065TAC), Piperacilina/Tazobactam (Cecon[®], Lote: 3893), Norfloxacina (DME[®], Lote: 2066NOR). Ainda para as amostras de urina foram testados: Ceftazidime (Cecon[®], Lote: 3898), Cefotaxime (Cecon[®], Lote: 3919), Aztreonam (Cecon[®], Lote: 2052ATM), Ampicilina/Sulbactam (Cecon[®], Lote: 2043APS) e Imipenem (Cecon[®], Lote: 2089IPM). Para as demais amostras: Ceftriaxone (DME[®], Lote: 2100CRO), Cefuroxima (Cecon[®], Lote: 3857), Amoxicilina/Ácido Clavulânico (DME[®], Lote: 2048AMC), Sulfazotrim (Cecon[®], 3974) e Levofloxacina (DME[®], Lote: 2049LEV).

Preparou-se uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de MacFarland (1,0x10⁸ UFC/ml) e com o auxílio de um swab semeou-se a amostra em uma placa de ágar Muller-Hinton (Prodimol Biotecnologia[®]). Em seguida, os discos de antibióticos foram adicionados com a ajuda de uma pinça. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24h. Após esse período foram feitas as leituras nos halos de inibição. A interpretação dos resultados foi realizada conforme estabelecida o CLSI (2013).

4.4 Teste de disco aproximação

Para todas as amostras que tiveram resultado positivo para produção de ESBL pelo Vitek 2[®] (bioMérieux) foi realizado o teste fenotípico de disco aproximação, conforme descrito por Jarlier (JARLIER et al., 1988).

Foi preparada uma suspensão bacteriana na escala 0,5 de MacFarland. Com o auxílio de um swab foi inoculada em uma placa de Muller-Hinton. Em seguida, foram adicionados os discos de Amoxicilina/Ácido Clavulânico (DME[®], Lote: 2048AMC), Ceftazidime (Cecon[®], Lote: 3898), Ceftriaxone (DME[®], Lote: 2100CRO), Cefotaxime (Cecon[®], Lote: 3919), Cefepime (Cecon[®], Lote: 3877) e Aztreonam (Cecon[®], Lote: 2052ATM) distantes centro a centro de um disco de Amoxicilina/Ácido Clavulânico. A distância entre os discos variou de 20 a 30 mm, no entanto, a distância que melhor detectou as ESBL foi de 20 mm. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 18 a 24h. Após esse período foi realizada a leitura das placas. O aparecimento de distorção no halo de inibição das cefalosporinas ou do aztreonam, ou o aparecimento de uma “zona fantasma” foi indicativo que a amostra produzia ESBL.

4.5 Amplificação dos genes codificadores de ESBL

Todas as amostras que obtiveram resultados positivos no teste fenotípico para detecção de ESBL, tanto no Vitek quanto no teste de disco aproximação, foram testados por PCR para a pesquisa de *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}.

4.5.1 Extração do DNA

Os isolados bacterianos foram semeados em ágar Muller Hinton, incubados a 37°C por 18 a 24 horas. Após esse período, em um microtubo de 1,5 ml contendo água ultra-pura estéril, preparou-se uma suspensão densa a partir da raspagem das colônias. A suspensão foi fervida em banho-maria a 100°C por 15 minutos, com o intuito de lisar as células bacterianas liberando o seu material genético. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 2 minutos a 5.600 x g (10.000 rpm). O sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro microtubo de 0,6 ml e acondicionado a -20°C até o momento da reação de PCR.

4.5.2 Iniciadores

A análise das características dos iniciadores descritos na literatura (Quadro 2) foi realizada utilizando o programa PrimerSelect (Lasergene®).

O par de iniciadores para amplificação do 16S DNAr, utilizado nas reações de PCR como controle interno, foi desenhado para este estudo. Primeiramente, sequências genômicas de DNA da subunidade 16S do RNAr bacteriano foram alinhadas pelo programa BioEdit (HALL, 1999). As regiões similares foram utilizadas para desenho dos iniciadores com o programa PrimerSelect (Lasergene®).

A especificidade de todos os iniciadores foi avaliada pela ferramenta Primer Blast (NCBI). A lista completa dos iniciadores utilizados neste estudo está disposta no quadro 2.

Quadro 2: Sequência de iniciadores utilizados na pesquisa de ESBL.

Enzima		Iniciador	Produto	Referência
CTX-M Grupo 1	F	CCA TGG TTA AAA AAT CAC TGC G	431 pb	Modificado de (WOODFORD et al., 2006)
	R	AGC AAT CAG CTT ATT CAT CGC C		
CTX-M Grupo 2	F	CGA CGC TAC CCC TGC TAT T	552pb	(WOODFORD et al., 2006)
	R	CCA GCG TCA GAT TTT TCA GG		
CTX-M Grupo 9	F	CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG	205pb	(WOODFORD et al., 2006)
	R	ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC		
TEM	F	TTC CGT GTC GCC CTT ATT C	782pb	Modificado de (DALLEENNE et al., 2010)
	R	CCT GAC TCC CCG TCG TGT A		
SHV	F	GCA AAT TAA ACT AAG CGA AAG CC	705pb	Modificado de (DALLEENNE et al., 2010)
	R	GTA TCC CGC AGA TAA ATC ACC AC		
16S	F	GGG TGA GTA ATG TCT GGG AAA C	929pb	Este estudo
	R	TTC CCG AAG GCA CCA ATC		

Os iniciadores CTX-M do Grupo 1 amplificam os seguintes tipos: CTX-M 1, CTX-M 3, CTX-M 10, CTX-M 11, CTX-M 12, CTX-M 15, CTX-M 22, CTX-M 32, CTX-M 33, CTX-M 37, CTX-M 42, CTX-M 54, CTX-M 55, CTX-M 57, CTX-M 61, CTX-M 68, CTX-M 71, CTX-M 79, CTX-M 82, CTX-M 89, CTX-M 101, CTX-M 116, CTX-M 117, CTX-M 136, CTX-M 142.

Os iniciadores CTX-M do Grupo 2 amplificam CTX-M 2, CTX-M 4, CTX-M 5, CTX-M20, CTX-M 31, CTX-M 35, CTX-M 43, CTX-M 56, CTX-M 59, CTX-M 92, CTX-M 97, CTX-M 131.

Já os iniciadores do Grupo 9 amplificam CTX-M dos tipos: CTX-M 9, CTX-M 13, CTX-M 14, CTX-M 16, CTX-M 17, CTX-M 18, CTX-M 19, CTX-M 24, CTX-M 27, CTX-M 38, CTX-M 51, CTX-M 65, CTX-M 82, CTX-M 83, CTX-M 84, CTX-M 85, CTX-M 86, CTX-M 90, CTX-M 93, CTX-M 98, CTX-M 99, CTX-M 104, CTX-M 105, CTX-M 106, CTX-M 110, CTX-M 111, CTX-M 112, CTX-M 113, CTX-M 121, CTX-M 122, CTX-M 127, CTX-M 134.

Os iniciadores TEM amplifcam os tipos: TEM 1, TEM 19, TEM 52, TEM 116, TEM 135, TEM 143, TEM 153, TEM 177, TEM 183, TEM 185, TEM 186, TEM 188, TEM 189, TEM 190, TEM 193, TEM 194, TEM 195, TEM 196, TEM 197, TEM 199, TEM 201.

E finalmente, os iniciadores SHV amplificam os tipos: SHV 1, SHV 2, SHV 5, SHV 7 SHV 8, SHV 10, SHV 11, SHV 12, SHV 13, SHV 18, SHV 19, SHV 24, SHV 25, SHV 26, SHV 27, SHV 28, SHV 29, SHV 30 - 38, SHV 40-44, SHV 46, SHV 48, SHV 49 SHV 50, SHV 51, SHV 55, SHV 56, SHV 57, SHV 59, SHV 60 – 71, SHV 73, SHV 83, SHV 85, SHV 86, SHV 89, SHV 92, SHV 93 – 107, SHV 108, SHV 109, SHV 120-126, SHV 129, SHV 132, SHV 133, SHV 134, SHV 135, SHV 136, SHV 137 SHV 140, SHV 141, SHV 142, SHV 144, SHV 145, SHV 147, SHV 148, SHV 150 - 163, SHV 165, SHV 167, SHV-168.

4.5.3 Reações de PCR

Foram realizadas duas reações de PCR multiplex para a determinação dos tipos de enzima de cada amostra. Na primeira reação foram adicionados os iniciadores CTX-M do Grupo 1, Grupo 2 e Grupo 9 e o 16S. Na segunda reação os iniciadores utilizados foram TEM, SHV e 16S.

Para chegar a estas duas reações de PCR multiplex, cada iniciador foi testado individualmente (Figura 5), passando por um gradiente de temperatura de anelamento que variava de 50 °C a 60 °C

com intervalos de 2 °C entre elas. Ainda, foi testada a concentração ideal de MgCl₂ na reação de 1,0 mM, 1,5 mM, 2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 10 µl, contendo água ultra-pura (4,2 µl), tampão de enzima 5x (2,0 µl) (5X Green GoTaq® Reaction Buffer, Promega®), 1,5 mM de MgCl₂ (0,6 µl), 200 µM de desoxinucleotídeos trifosfatados (dNTP) (1,0 µl), 1 µM de cada um dos iniciadores (senso e antissenso) (0,5 µl), 1U de GoTaq® DNA Polymerase (Promega®) 5 U/µl (0,2 µl) e 1µl de DNA.

As condições das reações foram as mesmas para os dois conjuntos de iniciadores, seguindo-se a metodologia para PCR *in house*. A desnaturação ocorreu a 95 °C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto. A extensão final se deu a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos das reações foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA), corados pelo brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografados usando transiluminador. O padrão de tamanho molecular utilizado foi 100 bp Sharp DNA Marker (Real Biotech Corporation®).

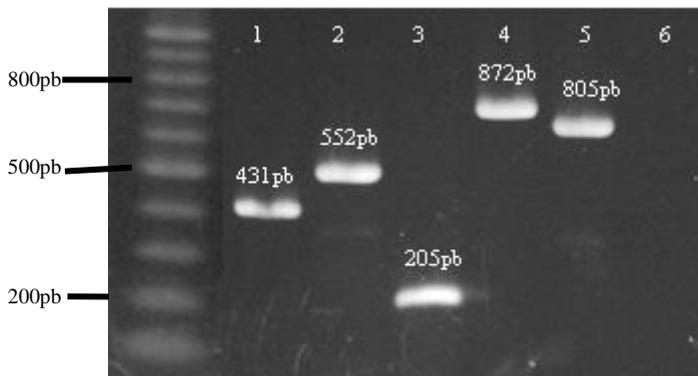


Figura 5: Foto dos produtos amplificados de cada iniciador.

Legenda: 1: CTX-M grupo 1; 2: CTX-M grupo 2; 3: CTX-M grupo 9, 4: TEM; 5: SHV; 6: Controle negativo

4.5.4 Sequenciamento

A identidade dos produtos amplificados de cada gene foi confirmada por sequenciamento em um equipamento Hitachi 3500 Genetic Analyzer (AB Applied Biosystems®, Foster City/EUA), sendo a reação de sequenciamento preparada a partir do Kit BigDye®

Terminator (AB Applied Biosystems®, Foster City/EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Resumidamente, as reações foram realizadas na presença de 5 pmol dos iniciadores específicos de cada produto e 7 µl do produto de PCR purificado por precipitação, nas seguintes condições térmicas: um passo inicial de desnaturação a 96°C por 60 segundos seguidos por 35 ciclos de desnaturação a 96°C por 1 segundo, ligação dos iniciadores a 50°C por 5 segundos com rampa de alteração da temperatura de 1°C/segundos, e extensão a 60°C por 240 segundos. Posteriormente os produtos marcados foram precipitados utilizando etanol/EDTA para a retirada dos nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Os produtos purificados foram ressuspensos em 10 µl de formamida e eletroinjetados. A montagem dos *contigs* e a análise da qualidade foram feitas por meio do pacote Phred/Phrap/Consed (<http://www.phrap.org>) (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998). A confirmação da identidade dos fragmentos foi realizada utilizando o algoritmo BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST). Todas as etapas do sequenciamento e análise das sequências obtidas foram realizadas em colaboração com o Laboratório de Protozoologia (www.proto.ufsc.br) e o Laboratório de Bioinformática da UFSC (www.bioinformatica.ufsc.br).

Os isolados submetidos ao sequenciamento, posteriormente foram utilizados como controle positivo das reações de PCR multiplex.

4.5.5 Genotipagem por RAPD

Para o estudo da variabilidade genética entre os isolados produtores de ESBL realizou-se a técnica de RAPD. Esta técnica é uma variação da técnica de PCR convencional avaliando-se o perfil obtido após uma amplificação randômica do DNA alvo.

Foram testados vários iniciadores randômicos (3303: TCA CGA TGA A; 3304: GCA CTG TCA; 3306: AGC ATC TGT T; 3307: AGT GCT ACG T e Randon Hexamers (Qiagen®) específicos para RAPD, entretanto não foram observadas bandas de amplificação. O iniciador testado com melhor perfil de bandas foi o denominado “KPC reverse” do estoque de iniciadores do Laboratório de Microbiologia Molecular, com 17 bases (5’ GCG GAT GCG GTG GTT GC 3’).

O volume final desta reação foi de 10 µl, contendo água ultra-pura (5,5 µl) tampão de enzima 10x (1,0 µl) (200 mM Tris-HCl pH 8,4, 500 mM KCl), 1,5 mM de MgCl₂ (0,3 µl), 200 µM de dNTP (1,0 µl), 1µM do iniciador (KPC reverse) (1,0 µl), 1U de Taq-DNA polimerase (Invitrogen®) 5 U/µl (0,2 µl) e 1µl de DNA.

As condições de amplificação foram: desnaturação a 95 °C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 38°C por 40 segundos e 72 °C por 1 minuto. A extensão final se deu a 72 °C por 7 minutos.

Os produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris 89 mM, Borato 89 mM, 2 mM EDTA), corados pelo brometo de etídio a 0,5 µg/ml e fotografados usando transiluminador. O padrão de tamanho molecular utilizado foi 100 bp Sharp DNA Marker (Real Biotech Corporation®).

O perfil eletroforético foi analisado segundo os critérios de Tenover (1995) (Tabela 1) que considera um isolado “intimamente relacionado” a outro quando o seu padrão difere com um único evento genético, ou seja, uma inserção ou deleção no DNA, o que geralmente resulta em duas ou três bandas diferentes. Essas variações podem ser observadas em estirpes de algumas espécies quando cultivadas repetidas vezes ou quando isoladas muitas vezes do mesmo paciente.

Quando são observadas diferenças de quatro a seis bandas, ocorreram dois eventos genéticos independentes e esses isolados são considerados “possivelmente relacionados”. Essas variações ocorrem entre isolados coletados por períodos de tempo maior que seis meses ou obtidos de um grande número de pacientes envolvidos em um surto de longa duração.

Finalmente, um isolado é considerado “não relacionado epidemiologicamente” com outro quando seus padrões apresentam uma diferença maior que sete bandas, ou seja, diferenças consistentes com três ou mais eventos genéticos independentes, isso significa que menos de 50% do padrão de bandas de um está não relacionado com o outro (TENOVER et al., 1995)

Tabela 1: Critérios interpretativos para os padrões de PFGE segundo (TENOVER et al., 1995)

Categoria	Nº de diferenças genéticas	Nº típico de diferenças nas bandas	Interpretação
Indistinguíveis	0	0	Parte de um surto
Intimamente relacionadas	1	2 - 3	Provavelmente parte de um surto
Possivelmente relacionadas	2	4 - 6	Possivelmente parte do surto
Diferentes	≥ 3	≥ 7	Não faz parte do surto

Os perfis eletroforéticos do DNA bacteriano, ainda, foram analisados e interpretados visualmente, gerando uma representação visual de presença/ausência de bandas e um genótipo binário (0=ausência / 1=presença). Na análise computacional, a matriz de distância foi gerada pelo programa DendroUPGMA (GARCIA-VALLVÉ; PUIGBO, 2009), onde os percentuais de similaridades foram estimados pelo Coeficiente de Dice e a construção dos dendogramas foi executado pelo programa MEGA 6.05 (TAMURA, KOICHIRO et al., 2013) a partir da matriz gerada, utilizando o modelo matemático UPGMA (*Unweighted Pair Group Method*).

5 Resultados e Discussão

As enterobactérias estão entre as principais causas de infecção em praticamente todos os sítios do organismo, atingindo adultos, crianças e idosos e podendo ser tanto de origem hospitalar como comunitária (SCHWABER et al., 2004). De acordo com a CCIH do HU/UFSC, de janeiro de 2009 a agosto de 2012, cerca de 46 % das infecções hospitalares foram causadas por microrganismos da família *Enterobacteriaceae*, especialmente *K. pneumoniae* (44,8%), *E. coli* (34,0%) e *Enterobacter* spp. (12,3%). Com base nessas informações, optou-se por estudar as enterobactérias mais prevalentes como causa das infecções relacionadas à assistência à saúde (IRAS), no HU/UFSC.

Foram analisadas 145 estirpes bacterianas, das quais 97 (66,9%) de *E. coli*, 37 (25,5%) de *Klebsiella pneumoniae*, 6 (4,1%) de *Enterobacter cloacae* e 5 (3,4%) *Enterobacter aerogenes*, isoladas de todas as amostras de urina, corrente sanguínea, secreção traqueal e secreção de ferida cirúrgica submetidas a exame de cultura e provenientes dos pacientes internados no HU/UFSC, no período estudado.

Do total de isolados estudados, 33 (22,7 %) foram provenientes de pacientes internados na UTI, 29 (20 %) na Clínica Médica II, 22 (15,2 %) na Clínica Cirúrgica I, 21 (14,5 %) na Clínica Médica III, 18 (12,4%) na Clínica Cirúrgica II, nove (6,2%) na Clínica Médica I e 13 (9%) em outros setores de internação (Figura 6).

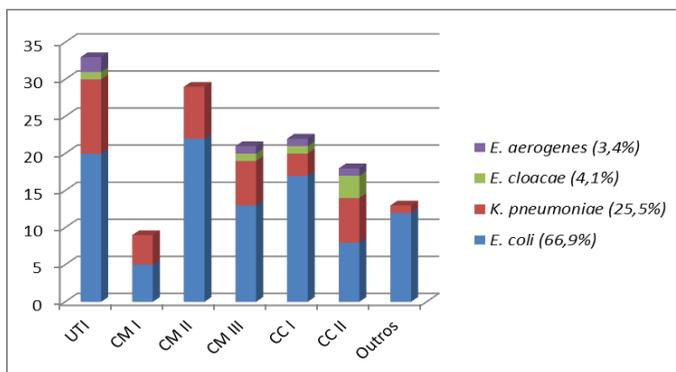


Figura 6: Distribuição dos isolados clínicos por microrganismos isolados em cada setor de internação. Legenda: CM I: Clínica Médica I; CM II: Clínica Médica II, CM III: Clínica Médica III, CC I: Clínica Cirúrgica I; CC II: Clínica Cirúrgica II.

A distribuição dos isolados visualizada na figura 7 mostra que os sítios anatômicos mais afetados foram o trato urinário, de onde foram isoladas 118/145 (81,4%) estirpes bacterianas, seguido da corrente sanguínea, com 14/145 (9,6%) isolados, ferida cirúrgica, com 12/145 (8,3%) e secreção traqueal, com 1/145 (0,7%).

As infecções do trato urinário foram as que contribuíram com o maior número de isolamentos, 118 dos 145 e, como esperado, *E. coli* foi identificada em 86 (73%) das amostras de urina, *K. pneumoniae* em 26 (22%), *E. cloacae* em 2 (1,7%) e *E. aerogenes* em 4 (3,4%). Nas amostras de sangue foram isoladas 8 (57,1%) *E. coli*, 4 (28,6%) *K. pneumoniae*, 1 (7,1%) *E. cloacae* e 1 (7,1%) *E. aerogenes*. Das amostras de ferida 3 (25%) dos isolados foram *E. coli*, 6 (50%) *K. pneumoniae* e 3 (25%) *E. cloacae*. Apenas uma amostra de secreção traqueal foi coletada e o microrganismo isolado foi *K. pneumoniae* (Figura 7).

Dados da literatura científica, reiteradamente constataam que a grande maioria das infecções hospitalares ocorre nos mesmos quatro sítios anatômicos observados nesse trabalho (ANVISA, 2004b; CCIH/HU, 2013; ECDC, 2013). Neste estudo, o setor de internação que mais apresentou registros de infecções hospitalares foi a UTI, corroborando dados de outros pesquisadores (BARROS et al., 2012; DAL-BÓ et al., 2012; NOGUEIRA et al., 2009; PARUCKER, 2010; ROSENTHAL et al., 2010).

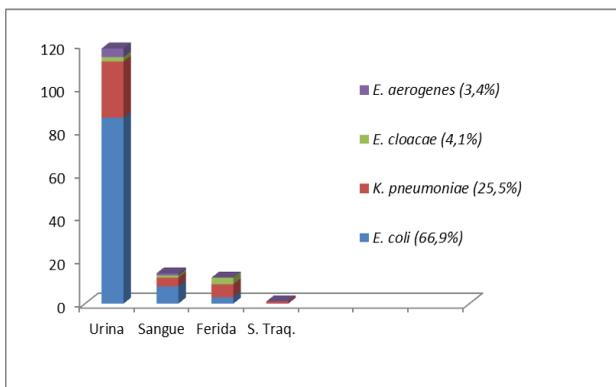


Figura 7: Distribuição dos microrganismos isolados por sítio anatômico.

O Programa de Vigilância Antimicrobiana SENTRY, 2012, reportou que, de 2008 a 2011, a maioria dos isolados de IrAS na América Latina foi proveniente de infecções de corrente sanguínea

(52,6%), seguida de ferida cirúrgica (22,9%) e pneumonia (13,1%). Ainda segundo o SENTRY, 2012, entre os microrganismos mais prevalentes nas infecções de corrente sanguínea estão *S. aureus* (20,7%), *E. coli* (19%) e *Klebsiella* spp. (12,3%) e nas pneumonias, *P. aeruginosa* (31,2%), *S. aureus* (20%), *Acinetobacter* spp. (17,7%), *Klebsiella* spp. (10,2%) e *Enterobacter* spp. (5,1%) são os mais prevalentes (GALES et al., 2012). A distribuição por sítio anatômico, assim como dos microrganismos mais prevalentes em IrAS, podem variar de instituição para instituição, mesmo pertencendo ao mesmo país. Por isso, ressalta-se a importância de estudos epidemiológicos locais para que se conheça o microbiota daquele ambiente e o perfil de suscetibilidade para que se tomem as medidas de controle e prevenção de infecções devidamente cabíveis àquele local.

Na Tabela 2 está disposta a distribuição das enterobactérias selecionadas para este estudo, isoladas no Setor de Análises Clínicas do HU provenientes de infecção hospitalar no HU/UFSC entre janeiro de 2009 e julho de 2013. Observa-se que no ano de 2009, a prevalência de *E. coli* produtora de ESBL foi de 23% e que em 2011 a prevalência foi de 39,7%. Neste estudo esta taxa foi de 13,4%. A prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL em 2009 foi de 64,5%, em 2011 foi 56,5% e neste estudo, 65%.

Tabela 2: Distribuição das enterobactérias isoladas de infecção hospitalar no período de janeiro de 2009 a julho de 2013, com destaque para as produtoras de ESBL.

Enterobactérias	ago/2012 - jul/2013 ¹		2009 ²		2010 ²		2011 ²	
	nº	%	nº	%	nº	%	nº	%
<i>Escherichia coli</i>	84	58	67	31,2	36	23,3	47	25
<i>E. coli</i> ESBL	13	9	20	9,3	6	3,9	31	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	13	9	28	13	56	36,4	43	23
<i>K. pneumoniae</i> ESBL	24	16,5	51	23,7	56	36,4	52	27
<i>Enterobacter aerogenes</i>	5	3,5	10	4,6	0	0	0	0
<i>Enterobacter cloacae</i>	6	4	39	18,1	0	0	17	9
Total	145	100	215	100	154	100	190	100

Fonte: 1: Dados do autor; 2: (CCIH/HU, 2013)

5.1 Perfis de suscetibilidade dos isolados

O perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos da *E. coli*, disposto na Tabela 3, mostra que houve uma pequena variação entre as taxas anuais de sensibilidade às cefalosporinas de terceira e quarta geração, porém sem delinear uma tendência clara, haja vista ao Cefepima, cujos valores foram 88%, 85%, 95% e 90%, respectivamente para os anos de 2009, 2010, 2011 e 2012 e ao Cefotaxima, cujas taxas foram 75%, 86%, 87% e 86% para esses anos. Em relação à cefuroxima, que é de segunda geração, as taxas de sensibilidade foram de 85%, 80% e 78% nos anos de 2009, 2010 e 2012, respectivamente, parecendo haver uma tendência no sentido de aumentar a resistência a esse antibiótico. Estes resultados são compatíveis com a taxa de 13,4% de estirpes de *E. coli* produtoras de ESBLs encontrada, uma vez que a atividade dessas enzimas é variável frente às diversas cefalosporinas, além de que outros mecanismos podem estar envolvidos na resistência aos β -lactâmicos, bem como nem toda a bactéria produtora de ESBL é detectada no antibiograma de rotina (BABIC et al., 2006; BUSH et al., 1995; CHAMBERS, 2010; PAGES et al., 2008). Importante ainda ressaltar a baixa suscetibilidade frente às fluoroquinolonas, que neste estudo foi um pouco maior que 60%, principalmente se considerarmos sua larga utilização como terapia empírica nas ITUs, cujo principal agente é *E. coli* (RON, 2010), porém este resultado corrobora dados do SMART (2012), que reportou uma taxa de suscetibilidade às fluoroquinolonas de cerca de 60%, na América Latina, Ásia e Europa (BOUCHILLON et al., 2012). No entanto, quando o microrganismo em questão é produtor de ESBL, a suscetibilidade pode variar de 7 a 40% (MORRISSEY et al., 2013).

Tabela 3: Perfil de sensibilidade de estirpes *E. coli* aos antimicrobianos, entre 2009 e 2013.

Antibióticos	ago/2012 - jul/2013 ¹	2009 ²	2010 ²	2011 ²
Amicacina	100%	90%	67%	100%
Amoxicilina/Clavulanato	75%	73%	100%	100%
Ampicilina	36%	30%	32%	49%
Ampicilina/Sulbactam	54%	-	-	65%
Aztreonam	95%	-	-	-
Cefalotina	27%	44%	54%	58%
Cefazolina	62%	50%	83%	-
Cefepima	90%	88%	85%	95%
Cefotaxima	86%	75%	86%	87%
Ceftazidima	95%	80%	84%	87%
Ceftriaxona	89%	83%	77%	100%
Cefuroxima	78%	85%	80%	-
Ciprofloxacina	62%	62%	56%	73%
Gentamicina	82%	81%	82%	82%
Levofloxacina	62%	55%	-	-
Imipenem	100%	100%	100%	100%
Meropenem	100%	100%	100%	100%
Nitrofurantoína	85%	83%	100%	100%
Norfloxacina	65%	48%	33%	100%
Piperacilina/Tazobactam	81%	100%	92%	-
Sulfametoxazol/trimetoprim	62%	55%	36%	75%
Total de isolados	97	67	36	47

1: Dados do autor; 2: (CCIH/HU, 2013). Legenda: -: Dados não demonstrados.

Um fato bastante alarmante observado neste trabalho foi a suscetibilidade de *K. pneumoniae* frente às cefalosporinas de terceira e quarta gerações e ao Aztreonam, que variava entre 81 e 87%, em 2009 e entre 35,1 e 43,2%, em 2012 (Tabela 4). Os dados deste estudo, referentes a 2012, refletem a alta prevalência de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs (65,0%), no HU/UFSC. O mesmo não acontece com os dados de 2009, onde parece haver uma incongruência, visto que à época, já havia uma alta prevalência de *K. pneumoniae* (64,5%), tornando-se quase inexplicável as altas taxas de sensibilidade observadas na tabela 4, como por exemplo, 100% de sensibilidade à

cefazolina, que é uma cefalosporina de primeira geração e 81% de sensibilidade à cefepima, de quarta geração. A sensibilidade às fluoroquinolonas foi cerca de 60%, semelhante à observada nos isolados de *E. coli*, portanto, devendo ser considerado como um sinal de alerta para a limitação da terapia empírica, também com esse antimicrobiano. A diminuição da suscetibilidade aos carbapenêmicos, que era de 100% e passou para 95,8%, chama a atenção para a disseminação de estirpes produtoras de carbapenemases, que não foi objeto deste estudo, porém é um problema mundial. Geralmente, a resistência aos carbapenêmicos está associada à produção de carbapenemases, porém pode se dar por outros mecanismos, como a diminuição na expressão dos canais de porinas associada à produção de ESBL (BRADFORD et al., 1997). Ressalte-se que essas estirpes, em decorrência da pressão seletiva pelo uso de antibióticos, podem adquirir outros mecanismos de resistência, tornando-se multidroga-resistentes (MDR). A resistência a essas importantes classes de antimicrobianos, como β -lactâmicos, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos, restringe drasticamente as opções terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por enterobactérias, microrganismos que estão entre as mais importantes causas de infecções, nesse hospital.

Tabela 4: Percentual de estirpes de *K. pneumoniae* suscetíveis aos antimicrobianos entre 2009 e 2013

Antibióticos	ago/2012 - jul/2013 ¹	2009 ²	2010 ²
Amicacina	86,50%	75%	100%
Amoxicilina/Clavulanato	43,20%	60%	100%
Ampicilina	0,00%	-	-
Ampicilina/Sulbactam	35,10%	-	-
Aztreonam	43,20%	-	-
Cefalotina	32,40%	60%	87%
Cefazolina	21,60%	100%	80%
Cefepime	35,10%	81%	87%
Cefotaxime	35,10%	-	87%
Ceftazidime	43,20%	87%	87%
Ceftriaxone	35,10%	78%	83%
Cefuroxime	27,00%	86%	83%
Ciprofloxacina	56,70%	75%	87%
Gentamicina	48,60%	83%	92%
Levofloxacina	59,50%	67%	67%
Imipenem	100,00%	100%	100%
Meropenem	95,80%	100%	100%
Nitrofurantoína	27,00%	10%	25%
Norfloxacina	65,00%	71%	67%
Piperacilina/Tazobactam	51,30%	100%	90%
Sulfametoxazol/Trimetoprim	65,00%	90%	75%
Total de isolados	37	28	19

1: Dados do autor; 2: (CCIH/HU, 2013)

Enterobacter spp. são bactérias intrinsecamente resistentes a aminopenicilinas, Cefazolina e Cefoxitina devido à produção da β -lactamase AmpC constitutiva cromossomal (DUNNE et al., 2000). Além disso, a exposição desses microrganismos a antibióticos β -lactâmicos pode induzir a expressão de AmpC com consequente resistência às cefalosporinas de terceira geração (PATERSON, 2006). O perfil de suscetibilidade aos antibióticos das amostras de *Enterobacter* spp. (Tabela 5), principalmente *Enterobacter cloacae* reflete essa característica. Os dados obtidos através da CCIH do HU/UFSC e os dados obtidos neste estudo mostram que as estirpes de *Enterobacter*

cloacae, possuem baixa ou nenhuma suscetibilidade à maioria dos antibióticos, principalmente frente às cefalosporinas. As cinco estirpes de *E. aerogenes* coletadas neste estudo apresentaram alta suscetibilidade aos antibióticos se comparados com os dados da CCIH, referentes a 42 isolados, analisado no período 2009-2013. É possível que essa diferença esteja relacionada com o pequeno número de estirpes analisadas.

Tabela 5: Percentual de estirpes de *Enterobacter* spp. suscetíveis aos antimicrobianos entre 2009 e 2013

Antibióticos	<i>E. cloacae</i>		<i>E. aerogenes</i>	
	2009 – 2013 ¹	ago/2012 a jul/2013 ²	2009 – 2013 ¹	ago/2012 - jul/2013 ²
Amicacina	65,6%	83,3%	69,2%	100,0%
Cefalotina	-	0,0%	3,0%	0,0%
Cefazolina	-	0,0%	-	0,0%
Cefepime	43,0%	66,7%	71,0%	100,0%
Cefotaxime	54,2%	33,3%	58,8%	100,0%
Ceftazidime	26,2%	50,0%	61,9%	100,0%
Ceftriaxone	19,7%	33,3%	53,8%	80,0%
Cefuroxime	2,7%	33,3%	28,6%	80,0%
Ciprofloxacina	46,5%	66,7%	69,0%	100,0%
Gentamicina	61,4%	66,7%	73,8%	100,0%
Levofloxacina	38,9%	66,7%	66,7%	100,0%
Imipenem	97,4%	100,0%	100,0%	100,0%
Meropenem	96,7%	100,0%	97,0%	100,0%
Nitrofurantóina	18,0%	66,7%	14,3%	20,0%
Norfloxacina	16,1%	66,7%	80,0%	100,0%
Piperacilina/Tazobactam	68,2%	50,0%	50,0%	80,0%
Sulfametoxazol/Trimetoprim	47,6%	66,7%	84,2%	100,0%
Total de isolados	88	6	42	5

1: (CCIH/HU, 2013); 2: Dados do autor

Ao analisar o perfil de suscetibilidade das estirpes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* produtoras de ESBL (Tabela 6), observa-se um

quadro bastante alarmante, quando comparado às bactérias que não produzem essa enzima. A sensibilidade de *K. pneumoniae* ESBL à Cefotaxima e ao Aztreonam foi de 12,5% e às demais cefalosporinas de terceira e quarta gerações foi de zero por cento (0,0%), taxas bem menores do que as observadas quando não se discrimina essas estirpes produtoras de ESBL, que variam entre 35,1% a 43,2%. Esses dados são diferentes dos publicados pelo SMART, nos EUA, onde a sensibilidade de *K. pneumoniae* ESBL para Cefepima foi 34,4% e 18,8% para Cefotaxima, Ceftazidima e Ceftriaxona. Por outro lado, a suscetibilidade às fluoroquinolonas observada em nosso estudo foi 33,3% e 37,5% para Ciprofloxacina e Levofloxacina, respectivamente, taxas maiores do que os 20,0% publicados pelo SMART para essa bactéria. A suscetibilidade de *E. coli* ESBL às cefalosporinas foi de 23,1% para o Cefepima, zero por cento (0,0%) para Cefotaxima, 61,5% para o Ceftazidima e Aztreonam e 15,4% para o Ceftriaxona, e, taxas que também são maiores para as observadas quando são considerados todos os isolados de *E. coli* e que variou entre 86% e 95%. Esses resultados também diferem dos obtidos pelo SMART nos EUA, para sensibilidade de *E. coli* produtora de ESBL à Ceftazidima (38%) e à Ceftriaxona (5,6%), porém foram semelhantes para Cefepima (22,5%) e Cefotaxima (4,2%). A sensibilidade às fluoroquinolonas de *E. coli* ESBL em nosso estudo foi de 30,8%, taxa bem maior do que os 7,0% publicados pelo SMART, para os EUA (BOUCHILLON et al., 2013). A suscetibilidade de *E. cloacae* ESBL às cefalosporinas foi de 0% para o Cefotaxima e Ceftriaxona e 33,3% para o Cefepima e Ceftazidima. A comparação entre as estirpes ESBL e não ESBL mostra também a diminuição da sensibilidade às fluoroquinolonas que foi cerca de 32% para o Ciprofloxacina, 34% para o Levofloxacina e 42% para o Norfloxacina, estando em conformidade com a literatura (MORRISSEY et al., 2013). Além disso, observam-se também taxas menores de suscetibilidade à Gentamicina em *K. pneumoniae* (25%), *E. coli* (38,5%) e *E. cloacae* (33,3%) produtoras de ESBL, respectivamente, mostrando que os mecanismos de resistência dessas estirpes não se limitam apenas à produção de ESBLs.

Tabela 6: Perfil de suscetibilidade de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *E. cloacae* produtores de ESBL.

Antimicrobianos	Isolados produtores de ESBL		
	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>
Nome			
Amicacina	83,3%	100,0%	66,7%
Ampicilina	0,0%	0,0%	0,0%
Ampicilina + Sulbactam	8,3%	30,8%	0,0%
Aztreonam	12,5%	61,5%	0,0%
Cefalotina	0,0%	0,0%	0,0%
Cefepime	0,0%	23,1%	33,3%
Cefotaxima	0,0%	0,0%	0,0%
Ceftazidima	12,5%	61,5%	33,3%
Ceftriaxona	0,0%	15,4%	0,0%
Ciprofloxacina	33,3%	30,8%	33,3%
Ertapenem	100,0%	100,0%	100,0%
Gentamicina	25,0%	38,5%	33,3%
Imipenem	100,0%	100,0%	100,0%
Levofloxacina	37,5%	30,8%	33,3%
Meropenem	95,8%	100,0%	100,0%
Norfloxacina	45,8%	46,2%	33,3%
Piperacilina + Tazobactam	29,2%	61,5%	33,3%
Sulfametoxazol/Trimetoprim	54,2%	61,5%	33,3%

A resistência às quinolonas geralmente está associada a mutações cromossomais, no entanto, tem sido descrito um aumento da resistência às quinolonas mediada por plasmídeos (ANSSOUR et al., 2009). A associação entre os genes de resistência aos β -lactâmicos (ESBL, AmpC) e os de resistência às quinolonas em um mesmo plasmídeo estão sendo cada vez mais reportados (ANSSOUR et al., 2009; CATTOIR et al., 2008; HASSAN et al., 2012; MINARINI et al., 2008b; POIREL et al., 2012; STRAHILEVITZ et al., 2009). Com isso, a preocupação com esses microrganismos torna-se ainda mais evidente, principalmente no ambiente hospitalar, onde a transferência de genes de resistência pode ocorrer mais facilmente, reduzindo o arsenal terapêutico para combater essas bactérias. Neste estudo não se realizou a pesquisa dos genes de resistência às fluoroquinolonas, porém, cerca de 30% das estirpes produtoras de ESBL, tanto de *E. coli* quanto de *K. pneumoniae* foram suscetíveis a esta classe de antibiótico.

A circulação de estirpes multirresistentes é um sério problema para as instituições de saúde, pois prejudica os esquemas de terapia empírica e reduzem as opções de tratamento apropriado, fatores que contribuem para o aumento das falhas terapêuticas, do tempo de permanência do paciente no hospital e dos riscos de complicações relacionadas com o seu estado de saúde, inclusive podendo levá-lo a óbito. Bactérias multirresistentes possuem um papel extremamente eficaz na disseminação de genes de resistência, isso porque todos os elementos de resistência são transmitidos verticalmente, ou seja, todos os seus descendentes terão os mesmos elementos, aumentando a prevalência da resistência. E ainda elas podem doar ou transmitir seus elementos de resistência horizontalmente a outras estirpes, espécies e gêneros (WOODFORD et al., 2011).

O que se pôde observar nesse estudo é que com o passar dos anos as estirpes de *E. coli*, *Enterobacter* spp e principalmente *K. pneumoniae* estão se tornando cada vez menos suscetíveis aos antibióticos, adquirindo e aprimorando mecanismos de resistência, tornando-se resistentes a várias classes de antibióticos, limitando o tratamento terapêutico. E uma vez que surge a resistência a determinado antibiótico é muito difícil contê-la (LIVERMORE, 2012), principalmente se os genes que as expressam estão em elementos móveis, passíveis de disseminação horizontal entre microrganismos.

5.2 Detecção fenotípica de ESBL

O teste fenotípico para ESBL foi realizado para as amostras que apresentaram alguma diminuição na suscetibilidade às cefalosporinas e que foram positivas para o teste de ESBL no Vitek 2®. Das 145 amostras, 40 (27,6%) foram positivas para ESBL no Vitek 2® e em 39 (97,5%) isolados pode-se confirmar a produção de ESBL pelo Teste de Disco Aproximação. Apenas uma amostra de *E. coli* não apresentou distorção nos halos no teste fenotípico de confirmação, mesmo alterando as distâncias entre os discos.

A estirpe de *E. coli* que não apresentou distorção no halo no teste de Disco Aproximação foi proveniente de uma secreção de ferida. Esse isolado apresentou resistência apenas para Cefalotina e Cefotaxima, porém foi sensível para as demais cefalosporinas testadas. Além disso, apresentou resistência à Ampicilina, Ampicilina/Sulbactam, Gentamicina Ciprofloxacina, Norfloxacina e Levofloxacina, mostrando que possui também mecanismos de resistência aos aminoglicosídeos e às fluoroquinolonas.

A sensibilidade da detecção de ESBL varia com o antibiótico, uma vez que depende da afinidade da ESBL pelo substrato presente no antibiótico (BUSH et al., 1995), por exemplo, a ESBL CTX-M tem maior afinidade pelo Cefotaxima (MATSUMOTO et al., 1988). Neste estudo, a detecção de ESBL pelo aparecimento da distorção no halo de inibição ou da zona fantasma (Figura 8), foi de 90% para Cefotaxima, 85% para Aztreonam, 82,5% para Ceftriaxona, 75% para Cefepima e 62,5% para Ceftazidima. Em 48,7% das amostras, ocorreu a distorção no halo de inibição para todos os antibióticos testados. O aparecimento da distorção no halo apenas para Ceftazidima não ocorreu em nenhum isolado, diferentemente do Cefepima, onde só foi possível detectar a produção de ESBL em um isolado de *Enterobacter cloacae* pela adição deste disco ao teste (GARCÍA et al., 2010; THOMSON, 2001). Nesse estudo, a Ceftazidima não acrescentou qualquer benefício à detecção de ESBL pelo teste de Disco Aproximação, enquanto que o Cefepima foi necessário para a detecção de ESBL em *Enterobacter* spp. Entretanto, é possível detectar cerca de 95% das ESBLs em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. realizando o teste com apenas os disco de Ceftriaxona, Cefotaxima e Aztreonam (GARREC et al., 2011; SFM, 2010), confirmando, mais uma vez que esse teste fenotípico é uma alternativa simples e de baixo custo para ser padronizado na rotina de pequenos laboratórios clínicos.



Figura 8: Teste Positivo para ESBL com o Teste de Disco Aproximação.

Legenda: AMC: Amoxicilina/Clavulanato, ATM: Aztreonam, CAZ: Ceftazidima, CPM: Cefepima, CRO: Ceftriaxona, CTX: Cefotaxima

Embora a adição da Cefepima ao teste tenha auxiliado na detecção de ESBL nas amostras de *Enterobacter cloacae*, o desempenho do teste com este antibiótico foi de 75%, mais baixo do que o observado com Ceftriaxona, Cefotaxima e Aztreonam, porém melhor do que com Ceftazidima. Estudos com outras enterobactérias serão necessários para analisar os resultados com a substituição da Ceftazidima pelo Cefepima no teste de Disco Aproximação.

O teste de Disco Aproximação não é o teste fenotípico confirmatório para detecção de ESBL recomendada pelo CLSI, no entanto, os resultados obtidos nesse estudo corroboram dados publicados que comparam os testes fenotípicos para detecção de ESBL e que revelaram que a Disco Aproximação possui sensibilidade de 94% na distância de 30 mm (GARREC et al., 2011; WIEGAND et al., 2007); porém, se o Cefepima for acrescentada, e a distância for reduzida para 20 mm, a sensibilidade pode chegar a 100% (GARREC et al., 2011). No presente estudo o Cefepima foi utilizado em todos os testes, independente da espécie bacteriana, e a distância entre os discos foi testada conforme o diâmetro do halo que a amostra apresentava com as cefalosporinas. Quando o isolado apresentava halo de inibição entre 6 e 12 mm para as cefalosporinas e para o Aztreonam, a distância entre os discos adotada foi de 20 mm. Para halos de inibição maiores que 12 mm, adotou-se a distância de 30 mm, fazendo-se os ajustes necessários.

Segundo dados do *Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial* (TEST) em 2007 a América Latina tinha a prevalência mais alta de ESBL do mundo (44%), enquanto que, na Ásia, *K. pneumoniae* produtoras de ESBL representavam 22%, 13,3% na Europa e 7,5% na América do Norte. Em *E. coli*, essa prevalência é menor, porém a América Latina segue em primeiro lugar com 13,5%, seguida da Ásia com 12%, Europa 7,6% e América do Norte 2,2% (REINERT et al., 2007). Em 2013, dados do SMART revelaram que a prevalência de ESBL na Ásia aumentou consideravelmente para 40% em *E. coli*, *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *P. mirabilis* e que essa prevalência na América Latina continua sendo uma das mais altas (29%) do mundo. Por outro lado, na América do Norte a taxa continua abaixo de 5% (MORRISSEY et al., 2013). A taxa de ESBL de 65% (n=37) para *K. pneumoniae* encontrada neste estudo superou os dados dos estudos de vigilância citados, no entanto para *E. coli* a taxa encontrada, de 13,4% (n=13), corroborou as taxas mundiais. A taxa de ESBL em *E. cloacae* encontrada foi de 50% (n=3), porém devido ao número pequeno de amostras dessa espécie, não foi possível fazer qualquer relação com outros estudos. No Brasil não há estudos nacionais de vigilância de

ESBL em enterobactérias, porém estudos pontuais apontaram taxas de ESBL em torno de 24% (LAGO et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2006), um pouco mais baixas que os 27,6% encontrados nessa pesquisa.

O fato de *K. pneumoniae* quase sempre possuir as taxas mais altas de ESBL não está totalmente explicado. Uma das hipóteses é que normalmente quem carrega as ESBL são plasmídeos grandes, mais comuns em *Klebsiella* spp. do que em qualquer outra espécie de enterobactéria. Outra hipótese é a de que *Klebsiella* spp. seja mais adaptada ao ambiente hospitalar, sobrevivendo por mais tempo nas superfícies, o que facilitaria a aquisição de determinantes de resistência de outros microrganismos (PATERSON; BONOMO, 2005).

5.3 Amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}

A detecção molecular de ESBL é uma importante ferramenta utilizada nas pesquisas de vigilância epidemiológica (DALLENNE et al., 2010). A expressão de ESBL pode ser codificada por diversos genes e, neste estudo, foram utilizados cinco iniciadores para a detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M}. Na PCR, a melhor temperatura de anelamento foi a de 56 °C e permitiu a amplificação dos produtos de todos os iniciadores e a concentração de MgCl₂ para as reações que permitiu a amplificação dos produtos foi a padrão, de 1,5 mM. Tentou-se padronizar uma única reação de PCR multiplex, já que a temperatura de anelamento e a concentração dos reagentes eram as mesmas para todos os iniciadores, no entanto, não foi possível essa padronização, porque ocorria uma competição muito grande entre iniciadores não permitindo a amplificação dos produtos desejados.

Dentre os 40 isolados produtores de ESBL pelos testes fenotípicos, 39 amplificaram pelo menos um gene de ESBL, conforme demonstrado na Figura 9. Apenas uma estirpe de *E. coli* isolada de uma amostra de urina, que foi positiva para ESBL tanto no Vitek quanto no Teste de Disco Aproximação, não expressou nenhum dos genes pesquisados. Para essa amostra deveria ser realizada a pesquisa de ESBL com outros iniciadores

Além disso, apenas 25,6% (n=10) das 39 amostras positivas para ESBL por PCR, foram positivas para um único gene pesquisado, 36% (n=14) amplificaram dois genes, 28,2% (n=11) três genes e 10,2% (n=4) quatro genes. A distribuição dos genes amplificados por amostra está exposta no quadro 3.

Quadro 3: Distribuição dos genes amplificados por isolado.

Genes Detectados	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. cloacae</i>
CTX-M 1	1	1	0
CTX-M 2	2	0	0
CTX-M 9	1	0	0
TEM	2	1	2
SHV	0	0	0
TEM e SHV	2	6	0
CTX-M 1 e TEM	2	1	0
CTX-M 2 e TEM	0	1	0
CTX-M 2 e SHV	0	1	0
CTX-M 9 e TEM	0	1	0
CTX-M 1, TEM e SHV	0	8	0
CTX-M 2, TEM e SHV	0	1	1
CTX-M 9, TEM e SHV	0	1	0
CTX-M 1, CTX-M 2, TEM e SHV	1	0	0
CTX-M 1, CTX-M 9, TEM e SHV	1	2	0
Total	12	24	3

O produto de um exemplar de cada gene amplificado na PCR foi sequenciado e analisado utilizando-se o algoritmo Blastn. Observou-se 100% de homologia com sequências depositadas no Genbank nas seguintes ESBLs: o produto obtido com os iniciadores CTX-M Grupo 1 foi identificado como uma ESBL do tipo CTX-M-15 (KF769131.1), do CTX-M Grupo 2 como CTX-M-2 (KC770995.1), e do CTX-M Grupo 9, como CTX-M 14 (AB780368.1). Com os iniciadores para o grupo TEM, o produto foi identificado como uma β -lactamase do tipo TEM 1 (JX268618.1) e com os iniciadores do grupo SHV, com uma enzima do tipo SHV 1 (GU197549.1).

Durante a década de 1990, as ESBLs dominantes eram as do tipo TEM e SHV, associadas principalmente com clones epidêmicos em

surtos hospitalares relacionados com *K. pneumoniae* (PATERSON; BONOMO, 2005). No entanto, no século 21 ocorreu uma mudança na epidemiologia e o novo cenário incluiu o aumento do número de diferentes tipos de CTX-M, encontrados mais em estirpes de *E. coli* e o reconhecimento de vários clones e elementos genéticos que carregam esse gene. Essa mudança ocorreu mais rapidamente na América Latina e Europa (CANTON; COQUE, 2006). A CTX-M do tipo 15 é a mais amplamente disseminada no mundo, geralmente encontrada em estirpes de *E. coli*, seguida dos tipos CTX-M 9 e CTX-M 14 (CANTON; COQUE, 2006; LASCOLS et al., 2012; LIVERMORE, 2012; MORRISSEY et al., 2013; PEREZ et al., 2007). Diversos trabalhos realizados no Brasil, apontam a CTX-M 2 como sendo o tipo de ESBL mais prevalente (DE OLIVEIRA GARCIA et al., 2008; FERNANDES et al., 2009; LOPES et al., 2010; NOGUEIRA, 2011; SILVA; LINCOPAN, 2012). Por outro lado, escassa literatura descreve a presença de ESBL do tipo TEM, em Juiz de Fora, Minas Gerais (MINARINI et al., 2007), de CTX-M 15, no Rio de Janeiro (PEIRANO et al., 2011) e TEM e SHV em Santa Maria, Rio Grande do Sul (OLIVEIRA et al., 2009).

Os resultados obtidos nesse estudo diferem dos dados publicados na literatura científica nacional e internacional, quando mostram a prevalência massiva de TEM em 82,5% dos isolados. Embora nessa taxa possa também estar incluídas β -lactamases do tipo TEM 1 não ESBL, ainda é uma prevalência muito alta. Por outro lado, cinco amostras que amplificaram apenas o gene *bla*_{TEM} apresentaram resultado compatível com a presença de ESBL nos testes fenotípicos, tanto no Vitek 2[®] com no teste de disco aproximação, sugerindo, portanto, tratar-se de TEM ESBL. Entretanto, faz-se necessário o sequenciamento desses produtos para maior esclarecimento.

O mundo inteiro está presenciando uma reversão na prevalência dos tipos de ESBL, mostrando predomínio de CTX M 15 em diversos países, tanto da Europa quanto na América Latina. Ainda que não tenha sido a enzima predominante na população objeto desse estudo, a prevalência de CTX-M detectada foi de 65%, uma taxa muito elevada, que parece estar em consonância com a tendência mundial. Entretanto, a taxa de ESBL do tipo CTX-M grupo 1 foi de 42,5%, na população estudada, taxa maior que da ESBL do tipo CTX-M grupo 2, de 17,5%, não se confirmando os dados da literatura nacional, que apontam esta última como sendo a ESBL de maior prevalência, no Brasil.

Considerando os dados da literatura que apontam CTX-M 15 como a mais prevalente e considerando que a maior taxa de

amplificação neste estudo ocorreu com os iniciadores CTX-M do grupo 1, que amplifica entre outras, a CTX-M 15, e ainda, que o resultado do sequenciamento deste produto revelou tratar-se de CTX-M 15, podemos inferir que esta é, possivelmente, a ESBL mais prevalente nas infecções hospitalares causadas por *E. coli* e *K. pneumoniae*, no HU/UFSC. Todavia, para confirmação da prevalência desse tipo de ESBL, todos os produtos de PCR deverão ser sequenciados.

Contrariando os dados dos estudos nacionais, que apontam como a ESBL mais prevalente no Brasil a do tipo CTX-M 2, neste estudo, apenas 17,5% dos isolados foram positivos para CTX-M grupo 2, onde o membro principal é a CTX-M 2. Ainda que o resultado do sequenciamento deste produto tenha sido CTX-M 2, esta não é a ESBL mais prevalente em *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de urina, sangue, secreção de ferida cirúrgica e secreção traqueal neste hospital, mesmo que o sequenciamento de todos os produtos deste iniciador seja CTX-M 2.

As ESBLs do tipo CTX-M 9 e CTX-M 14 são, respectivamente, a segunda e a terceira ESBL mais prevalentes no mundo. Porém, apenas 12,5% dos isolados foram positivos para CTX-M grupo 9, que possui como representantes mais importantes as enzimas CTX-M 9 e CTX-M 14. Esse resultado não foi compatível com a literatura internacional, porém está de acordo com os dados nacionais, onde estas enzimas quase não foram descritas (SILVA; LINCOPAN, 2012).

E a enzima do tipo SHV 1 é bastante comum em *K. pneumoniae* sendo responsável pela resistência intrínseca à ampicilina (PATERSON; BONOMO, 2005). Nesse estudo foi detectada em 60% dos isolados analisados, entretanto, a exemplo do que aconteceu com a enzima TEM, entre os produtos amplificados, é possível que haja β -lactamase do tipo SHV (SHV 1) não ESBL. Diferentemente do que ocorreu com TEM, os isolados que continham *bla*SHV, continham, também um ou mais genes de resistência associados. Nesse sentido, não dá para relacionar o fenótipo de ESBL com o *bla*SHV.

Porém o resultado que mais chamou a atenção foi a amplificação de mais de uma enzima na maioria dos isolados (77%). Esse resultado foi muito mais comum em *K. pneumoniae* (92%), porém ocorreu com bastante frequência em *E. coli* (50%) e em uma estirpe de *E. cloacae*. Isso pode ser explicado pelo fato de algumas enzimas pertencerem a um mesmo grupo de plasmídeo. Por exemplo, o gene *bla*_{CTX-M 15} (CTX-M Grupo 1, neste estudo), está geralmente associado com *bla*_{TEM 1} e *bla*_{OXA 1}, por estarem associadas a um mesmo grupo de plasmídeos. Genes *bla*_{CTX-M 2} e *bla*_{CTX-M 9} também são normalmente encontrados no mesmo

grupo de plasmídeo. Este fato também pode explicar porque a disseminação dessas enzimas ocorre tão rapidamente (CARATTOLI, 2009).

5.4 Variabilidade genética dos isolados

Compreender a distribuição e a relação entre os microrganismos é essencial para determinar a epidemiologia das infecções e auxiliar no planejamento e aplicação das medidas de controle e prevenção (NANVAZADEH et al., 2013).

Dentro das metodologias de genotipagem baseadas em PCR, o RAPD-PCR é um método bastante empregado por sua simplicidade, rapidez, sensibilidade, baixo custo e, principalmente, por conseguir distinguir estirpes com bastante competência. Ela pode servir como triagem primária para a tipagem de bactérias por PFGE (NANVAZADEH et al., 2013; VOS et al., 1997). Uma desvantagem do método reside principalmente na baixa reprodutibilidade, portanto, idealmente são necessários mais de um perfil de RAPD de cada amostra para garantir a robustez dos dados. Infelizmente, apesar dos diversos iniciadores testados, só foi possível a obtenção de um perfil com variabilidade aceitável para cada estirpe bacteriana.

A análise dos perfis eletroforéticos obtidos pelo RAPD foram realizadas tomando como base os critérios de Tenover (1995), anteriormente descrito no item 4.5.5, conforme foi adotado por alguns estudos (CARVALHO et al., 2003; DREVINEK et al., 2005; SANTOS, 2003; SPEIJER et al., 1999). Segundo esses critérios interpretativos, para os padrões de PFGE/RAPD, pelo menos dez fragmentos de DNA devem ser analisados. Esses critérios são baseados em possíveis eventos de mutação para estabelecer uma relação entre os isolados da mesma espécie. Neste estudo, a RAPD de *K. pneumoniae* produziu e amplificou seis fragmentos de DNA, nove de *E. coli* e onze de *E. cloacae*. Na Figura 11 observam-se os perfis eletroforéticos de sete amostras de *K. pneumoniae*, três de *E. coli* e três de *E. cloacae*, todos diferentes uns dos outros, com exceção de *E. cloacae*.

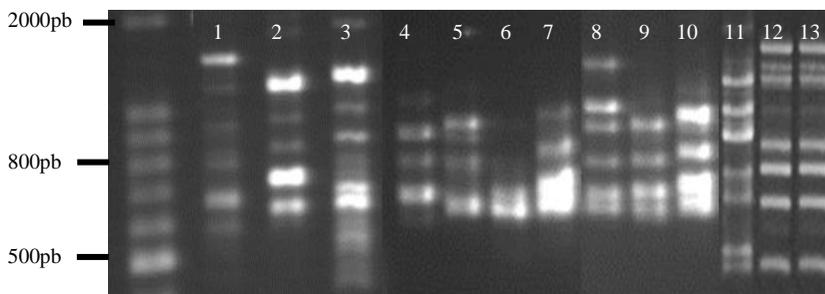


Figura 11: Montagem representativa dos géis das reações de RAPD de alguns isolados de *E. coli* (1 a 3), *K. pneumoniae* (4 a 10), e *E. cloacae* (11 a 13).

Legenda: Amostras - *E. coli* (155Ec, 165Ec, 269Ec), *K. pneumoniae* (26Kp, 65Kp, 137Kp, 167Kp, 490Kp, 515Kp, 516Kp), e *E. cloacae* (489Ecl, 338Ecl e 536Ecl), respectivamente.

De acordo com os critérios de Tenover, 1995, das treze amostras de *E. coli* que foram submetidas ao RAPD, dez estavam intimamente relacionadas, uma vez que apresentaram, no máximo, três bandas de diferença. A análise visual mostrou que o perfil eletroforético das amostras 94Ec, 155Ec, 644Ec e 719Ec eram indistinguíveis entre si e foi utilizado como padrão de comparação entre todas as estirpes de *E. coli*. As amostras 165Ec, 269Ec, 294Ec e 337Ec apresentaram duas bandas de diferença entre si e as amostras 873Ec e 923Ec três bandas, portanto, intimamente relacionadas, por essa metodologia. A amostra 381Ec possuía uma diferença de seis bandas, entando, portanto, possivelmente relacionada. A amostra 281Ec apresentou sete bandas de diferença e a 387Ec oito bandas, portanto, segundo os critérios de Tenover, as duas últimas não estão relacionadas com as demais amostras. Essas variações podem ocorrer entre isolados coletados por períodos de tempo maior que seis meses ou obtidos de um grande número de pacientes envolvidos em um surto de longa duração (TENOVER et al., 1995). Nesse caso, os isolados foram coletados ao longo de um ano, podendo ter ocorrido dois eventos genéticos, causando as mutações que promoveram as variações nas bandas.

Os 24 isolados de *K. pneumoniae* apresentaram perfis eletroforéticos com mais de 87% de similaridade entre si. Os isolados 167Kp, 170Kp, 212Kp, 596Kp, 614Kp, 720Kp e 726Kp apresentaram 100% de similaridade, portanto, indistinguíveis entre si, e o perfil eletroforético desse grupo foi estabelecido como padrão de comparação.

As amostras, 26Kp, 411Kp, 515Kp, 516Kp, 537Kp e 801Kp também indistinguíveis entre si, formaram um segundo grupo, diferenciando-se em apenas uma banda do padrão. As amostras 288Kp, 295Kp, 852Kp, 929Kp e 934Kp formaram um terceiro grupo, com duas bandas diferentes do padrão e uma banda diferente do segundo grupo. Esse resultado sugere que essas estirpes pertencem a um mesmo clone que está estabelecido no HU/UFSC.

5.4.1. *Escherichia coli*

Para as amostras de *E. coli*, o perfil eletroforético e o dendograma construído com base na análise dos padrões das bandas está disposto na Figura 12.

O valor do Coeficiente de Correlação Cofenética (CCC) foi 0,82 ($\geq 0,8$ = significativo). A Média de Similaridade Global entre os isolados foi 0,65, ou seja, os isolados de *E. coli* produtores de ESBL deste estudo possuem 65% de similaridade global entre eles, como pode ser visualizado na Figura 12. Sendo assim, analisando-se somente este perfil de RAPD, os ramos não apresentam diferenças significativas para subdividir os isolados em genótipos diferentes. O resultado da análise por UPGMA reforça o obtido segundo os critérios de Tenover, a maioria das amostras consideradas “Intimamente ou Possivelmente Relacionadas”.

É interessante ressaltar que as amostras indistinguíveis entre si e as intimamente relacionadas não foram isoladas de uma mesma unidade clínica. As amostras 94Ec, 155Ec, 165Ec, 294Ec, 337Ec, 644Ec, 873Ec e 923Ec foram isoladas de urina na Clínica Cirúrgica II, Clínica Médica III, UTI, UTI, Clínica Cirúrgica I, Clínica Médica II, Clínica Médica II e Clínica Cirúrgica II, respectivamente. Enquanto as amostras 269Ec e 719Ec foram isoladas de ferida cirúrgica na Clínica Cirúrgica I. Esses isolados, portanto, possivelmente pertencem a um único clone, instalado no hospital.

Destacam-se as amostras 923Ec e 873Ec que apresentaram o perfil eletroforético idêntico no RAPD (Figura 12) e, no entanto, o isolado 923Ec não amplificou nenhum dos genes pesquisados, enquanto que o 873Ec amplificou o gene *bla*_{TEM}. Ao observar os perfis de suscetibilidade das duas amostras, nota-se que a 923Ec é resistente ao Cefepima, Aztreonam e a Amoxicilina/Ác. Clavulânico, enquanto a 873Ec é sensível aos dois primeiros antibióticos e intermediário a Amoxicilina/Ác. Clavulânico. Além disso, observa-se que a 923Ec possui sensibilidade intermediária ou resistência a todos os antibióticos

que possuem associação a um inibidor de β -lactamase, sendo eles Ác. Clavulânico, Sulbactam ou Tazobactam, enquanto a 873Ec é sensível, isso sugere que o isolado 923Ec possui a associação de uma ESBL com outra β -lactamase resistente aos inibidores dessas enzimas, como por exemplo, AmpC. Uma pesquisa mais aprofundada precisa ser feita, outras ESBLs devem ser pesquisadas, assim como outras β -lactamases. A genotipagem de plasmídeos seria uma boa alternativa para esses casos, já que a grande maioria dessas enzimas está localizada em plasmídeos, pois daria a dimensão da variabilidade associada à resistência dessas bactérias.

Não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre os dados genotípicos e o perfil de suscetibilidade dos isolados aos antibióticos testados, apenas que todas as amostras são sensíveis à Amicacina e aos carbapenêmicos, e resistentes à Ampicilina, Cefalotina, Cefotaxime. Também não houve correlação entre a similaridade genética com o tipo de ESBL detectado por PCR.

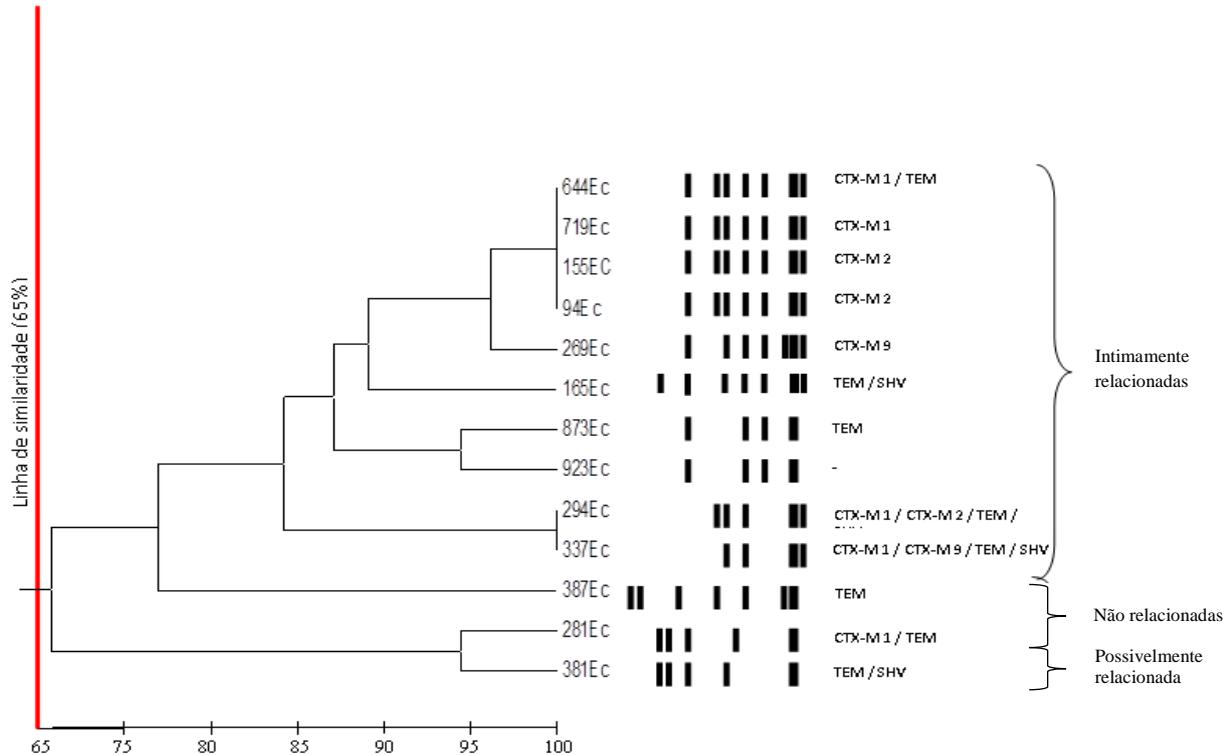


Figura 12: Dendrograma e perfil eletroforético dos isolados clínicos de *E. coli*. As relações evolutivas foram inferidas pelo método de UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). O dendrograma foi desenhado em escala com o comprimento dos ramos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética (TAMURA, K. et al., 2013). A linha vermelha mostra a escala de similaridade (%). A similaridade global entre os isolados foi de 65% e o Coeficiente de Correlação Cofenética 0,82. Também estão indicados os genes amplificados e a interpretação segundo os critérios de Tenover.

5.4.2 *Klebsiella pneumoniae*

Os perfis eletroforéticos e o dendograma das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, resultado da técnica de RAPD-PCR estão na Figura 13. O valor do CCC das 24 amostras de *K. pneumoniae* foi de 0,82, portanto, significativo. A Média de Similaridade Global entre os isolados foi 0,87, ou seja, os isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL deste estudo possuem 87% de similaridade global entre eles, como pode ser visualizado na Figura 13. O resultado da análise por UPGMA reforça o obtido segundo os critérios de Tenover, sendo todas as amostras consideradas “Intimamente Relacionadas”.

Como se pode observar no dendograma (Figura 13), as amostras *K. pneumoniae* apresentaram maior similaridade que as amostras de *E. coli*. Este fato é facilmente observado na figura e comprovado analisando-se a Soma do Tamanho dos Braços (STB) entre os isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* ($E_c=1,23 / K_p=0,6$); isto é, os isolados de *K. pneumoniae* são aproximadamente 2x mais similares que os de *E. coli*.

As amostras foram isoladas de todos os sítios anatômicos estabelecidos para esse estudo e em todas as unidades de internação do hospital, mostrando que elas não se limitam a apenas uma unidade.

Também não foi possível estabelecer nenhuma correlação entre os dados genotípicos e o perfil de suscetibilidade dos isolados aos antibióticos testados. As amostras 137Kp, 212Kp, 453Kp, 515Kp, 516Kp e 537Kp possuem praticamente o mesmo perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, no entanto não pertencem ao mesmo grupo de similaridade. O isolado 929Kp apresentou resistência ao meropenem, diferente de todas as outras amostras e apresentava um perfil fenotípico de metalo-beta-lactamase. Foi enviado a um laboratório de referência, onde foi descoberto que aquele isolado apresentava resistência aos carbapenêmicos por dois mecanismos: produção de ESBL e diminuição na expressão dos canais de porinas (dados não mostrados). Todos os isolados foram resistentes para Ampicilina, Cefotaxima e Ceftriaxona, mas para este último, a amostra 801Kp apresentou suscetibilidade intermediária.

Na detecção de ESBL por PCR não se observou relação entre os isolados do mesmo grupo. Entretanto, há várias amostras com o mesmo fenótipo no teste de Disco Aproximação e mesmo genótipo na PCR. Isolados como 515Kp, 516Kp, 537Kp, 720Kp e 801Kp apresentam o mesmo fenótipo no teste de Disco Aproximação, expressam as mesmas ESBL, pelo PCR, porém não fazem parte do mesmo grupo de similaridade pelo RAPD-PCR.

Corroborando os resultados obtidos tanto para *K. pneumoniae* quanto para *E. coli*, um estudo realizado por Ben-Hamouda e colaboradores (2003) não encontrou correlação direta entre os perfis genotípicos e os padrões de suscetibilidade aos antibióticos. Isolados com o mesmo antibiotipo frequentemente apresentavam perfis genotípicos diferentes e muitos isolados com padrões genotípicos idênticos não tinham o mesmo perfil de suscetibilidade (BEN-HAMOUDA et al., 2003). Da mesma maneira que Li e colaboradores (2003) encontraram diferentes genes de ESBLs em isolados com o mesmo perfil genotípico, indicando a possível presença de diversos plasmídeos entre isolados de um mesmo clone (LI et al., 2003). Portanto, ressalta-se a importância de uma análise mais aprofundada dos plasmídeos, tendo em vista que os mesmos são o principal veículo de disseminação de genes de resistência. A genotipagem do DNA plasmidial pode ser uma ferramenta importante na explicação da variabilidade dos determinantes de resistência, já que a maioria deles está localizada em plasmídeos e não no cromossoma (BEN-HAMOUDA et al., 2003; LI et al., 2003; MARKOVSKA et al., 2013; PARTRIDGE et al., 2011).

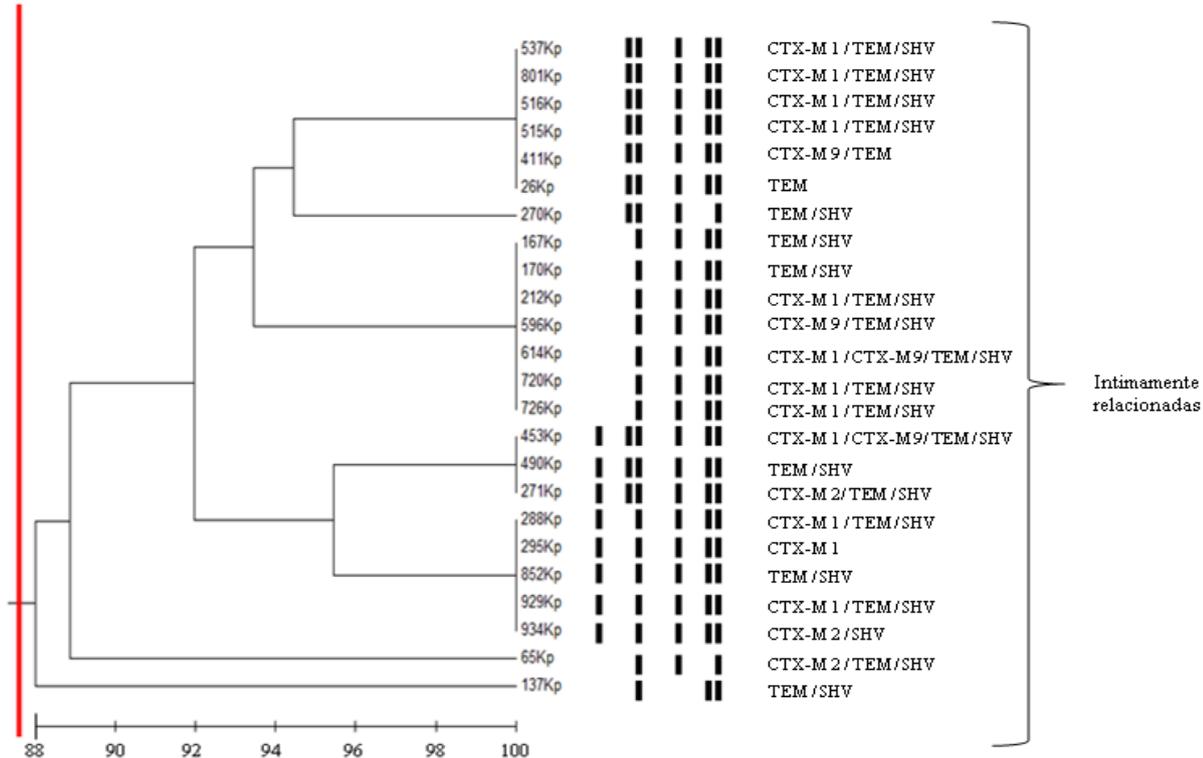


Figura 13: Dendrograma e perfil eletroforético dos isolados clínicos de *K. pneumoniae*. As relações evolutivas foram inferidas pelo método de UPGMA (SNEATH; SOKAL, 1973). O dendrograma foi desenhado em escala com o comprimento dos ramos nas mesmas unidades que as distâncias evolutivas utilizadas para inferir a árvore filogenética (TAMURA, K. et al., 2013). A linha vermelha mostra a escala de similaridade (%). A similaridade global entre os isolados foi de 87% e o Coeficiente de Correlação Cofenética 0,82. Também estão indicados os genes amplificados e a interpretação segundo os critérios de Tenover.

5.4.3 *Enterobacter cloacae*

Para os isolados de *E. cloacae* produtores de ESBL não foi possível a construção do dendograma pelo limitado número de amostras (3). A interpretação dos resultados foi realizada manualmente, analisando visualmente a Figura 11.

Analisando o perfil eletroforético dos isolados de *E. cloacae* é possível perceber que as amostras 338Ecl e 536Ecl possuem perfis idênticos. Possivelmente são um mesmo clone. Essas amostras foram isoladas de ferida cirúrgica na Clínica Cirúrgica II, portanto, por enquanto, estão limitadas a uma única unidade de internação.

Diferentemente do que aconteceu com *E. coli* e *K. pneumoniae*, os isolados idênticos pelo RAPD possuem perfis de sensibilidade bastante semelhantes. As únicas diferenças são que a amostra 338Ecl é sensível à Amicacina e à Ceftazidima, enquanto a 536Ecl é resistente ao primeiro e possui suscetibilidade intermediária ao segundo. Ainda, a amostra 338Ecl possui suscetibilidade intermediária ao Aztreonam e Cefepime, enquanto a 536Ecl é resistente a ambos. No teste de Disco Aproximação as amostras 338Ecl e 536Ecl apresentaram distorção nos mesmos antibióticos, Cefotaxima e Cefepima, enquanto a amostra 489Ecl apresentou distorção apenas no Cefepime. Na detecção de ESBL a amostra 489Ecl apresenta os genes para CTX-M Grupo 2, TEM e SHV, enquanto as amostras 338Ecl e 536Ecl apresentam o gene TEM apenas. Entranto, nenhuma correlação é possível pelo número reduzido de isolados.

Há poucos estudos relatando surtos de *E. cloacae* produtoras de ESBLs. Alguns trabalhos relatam a prevalência da ESBL do tipo SHV 12 nessa espécie bacteriana (LIU et al., 2004), outros do tipo CTX-M 3 (JIANG et al., 2005; MORIGUCHI et al., 2007), CTX-M 9 e SHV (MANZUR et al., 2007), CTX-M 15, (OTEO et al., 2013; PASANEN et al., 2013). Porém, devido ao número limitado de amostras de *Enterobacter spp.* isoladas no HU-UFSC, no período estudado, não é possível fazer qualquer correlação desses resultados com a literatura mundial.

5.5 Considerações sobre a dispersão de bactérias multirresistentes

Apesar de ainda serem necessários estudos complementares com os isolados aqui descritos (PFGE cromossômica e plasmidial, amplificação e sequenciamento de outros genes), os resultados obtidos nesse estudo são preocupantes, sugerindo a existência de uma estirpe de

K. pneumoniae endêmica no HU/UFSC, disseminada por todos os setores, situação semelhante à observada com as estirpes de *E. coli*. As linhagens bacterianas estudadas foram todas resistentes a vários antibióticos, muitas a mais de uma classe, limitando o arsenal terapêutico. Todas expressaram ESBL e 77% expressaram mais de um tipo dessa enzima, demonstrando uma disseminação desenfreada de genes de resistência entre as bactérias. São necessárias medidas energéticas e urgentes de contenção, sob pena de, a curto prazo, estarmos nos defrontando com um cenário muito difícil de administrar, uma vez que a resistência aos carbapenêmicos já é uma realidade neste hospital, dificultando cada vez mais o tratamento das infecções bacterianas e aumentando os riscos para o paciente.

Durante este estudo foram identificadas também 24 isolados de *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase do tipo KPC e possivelmente um clone de *Acinetobacter* spp. pan-resistente disseminado em vários setores do hospital, especialmente na UTI. Como estas amostras são objeto de outros projetos, elas não foram descritas aqui, mas são mais uma comprovação da necessidade de se estudar novas estratégias de controle de disseminação de bactérias multirresistentes no HU/UFSC.

Estamos numa batalha contra as ESBL e as KPC, principalmente. O desfecho desse embate depende diretamente das armas que serão utilizadas pelos profissionais de saúde, porque já conhecemos a eficiência do arsenal bacteriano. Como evitar que bactérias ainda mais resistentes não se tornem endêmicas no hospital?

Cita-se aqui o exemplo do Hospital Conceição do Rio Grande do Sul que obteve sucesso nas ações contra bactérias multirresistentes. Em maio de 2013, a CCIH do hospital desativou quinze leitos de UTI para contenção de enterobactérias multirresistentes, KPC ou NDM 1 positivas. Essa ação de controle contou com um rigoroso plano de desinfecção dos leitos, assim como reformas na unidade, e controle da diluição dos sanitizantes, a fim de evitar a permanência dos microrganismos nas superfícies, que pode ser um veículo para disseminação desses microrganismos e para facilitar as posteriores limpezas. Essas medidas conseguiram conter a disseminação dessas bactérias e a partir disso foi criado o Plano de Contingência dos mecanismos de resistência nas IrAS causadas por enterobactérias (PLACON), que estabelece os procedimentos a serem adotados pelos serviços de saúde e órgãos envolvidos diretamente na resposta à ocorrência de eventos adversos infecciosos (ANVISA, 2013c).

Obter sucesso no controle e prevenção das infecções por microrganismos multirresistentes não é tarefa fácil, porém, parece ser possível. Tornam-se necessárias a criação uma rede de informações eficiente e a implantação de medidas de intervenções, medidas essas que exigem esforços por parte de todos os envolvidos com a assistência à saúde. A prevenção e o controle de surtos ou a redução de taxas endêmicas, sob a execução de medidas rigorosas, pode demandar anos de dedicação de instituições e órgãos (SIEGEL et al., 2006).

Cabe à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar a tarefa de instituir medidas de precaução, como a educação continuada e permanente dos profissionais da saúde e colaboradores sobre biossegurança, higiene e contato com o paciente, assim como monitoramento do uso de antimicrobianos e sanitizantes, atividades de vigilância epidemiológica e microbiológica e investigação e controle de surtos. Ainda, a instituição de campanhas, como por exemplo, campanha de lavagem das mãos e a fiscalização do cumprimento das medidas adotadas pela instituição.

6 Sumário de Resultados

- ✓ Neste estudo, observou-se a diminuição da suscetibilidade aos antimicrobianos, ao longo dos anos de 2009 a 2013, em estirpes de *K. pneumoniae*
- ✓ A análise o perfil de suscetibilidade de estirpes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* produtoras de ESBL revelou uma diminuição acentuada na sensibilidade de oximinocefalosporinas e para outras classes de antibióticos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.
- ✓ Com o teste fenotípico de Disco Aproximação foi possível detectar 97,5% dos isolados produtores de ESBL.
- ✓ Foi possível detectar 95% dos isolados ESBL positivos utilizando os discos de Ceftriaxona, Cefotaxima e Aztreonam, distantes 20 mm do disco de Amoxicilina com Ácido Clavulânico.
- ✓ Neste estudo, a prevalência de ESBL em estirpes de *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* no HU/UFSC, no período estudado, foi de 27,6%. Sendo que 65% dos isolados de *K. pneumoniae*, 50% de *Enterobacter cloacae* e 13,4% de *E. coli* produziam algum tipo de ESBL;
- ✓ A β -lactamase mais prevalente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* no HU/UFSC foi a do tipo TEM (82,5%), seguida de CTX-M (65%), onde prevaleceu o CTX-M grupo 1 (42,5%);
- ✓ 77% de todos isolados produtores de ESBL apresentaram mais de um tipo de enzima.
- ✓ Estirpes de *K. pneumoniae* apresentaram 87% de similaridade genética pela metodologia de RAPD, enquanto estirpes de *E. coli* apresentaram 65% de similaridade pelo mesmo método.
- ✓ Não houve relação entre os perfis de resistência das bactérias produtoras de ESBL e as enzimas que expressavam ou entre os perfis de resistência com os genótipos obtidos por RAPD.

7 Conclusão

Considerando os resultados obtidos, estirpes produtoras de ESBL podem ser detectadas fenotipicamente com sucesso pela metodologia de disco-aproximação. Além disso, o fenótipo ESBL não é explicado pela presença de um único gene de resistência; na sua maioria, as estirpes carregam mais de um gene. Entretanto, diferentemente do que se esperava, as β -lactamases mais prevalentes neste estudo foram as do tipo TEM, seguida de CTX-M, especialmente a CTX-M do grupo 1. Ainda, parece haver uma estirpe endêmica de *K. pneumoniae* distribuída em vários setores do HU/UFSC, porém, para confirmar este resultado, outras metodologias de genotipagem devem ser aplicadas.

8 Perspectivas

- ✓ Realizar eletroforese de campo pulsado em gel de agarose em DNA cromossômico e plasmidial para os isolados produtores de ESBL, a fim de compreender o modo de disseminação e a correlação epidemiológica entre bactérias causadoras de IrAS;
- ✓ Realizar o sequenciamento completo dos genes identificados para avaliar a prevalência dos tipos de ESBL;
- ✓ Ampliar a pesquisa para outras ESBLs, assim como pesquisar β -lactamases do tipo AmpC e Carbapenemases para todas as espécies de enterobactérias isoladas no HU-UFSC.

9 Referências

AMBLER, R. P. The structure of beta-lactamases. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci**, v.289, n.1036, p.321-331. 1980.

ANDERSSON, D. I.HUGHES, D. Antibiotic resistance and its cost: is it possible to reverse resistance? **Nat Rev Microbiol**, v.8, n.4, p.260-271. 2010.

ANSSOUR, L., et al. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and bla in Algeria. **J Chemother**. 2009.

ANVISA. **Infecção relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 1: Legislação e Criação de um Programa de Prevenção e Controle de Infecção Hospitalar**. Anvisa. São Paulo. 2004a

ANVISA. **Infecções relacionadas à Assistência à Saúde: Módulo 4: Prevenção de infecções em Unidades de Terapia Intensiva**. . Anvisa. São Paulo. 2004b

ANVISA. **Manual dos SINAIS: Sistema Nacional de Informação para o Controle de Infecções em Serviços de Saúde**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sinais/manual_sinais.pdf>. Acesso em: 30 dez. 2013.

ANVISA. **Resistência Microbiana: Mecanismos e Impacto Clínico**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm>. Acesso em: 31 dez. 2013.

ANVISA. **Anvisa suspende a manutenção do Sistemas Sinais**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/divulga/informes/2009/220509.htm>>. Acesso em: 30 dez. 2013.

ANVISA. **Medidas Para Identificação, Prevenção e Controle de Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde Por Microrganismos Multirresistentes**. Nota Técnica nº1, de 2010. Brasília, DF: 25 out. 2010

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.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1d5166804e2574a3b08db3c09d49251b/6+-+Detecção+e+identificação+de+bactérias+de+importância+médica..pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 jan. 2013.

ANVISA. **Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multirresistentes.** Nota Técnica nº 1, de 2013. Brasília, DF: 17 jan. 2013b

ANVISA. **Plano de contingência dos mecanismos de resistência nas infecções relacionadas à assistência à saúde causadas por enterobactérias (PLACON).** Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/cc3e15004ffe3533a221e66d6e8afaaa/PLACON_11_06_13_VERS%C3%83O_FINAL.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 30 jan. 2014.

BABIC, M., et al. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resist Updat**, v.9, n.3, p.142-156. 2006.

BAQUERO, F. Low-level antibacterial resistance: a gateway to clinical resistance. **Drug Resist Updat**, v.4, n.2, p.93-105. 2001.

BARDAKCI, FEVZI. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. **Turkish Journal of Biology**, v.25, p.185-196. 2001.

BARROS, LÍVIA MOREIRA, et al. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**, v.33, n.33, p.429-435. 2012.

BAUER, A. W., et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **Am J Clin Pathol**, v.45, n.4, p.493-496. 1966.

BEN-HAMOUDA, THOURAYA, et al. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, n.1, p.427-433. 2003.

BENVENISTE, R.DAVIES, J. Aminoglycoside antibiotic-inactivating enzymes in actinomycetes similar to those present in clinical isolates of antibiotic-resistant bacteria. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.70, n.8, p.2276-2280. 1973.

BERTONA, E., et al. [Phenotypic and genotypic characterization of resistance to third-generation cephalosporins in *Enterobacter* spp]. **Rev Argent Microbiol**, v.37, n.4, p.203-208. 2005.

BERTRAND, X., et al. Molecular epidemiology of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. **Int J Antimicrob Agents**, v.22, n.2, p.128-133. 2003.

BIOMÉRIEUX. **VITEK® 2 Compact** Disponível em:
http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_IND_FDA_PRD_G_PRD_NDY_1. Acesso em: 02 abr. 2014.

BIONDI, S., et al. Current trends in beta-lactam based beta-lactamases inhibitors. **Curr Med Chem**, v.18, n.27, p.4223-4236. 2011.

BIZZARRO, M. J., et al. Changing patterns in neonatal *Escherichia coli* sepsis and ampicillin resistance in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. **Pediatrics**, v.121, n.4, p.689-696. 2008.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, p.1-14. 2004.

BOUCHER, H. W., et al. 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.

BOUCHILLON, S., et al. Fluoroquinolone resistance among gram-negative urinary tract pathogens: global smart program results, 2009-2010. **Open Microbiol J**, v.6, p.74-78. 2012.

BOUCHILLON, S. K., et al. Antimicrobial susceptibility of inpatient urinary tract isolates of gram-negative bacilli in the United States:

results from the study for monitoring antimicrobial resistance trends (SMART) program: 2009-2011. **Clin Ther**, v.35, n.6, p.872-877. 2013.

BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v.14, n.4, p.933-951, table of contents. 2001.

BRADFORD, PATRICIA A., et al. Imipenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Is Associated with the Combination of ACT-1, a Plasmid-Mediated AmpC b-Lactamase, and the Loss of an Outer Membrane Protein. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.41, n.3, p.563-569. 1997.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Dispõe sobre a obrigatoriedade de todos os hospitais do país de manterem a Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH). 1983, PORTARIA Nº 196 DE 24 DE JUNHO DE. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1983

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Estabelece normas para o controle Da infecção hospitalar e revoga a Portaria nº 196. 1992, PORTARIA Nº 930 DE 27 DE AGOSTO DE. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1992

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Dispõe sobre a obrigatoriedade dos hospitais manterem um Programa de Infecções Hospitalares e criarem uma Comissão de Controle de Infecções Hospitalares (CCIH) para a execução deste controle. LEI Nº 9431, DE 6 DE JANEIRO DE 1997. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1997

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Controle de infecção hospitalar. PORTARIA Nº 2616, DE MAIO DE 1998. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 1998

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Define o Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, cria a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, e dá outras providências. LEI Nº 9782, DE 26 DE JANEIRO DE 1999. Diário Oficial da União. 1999

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE -. Dispõe do ajuste do Regimento Interno da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. PORTARIA Nº

385, DE 4 DE JUNHO DE 2003. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 2003

BROWN, N. G., et al. Structural and biochemical evidence that a TEM-1 beta-lactamase N170G active site mutant acts via substrate-assisted catalysis. **J Biol Chem**, v.284, n.48, p.33703-33712. 2009.

BUSH, K. Characterization of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.33, n.3, p.259-263. 1989.

BUSH, K. Alarming beta-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant Enterobacteriaceae. **Curr Opin Microbiol**, v.13, n.5, p.558-564. 2010.

BUSH, K. Antimicrobial agents targeting bacterial cell walls and cell membranes. **Rev Sci Tech**, v.31, n.1, p.43-56. 2012.

BUSH, K. JACOBY, G. A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969-976. 2010.

BUSH, K., et al. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n.6, p.1211-1233. 1995.

CANTON, R. COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v.9, n.5, p.466-475. 2006.

CANTOR, CHARLES R., et al. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of very large DNA molecules. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v.17, p.287-304. 1988.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.6, p.2227-2238. 2009.

CARVALHO-ASSEF, A. P., et al. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.12, p.2956-2957. 2013.

CARVALHO, ANA PAULA D'ALINCOURT, et al. Chronic infection of cystic fibrosis patient airways by a single clone of *Burkholderia*

cepacia: Replacement of non-mucoid to mucoid morphotype. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, n.1, p.42-44. 2003.

CATTOIR, V., et al. Plasmid-mediated quinolone resistance pump QepA2 in an *Escherichia coli* isolate from France. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.10, p.3801-3804. 2008.

CCIH/HU. **Boletim Epidemiológico dos anos de 2009 a 2012 do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago** 2013.

CDC, CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>>. Acesso em: 08 jan. 2014.

CHAMBERS, HENRY F. Antibióticos betalactâmicos e outros antibióticos ativos na parede celular e membrana celular. In: KATZUNG (Ed.). **Farmacologia Básica e Clínica**. 10ª São Paulo: Amgh, 2010. v. p.654-670

CHANG, C. L., et al. Outbreak of ertapenem-resistant *Enterobacter cloacae* urinary tract infections due to a contaminated ureteroscope. **J Hosp Infect**, v.85, n.2, p.118-124. 2013.

CHIA, J. H., et al. Development of a multiplex PCR and SHV melting-curve mutation detection system for detection of some SHV and CTX-M beta-lactamases of *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Enterobacter cloacae* in Taiwan. **J Clin Microbiol**, v.43, n.9, p.4486-4491. 2005.

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. EUA. 2013. (M100-S23).

CLSI, CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Third Informational Supplement**. EUA. 2014. (M100-S24)

- CORMICAN, M. G., et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing strains by the Etest ESBL screen. **J Clin Microbiol**, v.34, n.8, p.1880-1884. 1996.
- D'ALINCOURT CARVALHO-ASSEF, A. P., et al. Escherichia coli producing KPC-2 carbapenemase: first report in Brazil. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.68, n.3, p.337-338. 2010.
- DA SILVA, G. J.MENDONCA, N. Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. **Virulence**, v.3, n.1, p.18-28. 2012.
- DAL-BÓ, KARLA, et al. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. **Rev Bras Ter Intensiva**, v.24, n.4, p.381-385. 2012.
- DALLENNE, C., et al. Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important beta-lactamases in Enterobacteriaceae. **J Antimicrob Chemother**, v.65, n.3, p.490-495. 2010.
- DATTA, N.KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in Enterobacteriaceae. **Nature**, v.208, n.5007, p.239-241. 1965.
- DAVIN-REGLI, A., et al. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. **Curr Drug Targets**, v.9, n.9, p.750-759. 2008.
- DAVIS, T. J.MATSEN, J. M. Prevalence and characteristics of Klebsiella species: relation to association with a hospital environment. **J Infect Dis**, v.130, n.4, p.402-405. 1974.
- DE CHAMPS, C., et al. A case-control study of an outbreak of infections caused by Klebsiella pneumoniae strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. **J Hosp Infect**, v.18, n.1, p.5-13. 1991.
- DE OLIVEIRA GARCIA, D., et al. Multiclonal outbreak of Klebsiella pneumoniae producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.5, p.1790-1793. 2008.

DELMAS, J., et al. Structure and dynamics of CTX-M enzymes reveal insights into substrate accommodation by extended-spectrum beta-lactamases. **J Mol Biol**, v.375, n.1, p.192-201. 2008.

DHANJI, H., et al. Isolation of fluoroquinolone-resistant O25b:H4-ST131 Escherichia coli with CTX-M-14 extended-spectrum beta-lactamase from UK river water. **J Antimicrob Chemother**, v.66, n.3, p.512-516. 2011.

DREVINEK, P., et al. Widespread clone of Burkholderia cenocepacia in cystic fibrosis patients in the Czech Republic. **J Med Microbiol**, v.54, n.Pt 7, p.655-659. 2005.

DRIEUX, L., et al. Phenotypic detection of extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae: review and bench guide. **Clin Microbiol Infect**, v.14 Suppl 1, p.90-103. 2008.

DROPA, M., et al. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.51, n.4, p.203-209. 2009.

DU, B., et al. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. **Intensive Care Med**, v.28, n.12, p.1718-1723. 2002.

DUNNE, E. F., et al. Emergence of domestically acquired ceftriaxone-resistant Salmonella infections associated with AmpC beta-lactamase. **JAMA**, v.284, n.24, p.3151-3156. 2000.

DZIDIC, SENKA, et al. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology And Biotechnology**, v.46, n.1, p.11-21. 2008.

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://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2013.

ELLINGTON, M. J., et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.2, p.321-322. 2007.

ESCMIC, EUROPEAN SOCIETY OF CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES. **EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance**. Disponível em: <http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_12_1222.pdf>. Acesso em: 5 jan. 2014.

EUCAST, THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. **Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters**. Disponível em: <Erro! A referência de hiperlink não é válida.>. Acesso em: 07 jan. 2014.

EWING, B.GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Res**, v.8, n.3, p.186-194. 1998.

EWING, B., et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res**, v.8, n.3, p.175-185. 1998.

FERNANDES, S. A., et al. CTX-M-2-producing *Salmonella* Typhimurium isolated from pediatric patients and poultry in Brazil. **Microb Drug Resist**, v.15, n.4, p.317-321. 2009.

FERNANDEZ, L., et al. 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 Rev**, v.25, n.4, p.661-681. 2012.

FUURSTED, K., et al. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). **Microbes Infect**, v.14, n.2, p.155-158. 2012.

GALDBART, J. O., et al. TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. **Clin Microbiol Infect**, v.6, n.6, p.316-323. 2000.

GALES, A. C., et al. 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.354-360. 2012.

GARCIA-VALLVÉ, SANTIPUIGBO, PERE. **DendroUPGMA: A dendrogram construction utility**. 2009.

GARCÍA, CRISTINA SERAL, et al. Betalactamasas de espectro extendido en enterobacterias distintas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v.28, n.1, p.12-18. 2010.

GARCIA, P., et al. Diversity of Plasmids Encoding Virulence and Resistance Functions in *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovar Typhimurium Monophasic Variant 4,[5],12:i:- Strains Circulating in Europe. **PLoS One**, v.9, n.2, p.e89635. 2014.

GARREC, H., et al. Comparison of nine phenotypic methods for detection of extended-spectrum beta-lactamase production by Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v.49, n.3, p.1048-1057. 2011.

HALL, TOM A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser**, v.41, p.95-98. 1999.

HAN, H., et al. Optimization of pulse-field gel electrophoresis for subtyping of *Klebsiella pneumoniae*. **Int J Environ Res Public Health**, v.10, n.7, p.2720-2731. 2013.

HANCOCK, R. E.BRINKMAN, F. S. Function of pseudomonas porins in uptake and efflux. **Annu Rev Microbiol**, v.56, p.17-38. 2002.

HASSAN, W. M., et al. Plasmid mediated quinolone resistance determinants *qnr*, *aac(6)-Ib-cr*, and *qep* in ESBL-producing *Escherichia coli* clinical isolates from Egypt. **Indian J Med Microbiol**, v.30, n.4, p.442-447. 2012.

HO, P. L., et al. Detection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases among bloodstream isolates of *Enterobacter* spp. in Hong Kong, 2000-2002. **J Antimicrob Chemother**, v.55, n.3, p.326-332. 2005.

HOMBACH, M., et al. Consequences of revised CLSI and EUCAST guidelines for antibiotic susceptibility patterns of ESBL- and AmpC beta-lactamase-producing clinical Enterobacteriaceae isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.68, n.9, p.2092-2098. 2013a.

HOMBACH, M., et al. Influence of clinical breakpoint changes from CLSI 2009 to EUCAST 2011 antimicrobial susceptibility testing guidelines on multidrug resistance rates of Gram-negative rods. **J Clin Microbiol**, v.51, n.7, p.2385-2387. 2013b.

HOOPER, D. C. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Drug Resist Updat**, v.2, n.1, p.38-55. 1999.

HOTA, B. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection? **Clin Infect Dis**, v.39, n.8, p.1182-1189. 2004.

HUANG, Z. M., et al. [Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant acinetobacter baumannii]. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.25, n.5, p.425-427. 2004.

INWEREGBU, KEN, et al. Nosocomial Infections. Continuing Education In Anaesthesia. **Continuing Education In Anaesthesia, Critical Care & Pain**, v.5, n.1, p.14-17. 2005.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v.22, n.1, p.161-182, Table of Contents. 2009.

JARLIER, V., et al. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis**, v.10, n.4, p.867-878. 1988.

JIANG, X., et al. Outbreak of infection caused by *Enterobacter cloacae* producing the novel VEB-3 beta-lactamase in China. **J Clin Microbiol**, v.43, n.2, p.826-831. 2005.

JOHNSON, J. R., et al. Virulence characteristics and phylogenetic background of multidrug-resistant and antimicrobial-susceptible clinical isolates of *Escherichia coli* from across the United States, 2000-2001. **J Infect Dis**, v.190, n.10, p.1739-1744. 2004.

JOHNSON, J. R. RUSSO, T. A. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". **J Lab Clin Med**, v.139, n.3, p.155-162. 2002.

JONES, R. N., et al. An overview of the Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection (MYSTIC) Program: 1997-2004. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.53, n.4, p.247-256. 2005.

KARAMI, N., et al. Sub-typing of extended-spectrum-beta-lactamase-producing isolates from a nosocomial outbreak: application of a 10-loci generic *Escherichia coli* multi-locus variable number tandem repeat analysis. **PLoS One**, v.8, n.12, p.e83030. 2013.

KEYNAN, Y. RUBINSTEIN, E. The changing face of *Klebsiella pneumoniae* infections in the community. **Int J Antimicrob Agents**, v.30, n.5, p.385-389. 2007.

KLEVENS, R. M., et al. Estimating health care-associated infections and deaths in U.S. hospitals, 2002. **Public Health Rep**, v.122, n.2, p.160-166. 2007.

KNOTHE, H., et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v.11, n.6, p.315-317. 1983.

KONG, K. F., et al. Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. **APMIS**, v.118, n.1, p.1-36. 2010.

LAGO, ALDALISE, et al. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da**

Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.43, n.4, p.430-434. 2010.

LASCOLS, C., et al. Using nucleic acid microarrays to perform molecular epidemiology and detect novel beta-lactamases: a snapshot of extended-spectrum beta-lactamases throughout the world. **J Clin Microbiol**, v.50, n.5, p.1632-1639. 2012.

LAVIGNE, J. P., et al. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. **Clin Microbiol Infect**, v.18, n.6, p.539-545. 2012.

LCF, LAHEY CLINIC FOUNDATION. **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/>>. Acesso em: 05 jan. 2014.

LEISER, JACIR JÚLIO, et al. Infecções Hospitalares em um centro de terapia intensiva de um hospital de ensino do norte do Paraná. **Ciência, Cuidado e Saúde**, v.6, n.2, p.181-186. 2007.

LEUZZI, MARIA SUELI PAPA, et al. Analysis by RAPD of the genetic structure of *Astyanax altiparanae* (Pisces, Characiformes) in reservoirs on the Paranapanema River, Brazil. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.3, p.355-362. 2004.

LEVERSTEIN-VAN HALL, M. A., et al. Evaluation of the Etest ESBP and the BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum beta-lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **J Clin Microbiol**, v.40, n.10, p.3703-3711. 2002.

LEVY, S. B. MARSHALL, B. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nat Med**, v.10, n.12 Suppl, p.S122-129. 2004.

LEVY, S. B. MCMURRY, L. Plasmid-determined tetracycline resistance involves new transport systems for tetracycline. **Nature**, v.276, n.5683, p.90-92. 1978.

LI, C. R., et al. Dissemination and spread of CTX-M extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* in central China. **Int J Antimicrob Agents**, v.22, n.5, p.521-525. 2003.

LIU, C. P., et al. Nosocomial and community-acquired *Enterobacter cloacae* bloodstream infection: risk factors for and prevalence of SHV-12 in multiresistant isolates in a medical centre. **J Hosp Infect**, v.58, n.1, p.63-77. 2004.

LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v.8, n.4, p.557-584. 1995.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum beta-lactamase. **Clin Microbiol Infect**, v.14 Suppl 1, p.3-10. 2008.

LIVERMORE, D. M. BROWN, D. F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance. **J Antimicrob Chemother**, v.48 Suppl 1, p.59-64. 2001.

LIVERMORE, D. M., et al. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.2, p.165-174. 2007.

LIVERMORE, DAVID M. Fourteen years in resistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.39, n.1, p.283-294. 2012.

LOPES, A. C., et al. bla(CTX-M-2) and bla(CTX-M-28) extended-spectrum beta-lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.105, n.2, p.163-167. 2010.

MANZUR, A., et al. Nosocomial outbreak due to extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Enterobacter cloacae* in a cardiothoracic intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v.45, n.8, p.2365-2369. 2007.

MARKOVSKA, RUMYANA DONKOVA, et al. Epidemiology and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Enterobacter* spp., *Pantoea agglomerans*, and *Serratia marcescens* Isolates from a Bulgarian Hospital. **Microbial Drug Resistance**, v.0, n.0, p.1-7. 2013.

MARTINEZ, J. L., et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev**, v.33, n.1, p.44-65. 2009.

MASSOVA, I.MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.42, n.1, p.1-17. 1998.

MATHIS, D. L., et al. Variation in Salmonella enteritidis RAPD-PCR patterns may not be due to genetic differences. *Avian Dis*, v.55, n.4, p.620-625. 2011.

MATSUMOTO, Y., et al. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from Escherichia coli that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrob Agents Chemother**, v.32, n.8, p.1243-1246. 1988.

MCGOWAN, J. E., JR. Changing etiology of nosocomial bacteremia and fungemia and other hospital-acquired infections. **Rev Infect Dis**, v.7 Suppl 3, p.S357-370. 1985.

MELZER, M.PETERSEN, I. Mortality following bacteraemic infection caused by extended spectrum beta-lactamase (ESBL) producing E. coli compared to non-ESBL producing E. coli. **J Infect**, v.55, n.3, p.254-259. 2007.

MINARINI, L. A., et al. Clonal transmission of ESBL-producing Klebsiella spp. at a university hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, v.56, n.6, p.587-591. 2008a.

MINARINI, L. A., et al. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Curr Microbiol**, v.54, n.5, p.335-341. 2007.

MINARINI, L. A., et al. Plasmid-mediated quinolone resistance determinants among enterobacterial isolates from outpatients in Brazil. **J Antimicrob Chemother**, v.62, n.3, p.474-478. 2008b.

MORIGUCHI, N., et al. Outbreak of CTX-M-3-type extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacter cloacae in a pediatric ward. **J Infect Chemother**, v.13, n.4, p.263-266. 2007.

MORRISSEY, I., et al. A Review of Ten Years of the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) from 2002 to 2011. **Pharmaceuticals (Basel)**, v.6, n.11, p.1335-1346. 2013.

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

NAAS, T., et al. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v.14 Suppl 1, p.42-52. 2008.

NANVAZADEH, F., et al. Genotyping of *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients by RAPD-PCR. **Burns**, v.39, n.7, p.1409-1413. 2013.

NEELA, V., et al. Use of RAPD to investigate the epidemiology of *Staphylococcus aureus* infection in Malaysian hospitals. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v.21, n.1, p.245-251. 2005.

NIKAIDO, H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. **Microbiol Mol Biol Rev**, v.67, n.4, p.593-656. 2003.

NODWELL, JUSTIN R. Novel Links between Antibiotic Resistance and Antibiotic Production. **Journal Of Bacteriology**, v.189, n.10, p.3683-3685. 2007.

NOGUEIRA, KEITE DA SILVA. **Prevalência e Caracterização Molecular de Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em Enterobactérias isoladas no Hospital das Clínicas em Curitiba**. 2011. 167 p. (Doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

NOGUEIRA, KEITE DA SILVA, et al. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v.10, n.6, p.390-395. 2006.

NOGUEIRA, PAULA SACHA FROTA, et al. Perfil da Infecção Hospitalar de um Hospital Universitário. **Revista Enfermagem UERJ**, v.17, n.1, p.96-101. 2009.

O'HARA C, M. Manual and automated instrumentation for identification of Enterobacteriaceae and other aerobic gram-negative bacilli. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.1, p.147-162. 2005.

OLIVEIRA, CAIO FERNANDO DE, et al. Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella* spp no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.42, n.5, p.556-560. 2009.

OLIVEIRA, ROSANGELA DEMARUYAMA, SÔNIA AYAKO TAO. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.10, n.3, p.775-783. 2008.

OLSON, A. B., et al. Identification of a progenitor of the CTX-M-9 group of extended-spectrum beta-lactamases from *Kluyvera georgiana* isolated in Guyana. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.5, p.2112-2115. 2005.

ORTEGA, M., et al. Epidemiology and outcome of primary community-acquired bacteremia in adult patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v.26, n.7, p.453-457. 2007.

OTEO, J., et al. Outbreak of multidrug-resistant CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* in a neonatal intensive care unit. **J Med Microbiol**, v.62, n.Pt 4, p.571-575. 2013.

PAGANI, L., et al. Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. **J Clin Microbiol**, v.40, n.4, p.1549-1552. 2002.

PAGES, J. M., et al. The porin and the permeating antibiotic: a selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v.6, n.12, p.893-903. 2008.

PARTRIDGE, S. R., et al. Recombination in IS26 and Tn2 in the evolution of multiresistance regions carrying blaCTX-M-15 on conjugative IncF plasmids from *Escherichia coli*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.55, n.11, p.4971-4978. 2011.

PARUCKER, LUCY MARIA BEZ BIROLO. **Epidemiologia das Infecções relacionada à Assistência à Saúde na grande**

Florianópolis, com ênfase em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. 2010. 177 p. (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

PASANEN, T., et al. An outbreak of CTX-M-15 -producing *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, and *Klebsiella* in a children's hospital in Finland. **Scand J Infect Dis**. 2013.

PATERSON, D. L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **Am J Infect Control**, v.34, n.5 Suppl 1, p.S20-28; discussion S64-73. 2006.

PATERSON, D. L. BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v.18, n.4, p.657-686. 2005.

PATERSON, D. L., et al. International prospective study of *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of extended-spectrum beta-lactamase production in nosocomial Infections. **Ann Intern Med**, v.140, n.1, p.26-32. 2004.

PEIRANO, G., et al. Molecular characteristics of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* from Rio de Janeiro, Brazil. **Clin Microbiol Infect**, v.17, n.7, p.1039-1043. 2011.

PEREZ, A., et al. Involvement of the AcrAB-TolC efflux pump in the resistance, fitness, and virulence of *Enterobacter cloacae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.56, n.4, p.2084-2090. 2012.

PEREZ, F., et al. The continuing challenge of ESBLs. **Curr Opin Pharmacol**, v.7, n.5, p.459-469. 2007.

PETRI, WILLIAM A. Antimicrobianos: Penicilinas, Cefalosporinas e outros antibióticos B-lactâmicos. In: GILMAN, GOODMAN & (Ed.). **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10ª. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill, 2005. v. p.891-912

PIRES, F. V., et al. Nasal Carriage of *Staphylococcus aureus* in Botucatu, Brazil: A Population-Based Survey. **PLoS One**, v.9, n.3, p.e92537. 2014.

PITOUT, J. D., et al. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **J Antimicrob Chemother**, v.56, n.1, p.52-59. 2005.

PITOUT, J.D., LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**, v. 8, p. 159–166. 2008.

PODSCHUN, R.ULLMANN, U. Klebsiella spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clin Microbiol Rev**, v.11, n.4, p.589-603. 1998.

POIREL, L., et al. Plasmid-Mediated Quinolone Resistance; Interactions between Human, Animal, and Environmental Ecologies. **Front Microbiol**, v.3, p.24. 2012.

POIREL, L., et al. In vivo acquisition of high-level resistance to imipenem in Escherichia coli. **J Clin Microbiol**, v.42, n.8, p.3831-3833. 2004a.

POIREL, L., et al. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of Pseudomonas aeruginosa in Athens, Greece. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.6, p.2277-2279. 2004b.

POIREL, L., et al. Multiplex PCR for detection of acquired carbapenemase genes. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.70, n.1, p.119-123. 2011.

QUEIROS, RAQUEL GUIMARÃES, THAIS. O Farmacêutico na Comissão de Controle de Infecção Hospitalar. In: STORPIRTIS (Ed.). **Farmácia Clínica e Atenção Farmacêutica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. v. p.211-216

RADU, S., et al. Detection of Escherichia coli O157:H7 by multiplex PCR and their characterization by plasmid profiling, antimicrobial resistance, RAPD and PFGE analyses. **J Microbiol Methods**, v.46, n.2, p.131-139. 2001.

RAFEI, R., et al. First report of bla_{NDM-1}-producing *Acinetobacter baumannii* isolated in Lebanon from civilians wounded during the Syrian war. *Int J Infect Dis*, v.21, p.21-23. 2014.

RAMOS, J. L., et al. Mechanisms of solvent tolerance in gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol*, v.56, p.743-768. 2002.

RASKO, D. A., et al. 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.

REINERT, R. R., et al. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. *J Antimicrob Chemother*, v.60, n.5, p.1018-1029. 2007.

REZK, N. A., et al. Typing of *Salmonella* Typhi strains isolated from Egypt by RAPD PCR. *3 Biotech*, v.2, n.1, p.17-25. 2012.

RODRIGUEZ, M. M., et al. Chromosome-encoded CTX-M-3 from *Kluyvera ascorbata*: a possible origin of plasmid-borne CTX-M-1-derived cefotaximases. *Antimicrob Agents Chemother*, v.48, n.12, p.4895-4897. 2004.

RON, E. Z. Distribution and evolution of virulence factors in septicemic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, v.300, n.6, p.367-370. 2010.

ROSA, MÁRIO BORGES, et al. A Farmácia e o Controle das Infecções Hospitalares. In: GOMES, MARIA JOSÉ VASCONCELOSREIS, ADRIANO MAX MOREIRA (Ed.). **Ciências Farmacêuticas: Uma abordagem em Farmácia Hospitalar**. São Paulo: Atheneu, 2000. v. p.407-427

ROSENTHAL, S.TAGER, I. B. Prevalence of gram-negative rods in the normal pharyngeal flora. *Ann Intern Med*, v.83, n.3, p.355-357. 1975.

ROSENTHAL, V. D., et al. International Nosocomial Infection Control Consortium (INICC) report, data summary for 2003-2008, issued June 2009. *Am J Infect Control*, v.38, n.2, p.95-104 e102. 2010.

SAHLY, H., et al. Increased serum resistance in *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.9, p.3477-3482. 2004.

SAHLY, H., et al. Extended-spectrum beta-lactamase production is associated with an increase in cell invasion and expression of fimbrial adhesins in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.52, n.9, p.3029-3034. 2008.

SANCHEZ, P., et al. The biocide triclosan selects *Stenotrophomonas maltophilia* mutants that overproduce the SmeDEF multidrug efflux pump. **Antimicrob Agents Chemother**, v.49, n.2, p.781-782. 2005.

SANDERS, C. C., et al. Detection of extended-spectrum-beta-lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae with Vitek ESBL test. **J Clin Microbiol**, v.34, n.12, p.2997-3001. 1996.

SANDERS, W. E., JR.SANDERS, C. C. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. **Clin Microbiol Rev**, v.10, n.2, p.220-241. 1997.

SANTOS, LUCIANA RUSCHEL DOS. Padronização da RAPD (DNA Polimórfico Amplificado ao acaso) para caracterização molecular de *Salmonella Enteritidis*. **Revista da FZVA**, v.10, n.1, p.144-158. 2003.

SCARPATE, ED CARLOS BONICOSSATIS, JOÃO JOSÉ. A presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de b-lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde e Ambiente**, v.4, n.1, p.1-11. 2009.

SCHUMANN, P.PUKALL, R. The discriminatory power of ribotyping as automatable technique for differentiation of bacteria. **Syst Appl Microbiol**, v.36, n.6, p.369-375. 2013.

SCHWABER, M. J., et al. Utility of NCCLS guidelines for identifying extended-spectrum beta-lactamases in non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. of Enterobacteriaceae. **J Clin Microbiol**, v.42, n.1, p.294-298. 2004.

SCHWARTZ, D. C. CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, n.1, p.67-75. 1984.

SELDEN, R., et al. Nosocomial klebsiella infections: intestinal colonization as a reservoir. **Ann Intern Med**, v.74, n.5, p.657-664. 1971.

SFM, SOCIETE FRANCAISE DE MICROBIOLOGIE. **Comite de l'antibiogramme de la Societe Francaise de Microbiologie: Recommandations 2010**. France. 2010

SHAH, A. A., et al. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. **Res Microbiol**, v.155, n.6, p.409-421. 2004.

SHENG, W. H., et al. Distribution of extended-spectrum beta-lactamases, AmpC beta-lactamases, and carbapenemases among Enterobacteriaceae isolates causing intra-abdominal infections in the Asia-Pacific region: results of the study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART). **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.7, p.2981-2988. 2013.

SIEGEL, JANE D., et al. **Management of Multidrug-Resistant Organisms In Healthcare Settings**. Disponível em: <http://www.cdc.gov/hicpac/pdf/MDRO/MDROGuideline2006.pdf>. Acesso em: 30 jan. 2013.

SILVA, KETRIN CRISTINA DALINCOPAN, NILTON. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **J Bras Patol Med Lab** v.48, n.2, p.91-99. 2012.

SILVER, S.PHUNG, L. T. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. **Annu Rev Microbiol**, v.50, p.753-789. 1996.

SMITH, J. L., et al. Extraintestinal pathogenic Escherichia coli. **Foodborne Pathog Dis**, v.4, n.2, p.134-163. 2007.

SNEATH, P.H.A.SOKAL, R.R. **Numerical Taxonomy**. Freeman, San Francisco. 1973

SOUGAKOFF, W., et al. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. **Rev Infect Dis**, v.10, n.4, p.879-884. 1988.

SPANU, T., et al. Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in Enterobacteriaceae isolates. **J Clin Microbiol**, v.44, n.9, p.3257-3262. 2006.

SPEIJER, H., et al. Application of different genotyping methods for *Pseudomonas aeruginosa* in a setting of endemicity in an intensive care unit. **J Clin Microbiol**, v.37, n.11, p.3654-3661. 1999.

STRAHILEVITZ, J., et al. Plasmid-mediated quinolone resistance: a multifaceted threat. **Clin Microbiol Rev**, v.22, n.4, p.664-689. 2009.

TAMURA, K., et al. **MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. Molecular Biology and Evolution**30: 2725-2729. 2013.

TAMURA, KOICHIRO, et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Mol. Biol. Evol.** , v.30, n.12, p.2725-2729. 2013.

TENOVER, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **Am J Infect Control**, v.34, n.5 Suppl 1, p.S3-10; discussion S64-73. 2006.

TENOVER, F. C., et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **J Clin Microbiol**, v.33, n.9, p.2233-2239. 1995.

THOMAS, C. M.NIELSEN, K. M. Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria. **Nat Rev Microbiol**, v.3, n.9, p.711-721. 2005.

THOMAS, C. P., et al. Early (2008-2010) hospital outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-48 carbapenemase in the UK. **Int J Antimicrob Agents**, v.42, n.6, p.531-536. 2013.

THOMSON, K. S. Controversies about extended-spectrum and AmpC beta-lactamases. **Emerg Infect Dis**, v.7, n.2, p.333-336. 2001.

TOLLENTINO, F. M., et al. High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-12), bla(SHV-31), bla(SHV-38), and bla(CTX-M-15) in Brazil. **Microb Drug Resist**, v.17, n.1, p.7-16. 2011.

TZOUVELEKIS, L. S., et al. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int J Antimicrob Agents**, v.14, n.2, p.137-142. 2000.

VINCENT, J. L., et al. The prevalence of nosocomial infection in intensive care units in Europe. Results of the European Prevalence of Infection in Intensive Care (EPIC) Study. EPIC International Advisory Committee. **JAMA**, v.274, n.8, p.639-644. 1995.

VOS, D. DE, et al. Analysis of epidemic *Pseudomonas aeruginosa* isolates by isoelectric focusing of pyoverdine and RAPD-PCR: modern tools for an integrated anti-nosocomial infection strategy in burn wound centres. **Burns**, v.23, n.2, p.379-386. 1997.

WAKSMAN, S. A. WOODRUFF, H. B. The Soil as a Source of Microorganisms Antagonistic to Disease-Producing Bacteria. **J Bacteriol**, v.40, n.4, p.581-600. 1940.

WATABE, M., et al. Epidemiological study of *E. coli* O157:H7 isolated in Northern Ireland using pulsed-field gel electrophoresis (PFGE). **Ulster Med J**, v.77, n.3, p.168-174. 2008.

WEBBER, M. A. PIDDOCK, L. J. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. **J Antimicrob Chemother**, v.51, n.1, p.9-11. 2003.

WELDHAGEN, G. F. Integrons and beta-lactamases--a novel perspective on resistance. **Int J Antimicrob Agents**, v.23, n.6, p.556-562. 2004.

WELINDER-OLSSON, C., et al. EHEC outbreak among staff at a children's hospital--use of PCR for verocytotoxin detection and PFGE for epidemiological investigation. **Epidemiol Infect**, v.132, n.1, p.43-49. 2004.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Prevention of hospital-acquired infections: A practical guide**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/hai/>>. Acesso em: 29 dez. 2013.

WIEGAND, I., et al. Detection of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae by use of semiautomated microbiology systems and manual detection procedures. **J Clin Microbiol**, v.45, n.4, p.1167-1174. 2007.

WOLFENBERGER, A., et al. Change of Antibiotic Susceptibility Testing Guidelines from CLSI to EUCAST: Influence on Cumulative Hospital Antibiograms. **PLoS One**, v.8, n.11, p.e79130. 2013.

WOODFORD, N., et al. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. **J Antimicrob Chemother**, v.57, n.1, p.154-155. 2006.

WOODFORD, NEIL, et al. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol Rev** **35 (2011) 736–755**, v.35, n.1, p.736-755. 2011.

YONG, D., et al. Characterization of a new metallo-beta-lactamase gene, bla(NDM-1), and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.12, p.5046-5054. 2009.