

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia**

Luciana Nery Silva

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
β-LACTAMASES E DA DIVERSIDADE CLONAL DE
ENTEROBACTÉRIAS RECUPERADAS DE HEMOCULTURAS DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Belo Horizonte

2015

Luciana Nery Silva

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE
β-LACTAMASES E DA DIVERSIDADE CLONAL DE
ENTEROBACTÉRIAS RECUPERADAS DE HEMOCULTURAS DE
PACIENTES HOSPITALIZADOS**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Área de Concentração: Ciências Biológicas

Orientadora: Profa. Simone G. dos Santos

Universidade Federal de Minas Gerais

Co-orientadora: Profa. Maria Auxiliadora

Roque de Carvalho

Aos meus pais, Lucas Evangelista e Gláucia Maria,
Que sempre acreditaram em meus sonhos e em minha capacidade.
Que sempre me apoiaram e incentivaram.
Meus exemplos de integridade, dignidade e fé.
Minha vida não teria tanta doçura sem este amor maior.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda proteção e luz em minha vida.

Ao meu esposo Leandro pela companhia, amor e ajuda na realização desse trabalho.

Ao meu irmão, André, por se preocupar comigo e por estar sempre querendo o meu bem.

À D. Lenir, pela doçura que sempre dedica a mim.

À minha querida amiga Valéria, pelos anos de amizade e por sempre torcer pelo meu sucesso.

À minha amiga Mirna, por toda ajuda neste projeto, pelo carinho e cuidado dentro e fora do laboratório.

A toda minha família e amigos, por se orgulharem de todas as minhas conquistas.

À professora Simone Gonçalves dos Santos a minha gratidão pela orientação, confiança, atenção, incentivo, preocupação e ensinamentos. Sou grata por conviver com uma pessoa tão humana.

À professora Maria Auxiliadora Roque de Carvalho (Dodora), sua trajetória acadêmica é uma fonte de inspiração.

Aos professores Luiz e Paula, por todo apoio e incentivo.

À Universidade Federal de Minas Gerais e ao Departamento de Microbiologia, pela formação e pela oportunidade de realização deste trabalho.

Aos colegas do mestrado, pelos momentos alegres, pelo incentivo, pela amizade e por toda ajuda sempre dispensada quando precisei.

Aos amigos do Laboratório de Microbiologia do Hospital Regional de Betim, em especial Divâni, Adriana, Juarez e Wilson, este é o lugar onde tudo começou.

E aos meus queridos e amados pais, por serem a essência da minha vida!

"Rir muito e com frequência; ganhar o respeito de pessoas inteligentes e o afeto das crianças; merecer a consideração dos críticos honestos; apreciar a beleza, encontrar o melhor nos outros; deixar o mundo um pouco melhor, seja por uma criança, um canteiro de jardim ou uma redimida condição social; saber que ao menos uma vida respirou mais fácil porque você viveu. Isso é ter sucesso".

(Ralph Waldo Emerson)

RESUMO

As Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde representam um desafio crescente em decorrência do aumento das taxas de resistência aos antimicrobianos. Essas infecções provocam sérios agravos à saúde do paciente, aumentam as taxas de mortalidade e elevam os custos médicos. O principal mecanismo de resistência aos antimicrobianos na família *Enterobacteriaceae* é a produção de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemases. As enterobactérias produtoras de ESBL mostram uma grande habilidade para disseminar e permanecer dentro do ambiente hospitalar, limitando as opções terapêuticas. Apesar da elevada prevalência dessas enzimas, sua produção ainda é subestimada, devido às dificuldades de detecção laboratorial. Este estudo teve como objetivo caracterizar a presença dos principais tipos de ESBL, AmpC e carbapenemases (KPC e NDM) por meio de métodos fenotípicos e genotípicos, e avaliar a diversidade genética de 88 enterobactérias recuperadas de hemoculturas em hospitais de Belo Horizonte, MG, nos períodos de junho de 2008 a junho de 2009 e, abril de 2013 a abril de 2014. Foram realizados testes de susceptibilidade aos antimicrobianos e a detecção fenotípica das enzimas ESBL por Teste do Sinergismo do Duplo Disco (TSDD) e Etest; AmpC, pelo Teste do Disco de Aproximação e disco combinado de cefoxitina com ácido fenilborônico e pesquisa de carbapenemases, pelo Teste de Hodge Modificado (THM). Os genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} foram avaliados pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Na avaliação da similaridade genética entre as amostras, utilizou-se o ERIC-PCR. Dentre as amostras identificadas, 58% de *K. pneumoniae*, 21% de *Enterobacter cloacae* complex, 10% de *Enterobacter aerogenes* e 11% de *E. coli*, a frequência da produção de ESBL quando utilizados o TSDD e o Etest foi de 56,8% e 55,6%, respectivamente. A pesquisa fenotípica de AmpC mostrou-se positiva apenas para uma amostra. Pelo THM, 39,2% das amostras de *K. pneumoniae* e 11,1% das de *Enterobacter* spp. foram positivas. Genes que codificam a síntese de ESBL foram observados em 79,5% das amostras. Dentre eles, *bla*_{TEM} foi o predominante, detectado em 61,3% (54/88) das amostras, seguido de *bla*_{SHV}, presente em 42% das amostras, especialmente em *K. pneumoniae* (36/51). A presença simultânea de marcadores que codificam dois tipos de ESBL foi observada em 37,5% (33/88) das amostras. A combinação *bla*_{TEM}/*bla*_{SHV} foi a mais comum em *K. pneumoniae* e *bla*_{TEM}/*bla*_{CTX-M} em *Enterobacter* spp. e *E. coli*. Em relação às carbapenemases, *bla*_{KPC} foi detectado em 45% (23/51) das amostras de *K. pneumoniae* e em 18,5% (5/27) das amostras de *Enterobacter* spp.. Foi detectada a presença de *bla*_{AmpC} em uma amostra de *E. coli* que também se mostrou resistente à cefoxitina. Os genes *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{NDM} e *bla*_{GES} não foram detectados em nenhuma das amostras bacterianas analisadas neste trabalho. Os resultados obtidos permitem sugerir que várias populações clonais estejam circulando entre os Hospitais em estudo, dentre estas algumas idênticas, que podem ter sido disseminadas por diferentes vias, como os profissionais da área de saúde e pacientes transferidos entre os hospitais.

Palavras chaves: Enterobactérias, Hemoculturas, Beta-lactamases, Marcadores de Resistência, Diversidade clonal.

Apoio Financeiro: FAPEMIG; CNPq; CAPES; PRPq/UFMG.

ABSTRACT

Healthcare Associated Infections represent a growing challenge due to the increase of antimicrobial resistance. These infections provoke severe harm to the patient's health, raise the mortality rates and the medical costs. The main mechanism of antimicrobial resistance in the family *Enterobacteriaceae* is the production of extended-spectrum β -lactamases (ESBL) and carbapenemases. The ESBL-producing enterobacteria show a great ability to disseminate and remain inside the hospital environment, limiting the therapeutic options. Despite the high prevalence of these enzymes, their production is still underestimated because of the difficulties of laboratory detection. The present research aimed to characterize the presence of the main types of ESBL, AmpC and carbapenemases (KPC and NDM) through phenotypic and genotypic methods, and to assess the genetic diversity of 88 enterobacteria recovered from hemoculture in hospitals in Belo Horizonte, MG, between June 2008 and June 2009 and also april 2013 and april 2014. It was carried out antimicrobial susceptibility testing and phenotypic detection of ESBL enzymes through Double-Disk Synergy Test (DDST) and Etest; AmpC, through the Double-Disk Synergy Test and combined disk of cefoxitin with phenylboronic acid and research of carbapenemases, through the Modified Hodge Test (MHT). The genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{KPC} and *bla*_{NDM} were evaluated by the Polymerase Chain Reaction (PCR). In the evaluation of the genetic similarity of the samples, it was used the ERIC-PCR. Among the identified samples, 58% of *K. pneumoniae*, 21% of *Enterobacter cloacae* complex, 10% of *Enterobacter aerogenes* and 11% of *E. coli*, the frequency of production of ESBL when DDST and Etest were used was of 56.8% and 55.6%, respectively. The phenotypic research of AmpC showed positive only to one sample. Through MHT, 39.2% of the samples of *K. pneumoniae* and 11.1% of the *Enterobacter* spp. were positive. Genes which encodes the synthesis of ESBL were observed in 79.5% of the samples. Among them, *bla*_{TEM} was dominant, detected in 61.3% (54/88) of the samples, followed by *bla*_{SHV} present in 42% of the samples, especially in *K. pneumoniae* (36/51). The simultaneous presence of markers which encode two types of ESBL were observed in 37.5% (33/88) of the samples. The combination *bla*_{TEM}/*bla*_{SHV} was the most common in *K. pneumoniae* and *bla*_{TEM}/*bla*_{CTX-M} in *Enterobacter* spp. and *E. coli*. Regarding the carbapenemases, *bla*_{KPC} was detected in 45% (23/51) of the samples of *K. pneumoniae* and in 18.5% (5/27) of the samples of *Enterobacter* spp.. It was detected the presence of *bla*_{AmpC} in a sample of *E. coli* which also showed resistance to cefoxitin. The genes *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}, *bla*_{NDM} and *bla*_{GES} were not detected in any of the bacterial samples analyzed here. The obtained results may suggest that several clonal populations might be circulating among the Hospitals studied, some identical, which can be disseminated through different ways, with health professionals and the patients' transferences between hospitals.

Keywords: Enterobacteria, Hemocultures, Beta-lactamases, Resistance Markers, Clonal Diversity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mecanismo de ação das β -Lactamases.....	24
Figura 2	Perfil de susceptibilidade das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=51) aos antimicrobianos avaliados.....	56
Figura 3	Perfil de susceptibilidade das amostras de <i>Enterobacter</i> spp. (n=27) aos antimicrobianos avaliados.....	57
Figura 4	Perfil de susceptibilidade das espécies de <i>Enterobacter cloacae</i> complex e <i>Enterobacter aerogenes</i> aos antimicrobianos avaliados.....	57
Figura 5	Perfil de susceptibilidade das amostras de <i>Escherichia coli</i> (n=10) aos antimicrobianos avaliados.....	58
Figura 6	Perfil de susceptibilidade das enterobactérias recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em CTIs e Outros Setores hospitalares ao painel de antimicrobianos avaliados	59
Figura 7	Fotos representativas de um dos Testes de Sinergismo do Duplo Disco empregados neste estudo.....	61
Figura 8	Foto ilustrativa de um Etest ESBL positivo encontrado neste estudo...	61
Figura 9	Foto ilustrativa de um Etest ESBL positivo encontrado neste estudo...	61
Figura 10	Foto ilustrativa de um Etest ESBL Não-Determinado encontrado neste estudo.....	62
Figura 11	Perfil de susceptibilidade à cefoxitina das amostras de enterobactérias recuperadas de hemoculturas.....	62
Figura 12	Foto representativa da amostra 105, com teste do disco combinado para Pesquisa de AmpC plasmidial positiva.....	63
Figura 13	Foto ilustrativa do Teste de Hodge Modificado positivo.....	64
Figura 14	Foto de Gel ilustrativo contendo fragmentos do gene <i>bla</i> _{CTX-M} e <i>bla</i> _{KPC1-3}	64
Figura 15	Combinação dos tipos de β -lactamases encontrados nas amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=51), <i>Enterobacter</i> spp. (n=27) e <i>Escherichia coli</i> (n=10) avaliadas.....	66
Figura 16	Porcentagem das amostras carreadoras de genes que codificam β -Lactamases por setores hospitalares.....	67
Figura 17	Dendrograma de similaridade genética entre as amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	70

Figura 18	Dendrograma de similaridade genética entre as amostras de <i>Escherichia coli</i>	71
Figura 19	Dendrograma de similaridade genética entre as amostras de <i>Enterobacter aerogenes</i>	71
Figura 20	Dendrograma de similaridade genética entre as amostras de <i>Enterobacter cloacae</i>	72
Quadro 1	Classificação das β -Lactamases.....	26
Quadro 2	Resultados das CIM ₅₀ e CIM ₉₀ das amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=51), <i>Enterobacter</i> spp. (n=27) e <i>Escherichia coli</i> (n=10).....	60
Quadro 3	Produção de β -lactamases entre as enterobactérias avaliadas: Análises fenotípica e genotípica.....	66

LISTA DE TABELAS

1. Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizada na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos... 53
2. Perfil genotípico das amostras de enterobactérias analisadas..... 65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AES	<i>Advanced Expert System</i>
AFB	Ácido Fenilborônico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CTI	Centro de Tratamento Intensivo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ERIC	<i>Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus</i>
ESBL	β -Lactamases de Espectro Estendido
ICS	Infecção da Corrente Sanguínea
IRAS	Infecção Relacionada à Assistência à Saúde
ITU	Infecção do Trato Urinário
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
Pb	Pares de Base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
SENTRY	<i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
THG	Transferência Horizontal de Genes
THM	Teste de Hodge Modificado
TSDD	Teste do Sinergismo do Duplo Disco
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Algorithm</i>
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	14
2.	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	Família <i>Enterobacteriaceae</i> : Aspectos Taxonômicos e Características Gerais.....	17
2.2	Família <i>Enterobacteriaceae</i> : Participação nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde.....	17
2.3	Resistência aos Antimicrobianos	20
2.4	Enzimas β -Lactamases.....	22
2.4.1	Classificação das β -lactamases.....	25
2.5	β -Lactamases de Espectro Estendido – ESBL.....	27
2.5.1	Epidemiologia das ESBL.....	28
2.5.2	Tipos de ESBL.....	31
2.6	Outros Tipos de β -lactamases.....	35
2.6.1	<i>Klebsiella Pneumoniae</i> Carbapenemase.....	35
2.6.2	Nova Delhi Metalo- β -lactamase.....	36
2.6.3	AmpC.....	37
2.7	Contexto Genético para Aquisição e Disseminação de Determinantes de Resistência aos β -lactâmicos e Carbapenêmicos.....	39
2.8	Deteção fenotípica de β -lactamases.....	40
2.9	Métodos Automatizados.....	41
2.10	Métodos Genotípicos e Tipagem Molecular das β -lactamases.....	41
3.	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo Geral.....	45
3.2	Objetivos Específicos.....	45
4.	MATERIAL E MÉTODO.....	46
4.1	Amostras Bacterianas.....	46
4.2	Armazenamento das Amostras.....	46
4.3	Critérios de Inclusão.....	46
4.4	Critérios de Exclusão.....	46
4.5	Instituições Participantes.....	46
4.6	Aspectos Éticos da Pesquisa.....	47
4.7	Identificação e Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	47
4.8	Deteção Fenotípica de β -lactamases.....	48
4.8.1	Pesquisa de ESBL - TSDD (Teste do Sinergismo do Duplo Disco).....	48
4.8.2	Pesquisa de ESBL -Etest [®]	49
4.8.3	Pesquisa de AmpC cromossomal induzível – Disco de Aproximação.....	49
4.8.4	Pesquisa de AmpC plasmidial – Discos combinados.....	50

4.8.5	Pesquisa de Carbapenemase - Teste de Hodge Modificado.....	51
4.9	Detecção Genotípica de β -Lactamases - Reação em Cadeia da Polimerase...	51
4.10	Tipagem Molecular por ERIC-PCR.....	54
5.	RESULTADOS	55
5.1	Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos microrganismos recuperados.....	55
5.2	Métodos Fenotípicos para Determinação de β -lactamases.....	60
5.2.1	Teste do Sinergismo do Duplo Disco (TSDD) e Epsilon test (Etest).....	60
5.2.2	Pesquisa de AmpC empregando-se o teste de susceptibilidade à Cefoxitina	62
5.2.3	Pesquisa AmpC cromossomal induzível.....	62
5.2.4	Pesquisa AmpC plasmidial - Bloqueio enzimático com ácido fenilborônico.	63
5.2.5	Teste de Hodge Modificado para pesquisa de carbapenemase.....	63
5.3	Detecção genotípica de β -lactamases nas amostras estudadas.....	64
5.3.1	Detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{GES}	64
5.3.2	Detecção dos genes <i>bla</i> _{KPC1-3} e <i>bla</i> _{NDM}	65
5.3.3	Detecção dos genes AmpC - <i>bla</i> _{AmpC} , <i>bla</i> _{CMY-2} , <i>bla</i> _{FOX} , <i>bla</i> _{DHA}	67
5.4	Diversidade genética das amostras de enterobactérias.....	67
6.	DISCUSSÃO	73
6.1	Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	74
6.2	Detecção fenotípica de β -lactamases.....	76
6.3	Detecção genotípica de β -lactamases.....	80
6.4	Similaridade Genética.....	84
7.	SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES	87
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE	106

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Infecção Hospitalar representa um grande desafio para a saúde pública em todo o mundo. É, por definição, a infecção adquirida após a admissão do paciente, e que se manifesta durante a internação ou após a alta hospitalar. Estas infecções prolongam o tempo de internação, aumentam os custos hospitalares e as taxas de mortalidade. Nos últimos anos, a expressão Infecção Hospitalar vem sendo substituída por Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS), expressão mais ampla, pela qual a prevenção e o controle das infecções passam a ser considerados para todos os locais onde se presta o cuidado e a assistência à saúde. Sendo assim, o hospital não é o único local onde se pode adquirir uma infecção, podendo existir o risco em procedimentos ambulatoriais, serviços de hemodiálise, assistência domiciliar, entre outros (BRASIL, 1998; HORAN *et al.*, 2008).

Devido ao fato de as IRAS estarem intimamente relacionadas a procedimentos de risco, como o uso de cateteres e a ventilação mecânica, as bactérias da família *Enterobacteriaceae*, uma vez que são ubiqüitárias, estão entre os mais importantes agentes destas infecções (PITOUT, 2010).

A família *Enterobacteriaceae* é a maior e a que congrega o mais importante grupo de bacilos Gram-negativos de importância médica (PATERSON, 2006; Friedrich *et al.*, 2010). Embora os membros desta família façam parte da microbiota indígena do homem e de outros animais, esses microrganismos são responsáveis por uma grande variedade de doenças (LIN *et al.*, 2010).

Durante as três últimas décadas, espécies resistentes a múltiplas drogas têm emergido entre as *Enterobacteriaceae*, tornado-se endêmicas em vários hospitais do mundo (KRITSOTAKIS, *et al.*, 2011). Dentro deste grupo, podemos destacar *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e espécies do gênero *Enterobacter*, como importantes causas de infecções relacionadas à assistência a saúde (LIN *et al.*, 2010).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos pode ser considerada como um dos mais graves problemas mundiais enfrentados pelos hospitais (VIALE *et al.*, 2013). A produção de enzimas β -lactamases que inativam a maioria dos antimicrobianos é o principal mecanismo de resistência apresentado pelas bactérias Gram-negativas, podendo, também, ser associada à redução de permeabilidade de membrana, devido à mutação em porinas (LIVERMORE, 2012). Nos últimos anos, novos antimicrobianos β -

lactâmicos têm sido desenvolvidos; no entanto, para cada novo antimicrobiano introduzido, uma nova β -lactamase emerge, causando resistência (BUSH; JACOBY, 2010). As enterobactérias produtoras de β -lactamase mostram uma grande habilidade para disseminar e permanecer dentro do ambiente hospitalar, o que limita as opções terapêuticas clinicamente disponíveis (DENISUIK *et al.*, 2013).

Dentro do grupo das enzimas que conferem resistência aos agentes β -lactâmicos, as β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL), as β -lactamase AmpC e a *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) são as que mais se destacam neste cenário (KIM *et al.*, 2005; NORDMANN *et al.*, 2009; NOGUEIRA-MIRANDA *et al.*, 2012).

As enzimas ESBL têm como principal característica conferir resistência aos β -lactâmicos de espectro estendido, como cefalosporinas de terceira e quarta geração e aos monobactâmicos (BUSH; FISHER, 2011). Genes que codificam enzimas ESBL têm sido descritos em várias espécies de *Enterobacteriaceae*. As principais enzimas são TEM, SHV e CTX-M e suas variantes, e as ESBL GES, VEB, PER, que, apesar de terem uma menor prevalência, já foram relatadas em diversas partes do mundo (POIREL *et al.*, 2012; DALLEENNE *et al.*, 2010).

A produção de β -lactamases AmpC confere resistência a uma ampla variedade de antimicrobianos: β -lactâmicos, β -lactâmicos associados aos inibidores de β -lactamases e monobactâmicos. A expressão de AmpC em bactérias Gram-negativas ocorre por indução do gene cromossomal *ampC* (principalmente após exposição a alguns antimicrobianos β -lactâmicos) e pela aquisição de plasmídeos (SASIREKHA e SHIVAKUMAR, 2012). Muitos laboratórios têm dificuldade de relatar resistência mediada por AmpC, principalmente por não existirem diretrizes que padronizem essa detecção (PITOUT, 2010).

KPC é uma enzima produzida principalmente por *K. pneumoniae*; entretanto, sua detecção já foi relatada em várias outras espécies da família *Enterobacteriaceae* e em bacilos Gram-negativos não fermentadores. Sua presença em espécies bacterianas confere resistência aos antimicrobianos carbapênemicos além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (BURNS *et al.*, 2013). Devido à sua localização em plasmídeos, essas enzimas têm um alto poder de disseminação, o que dificulta o controle de epidemias e preocupa os profissionais da área de saúde, pois o tratamento destas infecções é extremamente difícil, devido às escassas opções terapêuticas (NORDMANN *et al.*, 2009).

Dada a habilidade das bactérias de produzir diferentes mecanismos de resistência, a detecção desses continua sendo um grande desafio para os laboratórios clínicos. Diante disso, é imprescindível o conhecimento de métodos laboratoriais que permitam em uma correta detecção e identificação destes mecanismos de resistência, dos quais se destaca o arsenal enzimático. A determinação da presença de β -lactamases, associada ao perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos, e a análise da semelhança clonal entre as linhagens resistentes poderão delinear a sua distribuição inter e extra-hospitalar, contribuindo para a prevenção e controle de infecções.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família *Enterobacteriaceae*: Aspectos Taxonômicos e Características Gerais

A família *Enterobacteriaceae* é composta de 53 gêneros e mais de 130 espécies de bacilos Gram-negativos, que podem ser responsáveis por diversos quadros infecciosos sendo isolados de diferentes espécimes clínicos (KONEMANN *et al.*, 2008; EUZÉBY, 2014). Esses microrganismos estão amplamente distribuídos na natureza, encontrados no solo, na água, em vegetais e, principalmente, no trato intestinal de seres humanos e animais (KONEMANN *et al.*, 2008). Neste grupo, os gêneros mais frequentemente isolados de espécimes biológicos são: *Escherichia* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Proteus* spp., *Morganella* spp., *Providencia* spp., *Shigella* spp. e *Salmonella* spp. (PATERSON, 2006)

As enterobactérias representam 80% ou mais de todos os Gram-negativos de importância clínica isolados na rotina microbiológica. Apresentam motilidade variável e crescem na presença ou ausência de oxigênio. Crescem bem nos meios comuns de cultura e nos meios seletivos para enterobactérias. Fermentam a glicose com ou sem a formação de gás. A maioria é catalase positiva e oxidase negativa, e a maioria reduz o nitrato a nitrito (KONEMANN *et al.*, 2008).

2.2 Família *Enterobacteriaceae*: Participação nas Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde

As IRAS são definidas como toda e qualquer infecção que acomete o indivíduo, seja em instituições hospitalares, atendimentos ambulatoriais na modalidade de hospital dia ou domiciliar, e que possa estar associada a algum procedimento assistencial, seja ele terapêutico ou diagnóstico (HORAN *et al.*, 2008). São processos cujas manifestações clínicas de infecção ocorrem 72 horas após admissão; no entanto, pode-se considerar um período de 48 horas quando o processo estiver relacionado a algum procedimento invasivo (BRASIL, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2009).

Em média, 3% a 12% dos pacientes hospitalizados em países desenvolvidos adquirem IRAS. Do total, pelos menos um quarto ocorre em Unidades de Tratamento Intensivo (UTI) (OMS, 2011). Nos Estados Unidos, estima-se que os gastos gerados com os tratamentos em decorrência das IRAS variam em torno de 28 a 45 bilhões de

dólares (DICK *et al.*, 2015). No Brasil, apesar de não haver uma sistematização dos dados, estima-se que, aproximadamente, 5 a 15% dos pacientes hospitalizados e 25 a 35% dos pacientes admitidos em UTIs adquiram algum tipo de infecção relacionada à assistência a saúde, considerada, em geral, a quarta causa de mortalidade (LEISER *et al.*, 2007; ABEGG; SILVA, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2012). Vários fatores de riscos estão associados ao desenvolvimento destas infecções, como o uso de dispositivos médicos de longa permanência, tais como cateter central, tubos endotraqueais, sondas urinárias; procedimentos cirúrgicos, uso excessivo de antimicrobianos, entre outros (OLIVEIRA, 2010).

A disseminação das IRAS está, usualmente, associada à contaminação cruzada. A via mais comum de transmissão de microrganismos ocorre entre as mãos de profissionais da saúde e pacientes (OLIVEIRA, 2010). Pesquisas mostram que o ambiente hospitalar está intimamente relacionado à disseminação destes microrganismos. A presença de bactérias multirresistentes, ou não, é comum em superfícies inanimadas e equipamentos hospitalares (OLIVEIRA, 2010).

Os membros da família da *Enterobacteriaceae* são importante causa de infecção do trato urinário (ITU), infecções da corrente sanguínea (ICS), pneumonias, infecções intra-abdominais, podendo causar, também, meningites e abscessos em diferentes sítios corpóreos (PATERSON, 2006; BRATU, 2007; NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

As ICS constituem um grave problema de saúde e quase sempre estão associadas a altas taxas de morbidade e mortalidade. No ambiente hospitalar são indicativas de gravidade da doença, com letalidade em torno de 35%. Estes processos levam ao prolongamento da internação hospitalar, o que implica aumento dos custos médicos (KRAKE *et al.*, 2011; RIBAS *et al.*, 2007; GUILARDE *et al.*, 2007). O fator de risco mais importante para ICS é a cateterização intravascular. Estima-se que 90% das ICS intravasculares são decorrentes do uso de cateter venoso central (RIBAS, 2007).

ICS causadas por enterobactérias produtoras ESBL têm sido associadas ao aumento de falhas terapêuticas e da mortalidade. A presença de bactérias produtoras de ESBL reduz significativamente o número de antimicrobianos disponíveis para o tratamento (BOUCHER *et al.*, 2009; TRECARIKI *et al.*, 2012).

Em um trabalho de revisão realizado por Trecarichi e colaboradores (2012), avaliando os principais fatores de risco para ICS causada por enterobactérias produtoras

de ESBL, o uso prévio de antibioticoterapia com β -lactâmicos foi o fator mais importante, seguido da presença de comorbidades, procedimentos invasivos e uso de dispositivos, além do longo tempo de internação.

Assim, principalmente por apresentarem resistência a várias classes de antimicrobianos, dificultando as opções de tratamento, as enterobactérias representam um grave problema no ambiente hospitalar (PAGE; BUSH, 2014; PATERSON, 2006). Dentre os seis patógenos (ESKAPE: *S. aureus*, *K. pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, e espécies de *Enterobacter*) apontados como os mais prevalentes em infecções graves, duas espécies são da família *Enterobacteriaceae* (BOUCHER *et al.*, 2009; BUSH, 2010). Programas como *Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY) e o *Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection* (MYSTIC) têm mostrado a participação de alguns gêneros desta família, como uma urgência clínica e epidemiológica nas infecções (SILVA; LINCOPAN, 2012).

E. coli tem sido a espécie mais prevalente em infecções hospitalares em todo mundo, ocupando o segundo lugar depois de *Staphylococcus aureus* (KRAKER, 2011). Esta espécie bacteriana é a mais isolada nos laboratórios clínicos, sendo o patógeno mais comum em ITU. Além disso, a sua presença pode estar relacionada com infecções de ferida, pneumonias em pacientes imunodeprimidos, bacteremias, infecções intestinais e meningites em neonatos (BRATU, 2007; SOMPOLINSKY, 2004; KAPER, 2004)

A espécie *K. pneumoniae* é um importante patógeno oportunista humano que frequentemente está relacionado à IRAS, podendo causar ITU, pneumonia, septicemia e infecções de tecidos moles. Também está associada a infecções adquiridas na comunidade (TUON *et al.*, 2012). Uma importante fonte de contaminação é a microbiota indígena do paciente, podendo ocorrer infecções sistêmicas. Devido à sua habilidade de se disseminar rapidamente em ambiente hospitalar e apresentar resistência a uma variedade de antimicrobianos, esta espécie é responsável por vários surtos em hospitais de todo mundo, sendo, geralmente, associada a altas taxas de morbidade e mortalidade (ZHANG *et al.*, 2012).

Dados do programa SENTRY mostram que *K. pneumoniae* está entre os cinco patógenos mais frequentes na América Latina isolados de infecções relacionadas à assistência à saúde (SADER *et al.*, 2001). Considerando-se as infecções em pacientes internados em UTI, 12,1% a 16,9% são causadas por *K. pneumoniae*, sendo esta a segunda enterobactéria mais prevalente (SADER, 2001).

Membros do gênero *Enterobacter* ocupam o terceiro lugar dentre as enterobactérias recuperadas de IRAS no mundo (MARCOS *et al.*, 2008). Espécies deste gênero estão associadas com infecções em feridas, intra-abdominais, respiratórias, urinárias e da corrente sanguínea (MARCOS *et al.*, 2008). *Enterobacter* spp. juntamente com as espécies de *Citrobacter* spp., *Serratia* spp., *Morganella morganii* e *Providência* spp. compõem o grupo CESP, caracterizado pela habilidade de codificar β -lactamases cromossomais tipo AmpC (CHEONG, 2012; TUON *et al.*, 2010).

2.3 Resistência aos Antimicrobianos

O ambiente hospitalar favorece a emergência e disseminação de bactérias resistentes aos antimicrobianos. Dados europeus mostram que o número de mortes associadas às IRAS causadas por bactérias resistentes a múltiplas drogas é estimado em 25000 por ano, levando a custos extras e perda de produtividade de 1,5 bilhões de euros. Nos Estados Unidos, esse número chega a 99000 mortes por ano (OMS, 2012).

O aumento das taxas de resistência a antimicrobianos é acelerado pelo uso excessivo destes agentes, o seu uso sem prescrição médica, antimicrobianos de baixa eficácia e tratamento empírico. O problema é ainda maior em países com baixo poder econômico (OMS, 2012).

Os antimicrobianos revolucionaram a medicina em muitos aspectos e o seu uso tem sido responsável por salvar várias vidas, representando sua descoberta um marco importantíssimo na história da humanidade. A "revolução antibiótica" cresceu a partir do final da última década de 40 aos anos 60, tornando-se a Era de Ouro da descoberta do produto natural. Este período foi seguido por duas décadas de sucessos repetidos, quando houve várias modificações na estrutura dos antibióticos naturais com o objetivo de melhorar sua atividade. Posteriormente, o fluxo de novos antibióticos diminuiu, decrescendo o número de licenciados na década de 90 e na primeira década deste século (LIVERMORE, 2012).

Desde a introdução, em **1937**, dos primeiros antimicrobianos (as sulfonamidas), o desenvolvimento de mecanismos de resistência acarretou a diminuição de seu uso terapêutico, a resistência as sulfonamidas foi registrada pela primeira vez no final da década de **1930**, e o mesmo mecanismo ainda permanece décadas após a sua descoberta. A penicilina foi descoberta por Alexander Fleming em 1928 e introduzida na terapêutica em **1941**. Vários anos antes, uma penicilinase já tinha sido identificada

(DAVIES; DAVIES, 2010). A penicilina foi amplamente usada na prática clínica, e espécies resistentes capazes de inativar a droga tornaram-se predominantes. Modificações na estrutura da droga foram sendo feitas para evitar a clivagem do anel β -lactâmico pelas penicilinases (β -lactamases). A identificação de uma penicilinase bacteriana antes da utilização do antibiótico chama a atenção para o fato de que um grande número de genes de resistência aos antimicrobianos são componentes naturais das populações microbianas (BERTONCHELI; HÖRNER, 2008; DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência das bactérias aos antimicrobianos tem se tornado um grave problema mundial em hospitais. Por meio de vários mecanismos, pré-existentes ou adquiridos, os microrganismos apresentam uma grande habilidade de driblar o arsenal terapêutico usado no controle das doenças infecciosas (THEURETZBACHER, 2011). O incremento da resistência bacteriana representa um fenômeno paradoxal decorrente, em grande parte, da evolução da terapêutica médica. Se, por um lado, com o avanço tecnológico e a melhoria nos tratamentos os pacientes sobrevivem por mais tempo, por outro lado, estes ficam mais expostos aos microrganismos resistentes (BARROS *et al.*, 2012).

Dados mostram que as UTIs são mais propícias ao aparecimento e disseminação da resistência microbiana. Pacientes internados em UTIs apresentam gravidade e instabilidade clínicas constantes, são submetidos a vários procedimentos invasivos, permanecem internados por longos períodos, fazem uso de vários dispositivos, como cateter, sondas, aparelhos de suporte respiratórios e, geralmente, utilizam antibióticos de amplo espectro de ação (WAGENLEHNER *et al.*, 2006).

Nos últimos 60 anos, desde sua introdução, milhões de toneladas de antimicrobianos têm sido produzidos e utilizados para uma ampla variedade de fins. O seu uso tem se difundido em diferentes campos, tais como medicina humana, veterinária e agricultura (FALLAH *et al.*, 2012; MARTINEZ; BAQUERO, 2009). O planeta está cada vez mais saturado com estes agentes tóxicos, que tem contribuído claramente para o aumento e seleção de espécies resistentes. O desenvolvimento de gerações de microrganismos resistentes aos antimicrobianos e sua ampla distribuição pela biosfera são resultado de anos de pressão seletiva, principalmente pelo uso indevido e excessivo de antimicrobianos pelo homem (SILVA; LINCOPAN, 2012; DAVIES; DAVIES, 2010).

A resistência aos antimicrobianos mediada pelas bactérias ocorre através de características codificadas geneticamente, podendo ser intrínseca, adquirida e mais recentemente alguns autores também tratam da resistência adaptativa (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012). A resistência intrínseca ou natural é característica da espécie, é aquela resultante da genética, estrutura fisiológica natural do microrganismo. A resistência adquirida acontece devido a modificações genéticas por mutação (pontual, inserções e deleções) ou pela aquisição exógena de DNA (Transferência Horizontal de Genes - THG) tais como transformação, transdução e conjugação. A resistência adquirida resulta em uma completa modificação na genética de uma bactéria, que faz com que um antimicrobiano eficaz deixe de ser ativo contra determinado microrganismo (MARTINEZ; BAQUERO, 2009). Já a resistência adaptativa, envolve um aumento temporário na habilidade da bactéria de sobreviver na presença de um determinado antimicrobiano, devido à alteração no gene ou na expressão de proteínas como resultado da exposição a uma determinada condição, como, stress, condições nutricionais, estado de crescimento e níveis sub-inibitórios do próprio antimicrobiano. Esse tipo de resistência é de natureza transitória e reversível se houver a remoção da condição que a induziu (FERNÁNDEZ; HANCOCK, 2012).

As bactérias podem apresentar vários mecanismos de resistência contra um único agente ou a várias classes de agentes antimicrobianos, e esses múltiplos mecanismos podem coexistir em uma mesma linhagem, tornando-a multirresistente. Os principais mecanismos expressos pelas bactérias são: mudanças no envelope celular que impedem a entrada do antimicrobiano na célula, produção de enzimas que os inativam, modificações no alvo de ligação e hiperprodução de bombas de efluxo, que são codificadas cromossomalmente (MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, 2008; MARTÍNEZ; BAQUERO, 2009; CANTÓN; RUIZ-GARBAJOSA, 2011).

A emergência de resistência aos agentes β -lactâmicos de amplo espectro e aos inibidores de β -lactamases vem se tornando um grave problema mundial nas últimas décadas, sendo a destruição enzimática da droga o mecanismo mais comum e disseminado pelo mundo (DONG *et al.* 2012).

2.4 Enzimas β -Lactamases

A resistência aos antimicrobianos mediada por β -lactamases é, provavelmente, o mecanismo de resistência mais estudado ao longo da história das doenças infecciosas. No início dos anos 1940, a atividade das β -lactamases foi descrita

como um mecanismo com capacidade de inativar as penicilinas, colocando em risco o uso da principal classe de antimicrobianos (BUSH; FISHER, 2011; BUSH, 2013). Penicilinas mais estáveis, cefalosporinas e carbapenêmicos foram desenvolvidos com a finalidade de driblar a hidrólise pelas β -lactamases; entretanto, a cada introdução de um novo antimicrobiano uma nova β -lactamase surge com habilidades hidrolíticas diferentes (LIVERMORE, 2012).

Atualmente as β -lactamases são responsáveis pela maioria da multirresistência observada em bactérias Gram-negativas, isoladas de ambiente hospitalar ou da comunidade. Uma importante sociedade científica (*The Infectious Diseases Society of America*) tem reconhecido patógenos Gram-negativos como um dos problemas mais importantes relacionados a doenças bacterianas, enfrentados nas últimas décadas (BOUCHER *et al.*, 2009).

Apesar das enterobactérias produzirem uma grande quantidade de β -lactamases cromossomais, as β -lactamases transferíveis são as mais preocupantes (BAÑO; NAVARRO, 2008). Os elementos genéticos que codificam centenas dessas enzimas estão associados com a diminuição da sensibilidade a várias classes de antimicrobianos (BEBRONE, 2010; BUSH, 2010). Médicos dependem cada vez mais dos antimicrobianos de amplo espectro para tratar infecções provocadas por bactérias Gram-negativas, e a perda destes agentes por ação das β -lactamases tem deixado uma lacuna muito grande nas opções de tratamento (BUSH; FISHER, 2011).

O número de β -lactamases que ocorrem naturalmente já ultrapassa 1.300 variantes (BUSH, 2013; BUSH, 2013). O primeiro relato da produção de uma β -lactamase, foi em 1940 pela espécie *Bacillus coli*, agora conhecido como *E. coli*, que produzia uma enzima com capacidade de destruir a habilidade da penicilina em matar células bacterianas (BUSH, 2010). Estudos mais recentes mostram que microrganismos isolados de cavernas datadas com mais de quatro milhões de anos, apresentavam atividade hidrolítica para com os antimicrobianos β -lactâmicos (COSTA, *et al.*, 2011). Em outro trabalho foi mostrado fragmentos genéticos datados com mais de 30.000 anos retirados de pergelissolo (tipo de solo encontrado na região do Ártico) continham derivados de β -lactamases. Isso mostra que essas enzimas ou precursores que estão intimamente relacionados, já se encontravam presentes em fontes naturais onde havia moléculas contendo β -lactâmicos. Isso acabou proporcionando um ambiente protetor para os organismos produtores dessas enzimas (MEDEIROS, 1997; DAVIES, 2013; BUSH, 2013).

A produção de β -lactamases constitui o principal mecanismo associado à resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, como penicilinas, cefamicinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Essas enzimas são diversas em estrutura e na preferência de substrato bioquímicos (DRIEUX *et al.*, 2008; BEBRONE *et al.*, 2010; BUSH; FISHER, 2011; SILVA; LINCOPAN, 2012).

As enzimas β -lactamases se associam de forma não covalente ao anel β -lactâmico do antimicrobiano, e então, o radical hidroxila livre do resíduo de serina, presente no sítio ativo da enzima, cliva o anel β -lactâmico, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e os antimicrobianos que foram alterados e inativados (Figura 1) (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; WIELER *et al.*, 2011).

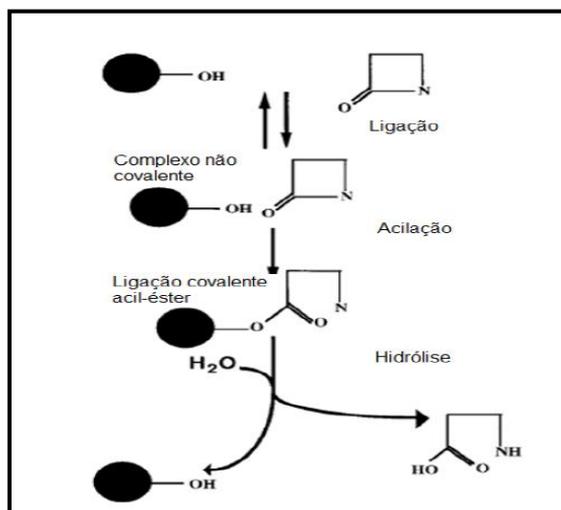


Figura 1: Mecanismo de ação das β -lactamases
Fonte: Adaptado de LIVERMORE, 1995.

Livermore (1995) denominou as β -lactamases como primárias as enzimas codificadas no cromossomo bacteriano, as quais são naturais às espécies, e como secundárias as enzimas que são codificadas por genes provenientes de inserção cromossomal ou adquiridas por plasmídeos. A distribuição das enzimas em plasmídeos ou transposons garante sua transmissibilidade e disseminação.

Alguns fatores interferem na habilidade das β -lactamases conferirem resistência ou não, como: localização, cinética, quantidade e as condições físico-químicas do meio. Em relação à localização, há uma diferença entre as Gram-positivas e Gram-negativas, já que as primeiras se encontram extracelularmente e, dependendo das condições de crescimento, algumas enzimas podem se aderir à membrana

citoplasmática. Nas Gram-negativas, as β -lactamases se encontram em grande quantidade no espaço periplasmático, razão pela qual a produção dessas enzimas é a principal forma de resistência aos antimicrobianos (LIVERMORE, 2008). Em relação à quantidade quanto maior for a concentração maior será a resistência ao antimicrobiano. Fatores como pH, substrato utilizado e concentração de íons podem interferir no perfil de sensibilidade dos microrganismos *in vitro* (DAUR, 2009).

Atualmente, a tecnologia do sequenciamento de nova geração (*high throughput*) vem permitindo aos pesquisadores mostrar a existência de bactérias carregando genes de resistência associadas a pássaros, insetos, peixes, objetos inanimados, dentre outros (DAVIES, 2013). Vários estudos também apontam os animais domésticos como portadores e disseminadores de genes que codificam estas enzimas (CARATOLI, 2008; WIELER *et al.*, 2011).

2.4.1 Classificação das β -lactamases

A classificação das β -lactamases é baseada em alguma característica funcional da enzima ou na sua estrutura primária. A primeira classificação para as β -lactamases foi desenvolvida por Richomond e Sykes (1973), essa classificação tinha como base o perfil hidrolítico, a susceptibilidade à inibição por benzoato de cloro mercúrio e cloxacilina, independente de serem de origem plasmidial ou cromossômica. O perfil hidrolítico era baseado na atividade contra cefaloridina e benzilpenicilina e elas foram agrupadas como cefalosporinase, penicilinase ou de amplo espectro, quando os substratos de referência eram hidrolisados em taxas semelhantes (LIVERMORE, 2008).

Em 1980, Ambler propôs uma classificação baseada na sequência proteica, pela qual as β -lactamases são agrupadas em quatro classes moleculares A, B, C e D, com base nos motivos conservados e distintos dos aminoácidos (BUSH, 2013; BUSH e JACOBY, 2010). Enzimas das classes A, C e D, são aquelas que catalisam a hidrólise do anel β -lactâmico através de um sítio ativo de serina, enquanto as β -lactamases de classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um íon de zinco no seu sítio ativo para facilitar a hidrólise dos β -lactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010).

Bush, Jacoby e Medeiros (1995), propuseram uma classificação baseada nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica das enzimas, separando-as em grupos funcionais. Novos subgrupos têm sido adicionados nesta classificação, em decorrência da identificação e aumento no número de novas famílias

de β -lactamases. Os grupos são alinhados de acordo com a habilidade dessas enzimas em hidrolisar os antimicrobianos β -lactâmicos e na propriedade de inativação dos inibidores de β -lactamases, ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (Quadro 1) (BUSH; JACOBY, 2010).

Quadro 1: Classificação das β -lactamases

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Classe Molecular	Substratos Preferenciais	Inibido por:		Enzimas Representativas
			CLA ou TZB	EDTA	
1	C	Cefalosporinas, cefamicina, penicilina	Não	Não	<i>E. coli</i> AmpC, P99, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	C	Cefamicina, penicilina, cefalosporina de espectro estendido	Não	Não	GC1, CMY-37
2a	A	Penicilinas	Sim	Não	PC1
2b	A	Penicilinas, Cefalosporinas de baixo espectro	Sim	Não	TEM-1, TEM-2, SHV-1, TLE-1 (TEM-90)
2be	A	Penicilina, cefalosporinas de espectro estendido monobactâmicos	Sim	Não	ESBL: CTX-M-15, CTX-M-44 (Toho-1), PER-1, SFO-1, SHV-5, TEM-10, TEM-26, VEB-1
2br	A	Penicilinas, Cefalosporinas de baixo espectro	Não	Não	IRTs: TEM-30, TEM-76, TEM-103, SHV-10, SHV-26
2ber	A	Penicilina, cefalosporinas de baixo espectro monobactâmicos	Não	Não	CMTs: TEM-50, TEM-68, TEM-89
2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	PSE-1, CARB-3
2d	D	Cloxacilina ou oxacilina	Variável	Não	OXA-1, OXA-10
2de	D	Cefalosporinas de espectro-estendido, penicilina	Variável	Não	OXA-11, OXA-15
2df	D	Carbapenêmicos, cloxacilina ou oxacilina	Variável	Não	OXA-23, OXA-48
2e	A	Cefalosporinas	Sim	Não	CepA
2f	A	Carbapenêmicos, cefalosporina, penicilina e cefamicina	Variável	Não	IMI-1, KPC-2, KPC-3, SME-1, GES-2
3a	B	Beta-lactâmicos, exceto monobactâmicos	Não	Sim	IMP-1, L1, NDM-1, VIM-1
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Sim	CphA, Sfh-1

Fonte: Adaptado de BUSH; FISHER (2011)

Legenda: CLA: ácido clavulânico; TZB: tazobactam; EDTA: ácidoetilenodiaminotetrácetico.

O nome dados para essas enzimas é composto geralmente por três ou quatro letras, fazendo referência, na maioria das vezes, à localização geográfica (*Ohio*, Estado

Norte Americano: **OHIO-1**); nome de pacientes (*Temoriana*: **TEM**) e preferência de substrato (*imipenem*: **IMP**) (BUSH; FISHER, 2011). O maior número de β -lactamases se encontra no grupo 2, classe molecular A, composto de 550 enzimas. Desde 2005 as enzimas β -lactamases pertencentes à classe D (grupo 2d) e à classe C (grupo 1), são as que apresentam um maior crescimento. Já o número de variantes de TEM, a segunda família mais prevalente de β -lactamases, tem apresentado um menor crescimento nos últimos cinco anos, isso também é percebido na família IMP das metalo- β -lactamases (MBLs) e SHV, já as enzimas OXA, CTX-M, CMY, VIM e a família KPC dobraram de número desde 2005 (BUSH; FISHER, 2011).

2.5 β -Lactamases de Espectro Estendido – ESBL

O termo β -lactamase de espectro estendido foi proposto em 1987, para definir β -lactamases plasmídeo-mediadas, mediante resistência às cefalosporinas de espectro estendido, em contrapartida ao termo “ β -lactamases de amplo espectro” que não afetavam as cefalosporinas, ex.: TEM-1, TEM-2 e SHV-1. Durante a última década de 80 o termo ESBL ficou restrito às variantes mutadas de β -lactamases de amplo espectro, TEM e SHV, e suas características bioquímicas e moleculares ainda eram limitadas (BUSH; FISHER, 2011; LEE *et al.*, 2011; LIVERMORE, 2008). Desde seu reconhecimento, tanto na Europa como nos Estados Unidos, essas enzimas foram associadas aos principais surtos de infecções (cefalosporinas-resistentes), causados por *E. coli* e *K. pneumoniae* (BUSH, 2010).

Em 1995, com base na sequência molecular e propriedades funcionais (substrato e propriedade de inibição), as ESBLs foram definidas como β -lactamases do grupo funcional 2be e classe molecular de Ambler A, mostrados no quadro 1, que são capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido (ceftazidima e cefotaxima) e monobactâmicos (aztreonam) a uma taxa de 10% a mais do que hidrolisam benzilpenicilinas e são inibidas por inibidores de β -lactamases, como o ácido clavulânico (LIVERMORE, 2008; BUSH; FISHER, 2011; LEE *et al.*, 2011).

O aumento no número de β -lactamases cada vez mais eficiente vem desafiando os profissionais de saúde em vários aspectos. Em relação à nomenclatura e à classificação taxonômica, os esquemas atualmente utilizados exibem um alto nível de complexidade, tendo sido adaptados às necessidades dos pesquisadores, mas sendo pouco acessíveis aos clínicos, profissionais do controle de infecção, políticos e

administradores hospitalares. Pouca informação é dada aos profissionais da área médica sobre como as β -lactamases contribuem para a resistência (GISKE *et al.*, 2008; BUSH; FISHER, 2011).

Novas β -lactamases têm sido descritas somente com base em dados de susceptibilidade e sequência de informação, ignorando influências como permeabilidade e fluxo de mutação, que afeta a sensibilidade de um organismo, podendo produzir β -lactamases relativamente benignas somente com a substituição de um aminoácido que tem pouco efeito na atividade enzimática. Tendo em vista o crescimento cada vez maior no número de enzimas, há necessidade de um consenso quanto à forma de melhor defini-las. Os pesquisadores vêm propondo ampliações nas definições da classificação das ESBL, visto que novas ESBL possuem atividade de hidrólise de substrato mais ampla do que foi previamente definido (LIVERMORE, 2008; BUSH; FISHER, 2011; LEE *et al.*, 2012).

As ESBLs apresentam variável expressão fenotípica: enquanto uma ESBL tem maior capacidade para hidrolisar drogas como a ceftriaxona ou a cefotaxima, outra pode ter maior capacidade de hidrolisar a ceftazidima ou o aztreonam. Portanto, a detecção laboratorial de estirpes produtoras de ESBL é bastante complexa, pois são necessários múltiplos substratos para sua detecção (HARADA *et al.*, 2008).

2.5.1 Epidemiologia das ESBL

A presença de ESBL em vários membros da família *Enterobacteriaceae*, principalmente *K. pneumoniae* e *E. coli*, fazem com que as infecções causadas por esses microrganismos patogênicos sejam dos importantes problemas de saúde pública, registrando-se ampliação de altas taxas de prevalência em diversas partes do mundo (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009; GAZIN *et al.*, 2012). Foi mostrado (*Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial*) que as taxas de produção de ESBL são maiores entre amostras de *K. pneumoniae* provenientes da América Latina (44%), seguidas pela Ásia/Costa do Pacífico (22,4%), Europa (13,3%) e América do Norte (7,5%) (REINERT *et al.*, 2007).

Na América do Norte, a primeira ESBL reportada nos EUA foi a enzima TEM, no final da década de 1980, e os principais tipos encontrados neste país são TEM e SHV e em menor frequência CTX-M. Tanto a prevalência como os tipos de ESBL encontradas nos EUA estão em contraste com a epidemiologia vista no restante do

mundo (DHILLON; CLARK, 2012). Dados do programa SENTRY, mostraram que durante a década de 90 *K. pneumoniae* produtora de ESBLs apresentou altas taxas nos EUA em comparação com o Canadá (7,6% versus 4,9%), entre as amostras de *E. coli* produtoras de ESBL a diferença não foi significativa. Houve uma diminuição nos níveis de prevalência para *K. pneumoniae* e *E. coli* produtoras de ESBL nos EUA durante o período de cinco anos (1999 a 2004), analisados pelo programa MYSTIC (DHILLON; CLARK, 2012).

Na Europa, a disseminação de enterobactérias produtoras de ESBL tem atingido taxas alarmantes. Apesar das grandes diferenças entre os países Europeus, quase todos os países já relataram surtos envolvendo microrganismos produtores de β -lactamases (DHILLON; CLARK, 2012). As primeiras amostras produtoras de β -lactamases foram detectadas na Alemanha e no Reino Unido; entretanto, o primeiro grande surto aconteceu na França (1986), onde 50 pacientes internados em UTI foram afetados, ocorrendo a disseminação para outras enfermarias (BUISSON *et al.*, 1987). Desde então, vários surtos desse tipo foram documentados em diversas partes do mundo. Durante os anos 1980 e 1990, os tipos de ESBL predominantes foram TEM e SHV, quase sempre adquiridos em ambiente hospitalar, muitas vezes associados a surtos em UTI. Com o aumento do número de enzimas CTX-M, houve uma mudança na distribuição dos tipos de ESBL pela Europa, sendo, atualmente, os tipos CTX-M e TEM os mais recuperados (ECDC, 2010).

Na América Latina, a primeira descrição de ESBL foi feita no Chile, sendo reportada a presença do tipo SHV-5 em *K. pneumoniae*. As taxas de ESBL na América do Sul estão entre as mais altas do mundo, sendo CTX-M o tipo dominante. *K. pneumoniae* está entre os principais produtores de ESBL, com taxas de prevalência variando entre 45% a 51%. Altas taxas também são encontradas em *E. coli*, com valores entre 8,5% a 18% (DHILLON; CLARK, 2012; VILLEGAS *et al.*, 2008). Esses índices podem variar entre os diferentes países da América do Sul: amostras de *Klebsiella* isoladas de UTIs no Brasil, Colômbia e Venezuela, têm taxas para ESBL variando de 30% a 60%. Das amostras de *K. pneumoniae* isoladas de ICS, no Brasil, 56,6% foram produtoras de ESBL. Entre as amostras de *E. coli* também isoladas de ICS no Uruguai e Chile, 4,5% e 12%, respectivamente, eram produtoras de ESBL (VILLEGAS *et al.*, 2008). Há muitas razões que poderiam explicar a alta prevalência de ESBL na América Latina como em outros países com poucos recursos econômicos. Situações como superlotação em hospitais, nível socioeconômico baixo, falta de administração de

antimicrobianos ou o seu uso excessivo, poucas práticas de controle de infecção (DHILLON; CLARK, 2012).

No Brasil, as taxas de produção dessas enzimas são bastante preocupantes, sendo os tipos mais frequentemente descritos TEM, SHV, CTX-M, OXA, além de GES, VEB e PER, em menor número (SILVA; LINCOPAM, 2012). A frequência de linhagens de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL em hospitais brasileiros tem sido mais elevada do que é observado em muitos hospitais da Europa e Reino Unido, totalizando cerca de 50% amostras de *K. pneumoniae* recuperadas de UTIs (DROPA *et al.*, 2010). Em um estudo realizado por Droga e colaboradores (2010), foram caracterizados em uma única amostra de *K. pneumoniae* os seguintes genes de ESBL: *bla*_{SHV-40}, *bla*_{TEM-116} e *bla*_{GES-7}. No trabalho de Abreu e colaboradores (2011), foi detectada uma taxa de 19% de positividade para enterobactérias produtoras de ESBL em hospitais da região nordeste do país.

Altas taxas de enterobactérias produtoras de ESBL também são encontradas no Continente Asiático, embora o interesse em relação a essas enzimas seja relativamente recente. Não há relatos completos sobre a incidência de ESBL na última década de 80 e início da de 90 (HAWKEY, 2008). Dados do programa SENTRY de 1998-1999, mostraram que o principal mecanismo de resistência aos β -lactâmicos nesta região era devido à presença de ESBL. Na China, a incidência de *E. coli* produtora de ESBL varia de 13% - 15%; para *K. pneumoniae*, os valores chegam de 20% a 60% em alguns centros. Estudo realizado em Hong Kong mostrou a mesma distribuição de genótipos de CTX-M em infecções humanas e em animais criados para o consumo, mostrando a disseminação cada vez maior de bactérias produtoras de ESBL em criações de animais (LING *et al.*, 2006; CARATTOLI, 2008; WIELER *et al.* 2011). As taxas de transporte fecal de produtores de ESBL também são altas, sustentando esse dado a disseminação de enterobactérias através da água de má qualidade e poucas redes de esgoto. A existência de uma população na China superando 1.3 bilhões de habitantes e na Índia 1.1 bilhões tem feito desses dois países os maiores reservatórios de genes ESBL CTX-M do mundo (HAWKEY, 2008).

Em comparação com o restante do mundo, os países africanos são os que apresentam a menor quantidade de dados sobre a prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL, mas fortes evidências indicam a prevalência de ESBL naquele continente. Países como Egito, Líbano, Arábia Saudita e África do Sul, tiveram pesquisas apontando altas taxas de ESBL (DHILLON; CLARK, 2012).

Os estudos de prevalência vêm mostrando que as taxas de ESBL na Europa são maiores que nos EUA, mas menores do que na América Latina e Ásia. O alto índice de organismos produtores de ESBL no mundo é bastante preocupante. A falta de recursos para um controle de infecção eficaz e acesso limitado aos antimicrobianos tem tido sérias implicações no que diz respeito a reduzir a morbidade e a mortalidade associadas a estas infecções (DHILLON; CLARK, 2012).

2.5.2 Tipos de ESBL

a) Enzimas TEM e SHV

As enzimas TEM e SHV estão entre as ESBL mais bem descritas desde sua descoberta na década de 1970 e início de 1980 e, desde então, foram exaustivamente documentadas. Já foram registradas por volta de 340 variantes de enzimas TEM e SHV. TEM-3 e SHV-12 estão entre as variantes mais identificadas em amostras de enterobactérias (FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2011; BUSH, 2010; POIREL *et al.*, 2012; KAREN; BUSH, 2010; BUSH; FISHER, 2011).

A maioria das variantes de TEM é distinguida somente por uma única substituição entre os aminoácidos, o que é suficiente para garantir uma nova variante (ex: TEM-3 e TEM-4), ou por substituições silenciosas (ex: *bla*_{TEM-1a} e *bla*_{TEM-1b}). As enzimas do tipo TEM são mais comuns em *E. coli* e *K. pneumoniae*, mas também já foram identificadas em outros membros da família *Enterobacteriaceae* (LEE *et al.*, 2011). Em estudo realizado no Brasil, foram apresentadas altas taxas de genes *bla*_{TEM} em enterobactérias isoladas de diferentes espécimes clínicos. Neste estudo, *bla*_{TEM} foi detectado em 75% das amostras avaliadas (ABREU *et al.*, 2011).

A enzima SHV é uma ESBL produzida principalmente por *Klebsiella* spp. e seu nome é devido à sua estrutura química sulfidril variável em seu sítio ativo de serina (THAI; PLEISS, 2010). Sua proteína prematura é formada por 286 aminoácidos. Essas enzimas acumulam mutações que conferem resistência aos β -lactâmicos e uma alta capacidade de disseminação pelo mundo (THAI; PLEISS, 2010).

Os genes que carregam essas enzimas estão localizados em plasmídeos e transposons. Mais de 131 variantes de SHV já foram descritas e sequências de informações de β -lactamases SHV podem ser encontradas no banco de dados de proteínas do *National Center for Biotechnology Information*. Atualmente, há um banco de dados chamado *SHV Engineering Database*, criado com o objetivo de armazenar um

inventário completo de dados sobre as β -lactamases SHV, sendo possível detectar novas SHV com novos perfis de mutação e identificar novas posições dos aminoácidos em que as mutações podem ocorrer (THAI; PLEISS, 2010).

A β -lactamase SHV foi descrita, primeiramente, como uma enzima de pequeno espectro e tendo ação contra a penicilina. Em 1983, foi descrita a primeira SHV de espectro estendido, sendo identificada em amostras clínicas de *K. pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *S. marcescens*. Devido à sua similaridade com SHV-1, essa nova SHV foi denominada SHV-2, tendo como diferença uma única substituição do aminoácido glicina na posição 238, por uma serina (HERITAGE, 1999; THAI; PLEISS, 2010). De forma geral, as espécies produtoras das enzimas SHV e TEM apresentam maior nível de resistência à ceftazidima do que à cefotaxima (BONNET, 2004).

b) CTX-M

As β -lactamases CTX-M são cefotaximases plasmídeo-mediadas, que constituem um grupo de enzimas dentro da família ESBL, grupo este que vem apresentando um rápido crescimento e uma rápida disseminação a partir de 1995, contemplando as ESBL mais prevalentes no mundo (BONNET, 2004; CANTÓ; COQUE, 2006; ZHAO *et al.*, 2013). CTX-M já foi encontrada em pelo menos 26 espécies bacterianas, sendo mais prevalente em *E. coli*, *K. pneumoniae* e *Proteus mirabilis* (ROSSOLINI *et al.*, 2008; POIREL *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2013).

O primeiro tipo da enzima CTX-M isolado foi CTX-M-1, descrita em espécies de enterobactérias isoladas na Europa no final da década de 80. Atualmente, mais de 163 variantes já foram relatadas (<http://www.lahey.org/studies>, atualizado em 20/01/15) (DHILLON; CLARK, 2011; POIREL *et al.*, 2012).

As enzimas CTX-M exibem preferência pelo substrato cefotaxima e ceftriaxona, em comparação com ceftadizima. Sua forte atividade de cefotaximase é devido à geometria única do sítio de ligação ao β -lactâmico, que permite um reconhecimento eficiente para penicilinas, cefalosporinas de menor espectro e cefotaxima (CANTÓ; COQUE, 2006; ROSSOLINI *et al.*, 2008).

Os genes *bla*_{CTX-M} tiveram origem no cromossomo de diferentes espécies de *Kluyvera* spp., que inclui várias espécies ambientais com pouco ou nenhuma atividade patogênica contra seres humanos, as espécies de *K. ascorbata* e *K. georgina*, têm sido reconhecidas como prováveis fontes de genes *bla*_{CTX-M} dos clusters CTX-M-1, CTX-M-

9 e CTX-M-2 (CANTÓ; COQUE, 2006). Para Rossolini e colaboradores (2008), a heterogeneidade de enzimas CTX-M, que se disseminam em ambientes hospitalares entre patógenos bacterianos reflete, provavelmente a ocorrência de múltiplos eventos independentes, relacionados à captura de genes *bla*_{CTX-M} de diferentes fontes dentro do genoma de *Kluyvera*.

A rápida disseminação de enzimas CTX-M é comparável somente com a disseminação da enzima TEM-1 na década de 1970. Esta enzima é endêmica na maioria dos países da Europa, Ásia e América do Sul. Algumas variantes são mais prevalentes em alguns países, como CTX-M-9 e CTX-M-14 na Espanha, CTX-M-1 na Itália e CTX-M-2 na maioria dos países da América do Sul, Japão e Israel. A variante CTX-M-15 é a que apresenta maior relevância clínica, sendo a variante mais identificada em espécies de enterobactérias em todo mundo. Essa enzima tem a capacidade de hidrolisar ceftazidima em um nível maior que as outras variantes (CANTÓ; COQUE, 2006; ROSSOLINI *et al.*, 2008; NASEER; SUNDSFJORD, 2011). Os genes *bla*_{CTX-M-15} são comumente encontrados em plasmídeos móveis que, na maioria das vezes, carregam, também, genes de resistência a outras drogas (ROSSOLINI *et al.*, 2008). CTX-M é a ESBL mais isolada no Brasil, quando comparada às enzimas TEM e SHV, e tem sido isolada frequentemente de amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* (SILVA; LINCOPAN, 2012).

A disseminação de genes *bla*_{CTX-M} é de grande preocupação, sendo esses genes encontrados tanto em patógenos adquiridos em hospitais como na comunidade. A associação desses genes com elementos móveis tais como *ISEcpI* (sequência de inserção) pode explicar a essa facilidade de se espalhar em ambiente hospitalar (TANI *et al.*, 2012). Em algumas áreas geográficas, como a Índia, são identificados em, aproximadamente, 60-80% de amostras de *E. coli* (POIREL *et al.*, 2012). Para Poirel e colaboradores (2012), essa disseminação que vem ocorrendo nos últimos 10 a 15 anos é um dos mais rápidos e importantes fenômenos que se tem observado em termo de resistência aos antimicrobianos.

c) Enzimas GES, VEB e PER

As enzimas tipo GES, PER e VEB são menos frequentes em comparação a TEM, SHV E CTX-M; entretanto, a sua identificação tem sido cada vez mais relatada entre bactérias Gram-negativas, sendo essas enzimas “parentes distantes” das ESBL, TEM, SHV e CTX-M (DALLENE *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2012).

O gene *bla*_{GES-1} (*Guiana Extended Spectrum β -lactamase*), foi identificado pela primeira vez em um *plasmídeo-borne* de *K. pneumoniae*, isolada de um paciente da Guiana Francesa (POIREL *et al.*, 2000). O perfil hidrolítico das enzimas pertencentes a essa família é bastante variável. GES-1 possui atividade contra penicilinas e cefalosporinas, apresentando uma alta atividade hidrolítica contra ceftazidima e cefotaxima. Não hidrolisa cefamicinas e carbapenêmicos mas, ao contrário da maioria das ESBL, não possui atividade de hidrólise contra os monobactâmicos e é inibida por clavulanato, tazobactam e imipenem (POIREL *et al.*, 2000; POIREL *et al.*, 2012). Algumas variantes de GES-1 como GES-2, GES-4, GES-5 e GES-6 hidrolisam carbapenêmicos. β -lactamases tipo GES têm sido relatadas em diversas localizações geográficas. GES-1 foi identificada na Argentina, Brasil, Portugal e Holanda em amostras bacterianas de *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa* e *S. marcescens*. Variantes GES-5 e GES-7 foram identificadas em amostras de *K. pneumoniae* no estado de São Paulo (DROPA, *et al.*, 2010; POIREL *et al.*, 2012). O fato de os genes *bla*_{GES} estarem presentes em integrons pode ter contribuído para a aquisição desses determinantes por bactérias Gram-negativas, gerando preocupação no que diz respeito a característica de algumas variantes de hidrolisar carbapenêmicos e à sua capacidade de disseminação (DROPA *et al.*, 2010; SILVA; LINCOPAN, 2012).

As enzimas tipo PER são β -lactamases pertencentes à classe A e possuem o comportamento cinético muito parecido com as outras ESBL pertencentes a este grupo. A enzima PER (*P. aeruginosa Extended Resistance*) foi identificada pela primeira vez em amostras de *P. aeruginosa* isoladas de um paciente turco (CELENZA *et al.*, 2006). Os genes *bla*_{PER} são mais amplamente distribuídos em amostras de *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *Salmonella enterica* e *Providencia rettgeri*, relatadas em diversas regiões do mundo (POIEREL *et al.*, 2012). As variantes PER-1e PER-2 são as mais descritas em amostras de enterobactérias, como *K. pneumoniae*, *Enterobacter aerogenes* e *E. cloacae*, sendo a variante PER-2 descrita somente em países da América do Sul, como, Argentina, Uruguai e Bolívia (CELENZA *et al.*, 2006)

Os genes *bla*_{VEB-1} são considerados emergentes e sua presença já foi detectada em vários microrganismos de diferentes partes do mundo durante a última década (POIREL *et al.*, 2009). O gene *bla*_{VEB-1} (*Vietnamese Extended Spectrum β -lactamase*) foi identificado em membros da família *Enterobacteriaceae* e alguns bastonetes Gram-negativos não fermentadores. Foi encontrada uma similaridade entre VEB-1 e outras ESBL, de apenas 38% de compartilhamento dos mesmos aminoácidos,

sendo PER a enzima mais próxima. Essa enzima confere altos índices de resistência aos antimicrobianos ceftazidima, cefotaxima e monobactâmicos (POIREL *et al.*, 2012). Os primeiros relatos de *bla*_{VEB-1} na América do Sul foram feitos por Poirel e colaboradores em 2009, em amostras de *A. baumannii*, isoladas de diferentes cidades da Argentina.

2.6 Outros Tipos de β -lactamases

2.6.1 *Klebsiella Pneumoniae* Carbapenemase

As enzimas KPC são carbapenemases pertencentes à classe A de Ambler e ao subgrupo 2f de Bush, Jacoby e Medeiros. As KPC conferem resistência aos carbapenêmicos (imipenem, ertapenem e meropenem), além de inativar penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (MARSIK; NAMBIAR, 2011). Essas enzimas são identificadas predominantemente em *K. pneumoniae*, entretanto, já foram reportadas em outros membros da família *Enterobacteriaceae* e não fermentadores (QUENN; BUSH, 2007; CAI *et al.*, 2008; AMBRETTI *et al.*, 2013).

A enzima KPC foi primeiramente identificada em 1996, na Carolina do Norte, EUA, em uma amostra de *K. pneumoniae*. Houve uma rápida expansão dessa enzima pela costa leste dos EUA e, em seguida, diversos relatos foram ocorrendo em outras regiões do mundo, como Israel, França, Escócia, Colômbia (BUSH, 2010). A prevalência de bactérias produtoras de KPC nos EUA no período de 2000-2005 foi de 15% (CASTANHEIRA *et al.*, 2008).

O primeiro surto de *K. pneumoniae* produtora de KPC fora dos EUA, ocorreu em Israel. Um único clone de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 e vários clones de *K. pneumoniae* produtora de KPC-3 foram responsáveis por vários surtos em hospitais de Tel Aviv (NASS *et al.*, 2008).

Na América do Sul, KPC foi relatada em *K. pneumoniae* em 2006, e subsequentemente em várias espécies de enterobactérias de diversos hospitais da Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2006). Os primeiros relatos de KPC no Brasil ocorreram em São Paulo (2005), Recife (2006) e no Rio de Janeiro (2007) (MONTEIRO *et al.*, 2009; PEIRANO *et al.*, 2008).

Os genes que codificam a enzima KPC estão localizados em plasmídeos e transposons, o que explica o seu alto potencial de disseminação entre patógenos humanos. O transposon que carrega os genes *bla*_{KPC}, é o Tn4401, que está frequentemente associado ao transposon Tn1331, este transposon contém os genes

*bla*_{OXA-4} e *bla*_{TEM-1} (NAAS *et al.*, 2009). O transposon Tn4401 tem a capacidade de se inserir em diversos plasmídeos de bactérias Gram-negativas (CURRIE, 2012). Atualmente, existem 22 variantes descritas (<http://www.lahey.org/studies> atualizado em 20/01/15), sendo KPC-2 e KPC-3 as enzimas predominantes (NAAS *et al.*, 2008).

Existe certa dificuldade para detectar KPC em laboratórios clínicos, pois essas enzimas podem não expressar resistência aos carbapenêmicos *in vitro* pelos testes convencionais. Assim, se os carbapenêmicos forem a opção do tratamento, pode ocorrer falha terapêutica e seleção de bactérias produtoras dessa enzima (NORDMANN; CUZON; NAAS, 2009).

A emergência de resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias é preocupante, devido ao fato de que resistência as carbapenêmicos está, geralmente, associada à resistência a maioria dos antimicrobianos β-lactâmicos e não-β-lactâmicos, originando amostras clínicas multirresistentes e pan-resistentes (RASMUSSEN; HØIBY, 2007; NORDMANN *et al.*, 2012).

2.6.2 Nova Delhi Metallo-β-lactamase

Em 2008, uma nova carbapenemase foi identificada (NDM-1). Essa nova enzima foi isolada de amostras de *E. coli* e *K. pneumoniae* recuperadas de um paciente na Suécia, que havia sido transferido da Índia (HO *et al.*, 2012). Essa nova β-lactamase pertence à classe B (classificação de Ambler) e confere resistência a todos os β-lactâmicos e carbapenêmicos. O gene *bla*_{NDM-1} foi originalmente encontrado em plasmídeos de *K. pneumoniae* (HU *et al.*, 2012).

Em estudo realizado em 2010, NDM-1 foi detectada em 37 amostras do Reino Unido e em 143 amostras de diferentes partes da Índia, Paquistão e Bangladesh, o que vem mostrando ser o subcontinente Indiano um importante reservatório desta enzima (HO *et al.*, 2012). Outros estudos têm mostrado outras espécies da família *Enterobacteriaceae* produzindo NDM-1, essas amostras foram identificadas nos estados Balcãs (Bósnia, Kosovo, Montenegro e Sérvia) (BOGAERTS *et al.*, 2011; SCHRENZEL *et al.*, 2011), Oriente Médio (GANN *et al.*, 2012) e China (HU *et al.*, 2012).

A disseminação global de NDM-1 está, geralmente, associada a viagens internacionais, turismo médico e potencial exposição em países Balcãs e no subcontinente Indiano (BUSHNELL *et al.*, 2013).

O primeiro caso de NDM no Brasil foi relatado em julho de 2013, em uma amostra de *P. rettgeri*, isolada em Porto Alegre (CARVALHO-ASSEF *et al.*, 2013). Em outro estudo realizado em 17 hospitais do Rio Grande do Sul, foram avaliadas amostras de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos, entre abril e outubro de 2013. A presença de *bla*_{NDM} foi detectada em amostras de *E. cloacae* complex e amostras de *M. morgani*. É importante ressaltar que algumas amostras de *E. cloacae* complex foram isoladas do mesmo hospital onde foi detectado o primeiro caso de NDM no Brasil (ROZALES *et al.*, 2014). Em um estudo realizado no Rio de Janeiro entre setembro e outubro de 2013 foi detectada pela primeira vez no Brasil em uma amostra de *E. cloacae*, a presença de *bla*_{NDM} e *bla*_{KPC-2}, simultaneamente (QUILES *et al.*, 2014).

Para alguns autores, o que mais se destaca nesta enzima é a frequente associação de *bla*_{NDM-1} com outros genes de resistência. Eles acreditam que a rápida disseminação mundial de enzimas NDM-1, resulta em uma consequência dramática para o tratamento dos pacientes e exige um grande monitoramento por parte do controle de infecção (BOGAERTS *et al.*, 2011; QUILES *et al.*, 2014). Bushnell e colaboradores (2013) enfatizam a importância de métodos laboratoriais de detecção confiáveis e sistemas de vigilância bem integrados.

2.6.3 AmpC

Enterobactérias que produzem β -lactamases do tipo AmpC cromossomais, tais como *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *S. marcescens*, *M. morgani*, *Providencia stuartii* e *E. coli* (essa última produtora de baixos níveis basais) podem tornar-se resistente às cefamicinas (cefexitina e cefotaten), oximinocefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e aos monobactâmicos (aztreonam) (PHILIPPON *et al.*, 2002; COUDRON, 2005; PITOUT, 2010).

As AmpCs podem ser divididas em dois grupos: cromossomais (que na maioria das vezes são induzíveis) e plasmidiais. As de origem cromossomal são reguladas por genes acessórios e reguladores. O operon cromossômico possui os genes *ampC*, *ampD*, *ampG* e *ampR*. A desregulação destes genes pode levar à superexpressão de *ampC* em bactérias Gram-negativas (PHILIPPON *et al.*, 2002).

O poder de indução para essa enzima é variável: cefalosporinas de primeira geração, ampicilina e carbapenêmicos são fortes indutores, enquanto as cefalosporinas de segunda e terceira geração são fracos indutores. A indução da produção de AmpC

ocorre devido à exposição da bactéria a um antimicrobiano indutor, cuja remoção resultará no retorno da produção de AmpC ao nível basal (CODRON, 2005; PATERSON, 2006; JACOBY, 2009; PITOUT, 2010).

A indução é um fenômeno genético e resulta da desrepressão (liberação) de genes responsáveis por uma determinada característica da célula que estava reprimida por outro gene, produtor de uma substância repressora. A cefoxitina e os carbapenêmicos (imipenem e meropenem) constituem os maiores indutores de resistência entre os antibióticos, desreprimindo a produção de β -lactamases em alguns microrganismos. As amostras que apresentam altos níveis de expressão de AmpC são de difícil detecção laboratorial, podendo impedir o reconhecimento da produção de ESBL, especialmente em *Enterobacter*, *Serratia*, *Providencia* entre outras (THOMSON, 2001). Nestes microrganismos, o clavulanato pode atuar como indutor de altos níveis de AmpC e aumentar a resistência desta bactéria para outras drogas, produzindo um resultado falso-negativo nos testes de detecção para ESBL (THOMSON, 2001; LIVERMORE; BROWN, 2001).

Genes que codificam enzimas β -lactamases AmpC plasmídeo-mediada são conhecidos desde 1989 (PHILIPPON *et al.*, 2002). Essas enzimas têm sido encontradas em todo o mundo, tanto em amostras nosocomiais como comunitárias (JACOBY, 2009). Estudos sugerem que as AmpC plasmidiais surgiram a partir de diversas AmpC cromossômicas, integradas em elementos genéticos de transferência por meio de sequências de inserção, facilitando a sua dispersão em diferentes microrganismos (ODEH *et al.*, 2002; JACOBY, 2009). Pequenas diferenças na sequência de aminoácidos distinguem as famílias destas enzimas. As principais famílias são: CMY, MIR, MOX, LAT, FOX, DHA, ACT, ACC, CFE, e a enzima CMY-2 é a mais relatada (JACOBY, 2009; MARSIK; NAMBIAR, 2011).

Como as β -lactamases AmpC cromossomais, as plasmidiais conferem resistência aos diversos β -lactâmicos (JACOBY, 2009). Espécies produtoras de β -lactamases AmpC plasmidiais são distinguidas das espécies produtoras de AmpC cromossomais pelo fato de, salvo algumas exceções, elas não serem induzíveis (MEZZATESTA *et al.*, 2012).

A dificuldade de detecção fenotípica em bactérias produtoras de AmpC limita a estimativa da prevalência dessas enzimas, implicando no controle da sua disseminação. A investigação molecular de AmpC é uma ferramenta importante para se

conhecer a diversidade dos mecanismos de resistência exibidos por bactérias de importância clínica (DÓI; PATERSON, 2007).

2.7 Contexto Genético para Aquisição e Disseminação de Determinantes de Resistência aos β -lactâmicos e Carbapenêmicos

Genes de resistência podem ser amplamente disseminados através de mecanismos de transferência horizontal de genes (THG), tais como: conjugação, transformação e transdução. Estes mecanismos permitem a mobilização de fragmentos específicos de DNA (elementos genéticos móveis) de uma região para outra, entre plasmídeos, entre cromossomos e de plasmídeos para cromossomos (MARTINEZ; BAQUERO, 2009). A THG tem tido um papel importante na evolução e transmissão de resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos, principalmente entre as bactérias entéricas, tanto em infecções na comunidade como hospitalares (DAVIES; DAVIES, 2010).

Elementos genéticos móveis se dividem em dois grupos: elementos que podem se mover a partir de uma célula bacteriana para outra, grupo que inclui plasmídeos conjugativos e transposons, e elementos que se movem de um local genético para outro na mesma célula, estes incluem os transposons, cassetes de genes e elementos de inserção (BENNETT, 2008).

Vários genes de resistência aos antimicrobianos que são observados em microrganismos Gram-negativos são parte de um gene cassete inserido em um integron. Mais de 60 cassetes diferentes já foram identificados (FALLAH *et al* 2012). Os cassetes mais comumente encontrados conferem resistência a uma variedade de agentes antimicrobianos, tais como aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol e trimetopim, e alguns conferem resistência aos antissépticos e desinfetantes (CHONG *et al.*, 2011).

Várias classes de integrons responsáveis pela resistência aos antimicrobianos foram identificadas e são distinguidas pela sequência de nucleotídeos das suas respectivas integrases. Quatro classes distintas de integrons que codificam várias integrases têm sido relatadas, sendo os integrons de classe 1 e classe 2 os mais frequentemente encontrados em espécies bacterianas de relevância clínica (FALLAH *et al* 2012).

Como elementos genéticos móveis mais importantes, os plasmídeos são moléculas de DNA extracromossômicas que se replicam independentemente, tendo como principal função a transmissão horizontal de genes entre as bactérias (BENNET, 2008). Plasmídeos que conferem resistência aos antimicrobianos foram descritos em 1960 por Watanabe e Fukasawa. Atualmente, crescentes relatos vêm associando a disseminação de genes de resistência a esses elementos, em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A aquisição de elementos genéticos móveis que codificam múltiplas β -lactamases e permitem uma rápida disseminação global vem colocando cada vez mais em risco o futuro dos antibióticos β -lactâmicos.

2.8 Detecção fenotípica de β -lactamases

O *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e o *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) são os dois comitês mais aceitos e empregados, mundialmente, nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos e testes fenotípicos para detecção de ESBL e carbapenemases. No Brasil, os pontos de corte utilizados nos testes de suscetibilidade a antimicrobianos são seguidos conforme as normas de CLSI. Entretanto, desde 2010 a ANVISA publica notas técnicas com o objetivo de implementar dados referentes a padrões de susceptibilidade de alguns antimicrobianos. Em 2013 foi publicada a Nota Técnica nº 1/2013, em substituição à de 2010, que dispõe de Medidas de Prevenção e Controle de Infecções por Enterobactérias Multirresistentes, com foco na resistência aos carbapenêmicos (ANVISA, 2013).

A metodologia utilizada para detecção de ESBL nas espécies de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli* e *P. mirabilis* é padronizada e validada pelo CLSI. O teste de *screening* é composto pela diminuição da susceptibilidade à cefalosporinas de terceira geração ou aztreonam, e o teste confirmatório avalia a presença do efeito inibitório do ácido clavulânico contra ceftazidima ou cefotaxima. Estes testes podem apresentar baixa sensibilidade quando os microrganismos produtores de ESBL são também produtores de outras β -lactamases que não inibidas pelo ácido clavulânico, como as β -lactamases AmpC ou metalo- β -lactamases (DÓI e PATERSON, 2007).

Existem diversos métodos fenotípicos para a detecção das principais classes de β -lactamases; a grande maioria deles utiliza bloqueadores enzimáticos para auxiliar na detecção destas enzimas, tais como: ácido clavulânico para ESBL (CLSI, 2014); ácido fenilborônico para KPC e AmpC (COUDRON, 2005; PITOUT *et al.*, 2009;

POURANAS *et al.*, 2010); EDTA - ácidos etilenodiaminotetracético, para metalo- β -lactamases (FIGUEIREDO *et al.*, 2011), entre outros. Porém, nenhum destes testes é 100% sensível ou específico na detecção destas enzimas, fazendo-se necessária a utilização de metodologias moleculares para auxiliar nesta identificação (LIN *et al.*, 2010).

2.9 Métodos Automatizados

Sistemas automatizados que incluem teste para detecção de ESBL como o VITEK[®] 2 (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France) utilizam painéis específicos que são desenhados para confirmar a presença de ESBL e são interpretados através de sistemas *experts*. O sistema VITEK 2 utiliza um cartão contendo ceftazidima e cefotaxima com ou sem o ácido clavulânico (HARADA *et al.*, 2008). Muitos estudos têm avaliado o desempenho dos sistemas automatizados para detecção de ESBL. Spanu e colaboradores (2006), avaliaram o mesmo sistema VITEK 2, em um total de 312 amostras de enterobactérias produtoras de ESBL. Destas, 306 foram confirmadas pelo sistema, mostrando uma sensibilidade de 98,1% e valor preditivo positivo de 99,3%. Resultados falso-negativos foram encontrados em apenas seis amostras. Para Wiegand e colaboradores (2007), o desempenho dos sistemas automatizados é variável, podendo apresentar uma baixa acurácia, quando comparado com os métodos fenotípicos convencionais.

2.10 Métodos Genotípicos e Tipagem Molecular das β -lactamases

Os métodos genotípicos são aqueles que envolvem o estudo do DNA microbiano, o cromossomo, plasmídeos e a presença de outros elementos genéticos. Também se analisa a homologia e a presença ou ausência de genes específicos (RAO, 2006). As técnicas moleculares são mais uma das ferramentas utilizadas para auxiliar na detecção das enzimas β -lactamases, possibilitando a identificação específica dessas enzimas ou a identificação dos genes responsáveis pela produção dessas enzimas (PITOUT *et al.*, 2008).

Os testes genotípicos para detecção da maioria das β -lactamases são realizados primariamente pela amplificação de genes específicos através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction-PCR*) (PITOUT; LAUPLAND,

2008; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). Esta reação consiste em multiplicar uma quantidade mínima de fragmentos de DNA a ser estudado (WALSH *et al.*, 2010). Técnicas adicionais, como o sequenciamento ou *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP), são necessárias para identificação de pontos de mutação que diferenciam alguns tipos de enzimas, como TEM e SHV (BIRKETT *et al.*, 2007; PITOUT; LAUPLAND, 2008).

Vários estudos desenvolveram metodologias de PCR multiplex para detectar vários genes de β -lactamases, como ESBL, carbapenemases e AmpC plasmidiais (ELLINGTON *et al.*, 2007; BIRKETT *et al.*, 2007; DALLENNE *et al.*, 2010; ONNBERG *et al.*, 2011; DENISUIK *et al.*, 2013).

Como já mencionado, as infecções bacterianas hospitalares são importante causa de morbidade e letalidade, tanto em países desenvolvidos como em países em desenvolvimento, e a disseminação de amostras produtoras de β -lactamases pode ser efetivamente controlada através de medidas adequadas (CHONG *et al.*, 2011). Para que isso ocorra, entretanto, é essencial discriminar linhagens bacterianas de uma mesma espécie. Uma das primeiras etapas na investigação de um possível surto hospitalar é detectar a linhagem que está originando os casos de infecção. Para tanto, deve-se proceder à tipificação epidemiológica da mesma (STUMPF *et al.*, 2005).

Membros de uma espécie com pequenas diferenças entre eles podem ser distinguidos através de métodos de tipagem. Por estes métodos, essas espécies podem ser subdivididas em subespécies, subgrupos, biótipos, sorotipos, variantes, etc. A tipagem de microrganismos é baseada nas suas características fenotípicas e genotípicas (MEZZATESTA *et al.*, 2012; WILSON; SHARP, 2006).

Os métodos de tipagem são de extrema importância para o controle de infecção hospitalar, para estudos epidemiológicos e até mesmo para o estudo da patogênese de uma infecção. Em ambientes hospitalares, esses métodos podem ser usados para determinar se um conjunto de amostras obtidas a partir de um paciente representa uma única linhagem infectante ou múltiplos contaminantes; determinar se uma série de isolados obtidos ao longo do tempo representa uma recaída de uma infecção devida à única linhagem ou episódios separados da doença, causados por diferentes estirpes (PITOUT, 2008).

Diferentes técnicas são utilizadas para analisar a clonalidade das amostras bacterianas. *Pulsed-field Gel Electrophoresis* (PFGE) é uma técnica de eletroforese utilizada para separar grandes fragmentos de DNA, por meio da reorientação do DNA

em gel pela ação de campos elétricos alternados. Esta técnica é reconhecida como padrão ouro para identificação de linhagens bacterianas. PFGE é uma técnica altamente discriminatória; porém, é de elevado custo e execução mais demorada (STUMPF *et al.*, 2005).

A descoberta de que genomas procariotos contêm sequências repetitivas como a ERIC (*Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus*), tem expandido o uso da biologia molecular, útil para avaliar a variabilidade genética de várias amostras bacterianas. Sequências ERIC foram descritas pela primeira vez em *E. coli*, *Salmonella typhimurium* (agora *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium) e outros membros da família *Enterobacteriaceae* (WILSON; SHARP, 2006). ERIC-PCR são sequências de palíndromo imperfeitas de 127 pb que ocorrem em múltiplas cópias no genoma das bactérias entéricas e víbrios (WILSON; SHARP, 2006). Estes números de cópias diferem em diferentes bactérias: em *E. coli* K-12 foram descritas 30 cópias; em *S. enterica* sorotipo *typhimurium* foram relatadas 150 (RAMAZANZADEH, *et al.*, 2013). ERIC-PCR possui uma boa capacidade discriminatória e pode complementar o RAPD-PCR ou RFLP, os quais são requeridos para se demonstrar pequenos níveis de variabilidade genética (WILSON; SHARP, 2006). Para Cartelle e colaboradores (2004), o ERIC-PCR parece ser o melhor método baseado em PCR para tipagem de amostras de *K. pneumoniae*.

Ramazanzadeh e colaboradores (2013) utilizaram a técnica do ERIC-PCR para caracterizar a diversidade genética de 230 amostras de *E. coli*, que foram isoladas de diferentes espécimes clínicos de pacientes internados em um Hospital Universitário do Iran. Dessas amostras, 81% apresentaram um único perfil e 18,7% apresentaram padrões comuns, o que é indicativo da mesma origem de disseminação. A transmissão clonal de *Acinetobacter baumannii* também tem sido evidenciada por padrões de ERIC-PCR, em amostras multirresistentes (CHEN *et al.*, 2011). Em outro estudo, *E. coli* e *K. pneumoniae* presentes em um surto nosocomial foram analisadas por ERIC-PCR (EDELSTEIN *et al.*, 2003).

ERIC-PCR apresenta as vantagens de ser um método barato, de fácil execução e fornecer resultados mais rápidos. Testes de clonalidade são importantes para estudos filogenéticos e atualmente representam um grande avanço para as análises epidemiológicas, principalmente em estudos de grandes surtos (STUMPF *et al.*, 2005; MEZZATESTA *et al.*, 2012).

Desta forma, este trabalho pretende contribuir com a geração de conhecimento científico acerca da distribuição dos genes de resistência e da diversidade genética em enterobactérias, utilizando metodologias fenotípicas e genotípicas.

3.OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Caracterizar a presença de β -lactamases por meio de métodos fenotípicos e genotípicos e avaliar a diversidade genética de enterobactérias recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em diversos hospitais de Belo Horizonte, MG.

3.2 Objetivos Específicos

- Confirmar por métodos automatizados específicos a identificação e o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos microrganismos recuperados;
- Determinar a presença de enzimas ESBL, Carbapenemases e AmpC, nas linhagens bacterianas de *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Enterobacter* spp., utilizando métodos fenotípicos;
- Pesquisar a presença de genes codificadores de ESBL dos tipos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES} nas amostras selecionadas;
- Investigar a presença de genes codificadores de Carbapenemases dos tipos *bla*_{KPC} e *bla*_{NDM} nas amostras selecionadas;
- Avaliar a presença β -lactamases AmpC plasmidiais dos tipos *bla*_{CMY}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA} nas amostras selecionadas;
- Estudar a diversidade genética das amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Enterobacter* spp. incluídas no estudo.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1 Amostras Bacterianas

Foram avaliadas 88 amostras de enterobactérias, sendo 51 de *K. pneumoniae*, 27 de *Enterobacter* spp. 10 de *E. coli*, pertencentes à coleção bacteriana do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios. Estas amostras foram recuperadas de hemoculturas de pacientes atendidos em diferentes hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais, nos períodos de junho de 2008 a junho de 2009 e, abril de 2013 a abril de 2014.

4.2 Armazenamento das Amostras

Para cada amostra foi preparada uma suspensão densa obtida de cultura em ágar *Brain Heart Infusion* BHI-DIFCO (OXOID[®], Basingstoke, ENGLAND), com crescimento de 16-24 horas, que foi colocada em 1ml de solução de ágar *Brucella* com glicerol a 10%, em tubo de rosca próprios para criopreservação. Em seguida, todas as amostras foram armazenadas em freezer, a uma temperatura de aproximadamente, -80°C, no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB/UFMG.

4.3 Critérios de Inclusão

Foram incluídos neste estudo amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli*, e *Enterobacter* spp. recuperadas de hemocultura e que apresentaram os seguintes fenótipos de resistência:

- Resistência a uma ou mais cefalosporina de 3^a geração e/ou,
- Resistência a um ou mais dos carbapenêmicos: ertapenem, meropenem e imipenem.

4.4 Critérios de Exclusão

Foram excluídos deste estudo todos os microrganismos disponíveis isolados de hemocultura que não apresentaram resistência a alguma cefalosporinas de 3^a geração, e/ou resistência a algum carbapenêmico.

4.5 Instituições Participantes

Os hospitais dos quais as amostras foram obtidas apresentam características de atendimento geral de urgência e ambulatorial, a saber:

- Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais: é um hospital universitário, público e geral que realiza atividades de ensino, pesquisa e assistência, sendo referência nos sistemas municipal e estadual de Saúde no atendimento aos pacientes portadores de doenças de média e alta complexidade.
- Hospital de Pronto Socorro João XXIII: atua como centro de referência e excelência no atendimento a pacientes vítimas de politraumatismos, grandes queimaduras, intoxicações e situações clínicas e/ou cirúrgicas de risco de morte. É mantido pela Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais - FHEMIG
- Hospital Municipal Odilon Behrens: é um hospital público, geral, de ensino e de pesquisa que presta atendimentos de urgência/emergência clínica e traumatológica.
- Hospital SEMPER AS: é um hospital privado de atendimento geral em várias áreas da clínica médica, medicina intensiva, maternidade, pediatria, ginecologia e cirurgia geral.
- Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte: é uma organização filantrópica, sem fins lucrativos, que tem várias especialidades médicas no nível ambulatorial ou internação, pequenas e grandes cirurgias, pediatria e medicina intensiva.

4.6 Aspectos Éticos da Pesquisa

O projeto foi submetido e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa dos Hospitais participantes e do COEP/UFMG (ETIC 614/08) e COEP/UFMG (Parecer Consubstanciado nº 898.517). Os pacientes não foram identificados, nem foram utilizados dados clínicos referentes aos mesmos. A única informação registrada foi relativa ao setor de internação dos pacientes dos quais as amostras foram obtidas.

4.7 Identificação e Perfil de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

Para fins de padronização e considerando as peculiaridades técnicas dos laboratórios de microbiologia de cada Instituição envolvida no estudo, todas as amostras foram novamente submetidas à identificação e aos testes de susceptibilidade às drogas, no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, ICB/UFMG.

A identificação e o perfil de susceptibilidade a drogas foram realizados pelo sistema automatizado VITEK[®] 2 Compact (bioMerieux, Marcy l'Etoile, FRANCE). Esse sistema de automação utiliza cartões com reagentes a partir dos quais é

determinado o perfil fenotípico da bactéria, por meio de reações colorimétricas e de turbidimetria.

Para a identificação foram utilizados os cartões GN (identificação de Gram-Negativos) e para o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos foram utilizados os cartões AST-105 e AST-239 (antibiograma para Gram-Negativos hospitalares). Todos os cartões foram inoculados e incubados no sistema de acordo com as instruções do fabricante. Todos os resultados foram interpretados usando o *Advanced Expert System* (AES) (software version VT2-R04.03). As linhagens utilizadas como controle de qualidade foram *E. coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (ATCC 700603). Os antimicrobianos contidos no cartão AST-105 e AST-239 compreendem aqueles propostos pelo CLSI para infecções sanguíneas cuja etiologia é de enterobactérias (APÊNDICE V).

4.8 Detecção Fenotípica de β -lactamases

Todas as amostras que tiveram fenótipo de resistência a alguma cefalosporina de 3ª geração e/ou algum carbapenêmico, confirmadas após análise pelo sistema automatizado VITEK[®] 2 Compact (bioMérieux), seguindo os critérios de seleção propostos pelo CLSI (2014), documento M100-S23, foram selecionadas para os experimentos a seguir.

4.8.1 Pesquisa de ESBL - TSDD (Teste do Sinergismo do Duplo Disco)

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana a partir do meio de cultura BHI foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala de *McFarland*, e esta foi inoculada em uma placa de 15 cm de diâmetro contendo ágar Muller-Hinton (Becton Dickinson[®], Estados Unidos). Em seguida, colocou-se um disco de amoxicilina/ácido clavulânico no centro da placa e ao redor deste foram distribuídos os antimicrobianos marcadores (aztreonam, cefotaxima, ceftazidima e ceftriaxona) na distância de 20 mm de centro a centro, em relação ao disco central. As placas foram incubadas a 35°C, em atmosfera por 18-24 horas (DRIEX *et al.*, 2008). Todos os discos foram obtidos da Laborclin (São Paulo, Brasil).

b) Interpretação

A formação de uma zona fantasma (“Ghost Zone”) entre qualquer antimicrobiano marcador e o disco contendo ácido clavulânico foi considerada indicativa da presença de ESBL.

4.8.2 Pesquisa de ESBL -Etest[®]

a) Preparo do inóculo

Uma suspensão bacteriana foi preparada em solução salina até atingir a turvação correspondente ao ponto 0.5 da escala *McFarland* e inoculada em uma placa de 15 cm contendo ágar Muller-Hinton (Becton Dickinson[®] Estados Unidos). Em seguida, as fitas de Etest[®] ESBL (AB BioMérieux) contendo cefotaxima (CT) em uma das extremidades, em um gradiente que varia de 0,5 a 32µg/mL, e cefotaxima associada ao ácido clavulânico (CTL) na outra extremidade, num gradiente que varia de 0.016 a 1µg/mL, foram depositadas na superfície do meio e o material foi incubado a 35°C em ar ambiente por 24 horas.

b) Interpretação

A amostra foi considerada produtora de ESBL quando a relação da CIM (µg/mL) entre CT/CTL foi maior ou igual a oito, e quando houve uma diminuição de $\geq 3 \log_2$ diluições no MIC na presença do ácido clavulânico. O aparecimento de deformação do halo (zona fantasma) também foi considerado como indicativo da produção de ESBL. Para fins de controle de qualidade foi utilizada a cepa de *E. coli* ATCC 25922 (controle negativo).

4.8.3 Pesquisa de AmpC cromossomal induzível – Disco de Aproximação

a) Preparo do Inóculo

Este teste foi realizado em conjunto com pesquisa de ESBL através do TSDD; portanto, seguiu a mesma metodologia para o preparo do inóculo e incubação. Após a colocação dos discos para pesquisa de ESBL, foi acrescentado o disco de cefoxitina a uma distância de 25 mm do disco de ceftriaxona. Essa técnica se baseia no sinergismo entre a cefoxitina (indutora da enzima AmpC) e o β -lactâmico (ceftriaxona).

b) Interpretação

A amostra foi reconhecida como produtora de AmpC cromossomal induzível, quando ocorreu o achatamento no halo do β -lactâmico (ceftriaxona) (LIVERMORE; BROWN, 2001).

4.8.4 Pesquisa de AmpC plasmidial – Discos combinados

A pesquisa fenotípica de β -lactamase tipo AmpC plasmidial foi realizada empregando-se a técnica descrita por Coudron (2005) e Pitout e colaboradores (2009).

a) Preparo do Inóculo

Inicialmente, 120 mg de ácido fenilborônico (AFB) (Sigma Aldrich, EUA) foram dissolvidos em 3 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), e 3 ml de água estéril foram adicionados a essa solução. Após homogeneização, 20 μ l desta solução foram adicionados a discos de cefoxitina (30 μ g) (Oxoid, EUA). Estes discos foram deixados em repouso para secagem, por 30 minutos. Após esse tempo, os discos de cefoxitina e de cefoxitina/ácido fenilborônico foram colocados em uma placa de 15 cm contendo ágar Muller-Hinton (Becton Dickinson[®], Estados Unidos), previamente inoculadas, de acordo com o método padronizado para disco-difusão (CLSI, 2013). Após incubação de 24 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ em ar ambiente, os halos de inibição do crescimento bacteriano ao redor do disco de cefoxitina com e sem AFB foram medidos.

b) Interpretação

Um aumento de ≥ 5 mm no halo do disco de cefoxitina/ácido fenilborônico em relação ao halo do disco sem o acréscimo do ácido fenilborônico foi considerado como resultado positivo para a produção de AmpC plasmidial. Para fins de controle de qualidade foram utilizadas a cepa de *E. coli* ATCC 25922 (controle negativo) e as enzimas CMY-2, FOX e DHA (controles positivos, gentilmente cedidos pela Profa. Ana Cristina Galles).

4.8.5 Pesquisa de Carbapenemase - Teste de Hodge Modificado, documento M100-S23 (CLSI 2014)

a) Preparo do Inóculo

Foi preparada uma suspensão bacteriana com a linhagem de *E. coli* ATCC 25922 em solução salina, com padrão de turvação correspondente a 0,5 na escala de *McFarland*, que foi diluída (1:10). Semeou-se essa suspensão em ágar Muller-Hinton (Becton Dickinson[®], Estados Unidos) e, em seguida, foi colocado no centro da placa um disco de meropenem (10µg). A amostra a ser testada foi estriada em linha reta, a partir da borda do disco. Da mesma maneira, foi realizada a estria da linhagem de *K. pneumoniae* produtora de KPC-2 (controle positivo, gentilmente cedida pela Profa. Mara Corrêa Lelles Nogueira) e da *E. coli* ATCC 25922 (controle negativo). A placa foi incubada à temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ ar ambiente, por 16 a 20 horas.

b) Interpretação

Quando ocorreu crescimento da linhagem de *E. coli* ATCC 25922 dentro da zona de inibição do meropenem, demonstrando uma invasão para dentro do halo (envergadura) a amostra teste foi considerada produtora de carbapenemase. Nos testes considerados negativos, não houve distorção no halo de inibição.

4.9 Detecção Genotípica de β -Lactamases - Reação em Cadeia da Polimerase

Nesta etapa foram realizados ensaios para pesquisa dos seguintes genes: *bla*_{FOX}, *bla*_{CMY}, *bla*_{DHA}, *bla*_{AmpC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, *bla*_{KPC}, *bla*_{NDM}. A reação ocorreu em um termociclador que, através de sucessivas mudanças de temperatura, direciona as três etapas da reação: desnaturação, anelamento e extensão.

a) Extração do DNA bacteriano

Uma alíquota do crescimento bacteriano foi homogeneizada em 1 mL de água miliQ estéril, até atingir a turvação correspondente ao valor de 3,0 da escala *McFarland*. Em seguida, esta suspensão foi incubada por 10 minutos, a 95°C , para extração do DNA, e centrifugada sob refrigeração a 4°C , por 30 segundos a 9000 rpm (GALES *et al.*, 2003, HAMMAMI *et al.*, 2011). Após a centrifugação, o sobrenadante que é a parte que tem o DNA foi quantificado em um Nanodrop[®] (*Technologies* INC, Wilmiington, DE, EUA).

b) Preparo do Master-Mix

Foi utilizado nesta etapa o kit Master Mix (PROMEGA[®], Madison, USA) contendo: 500units/mL de Taq DNA polimerase, 400 μ M de dATP, dGTP, dCTP, dTTP e 3mM de MgCl₂. Cada reação foi realizada em um volume final de 25 μ L sendo 12,5 μ l de Master Mix + 1,5 μ L de *primers* + 100 ng de DNA bacteriano + água livre de nuclease para completar o volume de 25 μ L.

c) Condições de amplificação do DNA (tabela 1)

Tabela 1: Oligonucleotídeos, amplicons e condições de reação de PCR utilizada na pesquisa de determinantes genéticos de resistência aos antimicrobianos

Gene	Fenótipo de resistência	Sequência dos oligonucleotídeos (5'-3')	Condições de amplificação	Amplicon	Referência
<i>bla</i> _{CTX-M}	β-lactâmicos	ATGTGCAGYACCAGTAAAG GGTCACCAGAAGGAGC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 56°C, 1min; 72°C, 1min; 94°C, 1mim, 45°C, 1min. Extensão final: 75°C, 5 mim	562 bp	JONES <i>et al.</i> , (2009)
<i>bla</i> _{SHV}	β-lactâmicos	CTTTACTCGCCTTTATCGGC TTACCGACCGGCATCTTTCC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 56°C, 1min; 72°C, 1min; 94°C, 1mim, 45°C, 1min. Extensão final: 75°C, 5 mim	982 bp	JONES <i>et al.</i> , (2009)
<i>bla</i> _{TEM}	β-lactâmicos	GTGCGCGGAACCCCTATT TTACCAATGCTTAATCAGTGAGGC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 56°C, 1min; 72°C, 1min; 94°C, 1mim, 45°C, 1min. Extensão final: 75°C, 5 mim	968 bp	JONES <i>et al.</i> , (2009)
<i>bla</i> _{GES}	β-lactâmicos	AGTCGGCTAGACCGGAAAG TTTGTCCGTGCTCAGGAT	Desnaturação inicial 94°C, 10min, 30x: 94°C, 40s; 40°C, 60s; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 7 mim	399 bp	DALLENNE <i>et al.</i> , (2010)
<i>bla</i> _{AmpC}	β-lactâmicos Cefalosporinas	ATAACCACCCAGTCACGC CAGTAGCGGACTGCGCA	Desnaturação inicial 94°C, 1 min, 35x: 94°C, 30s; 55°C, 30s; 72°C, 30s, Extensão final: 72°C, 4 mim	630 bp	ODEH <i>et al.</i> , (2002)
<i>bla</i> _{CMY}	β-lactâmicos Cefalosporinas	CGAAGAGGCAATGACCAGAC ACGGACAGGGTTAGGATAGY	Desnaturação inicial 94°C, 10min, 30x: 94°C, 40s; 40°C, 60s; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 7 mim	538 bp	DALLENNE <i>et al.</i> , (2010)
<i>bla</i> _{FOX}	β-lactâmicos Cefalosporinas	CTACAGTGCGGGTGGTTT CTATTTGCGGCCAGGTGA	Desnaturação inicial 94°C, 10min, 30x: 94°C, 40s; 40°C, 60s; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 7 mim	162 bp	DALLENNE <i>et al.</i> , (2010)
<i>bla</i> _{DHA}	β-lactâmicos Cefalosporinas	TGATGGCACAGCAGGATATTC GCTTTGACTCTTTCGGTATTCG	Desnaturação inicial 94°C, 10min, 30x: 94°C, 40s; 40°C, 60s; 72°C, 1min, Extensão final: 72°C, 7 mim	997 bp	DALLENNE <i>et al.</i> , (2010)
<i>bla</i> _{NDM}	Carbapenêmicos	GCAATGTCACTGAATACTCGT GCGATCCTTCCAACTCGT	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 60°C, 1min; 60°C, 1min; 72°C, 1mim, . Extensão final: 72°C, 10 mim	500bp	PL Ho <i>et al.</i> , 2012
<i>bla</i> _{KPC-1 a 3}	Carbapenêmicos	ATGTCACTGTATCGCCGTCT TTTTAGAGCCTTACTGCC	Desnaturação inicial 94°C, 5 min, 30x: 60°C, 1min; 60°C, 1min; 72°C, 1mim, . Extensão final: 72°C, 10 mim	892 bp	JONES <i>et al.</i> , (2009)

4.10 Tipagem Molecular por ERIC-PCR

Para a análise da similaridade clonal entre as amostras incluídas no estudo, foi empregada a técnica de ERIC-PCR. Os iniciadores utilizados para as reações foram:

- ERIC1F: 5´ TGTAAGCTCCTGGGGATTAC 3´
- ERIC2R: 5´AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG 3´

As condições da reação estiveram de acordo com Silbert *et al.*, 2004. Os produtos obtidos foram visualizados em gel de agarose 1,5%. A corrida foi de, aproximadamente, 120 minutos, a 90 volts. A similaridade entre os perfis gerados após visualização das bandas em gel de agarose foi avaliada utilizando-se o programa Bionumerics (Applied Maths, Saint-Martens-Latem, Bélgica) versão 7.1; o coeficiente de similaridade foi a correlação de Dice e, para a análise de *clusters*, o método foi o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method Algorithm*). Foram interpretados como possivelmente relacionados os perfis com similaridade igual ou maior a 90%.

5. RESULTADOS

5.1 Identificação e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos microrganismos recuperados

Neste estudo foram avaliadas 88 amostras de enterobactérias, identificadas por método automatizado, como *Klebsiella pneumoniae* (n=51), *Enterobacter cloacae* complex (n=18), *Enterobacter aerogenes* (n=9) e *Escherichia coli* (n=10). Do total, 32,9% foram oriundas de Centros de Tratamento Intensivo (CTI) e 67% de outras unidades hospitalares, como enfermarias, pronto atendimento, maternidade, que neste estudo foram designadas como outros setores.

Todas as amostras avaliadas (n=88) apresentaram resistência a, pelo menos, uma das cefalosporinas de terceira geração testadas (ceftriaxona ou cefotaxima e ceftazidima), sendo este o principal critério de inclusão adotado no estudo. De acordo com os padrões estabelecidos internacionalmente para classificação dos níveis de resistência (MAGIORAKOS *et al.*, 2011), 86,3% das amostras foram consideradas como multidroga-resistentes (*multidrug-resistant* - MDR). O microrganismo é considerado um MDR quando não apresentar sensibilidade a pelo menos um antimicrobiano em três ou mais classes.

Para a interpretação dos resultados dos testes de susceptibilidade a antimicrobianos foram utilizados os critérios preconizados na Nota Técnica da ANVISA Nº. 01/2013 e CLSI/2014.

O perfil de susceptibilidade a antimicrobianos, apresentado pelas amostras de *K. pneumoniae*, está representado na figura 2. Neste, é possível observar que a maioria destas amostras, foi resistente à ceftriaxona (98%), à ceftazidima (78%) e à cefepime (67%). Entre os aminoglicosídeos avaliados, 49% das amostras de *K. pneumoniae* foram resistentes à gentamicina (49%); porém, todas estas sensíveis à amicacina. Em relação à fluoroquinolona (ciprofloxacina), *K. pneumoniae* apresentou uma elevada taxa de resistência (72,5%). Já dentre os carbapenêmicos, ertapenem foi o menos efetivo, mostrando resistência em mais da metade das amostras de *K. pneumoniae* (53%), índice de resistência bem mais elevado do que aqueles apresentados aos outros antimicrobianos desta classe, meropenem (29,5%) e imipenem (29%). *K. pneumoniae* foi a única espécie dentre todas as amostras avaliadas neste estudo a apresentar resistência à colistina (20%).

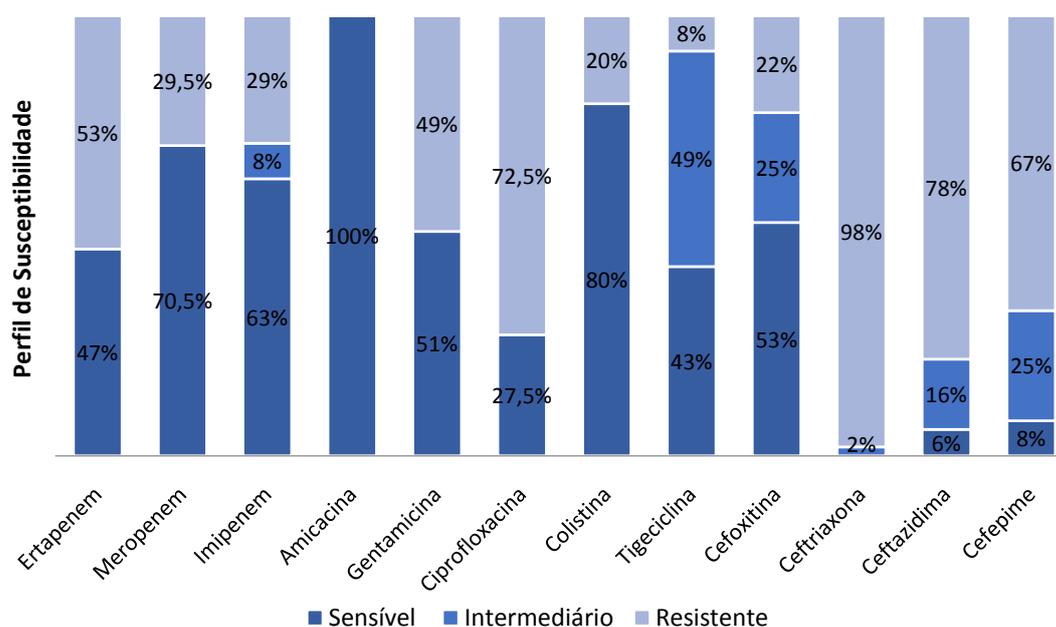


Figura 2: Perfil de susceptibilidade das amostras de *K. pneumoniae* (n=51) aos antimicrobianos avaliados.

As amostras de *Enterobacter* spp. apresentaram 100% de resistência à cefoxitina e à ceftriaxona e 92,5% à ceftazidima. Cefepime foi a cefalosporina que apresentou a maior efetividade quando comparada com os outros membros desta classe, com taxa de resistência bacteriana de 44%.

Os antimicrobianos contra os quais foram observadas as menores taxas de resistência entre as amostras de *Enterobacter* spp., foram amicacina (4%), meropenem e imipenem (15%). Para tigeciclina, observou-se variação da resistência de 7%, além de 30% das amostras serem classificadas com um fenótipo de resistência intermediária. Esse fenótipo foi visto também entre as amostras de *K. pneumoniae* (49%). O antimicrobiano que apresentou a melhor eficácia contra as amostras de *Enterobacter* foi a colistina, com 100% de sensibilidade.

Em relação aos aminoglicosídeos, a quase totalidade das amostras de *Enterobacter* foi sensível à amicacina (96%); no entanto, a maioria delas mostrou-se resistente à gentamicina (63%). A taxa de resistência à ciprofloxacina foi de 37% (Figura 3).

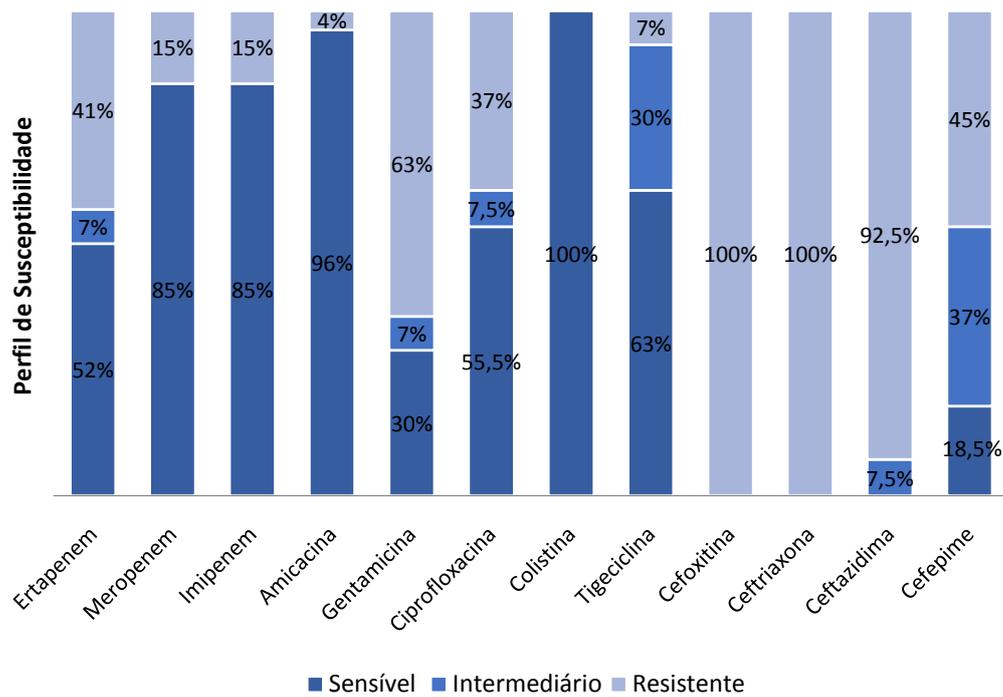


Figura 3: Perfil de susceptibilidade das amostras de *Enterobacter* spp. (n=27), aos antimicrobianos avaliados.

A figura 4 mostra o perfil de resistência apresentado pelas espécies de *E. cloacae* complex e *E. aerogenes*. Nota-se que as amostras de *Enterobacter aerogenes* apresentaram taxas de resistência mais elevadas em comparação com as amostras de *E. cloacae* complex, para quase todos os antimicrobianos testados.

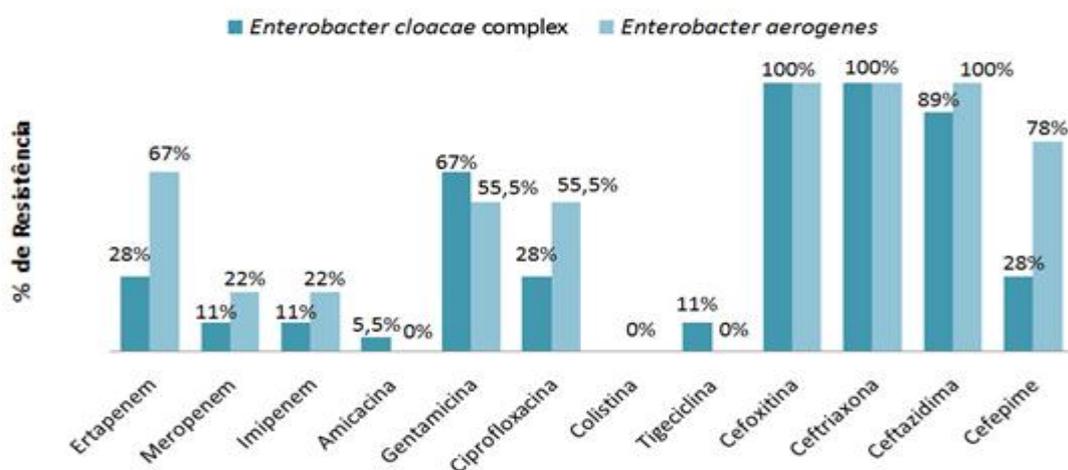


Figura 4. Perfil de resistência das espécies de *Enterobacter cloacae* complex e *Enterobacter aerogenes*, aos antimicrobianos avaliados.

Analisando a resistência aos antimicrobianos em *E. coli*, nota-se que as taxas são inferiores quando comparadas às de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Os antimicrobianos que tiveram a menor eficácia neste grupo bacteriano foram ceftriaxona, com 100% de resistência, ciprofloxacina (70%) e gentamicina (60%). Para cefepime, 60% das amostras de *E. coli* apresentaram resistência intermediária a este antimicrobiano e 40% resistência plena. As amostras de *E. coli* foram, ainda, sensíveis aos carbapenêmicos (meropenem, imipenem e ertapenem) testados. Também foi observada sensibilidade total aos antimicrobianos amicacina, colistina e tigeciclina (Figura 5).

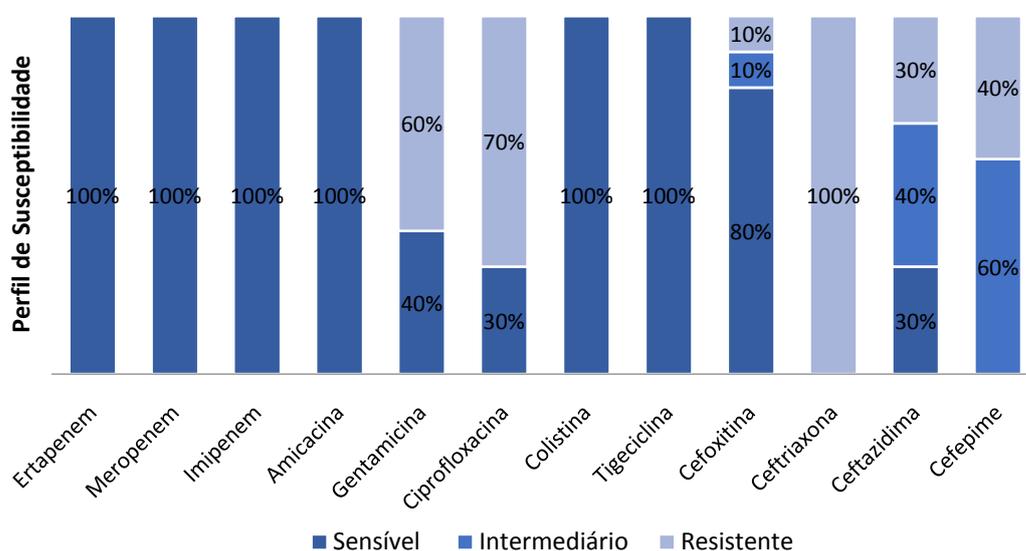


Figura 5. Perfil de susceptibilidade das amostras de *Escherichia coli* (n=10), aos antimicrobianos avaliados.

A figura 6 apresenta os perfis de resistência das amostras de enterobactérias provenientes de pacientes internados em CTIs e das amostras oriundas de outros setores hospitalares, notando-se no grupo CTI taxas de resistência mais elevadas. Os agentes com a menor eficácia contra as amostras provenientes dos CTIs foram ertapenem (62%), ciprofloxacina (76%), ceftazidima (83%), ceftriaxona (96,5%) e cefepime (72%). Amicacina foi o agente mais eficaz em ambos os grupos, sendo que o nível de resistência a este antimicrobiano não ultrapassou os 2%.

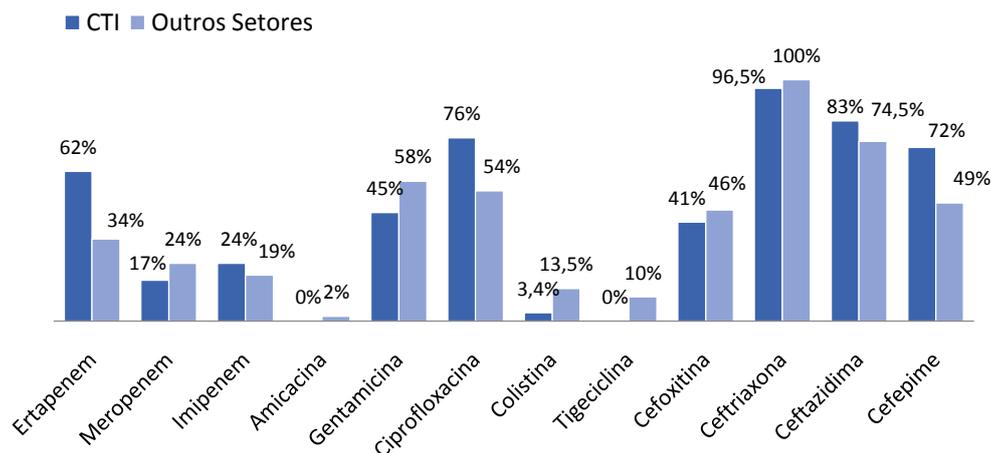


Figura 6: Perfis de resistência das enterobactérias recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em CTIs e de Outros Setores hospitalares, aos antimicrobianos avaliados neste estudo.

A menor concentração dos antimicrobianos testados capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras (CIM₉₀) foi superior ao ponto de corte estabelecido para cada antimicrobiano em 83,3% das amostras de *K. pneumoniae*, 75% das de *Enterobacter* spp. e 33,3% nas amostras de *E. coli*. Com relação à CIM₅₀, as concentrações que estiveram acima do ponto de corte estabelecidos para cada antimicrobiano foram de 50% para *K. pneumoniae*, 41,6% para *Enterobacter* spp. e 25% para as amostras de *E. coli*. Amicacina foi o antimicrobiano que apresentou a maior efetividade contra todas as espécies, mostrando CIM₅₀ variando de 2-4µg/mL e CIM₉₀ entre 2-16µg/mL (Quadro 2).

Quadro 2: Resultados das CIM₅₀ e CIM₉₀ dos antimicrobianos testados para as amostras de *Klebsiella pneumoniae* (n=51), *Enterobacter* spp. (n=27) e *Escherichia coli* (n=10) isoladas de hemoculturas em hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais.

Concentração Inibitória Mínima (CIM) µg/mL									
Antimicrobianos	CIM Interpretação			<i>K. pneumoniae</i>		<i>Enterobacter</i> spp.		<i>E. coli</i>	
	S	I	R	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀	CIM ₅₀	CIM ₉₀
Ertapenem	≤0,5	1	≥2	4	≥8	≤0,5	8	≤0,5	≤0,5
Meropenem	≤1	2	≥4	1	≥16	≤0,25	≥16	≤0,25	≤0,25
Imipenem	≤1	2	≥4	≤1	≥16	≤1	≥16	≤0,25	≤1
Amicacina	≤16	32	≥64	4	16	4	16	≤2	≤2
Gentamicina	≤4	8	≥16	≤1	≥16	≥16	≥16	≥16	≥16
Ciprofloxacina	≤1	2	≥4	≥4	≥4	1	≥4	≥4	≥4
Colistina ^A	≤2	-	≥4	≤0,5	≥16	≤0,5	≤0,5	≤0,5	≤0,5
Tigeciclina ^A	≤1	2	≥4	2	2	1	2	≤0,5	≤0,5
Cefoxitina	≤8	16	≥32	8	≥64	≥64	≥64	≤4	16
Ceftriaxona	≤1	2	≥4	≥64	≥64	≥64	≥64	16	≥64
Ceftazidima	≤4	8	≥16	16	≥64	16	≥64	4	16
Cefepime	≤2	-	≥16	16	≥64	4	≥64	2	8

CIM₉₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras CIM₅₀: Concentração inibitória mínima capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras. S: sensível; I: intermediário; R: resistente

5.2 Métodos Fenotípicos para Determinação de β-lactamases

5.2.1 Teste do Sinergismo do Duplo Disco (TSDD) e *Epsilon*meter test (Etest)

A produção de ESBL detectada pelo Etest foi de 55,6%, sendo este resultado similar aos valores encontrados pelo TSDD (56,8%). Quando estas metodologias foram analisadas separadamente, o Etest apresentou um melhor desempenho para as amostras de *E. coli* (80%) e o TSDD para as de *K. pneumoniae* (66,6%). *Enterobacter* spp. apresentou baixa produção de ESBL, tanto pelo TSDD (29,6%), como pelo Etest (33,3%) (Quadro 3). As figuras 7, 8, 9 e 10 exemplificam os testes TSDD e Etest.

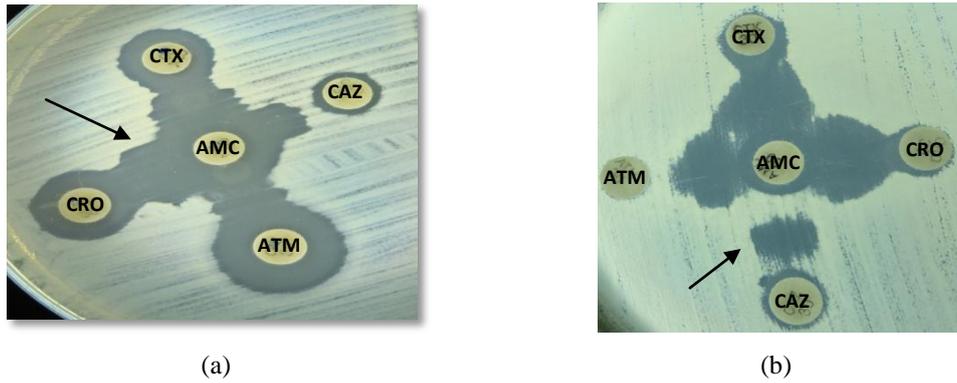


Figura 7: Fotos representativas de um dos Testes de Sinergismo do Duplo Disco empregados neste estudo; (a) alargamento do halo de inibição; (b) formação de zona fantasma. AMC: amoxicilina/ácido clavulânico; ATM: aztreonam; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CTX: cefotaxima.

As taxas de amostras produtoras de ESBL empregando-se os testes TSDD e Etest foram comparadas aos resultados encontrados pelo sistema VITEK[®]2 *Advanced Expert System* (AES) e estão apresentados no quadro 3. O VITEK[®]2 AES analisa a presença de ESBL apenas para as amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli*. Este sistema apresentou uma taxa de positividade para ESBL de 86,2%, índice bem acima dos outros dois testes.

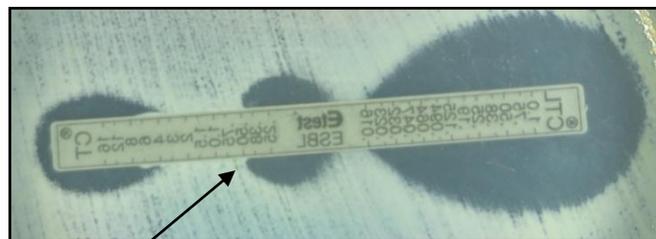


Figura 8: Foto ilustrativa de um Etest ESBL positivo encontrado neste estudo. Observa-se formação de zona de inibição abaixo da CT. CT: cefotaxima; CTL: cefotaxima/ácido clavulânico.

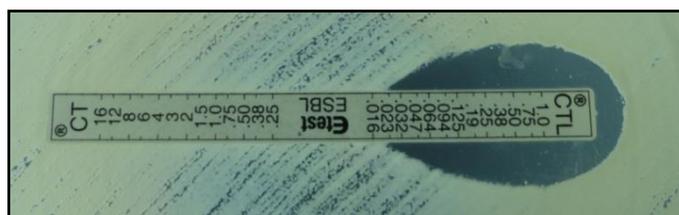


Figura 9: Foto ilustrativa de um Etest ESBL positivo encontrado neste estudo: Diminuição de $\geq 3 \log^2$ diluições no MIC na presença do ácido clavulânico. CT: cefotaxima; CTL: cefotaxima/ácido clavulânico.

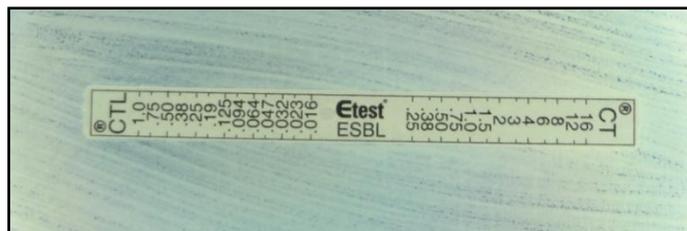


Figura 10: Foto ilustrativa de um Etest ESBL Não-Determinado encontrado neste estudo: Valores da CIM estão acima da escala de interpretação. CT: cefotaxima; CTL: cefotaxima/ácido clavulânico.

5.2.2 Pesquisa de AmpC empregando-se o teste de susceptibilidade à Cefoxitina

Em relação à resistência à cefoxitina como marcador da presença de AmpC, 39 das 88 amostras apresentaram resistência (44,3%) a esse antimicrobiano. A figura 11 mostra os perfis de susceptibilidade das amostras analisadas à cefoxitina.

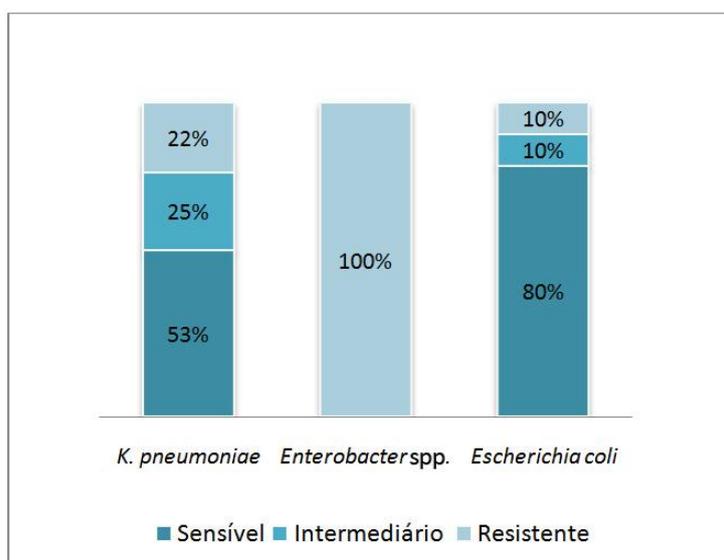


Figura 11: Perfis de susceptibilidade à cefoxitina das amostras de enterobactérias recuperadas de hemoculturas.

5.2.3 Pesquisa AmpC cromossomal induzível

A investigação da produção de AmpC cromossomal induzível empregando-se a técnica do disco de aproximação não apresentou nenhum resultado positivo dentre as amostras de *Enterobacter spp.* e *E. coli* avaliadas.

5.2.4 Pesquisa AmpC plasmidial - Bloqueio enzimático com ácido fenilborônico

A pesquisa de AmpC plasmidial utilizando o ácido fenilborônico foi aplicada para as amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* que apresentaram resistência à cefoxitina e pesquisa de carbapenemase negativa. Das amostras de *K. pneumoniae*, 11 se mostraram resistentes à cefoxitina e, dessas, 8 eram produtoras de carbapenemase, sendo excluídas do teste. O restante (03 amostras) apresentou resultado negativo para a pesquisa de AmpC plasmidial. Já entre as amostras de *E. coli*, uma amostra foi resistente à cefoxitina com CIM de 32µg/ml e resultado positivo, como mostrado na Figura 12.

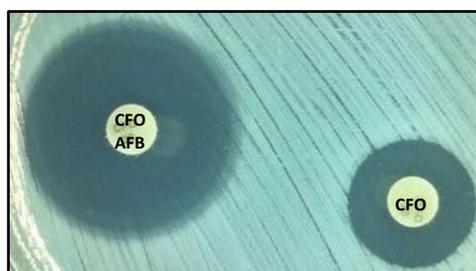


Figura 12: Foto representativa da amostra 105, com teste do disco combinado para Pesquisa de AmpC plasmidial positivo. CFO: cefoxitina; AFB: ácido fenilborônico.

5.2.5 Teste de Hodge Modificado para pesquisa de carbapenemase

O THM foi aplicado para todas as amostras de enterobactérias incluídas no estudo, seguindo os critérios estabelecidos pelo CLSI (M100S24, 2014). Dentre as enterobactérias pesquisadas, somente as amostras de *E. coli* não apresentaram positividade para produção de carbapenemase. Já 39,2% (20/51) das amostras de *K. pneumoniae* foram positivas por esta metodologia, enquanto que, entre as amostras de *Enterobacter spp.*, a positividade foi de 11,1% (03/27). Na figura 13 temos a ilustração de um THM positivo. Quando se avaliou a resistência aos carbapenêmicos entre as amostras com THM positivo, 95,6% foram resistentes ao ertapenem, 65,2% ao imipenem e 60,8% ao meropenem (APÊNDICE IA e IB).

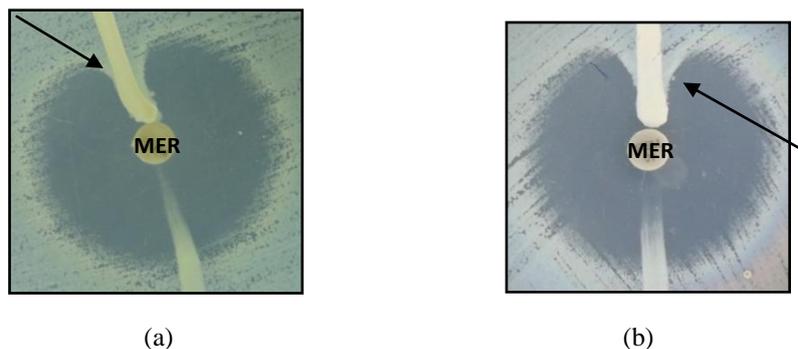


Figura 13: Foto ilustrativa do Teste de Hodge Modificado positivo; (a) e (b): As setas indicam a deformação nos halos de inibição. MER: meropenem.

5.3 Detecção genotípica de β -lactamases nas amostras estudadas

5.3.1 Detecção dos genes bla_{TEM} , bla_{SHV} , bla_{CTX-M} , bla_{GES}

Das amostras estudadas, 79,5% (70/88) foram positivas para algum dos genes codificadores de ESBL pela técnica da PCR (Figura 14). O gene mais frequente foi o bla_{TEM} , presente em 61,3% (54/88) das amostras, seguido pelo bla_{SHV} , encontrado em 42% (37/88) das amostras. Já o bla_{CTX-M} foi detectado em 26,1% (23/88) de todas as amostras analisadas. A espécie *K. pneumoniae* foi aquela com a maior taxa de detecção de bla_{SHV} 70,5% (36/51), dados estes apresentados na tabela 2.

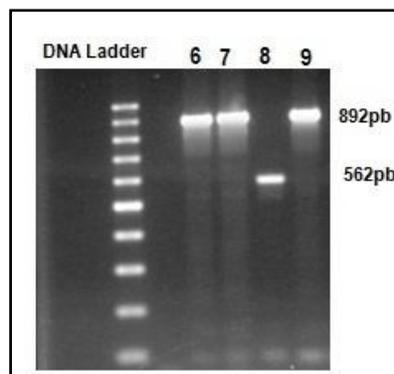


Figura 14 : Gel ilustrativo contendo fragmentos do gene bla_{CTX-M} e bla_{KPC1-3} amplificados com *primers* específicos. DNA Ladder: marcador de 100 pb; fragmento de 892 pb caracterizando KPC; fragmento de 562 pb caracterizando CTX-M.

A co-existência de dois tipos de ESBL em uma mesma amostra, foi encontrada em 37,5% (33/88) dos casos avaliados, sendo a combinação de bla_{TEM}/bla_{SHV} mais comum entre as amostras de *K. pneumoniae* e bla_{TEM}/bla_{CTX-M} , entre as de *Enterobacter* spp. e *E. coli*. Os genes bla_{TEM} , bla_{SHV} e bla_{CTX-M} , foram detectados

simultaneamente apenas nas amostras de *K. pneumoniae*, e isso ocorreu em 17,6% (09/51) das mesmas (Figura 15). Não foi detectada a presença do gene *bla_{GES}* em nenhuma das amostras bacterianas analisadas neste trabalho.

Tabela 2: Perfil genotípico das amostras de enterobactérias analisadas

Espécies Bacterianas	Genótipo	Frequência de Detecção
<i>K. pneumoniae</i> (51)	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	03 (5,9%)
	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	04 (7,8%)
	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	11 (21,5%)
	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	07 (13,7%)
	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	12 (23,5%)
	<i>bla_{CTX-M}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	05 (9,8%)
	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>	01 (1,9%)
	<i>bla_{TEM}</i>	32 (62,7%)
	<i>bla_{SHV}</i>	36 (70,5%)
	<i>bla_{CTX-M}</i>	13 (25,4%)
	<i>bla_{KPC}</i>	23 (45%)
<i>Enterobacter</i> spp (27)	<i>bla_{KPC}</i> , <i>bla_{TEM}</i>	02 (7,4%)
	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{SHV}</i>	01 (3,7%)
	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>	04 (14,8%)
	<i>bla_{TEM}</i>	14 (51,8%)
	<i>bla_{SHV}</i>	01 (3,7%)
	<i>bla_{CTX-M}</i>	05 (18,5%)
	<i>bla_{KPC}</i>	05 (18,5%)
<i>Escherichia coli</i> (10)	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{CTX-M}</i>	03 (30%)
	<i>bla_{TEM}</i> , <i>bla_{AmpC}</i>	01 (10%)
	<i>bla_{TEM}</i>	08 (80%)
	<i>bla_{CTX-M}</i>	05 (50%)

5.3.2 Detecção dos genes *bla_{KPC1-3}* e *bla_{NDM}*

Os genes que codificam as carbapenemases KPC e NDM, foram também pesquisados neste estudo, e esta última não foi detectada em nenhuma das amostras analisadas. Das amostras de *K. pneumoniae* estudadas, 45% (23/51) e 18,5% (5/27) entre as de *Enterobacter* spp. apresentaram o gene *bla_{KPC1-3}*. Este gene não foi encontrado em nenhuma das amostras de *E. coli*. Na avaliação da produção de carbapenemase pelos métodos fenotípicos e genotípicos, o THM mostrou-se positivo em 26,1% (23/88) das amostras, enquanto o gene *bla_{KPC1-3}* foi detectado em 31,8% (28/88) das amostras (Quadro 3).

Quadro 3: Produção de β -lactamases entre as enterobactérias avaliadas: Análises fenotípica e genotípica

Amostras Bacterianas	ESBL				Carbapenemase	
	TSDD	E-TEST	VITEK 2 /AES	PCR	THM	PCR (KPC)
<i>K. pneumoniae</i>	34 (66,65)	31 (60,7%)	44 (86,2%)	45 (88,2)	20 (39,2%)	23 (45%)
<i>Enterobacter spp.</i>	08 (29,6%)	09 (33,3%)	-	15 (55,5)	03 (11,1%)	05 (18,5%)
<i>E. coli</i>	08 (80%)	09 (90%)	10 (100%)	10 (100)	0%	0%
Total	50 (56,8%)	49 (55,6%)	-	70 (79,5)	23 (26,1%)	28 (31,8%)

TSDD: Teste do Sinergismo do Duplo Disco; VITEK 2 AES: *Advanced Expert System*; THM: Teste de Hodge Modificado; PCR: Reação em Cadeia da Polimerase; KPC: *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase.

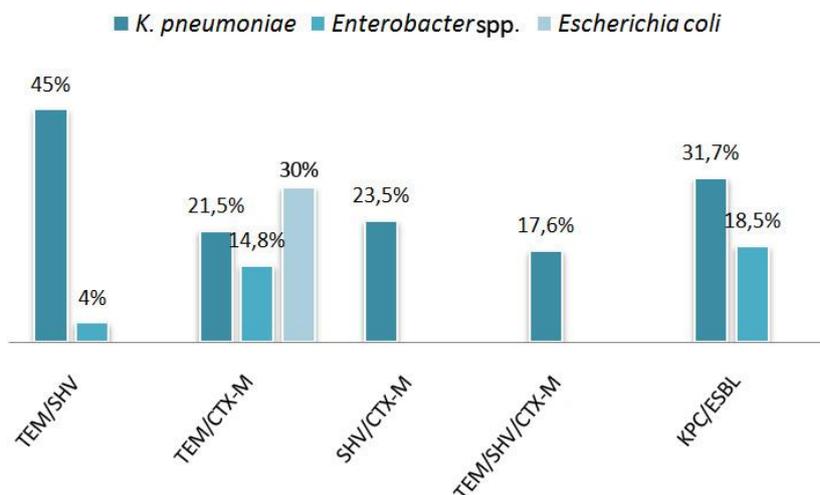


Figura 15: Combinação dos tipos de β -lactamases encontrados nas amostras de *K. pneumoniae* (n=51), *Enterobacter spp.* (n=27) e *E. coli* (n=10) avaliadas.

Quando a produção das enzimas β -lactamases foi comparada entre as amostras dos pacientes internados em CTIs com aquelas dos de outros setores de internção, nota-se que os índices de detecção foram mais elevados para as amostras provenientes do CTI. A única exceção foi para a enzima TEM, que esteve presente em 66,4% das amostras dos Outros Setores. Os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC} foram os mais detectados entre as amostras do CTI (58,6% e 44,8%, respectivamente). Esses dados podem ser vistos na figura 16.

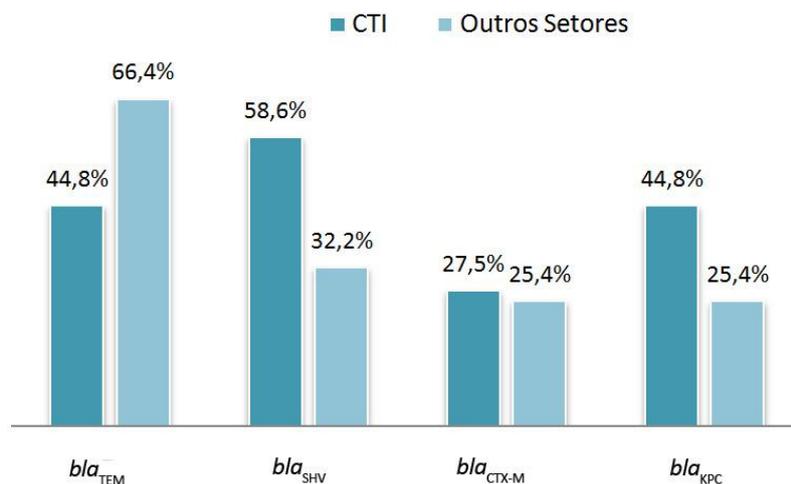


Figura 16: Porcentagem das amostras carreadoras de genes que codificam β -lactamases por setores hospitalares.

5.3.3 Detecção dos genes AmpC - *bla*_{AmpC}, *bla*_{CMY-2}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}

A investigação da presença de genes determinantes da produção de AmpC plasmidial, nas amostras que apresentavam resistência à cefoxitina, pela PCR, não identificou nenhum dos genes pesquisados (*bla*_{CMY-2}, *bla*_{FOX}, *bla*_{DHA}). Apenas a amostra de número 105, uma *E. coli*, apresentou produto da PCR compatível para o gene *bla*_{AmpC}.

5.4 Diversidade genética das amostras de enterobactérias

a) *Klebsiella pneumoniae*

De acordo com o perfil de bandejamento das 51 amostras de *K. pneumoniae* avaliadas por ERIC-PCR, duas a cinco bandas foram observadas (Apêndice IV). O dendrograma gerado agrupou estas amostras em quatro diferentes *clusters* (I, II, III e IV) (Fig. 17). Nove perfis (18,3%) foram agrupados no *cluster* I, sendo estes provenientes dos hospitais A, B e C. O *cluster* II foi composto de oito (16,3%) amostras, estas tendo origem no hospital C, exceto a amostra 29 pertencente ao hospital A. As nove (18,3%) amostras agrupadas no *cluster* III foram originadas dos hospitais A, B, C e E. O *cluster* IV agrupou o maior número de amostras (23; 46,9%), sendo 19 provenientes do hospital B e o restante oriundo dos hospitais A e E. Algumas amostras apresentaram perfis idênticos entre si, tais como: (i) 34 e 35 (*cluster* I); (ii) 15 e 10 e

(iii) 53 e 54 (*cluster* III); e (iv) 37 e 40, (v) 39 e 41, (vi) 42, 52, 43, 47 e 50, (vii) 46 e 58, (viii), 20 e 30 (*cluster* IV), sendo o último *cluster* o que agrupou o maior número de amostras com perfis de bandas idênticos. As amostras de *K. pneumoniae* de número 13 e 31 não foram incluídas nas análises de similaridade, pois não houve amplificação dos produtos da PCR através do ERIC, não gerando bandeamento, mesmo após repetições.

b) *Escherichia coli*

Em relação às amostras de *E. coli*, o perfil de bandeamento revelou de duas a sete bandas por amostra, conforme demonstrado no apêndice IV. O dendrograma gerado agrupou estas amostras em dois *clusters*: I e II (Fig. 18). O *cluster* I é formado por três amostras, sendo as amostras de números 102 e 103 originadas do hospital E, com 90% de similaridade. No *cluster* II foram agrupadas sete amostras, sendo que algumas se agruparam com no mínimo 90% de similaridade: (i) 104 e 105; (ii) 108 e 109. Todas as amostras do *cluster* II são oriundas do hospital B.

c) *Enterobacter spp.*

As análises de similaridade genética das amostras do gênero *Enterobacter* foram feitas separando as espécies *E. cloacae* e *E. aerogenes*. Em relação às amostras de *E. cloacae*, os perfis de bandeamento apresentaram de três a nove bandas por amostra (APÊNDICE IV). A figura 19 apresenta o dendrograma gerado a partir das amostras de *E. aerogenes*, nele sendo possível observar a formação de três *clusters* distintos I, II e III. Duas amostras agrupadas no *cluster* I foram provenientes dos hospitais B e C e apresentaram 60% de similaridade, e três amostras provenientes do hospital B foram agrupados no *cluster* II, com similaridade variando de 90-95%. No *cluster* III foram agrupadas quatro amostras, sendo que três, pertencentes aos hospitais B e D, se agruparam com 100% de similaridade e uma amostra (79) se agrupou com 90% de similaridade a estas três.

O dendrograma gerado a partir do perfil de bandeamento das amostras de *E. cloacae* as agrupou em dois *clusters* distintos: I e II (Fig. 20). Seis amostras (35,2%) foram agrupadas no *cluster* I, sendo estas provenientes do hospital B, 10 amostras (58,8%) agruparam-se no *cluster* II, sendo originadas dos hospitais B, C e E, e uma amostra (70) não se agrupou a nenhum *cluster*. As amostras que apresentaram perfis idênticos entre si foram: (i) 84 e 86 (*cluster* I); (ii) 73, 74 e 75 (Hospital C); (iii) 76 e 72

(Hospitais C e E, respectivamente); (iv) 82 e 77 (Hospital C); (vi) 87 e 88 (Hospital B), pertencentes ao *cluster* II. A amostra de *E. cloacae* de número 83 não foi incluída nas análises de similaridade, pois não houve amplificação do produtos da PCR através do ERIC, não gerando bandeamento, mesmo após repetições.

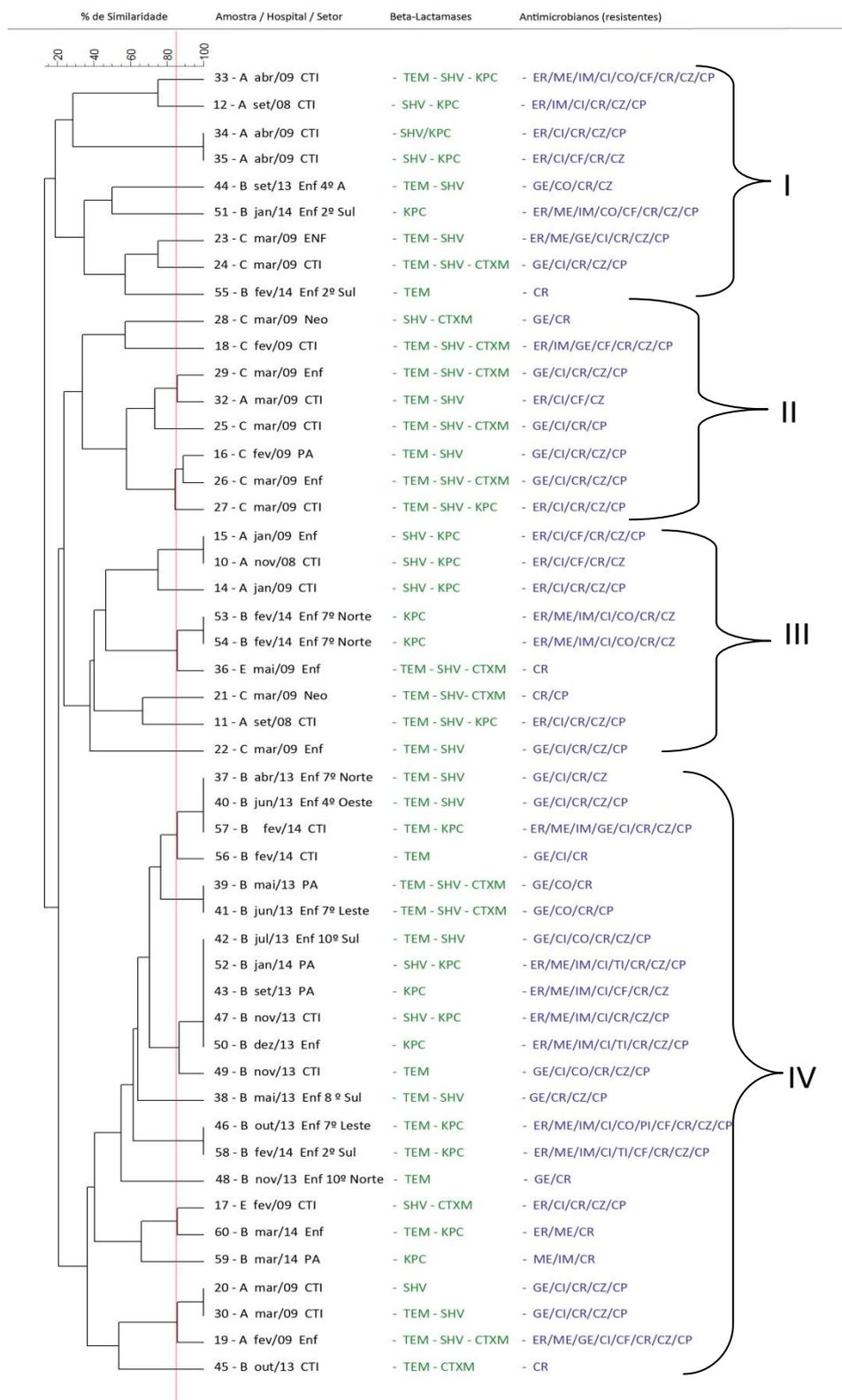
ERIC-PCR *Klebsiella pneumoniae*

Figura17: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade Dice mostrando as relações entre os isolados de *K. pneumoniae*. Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). ME: meropenem; IM: imipenem; GE: gentamicina; CI: ciprofloxacina; CO: colistina; TI: tigeciclina; CF: ceftoxitina; CR: ceftriaxona; CZ: ceftazidima; CP: cefepime.

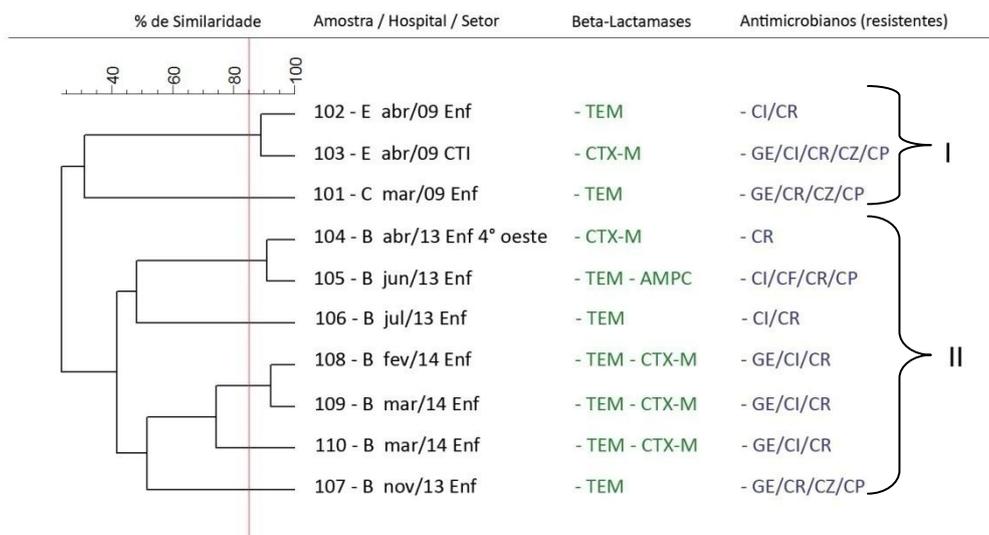
ERIC-PCR *Escherichia coli*

Figura 18: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade Dice mostrando as relações entre os isolados de *E. coli*. Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). ME: meropenem; IM: imipenem; GE: gentamicina; CI: ciprofloxacina; CO: colistina; TI: tigeciclina; CF: ceftazidima; CR: ceftriaxona; CZ: ceftazidima; CP: cefepime.

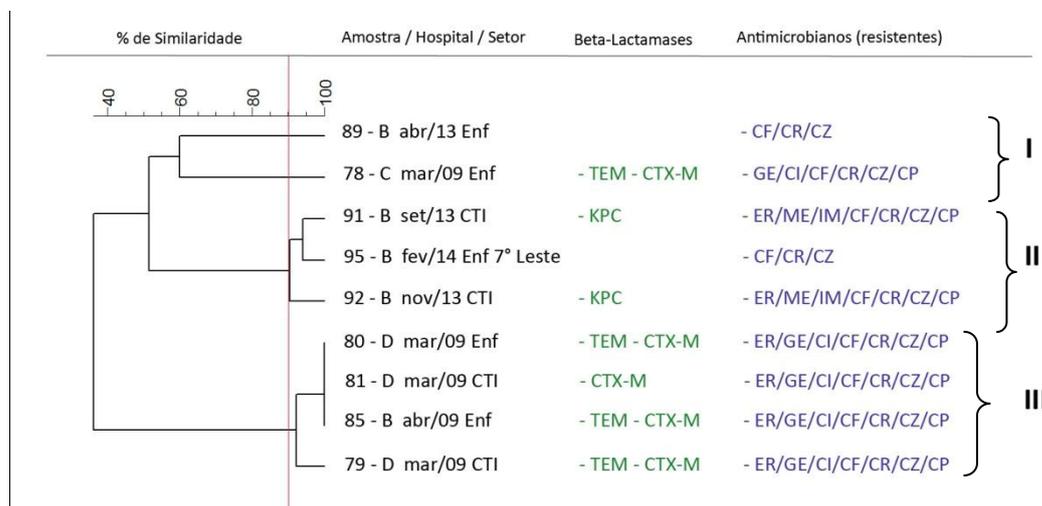
ERIC-PCR *Enterobacter aerogenes*

Figura 19: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade Dice mostrando as relações entre os isolados de *E. aerogenes*. Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). ME: meropenem; IM: imipenem; GE: gentamicina; CI: ciprofloxacina; CO: colistina; TI: tigeciclina; CF: ceftazidima; CR: ceftriaxona; CZ: ceftazidima; CP: cefepime.

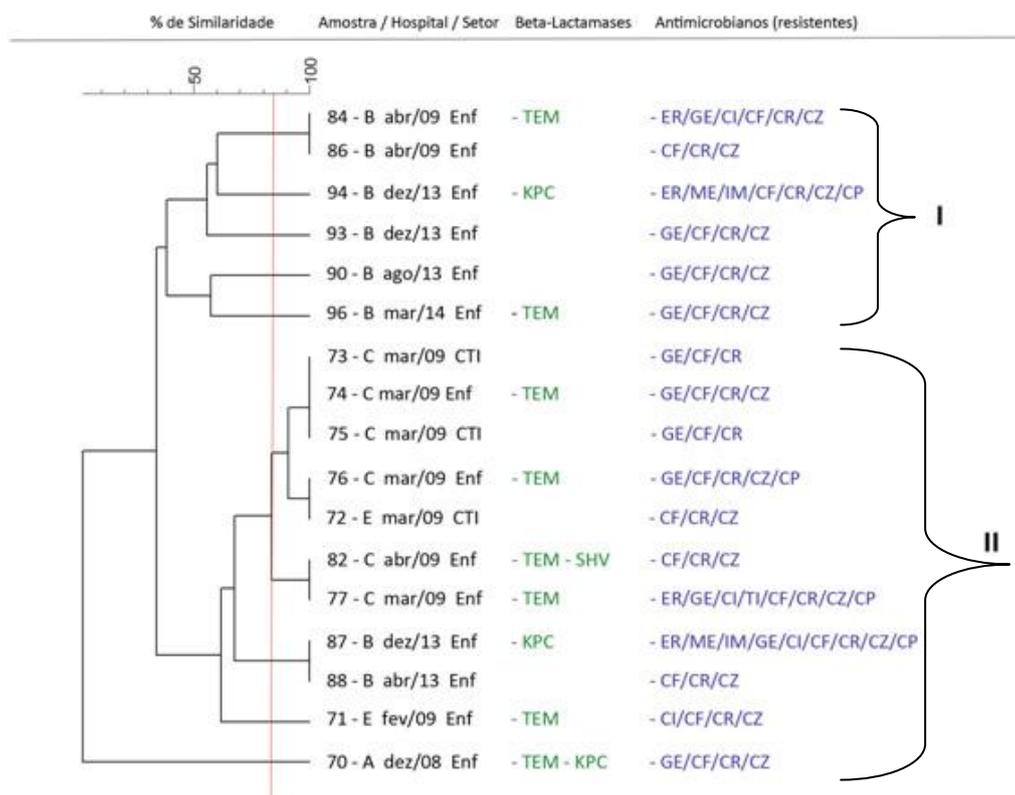
ERIC-PCR *Enterobacter cloacae*

Figura 20: Dendrograma de similaridade genética derivado do coeficiente de similaridade Dice mostrando as relações entre os isolados de *E. cloacae*. Construção feita usando o agrupamento com *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean* (UPGMA). ME: meropenem; IM: imipenem; GE: gentamicina; CI: ciprofloxacina; CO: colistina; TI: tigeciclina; CF: ceftazidima; CR: ceftriaxona; CZ: ceftazidima; CP: cefepime.

6. DISCUSSÃO

Os antimicrobianos estão entre os fármacos mais utilizados pela medicina humana. O uso destes agentes é um dos principais fatores para a seleção de microrganismos resistentes. As bactérias têm mostrado cada vez mais habilidades em tornar-se resistentes a qualquer tipo de antimicrobiano desenvolvido, fazendo-se mais necessário avanço no conhecimento dos mecanismos de resistência por elas exibidos (PALMER; KISHONY, *et al.*, 2013; DAVIES, 2013).

K. pneumoniae e *E. coli* são as espécies mais prevalentes dentro da família *Enterobacteriaceae*, sendo responsáveis por inúmeros tipos de infecções (SUPERTI *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2012). *Enterobacter* é outro gênero de patógenos frequentemente encontrados em infecções nosocomiais que têm sido associados a diversos surtos, principalmente em unidades de tratamento intensivo (MARTINEZ *et al.*, 2004; PATERSON *et al.*, 2006; MULLER *et al.*, 2012; TUON *et al.*, 2012).

No presente estudo, *K. pneumoniae* foi a espécie com o maior número de amostras, correspondendo a 58% das bactérias isoladas, seguida por *Enterobacter* spp. (31%), e *E. coli* (11%). Isso corrobora os dados do programa SENTRY, que mostrou que, entre nos anos de 2008 e 2010, *K. pneumoniae* foi responsável por 12,3% de todas as ICS no Brasil, Chile, Argentina e México (GALES *et al.*, 2012). Outro estudo realizado em Porto Alegre avaliou a incidência de *K. pneumoniae* e *E. coli* em bacteremias nosocomiais. Foram incluídas neste estudo 145 amostras bacterianas e, destas, 81(59%) eram *K. pneumoniae* e 64 (44,1%) *E. coli*. Os autores avaliaram, ainda, a porcentagem de bactérias produtoras de ESBL, o que correspondeu a 35,2% das amostras (SUPERTI *et al.*, 2009).

Em relação às amostras de *Enterobacter* spp. apenas duas espécies foram identificadas no presente estudo, *E. cloacae* e *E. aerogenes*. A prevalência destas duas espécies como um importante agente em bacteremias é consistente com outros trabalhos publicados (SANDERS; SANDERS, 1997; NOGUEIRA *et al.*, 2014). No presente estudo, o sistema automatizado VITEK® 2 foi utilizado para identificação de todas as amostras bacterianas avaliadas. Por este sistema, foram identificadas 18 amostras como pertencentes ao grupo *Enterobacter cloacae* complex, sendo que este sistema automatizado discrimina apenas duas (*E. cloacae* e *Enterobacter asburiae*) das seis espécies que compõem o grupo em questão. Essas espécies compartilham um DNA com 61% a 67% relacionados a *E. cloacae*, o que dificulta sua discriminação por

metodologias fenotípicas (MEZZATESTA *et al.*, 2012). No entanto, para o delineamento do perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos e para análise dos determinantes de resistência, o agrupamento dessas espécies não representou perda de confiabilidade dos resultados obtidos.

Nas últimas décadas, *Enterobacter* spp. vêm ganhando destaque no ambiente hospitalar. Estudos multicêntricos realizados entre as décadas de 1976 e 1989 pelo *National Nosocomial Infections Surveillance System* e em 2008 pelo *National Healthcare Safety Network* constataram que *Enterobacter* spp. respondem por 5% dos casos de bacteremias nosocomiais nos Estados Unidos (MEZZATESTA *et al.*, 2012). Outro estudo multicêntrico feito entre 1995 e 2002 mostrou que, dos 24179 casos de ICS, espécies de *Enterobacter* estiveram entre os dez patógenos mais isolados em CTI (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Um estudo retrospectivo realizado no Brasil mostrou que 205 amostras de *Enterobacter* spp. foram recuperadas de um total de 4907 casos de ICS, sendo 20% destes patógenos produtores de ESBL (NOGUEIRA, 2014).

6.1 Susceptibilidade aos antimicrobianos

Os pacientes internados em instituições de saúde estão expostos a uma variedade de microrganismos patogênicos, principalmente aqueles sob internação em CTI, cujo risco de infecção é bastante elevado. Isso implica um risco de 5 a 10 vezes maior em adquirir uma IRAS em CTI do que em outro setor de internação (BARROS, *et al.*, 2012). O uso de antimicrobianos de amplo espectro neste ambiente acaba por ocasionar maior pressão seletiva sobre a microbiota nosocomial, favorecendo a seleção de subpopulações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistentes à maioria dos antimicrobianos (PALMER; KISHONY, 2013).

No presente estudo, os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos mostraram elevados índices de resistência, não apenas aos agentes β -lactâmicos, aos quais essas amostras também apresentaram elevados valores das CIM₅₀ e CIM₉₀, como a outras classes de antimicrobianos. A produção de ESBL foi o principal mecanismo de resistência às cefalosporinas de terceira geração, uma vez que 79,5% das amostras resistentes a essas drogas eram produtoras de ESBL. Isso corrobora o trabalho de Nogueira (2011), que também observou a produção de ESBL como principal mecanismo de resistência às cefalosporinas de terceira geração em enterobactérias (79,1%) de origem hospitalar.

Do grupo de enterobactérias estudado, as amostras de *E. coli* avaliadas foram as únicas a não apresentar resistência aos carbapenêmicos. Esses resultados corroboram os dados do estudo realizado pelo programa SENTRY (já citado), pelo qual se buscou avaliar as taxas de resistência entre patógenos Gram-negativos isolados da América Latina (2008-2010). As 1517 amostras de *E. coli* isoladas mostraram uma alta sensibilidade aos carbapenêmicos, amicacina, e colistina (sensibilidade superior a 98,6%) (GALES *et al.*, 2012).

Outro dado importante observado no presente estudo foi a elevada taxa de resistência à fluoroquinolona (ciprofloxacina), com níveis de resistência atingindo 70% entre as amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli*. É importante ressaltar, ainda, que todas as amostras resistentes à ciprofloxacina também carregavam algum gene responsável pela produção de β -lactamases. Embora não tenha sido pesquisado, isso poderia ser explicado pela presença de plasmídeos que carregam genes de resistência às quinolonas, como *qnrA* e *qnrB*, e que também albergam outros genes de resistência a antimicrobianos como os β -lactâmicos, aminoglicosídeos, dentre outros (RODRIGUES-MARTINEZ *et al.*, 2011; KIM; HOOPER, 2014).

Os carbapenêmicos compreendem uma classe muito importante de antimicrobianos empregados na terapêutica em processos envolvendo microrganismos multirresistentes, especialmente aqueles produtores de ESBL, para os quais estas drogas são a primeira opção de tratamento (CHEN, 2011). A resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias pode surgir por aquisição de genes que codificam carbapenemases (MBL, KPC, GES ou OXA) ou por associação da expressão de genes que codificam cefalosporinas AmpC ou ESBL com alteração da expressão de porinas da membrana externa (JACOBY *et al.*, 2004).

A resistência aos carbapenêmicos encontrada neste trabalho foi expressada pelas amostras de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. Ertapenem foi o agente que apresentou a menor efetividade entre os carbapenêmicos avaliados. Carvalhaes e colaboradores (2009) também mostraram em seu trabalho, amostras de *K. pneumoniae* que apresentaram elevadas taxas de resistência ao ertapenem (89%), em comparação ao meropenem (43%) e imipenem (07%).

Ainda em relação à resistência aos carbapenêmicos, neste presente trabalho, onze amostras bacterianas que apresentaram resistência a esses agentes não foram codificadoras de carbapenemases. Isso também foi visto por Tsai e colaboradores (2011) que verificaram que a resistência aos carbapenêmicos ocorria mesmo na

ausência de carbapenemases, ESBL e cefalosporinases. Essa resistência era dada pela ausência de duas porinas na membrana externa (OmpK35 e OmpK36), sendo esta mais elevada para o ertapenem, fenômeno que também foi verificado no presente trabalho.

A circulação de linhagens multirresistentes é considerada um sério problema para as instituições de saúde, pois prejudica o regime de tratamento empírico e reduz as opções de tratamento, contribuindo, assim, para o aumento da mortalidade, maior tempo de internação e aumento dos custos hospitalares (GALES *et al.*, 2012).

6.2 Detecção fenotípica de β -lactamases

As pesquisas fenotípicas para produção de ESBL foram aplicadas para todas as amostras deste trabalho, sendo a resistência a uma cefalosporina de terceira geração o principal critério de inclusão das amostras neste estudo.

Desde 1980, testes fenotípicos têm sido desenvolvidos para detectar a produção de ESBL. A maioria é baseada no uso de cefalosporinas de terceira geração, geralmente cefotaxima ou ceftazidima, e um inibidor de β -lactamases, usualmente o ácido clavulânico (DRIEUX *et al.*, 2008). Somente com os testes de susceptibilidade aos antimicrobianos não é possível detectar e identificar a grande quantidade de enzimas β -lactamases existentes, fazendo-se necessária a confirmação da presença por diferentes metodologias, fenotípicas ou genotípicas. Exames complementares de triagem e fenotípicos têm se tornado um importante tema da pesquisa durante as duas últimas décadas (WILLEMS *et al.*, 2013; SINGH; SINGH, 2014).

Neste trabalho, a detecção da produção de ESBL pelo TSDD e Etest, apresentou resultados similares. Também vimos que houve uma variação do desempenho de cada teste dependendo da espécie avaliada. Isso se deve, principalmente, ao tipo de enzima que a bactéria está produzindo, o que está diretamente ligado ao substrato que está sendo degradado e a quantidade de enzima produzida (PEREIRA *et al.*, 2003; DRIEUX *et al.*, 2008; HARADA *et al.*, 2008). Em um estudo feito por Wiegand e colaboradores (2007), analisando a positividade do TSDD, foram observados índices de positividade de 92,9%, níveis estes superiores aos encontrados no presente estudo. Katuzna e colaboradores (2014) avaliaram o desempenho de diversos testes fenotípicos para detecção de ESBL e, das 42 amostras de *E. coli* estudadas, 20 (47,6%) foram produtoras de ESBL pelo TSDD e 11 (26,2%) pelo Etest, mostrando uma maior variação entre as duas metodologias aplicadas.

Muitos laboratórios clínicos utilizam o TSDD como teste confirmatório para detecção de amostras bacterianas produtoras de ESBL; apesar deste não ser um teste padronizado pelo CLSI, é considerado um método confiável (DRIEUX *et al.*, 2008; GAZIN *et al.*, 2012), embora alguns ajustes no teste sejam eventualmente necessários (DRIEUX *et al.*, 2008). Alguns estudos atribuem a variação de desempenho do teste, como a presença de resultados falsos negativos, com a distância entre os discos (TOFTELAND *et al.*, 2007; HARADA *et al.*, 2008). Outros autores atribuem este problema à escolha dos antimicrobianos marcadores (PITOUT 2005; TOFTELAND *et al.*, 2007; KAUR *et al.*, 2013; SINGH; SINGH, 2014). No presente trabalho, foram utilizados cinco substratos diferentes para aumentar a acurácia do teste, como sugerido pela literatura (DRIEUX *et al.*, 2008; HARADA *et al.*, 2008).

A produção de ESBL foi, também, avaliada pelo sistema *Expert* do VITEK®2. Por esta metodologia, 86,2% e 100%, respectivamente, das amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* apresentaram altos níveis de produção de ESBL. No trabalho de Garrec e colaboradores (2011) também foram obtidos valores elevados de detecção de ESBL para *E. coli* (92%) e *K. pneumoniae* (95%). Nossos resultados também mostraram que o sistema VITEK® 2 apresentou uma correlação bem expressiva quando comparado com os resultados obtidos pela pesquisa molecular. Spanu e colaboradores (2006) avaliaram o desempenho do VITEK® 2 na identificação de enterobactérias produtoras de ESBL, sendo os resultados obtidos por este sistema concordante com a pesquisa molecular de genes de ESBL, para 1.121 (99,3%) das 1.129 amostras bacterianas avaliadas.

Os *Guidelines* existentes para orientação na avaliação fenotípica da produção de ESBL em enterobactérias estão restritos à detecção destas enzimas apenas nas amostras de *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *Proteus* spp., sendo, ainda, um desafio para os laboratórios clínicos a detecção em outras espécies (CLSI, 2014; PITOUT; LAUPLAND, 2008). Um dos fatos que explica esta limitação, é que o ácido clavulânico (que é um inibidor de ESBL) pode ser mascarado por outros tipos de β -lactamases, tais como as enzimas AmpC, que são produzidas por *Enterobacter* spp.

Existem vários trabalhos que propõem testes alternativos para a detecção de ESBL em espécies bacterianas produtoras de β -lactamases da classe C; entretanto, nenhuma destas metodologias é preconizada por nenhum comitê internacional oficial. Com isso, a produção de ESBL em espécies como *Enterobacter* spp. é subestimada

(CHEONG *et al.*, 2012) Neste estudo, avaliamos a produção de ESBL nas amostras de *Enterobacter* spp. pela mesma metodologia aplicada à *E. coli* e à *K. pneumoniae*. Os resultados mostraram que houve uma baixa detecção da produção dessa enzima, tanto pelo TSDD como pelo Etest. No trabalho de Tzelepi e colaboradores (2000), no qual se avaliava a produção de ESBL em amostras de *Enterobacter* spp., das 31 amostras consideradas produtoras de ESBL pela focalização isoelétrica (IEF), em apenas 16% (5/31) foi detectada pelo TSDD. Isso mostra a necessidade de mais pesquisas para se detectar ESBL em bactérias produtoras de AmpC, para que se tenha um teste confiável e com uma boa reprodutibilidade, como alternativa para os laboratórios.

A detecção dos genes que conferem resistência aos carbapenêmicos utilizando métodos moleculares é considerada padrão ouro; porém, esse tipo de metodologia quase está restrito aos laboratórios de referência e centros de pesquisa. O Teste de Hodge Modificado (THM) é um método fenotípico que vem sendo bastante utilizado nos últimos anos, principalmente devido à sua alta sensibilidade (95-100%) em detectar enterobactérias produtoras de carbapenemase da classe A de Ambler, além de ser uma metodologia com padronização já definida pelo CLSI (QUEENAN; BUSH, 2007; MIRIAGOU *et al.*, 2010; BIRGY *et al.*, 2012; CLSI, 2014).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da nota técnica N°01/2013, sugere a utilização dos bloqueadores enzimáticos para detecção de carbapenemases, como o ácido fenilborônico para serino-carbapenemases e o EDTA para as metalo-betalactamases. Essa indicação se deve a algumas pesquisas que mostraram uma baixa sensibilidade (50%) do THM em detectar amostras produtoras de metalo-betalactamases, como a enzima NDM (GIRLICH *et al.*, 2011; ANVISA-NT01/2013).

No presente trabalho, THM apresentou positividade de 100%, quando comparado com os resultados da pesquisa molecular para o gene *bla_{KPC}*. O trabalho de Birgy e colaboradores (2012) corrobora os nossos dados, tendo os autores encontrado uma positividade de 95% (21/22) na pesquisa de carbapenemase pelo mesmo método. Em outro trabalho realizado no sul da Espanha, 44 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-3 apresentaram o THM positivo (LÓPEZ-CERERO *et al.*, 2014).

Em um estudo realizado em São Paulo avaliando 1521 amostras de enterobactérias resistentes ao ertapenem, 30% foram positivas para pesquisa do gene *bla_{KPC}* e 35,5% foram positivas no THM. As amostras consideradas positivas pelo THM foram, novamente, selecionadas em THM “verdadeiramente positivo” (maior distorção

do halo) e THM inconclusivo (pouca distorção do halo). As amostras com THM verdadeiramente positivo apresentaram 98% de especificidade e 100% de sensibilidade em relação à pesquisa molecular (CURY *et al.*, 2012).

Alguns autores discordam em relação à eficácia do THM, relatando que há uma dificuldade de interpretação do teste e que resultados falso-positivos podem ocorrer em espécies produtoras de ESBL ou AmpC com perdas de porinas (CARVALHAES *et al.*, 2009; PARESTERAN *et al.*, 2010). Entretanto, muitos estudos analisam grupos bacterianos distintos, como os não-fermentadores, e detectam diferentes carbapenemases (GIRLICH *et al.*, 2011). Em nosso estudo, o THM foi utilizado para enterobactérias que foram produtoras de KPC, o que pode explicar o alto nível de positividade.

A detecção de amostras produtoras de β -lactamase do tipo AmpC é considerada crítica em estudos epidemiológicos, não existindo ainda critérios aprovados para a confirmação fenotípica da presença de AmpC em enterobactérias (SASIREKHA; SHIVAKUMAR, 2012; EUCAST, 2013; CLSI, 2014). Embora a cefoxitina seja usada em alguns testes de detecção de AmpC, a susceptibilidade reduzida a essa droga é um indicador sensível, mas não é específico da produção de β -lactamases da Classe C, pois a resistência de enterobactérias à cefoxitina pode ser dada por alterações na permeabilidade da membrana externa (MOLAND *et al.*, 2008; TENOVER *et al.*, 2009).

Em relação à investigação da produção de AmpC cromossomal induzível através da técnica do disco de aproximação, todas as amostras pesquisadas apresentaram resultado negativo. Uma das explicações, de acordo com Livermore e Brown (2005) é que a distância entre os discos pode alterar o resultado, dependendo da enzima produzida pela bactéria a ser testada. Outros trabalhos mostram que a substituição da cefoxitina por outro indutor, como o imipenem, resultou em uma melhora considerável em relação à sensibilidade e especificidade do teste (TAN *et al.*, 2009).

Em relação à pesquisa da presença de AmpC plasmidial, aplicamos o teste para as amostras de *K. pneumoniae* e *E. coli* que apresentaram resistência à cefoxitina. Entretanto, após análise dos resultados, retiramos as amostras que apresentaram pesquisa molecular positiva para *bla*_{KPC}. Isso foi devido ao fato de que o ácido fenilborônico também é considerado um inibidor da enzima KPC; com isso, as amostras produtoras desta enzima poderiam gerar um resultado falso-positivo para a pesquisa fenotípica de AmpC plasmidial (COUDRON, 2005; PITOUT *et al.*, 2009; WILLEMS *et al.*, 2013). Neste teste, apenas uma amostra de *E. coli*, se mostrou produtora de

AmpC por esta metodologia. No estudo de Meyer e Picoli (2011), no qual avaliaram a produção de AmpC em amostras de *K. pneumoniae*, pelo teste do disco de cefoxitina combinado com AFB, a frequência de amostras produtoras foi de 22,4%.

O bloqueio enzimático com AFB têm sido utilizado em laboratórios de microbiologia clínica, para a pesquisa de AmpC plasmidial, particularmente em *E. coli* e *K. pneumoniae* (TENOVER, *et al.*, 2009; PITOUT *et al.*, 2009); entretanto, o conhecimento da especificidade e sensibilidade desse teste é importante na interpretação dos resultados.

A resistência a antimicrobianos é uma preocupação constante, pois afeta grandemente a saúde pública, sendo sua rápida detecção em laboratórios clínicos essencial para o reconhecimento de clones multirresistentes. De um modo geral, os métodos fenotípicos são uma alternativa simples e de baixo custo para serem padronizados, principalmente, na rotina de pequenos laboratórios clínicos. Daí a importância em se pesquisar e avaliar a eficácia e a confiabilidade destes testes.

6.3 Detecção genotípica de β -lactamases

A reação em cadeia da polimerase é uma técnica de referência para detecção dos diferentes genes que codificam as β -lactamases (PITOUT; LAUPLAND, 2008; FALAGAS; KARAGEORGOPOULOS, 2009). A expressão de ESBL pode ser codificada por diversos genes, sendo *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} os mais frequentemente detectados (BUSH, 2010; BUSH, 2013).

Durante a última década de 90, as ESBL do tipo TEM e SHV eram as enzimas dominantes, relacionadas principalmente a surtos nosocomiais causados por *K. pneumoniae* (PATERSON; BONOMO, 2005). No entanto, no século 21, a disseminação mundial de *E. coli* produtora de CTX-M tem sido alarmante, mostrando uma mudança na epidemiologia das ESBL, principalmente devido ao reconhecimento de vários clones e elementos genéticos que carregam esses genes (CHONG *et al.*, 2011; DALLENE *et al.*, 2010).

No Brasil, a maior preocupação inclui as altas taxas de resistência encontradas em *K. pneumoniae* e *E. coli*, embora as ESBL estejam amplamente disseminadas entre os membros da família *Enterobacteriaceae* e sejam descritas como enzimas do tipo TEM, SHV, CTX-M, VEB, BES e GES em diferentes Estados. Contudo, as enzimas dos grupos CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-9 têm sido relatadas

como as mais prevalentes em território brasileiro (SILVA; LINCOPAN, 2012). Neste estudo mostramos que a enzima mais detectada foi TEM, seguida de SHV. Já CTX-M apresentou menor prevalência nas amostras avaliadas, não corroborando, assim, os dados acima.

Estudo realizado em Portugal mostrou que, das 124 enterobactérias resistentes a cefalosporinas de terceira geração, 86,3% eram produtoras de ESBL, sendo o tipo CTX-M o mais prevalente (66,1%), enquanto 41,1% expressavam a enzima TEM (JONES-DIAS *et al.*, 2013). No trabalho de Fernandes e colaboradores (2014) foi realizada a caracterização molecular de ESBL provenientes de enterobactérias recuperadas de diversos espécimes clínicos e *bla*_{TEM} foi o gene mais prevalente, sendo identificado em 40,9% das amostras, seguido por *bla*_{CTX-M} (37,3%) e *bla*_{SHV} (23,3%). A prevalência de *bla*_{TEM} no nosso estudo (presente em 61,3% das amostras) corroborou os dados desta pesquisa.

No presente trabalho, foi possível observar a co-existência de genes codificadores de β -lactamases em várias amostras bacterianas, especialmente entre as de *K. pneumoniae*. Isso pode ser explicado pelo fato de alguns genes de β -lactamases pertencerem a um mesmo grupo de plasmídeos, além de contribuir para a compreensão da rápida disseminação desses genes no ambiente nosocomial (POIREL; NORDMANN, 2012).

De acordo com a literatura, a grande maioria das enzimas SHV são ESBL, exceto SHV-1 e SHV-11, e a maioria das linhagens de *K. pneumoniae* albergam em seu cromossomo o gene *bla*_{SHV-1} (HERITAGE *et al.*, 1999). Então, a alta frequência do gene *bla*_{SHV} em amostras de *K. pneumoniae* (70%) em nosso trabalho corrobora os dados da literatura; entretanto, somente através do sequenciamento desses genes será possível dizer se são, realmente, codificadores de ESBL, visto que 98% das amostras carreadoras de *bla*_{SHV} também albergavam outro gene de β -lactamases.

Dentre as amostras de *Enterobacter* spp. também foram observados elevados níveis de detecção de genes codificadores de ESBLs e carbapenemases. A maioria das amostras albergava o gene *bla*_{TEM}, que, no gênero *Enterobacter*, apresenta localização plasmidial (POIREL *et al.*, 2012). No trabalho de Nogueira e colaboradores (2014), foi apresentada uma variação do tipo de CTX-M de acordo com a espécie bacteriana avaliada. Houve um predomínio de CTX-M-2 em amostras de *E. cloacae*, enquanto em amostras de *E. aerogenes* foi detectada apenas CTX-M-59. Nossos resultados, nos quais o tipo de CTX-M pode ser mais prevalente em uma determinada

espécie do que em outra, corroboram estes dados da literatura. No presente estudo, o gene *bla*_{CTX-M} foi detectado somente nas amostras de *E. aerogenes*.

No estudo de Souna *et al.*, (2014), 42 amostras de *E. cloacae* foram recuperadas de diversos tipos de infecções nosocomiais, a fim de se determinar a prevalência e o perfil genotípico das ESBL. Todas as amostras foram positivas para *bla*_{TEM}, 27 carregaram os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} e apenas três espécies carregavam *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}. Em nosso trabalho também foi mostrada uma baixa frequência do gene *bla*_{SHV} nesta espécie.

O gene codificador de β -lactamase mais detectado em todas as amostras avaliadas no presente estudo, foi o *bla*_{TEM} e, a co-existência de *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} esteve presente nos três grupos bacterianos. Em *E. coli*, este fato foi observado em 30% das amostras avaliadas. Estudos já mostraram que a presença da enzima TEM é frequentemente encontrada em amostras clínicas que expressam CTX-M (SALVERDA *et al.*, 2010). Em um estudo de vigilância realizado na Suécia entre 2001-2006, as enzimas CTX-M e TEM foram detectadas em 92% e 63% das amostras de *E. coli*, respectivamente e, em 62% dessas amostras, ocorreu a co-existência de TEM e CTX-M (FANG *et al.*, 2008). Lina e colaboradores (2014) analisaram a presença de genes de β -lactamases em amostras de *E. coli* em diferentes hospitais em Bangladesh (2003-2007) e observaram que, das 40 amostras produtoras de ESBL, todas albergavam os genes *bla*_{CTX-M-1} e *bla*_{CTX-M-15}; além disso, 33 amostras também carregavam *bla*_{TEM}.

A produção de carbapenemases em enterobactérias tem se tornado endêmica em muitas regiões do mundo, especialmente entre as amostras de *K. pneumoniae*. A emergência de KPC tem se tornado um desafio às terapias antimicrobianas (MIRIAGOU *et al.*, 2010; TUON *et al.*, 2012). Infecções da corrente sanguínea causadas por *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (KPC) têm sido associadas com altas taxas de mortalidade (ZARKOTOU *et al.*, 2011). Neste estudo verificamos que a quase totalidade das amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC apresentavam fenótipo de multirresistência. De acordo com a literatura, bactérias produtoras de KPC são, frequentemente, resistentes a outras classes de antimicrobianos, tais como fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e tetraciclina (BUSH, 2010). Foi possível observar também que a detecção de *bla*_{KPC} estava mais associada às *K. pneumoniae* isoladas de pacientes nos CTIs. Em um estudo de vigilância realizado em quatro hospitais do Brooklyn, Nova Iorque, em 2004, foi verificada a ocorrência de isolamento de *K. pneumoniae* produtora de KPC em 35 a 40% dos pacientes internados em CTIs, sendo,

também, observadas elevadas taxas de mortalidade associada as estes pacientes (BUSH, 2010).

Estudo brasileiro do programa *Bacterial Nosocomial Infection Resistance Surveillance*, realizado em 11 hospitais, em cinco diferentes estados do País, com o objetivo de avaliar a relação clonal entre as amostras, verificou que das 57 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de KPC-2, também albergavam alguns genes de β -lactamases. Os genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, e *bla*_{TEM} foram detectados em 74%, 91% e 67% das amostras isoladas, respectivamente (SEKI *et al.*, 2011). Nosso trabalho, que mostrou a co-existência do gene *bla*_{KPC} com outros genes de ESBL nas amostras de *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. (31,7% e 18,5%, respectivamente), corrobora esses dados.

A investigação da presença de genes determinantes da produção de AmpC plasmidial pela técnica de PCR no presente estudo, não identificou nenhum destes genes procurados (CMY, DHA e FOX). Como estes são os mais comumente descritos na literatura, consideramos que a resistência à cefoxitina nas amostras avaliadas, possa ser decorrente de outros mecanismos de resistência, como a produção de carbapenemases associada à perda de porinas (POIREL; PITOUT; NORDMANN, 2007; THOMSON, 2010). Entretanto, este foi apenas um estudo preliminar. Oportunamente, a resistência à cefoxitina apresentada pelas amostras clínicas neste trabalho poderá ser objeto de estudo, considerando a importância deste mecanismo no contexto da resistência aos antimicrobianos (PITOUT *et al.*, 2009). A padronização da técnica de PCR, com a inclusão de outros iniciadores específicos e o estudo do perfil de porinas na membrana externa, também será necessária.

Neste estudo mostramos uma amostra de *E. coli* com produção de AmpC confirmada por metodologia fenotípica e genotípica, para o gene *bla*_{AmpC}. Entretanto, somente com os resultados destes ensaios não foi possível concluir a origem desta enzima. Estudos de sequenciamento serão necessários para confirmar se a *E. coli* (amostra 105), albergava o gene *bla*_{AmpC} em seu cromossomo ou se este se encontrava inserido em um plasmídio.

6.4 Similaridade Genética

A genotipagem pelo ERIC-PCR se baseia na análise de sequências cromossômicas repetidas, sendo usada para a caracterização clonal de diferentes espécies e estudo da relação genética entre amostras (COSTA *et al.*, 2006). Segundo Silbert e colaboradores (2004) é uma metodologia reprodutível e com poder discriminatório semelhante ao gerado pelo PFGE, considerada como padrão-ouro para estudos de tipagem molecular.

No presente estudo, foram empregados, com sucesso, ensaios de ERIC-PCR para a amplificação e caracterização do perfil genético das amostras de *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. aerogenes* e *E. cloacae*, embora três amostras não foram amplificadas por essa metodologia.

Dentre as amostras de *K. pneumoniae* avaliadas, observou-se que várias delas apresentavam o gene *bla*_{KPC}, e estas estavam distribuídas em diferentes setores hospitalares. Dentre elas vale-se citar a relação entre as amostras de número 15 e 10 (do Hospital A, carreando os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC}, oriundas dos setores, enfermaria e CTI, respectivamente); as de número 34 e 35 (carreando *bla*_{SHV} e *bla*_{KPC}, provenientes do CTI do hospital A) as de número 53 e 54 (do hospital B, carreando *bla*_{KPC}, provenientes da mesma enfermaria); 37, 40 e 57 (do hospital B, carreadoras dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, e *bla*_{KPC} oriundas de diferentes enfermarias e CTI). Esses dados são sugestivos de disseminação clonal.

Outro agrupamento que se destacou dentre as amostras de *K. pneumoniae* que seria sugestivo da disseminação clonal na mesma instituição hospitalar, é referente às amostras 42, 52, 43, 47 e 50, que pertencem ao um mesmo *cluster*, apresentam uma similaridade de 100%, albergam o gene *bla*_{KPC} (exceto a amostra 42), tiveram origem em diversos setores do hospital B e foram isoladas em diferentes meses dos anos de 2013 e 2014. Os dados apontam para a persistência de um mesmo clone bacteriano multiresistente ao longo deste ano em estudo.

No contexto da multirresistência, o aumento do número de enterobactérias produtoras de carbapenemase é bastante preocupante, devido ao fato de que os carbapenêmicos representam a última linha de antimicrobianos que ainda são realmente efetivos para tratamento de diversas infecções provocadas por enterobactérias (NORDMANN; CORNAGLIA, 2012).

Assim como os microrganismos produtores de ESBL, os produtores de KPC se disseminaram rapidamente pelo mundo. A presença de plasmídeos carreando genes de carbapenemases e β -lactamases de espectro estendido é a principal responsável pelo fenótipo de multirresistência entre as enterobactérias (WALSH, 2010).

No trabalho de Fernandes e colaboradores (2014), desenvolvido no norte de Portugal, foi utilizada a mesma técnica de ERIC-PCR para analisar a similaridade existente entre amostras de enterobactérias produtoras de β -lactamases, tendo sido observado um alto grau de diversidade genética entre as amostras. As amostras de *E. coli* foram agrupadas em 10 *clusters* distintos, enquanto *K. pneumoniae* se agrupou em cinco. Estas análises detectaram relações filogenéticas distintas entre as diferentes amostras das enterobactérias avaliadas.

No presente estudo foi possível observar que entre as amostras de *E. coli* houve a formação de 3 agrupamentos distintos e todos com um alto índice de similaridade. A co-existência dos genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} foi comum no *cluster* II. Também foi possível destacar a presença da amostra 105 carreando *bla*_{AmpC} e apresentando um perfil de similaridade de 90% com a amostra 104, que albergava o gene *bla*_{CTX-M}.

Os plasmídeos contendo *bla*_{AmpC} são, em geral, transferíveis e contém outros genes de resistência associados (JACOBY, 2009; THOMSON, 2010). A presença de microrganismos carreando genes de ESBL e AmpC, vai limitar as opções terapêuticas, visto que estas amostras são geralmente resistentes a praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos, exceto cefepime e carbapenêmicos. Essas amostras são uma grande preocupação em IRAS, exigindo um constante monitoramento em estudos de vigilância (SOUNA *et al.*, 2014)

Para as análises filogenéticas em *E. coli* produtoras de ESBL isoladas de animais utilizados para alimentação, Kar e colaboradores (2014) utilizaram as técnicas de ERIC-PCR e *Random Amplified Polymorphic DNA* (RAPD). Através das análises geradas pelo ERIC-PCR em 18 amostras de *E. coli* foi possível encontrar fragmentos de diferentes tamanhos, variando de 104 a 3222 pb, distribuídos em 4 *clusters* de acordo com o padrão de banda apresentado. Os autores puderam concluir pela eficiência de ambas as técnicas (ERIC e RAPD) para diferenciação das amostras de *E. coli* produtoras de ESBL e que essas tinham origem em uma única linhagem.

As análises feitas com as amostras de *Enterobacter* spp., no presente trabalho mostraram uma provável disseminação de populações clonais circulando em

instituições hospitalares diferentes. As amostras de *E. cloacae* de número 76 e 72, provenientes dos hospitais C e E, respectivamente, apresentaram padrões de bandas idênticos (100% de similaridade) e presença do gene *bla*_{TEM} na amostra 76. Outro exemplo sugestivo deste tipo de disseminação foi observado com as amostras de *E. aerogenes* de número 80, 81, 85 e 79. Os dados indicam circulação de clones carregando *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} entre os hospitais B e D. É interessante destacar que o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos apresentado por essas amostras eram idênticos. Essa relação sugere que a disseminação destas amostras entre esses hospitais possa ter ocorrido por diferentes vias, como os profissionais da área da saúde e a transferência de pacientes inter-hospitalar.

O gênero *Enterobacter* tem grande relevância nos processos infecciosos nosocomiais. O uso crescente de cefalosporinas de terceira geração vem contribuindo para aumentar a prevalência de estirpes resistentes. É um desafio para os médicos e microbiologistas reconhecer padrões de susceptibilidade indicativo da presença de β -lactamases, principalmente nas amostras de *Enterobacter* spp..

7. SÍNTESE DE RESULTADOS E CONCLUSÕES

- A resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos, avaliada através de sistema automatizado, mostrou que são altos os índices de resistência em *Enterobacter* spp. e *E. coli*, assim como entre as amostras de *K. pneumoniae*. Também foi possível observar altos níveis de resistência a outras classes de antimicrobianos como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.
 - Os resultados obtidos com os dois testes utilizados para a pesquisa de ESBL apresentaram resultados similares para o TSDD e Etest. O THM mostrou um ótimo desempenho para com as amostras de *K. pneumoniae*, comparando-se com os resultados da PCR. As metodologias testadas para pesquisa de AmpC apresentaram uma baixa sensibilidade, sugerindo que mais estudos seriam necessários para aperfeiçoamento das técnicas.
 - Pelo menos um dos genes codificadores de ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}) foi detectado em quase 80% das amostras estudadas.
 - A presença do gene *bla*_{KPC} foi detectada em, praticamente, metade das amostras de *K. pneumoniae*. Índices significativos também foram encontrados nas amostras de *Enterobacter* spp.
 - O gene *bla*_{AmpC}, codificador de cefalosporinases, foi detectado em apenas uma amostra de *E. coli*.
- Os resultados do presente estudo enfatizam a necessidade de cuidado especial com os altos os índices de resistência em *Enterobacter* spp. e *E. coli* e, mais preocupante, ainda, com relação a *K. pneumoniae*, tanto com relação aos antimicrobianos β -lactâmicos, como outras classes de antimicrobianos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos.
- Os resultados do presente estudo permitem sugerir que algumas populações clonais idênticas estejam circulando entre os Hospitais em estudo. A possibilidade de que este fenômeno se deva à disseminação por profissionais da área de saúde e por transferência de pacientes entre os hospitais reforça a necessidade de atenção especial no manuseio e monitoramento dos pacientes, e rigoroso suporte das comissões de controle de infecção, em especial na prevenção

REFERÊNCIAS

ABEGG, Patricia Terron Ghezzi M.; SILVA, Ligiane de Lourdes da. Controle de infecção hospitalar em unidade de terapia intensiva: estudo retrospectivo. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 32, n. 1, p.47-58, jan. 2011.

ABREU, Afonso Gomes *et al.* Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum β -lactamases-producing *Enterobacteriaceae* in northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 4, p.441-446, jul. 2011.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **NOTA TÉCNICA N° 01/2013: MEDIDAS DE PREVENÇÃO E CONTROLE DE INFECÇÕES POR ENTEROBACTÉRIAS MULTIRESISTENTES.** Brasília: 2013. 22 p.

AMBRETTI, Simone. Evaluation of Phenotypic and Genotypic Approaches for the Detection of Class A and Class B Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 3, p.212-215, 2013.

BARROS, Livia Moreira *et al.* Prevalência de microrganismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p.429-435, 2012.

BEBRONE, Carine *et al.* Current Challenges in Antimicrobial Chemotherapy: Focus on β -Lactamase Inhibition. **Drugs**, v. 70, n. 6, p.651-679. 2010.

BENNETT, Pm. Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. **British Journal Of Pharmacology**, v. 153, p.347-357, 2008.

BERTONCHELI, Claudia de Mello; HÖRNER, Rosmari. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 4, p.577-599, Dec. 2008.

BIRGY, André *et al.* Phenotypic Screening of Carbapenemases and Associated -Lactamases in Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p.1295-1302, abr. 2012.

BIRKETT, Christopher I. *et al.* Real-time TaqMan PCR for rapid detection and typing of genes encoding CTX-M extended spectrum β -lactamases. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, p.52-55, 2007.

BOGAERTS, Pierre *et al.* Emergence of NDM-1-Producing *Enterobacteriaceae* in Belgium. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 5, p.3036-3038, jun. 2011.

BONNET, R.. Growing Group of Extended-Spectrum. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, p.1-14, jan. 2004.

BOUCHER, Helen W. et al. Bad Bugs, No Drugs: No ESKAPE! An Update from the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p.1-12, jan. 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Novas Diretrizes Para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde. Maio de 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. PORTARIA N° 2.616, DE 12 DE MAIO DE 1998. Dispõe sobre a obrigatoriedade da manutenção pelos hospitais do país, de programa de controle de infecções hospitalares.

BRATU, Simona *et al.* Detection and Spread of *Escherichia coli* Possessing the Plasmid-Borne Carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Brief Report**, v. 44, n. 1, p.972-976, abr. 2007.

BURNS, K. et al. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Irish critical care units: results of a pilot prevalence survey, June 2011. **Journal Of Hospital Infection**, v. 83, p.71-73, jan. 2013.

BUSH, Karen. Alarming b-lactamase-mediated resistance in multidrug-resistant *Enterobacteriaceae*. **Current Opinion In Microbiology**, v. 13, p.558-564, 2010.

BUSH, Karen. Bench-to-bedside review: The role of β -lactamases in antibiotic-resistant Gram-negative infections. **Critical Care**, v. 14, p.1-8, 2010.

BUSH, Karen. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Antimicrobial Therapeutics Reviews: ANNALS OF THE NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES**, v. 5. p.84-90, jan. 2013.

BUSH, Karen. The ABCD's of b-lactamase nomenclature. **Journal Infect Chemotherapy**, v. 19, p.549-559, jul. 2013.

BUSH, Karen; FISHER, Jed F.. Epidemiological Expansion, Structural Studies, and Clinical Challenges of New β -Lactamases from Gram-Negative Bacteria. **The Annual Review Of Microbiology**, v. 65, p.455-478, jul. 2011.

BUSH, Karen; JACOBY, George A.. MINIREVIEW Updated Functional Classification of. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 54, n. 3, p.969-976, Mar. 2010.

BUSHNELL, Greta et al. Emergence of New Delhi metallo-b-lactamase type 1-producing *Enterobacteriaceae* and non-*Enterobacteriaceae*: global case detection and bacterial surveillance. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 17, p.325-333, 2013.

CAI, Jia Chang *et al.* Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* Isolates Possessing the Plasmid-Mediated Carbapenem-Hydrolyzing. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 6, p.2014-2018, June 2008.

CANTO, Rafael; RUIZ-GARBAJOSA, Patricia. Co-resistance: an opportunity for the bacteria and resistance genes. **Current Opinion In Pharmacology**, v. 11, p.477-485, ago. 2011.

CANTO', Rafael; COQUE, Teresa M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion In Microbiology**, v. 9, p.466-475, 2006.

CARATTOLI, A. Animal reservoirs for extended spectrum β -lactamase producers. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.117-123, 2008.

CARTELLE, Monica *et al.* Risk Factors for Colonization and Infection in a Hospital Outbreak Caused by a Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Expanded-Spectrum Cephalosporins. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 9, p.4242-4249, set. 2004.

CARVALHAES, Cecilia G. *et al.* Cloverleaf test (modified Hodge test) for detecting carbapenemase production in *Klebsiella pneumoniae*: be aware of false positive results. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p.249-251, 2010.

CARVALHO-ASSEF, Ana Paula D'alincourt *et al.* Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 2013, p.2956-2957, jul. 2013.

CASTANHEIRA, Mariana *et al.* Antimicrobial Activities of Tigecycline and Other Broad-Spectrum Antimicrobials Tested against Serine Carbapenemase and Metallo. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 2, p.570-573, fev. 2008.

CELENZA, G *et al.* Spread of *bla* (CTX-M-type) and *bla* (PER-2) β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 5, p.975-978, mai. 2006.

CHEN, Liang *et al.* Multiplex Real-Time PCR Assay for Detection and Classification of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Gene (*bla*_{KPC}) Variants. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 2, p.579-585, fev. 2011.

CHEN, Zhenhua *et al.* Molecular epidemiology of carbapenem-resistant *Acinetobacter* spp. from Xiang Ya Hospital, in Hunan Province, China. **Journal Basic Microbiology: Environment Health Techniques**, v. 53, p.121-127, dez. 2011.

CHEONG, Hae Suk *et al.* Clinical Significance of Infections Caused by Extended-Spectrum b-Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* Blood Isolates with Inducible AmpC b-Lactamase. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p.446-452, 2012.

CHONG, Yong *et al.* Genetic evolution and clinical impact in extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Infection*, **Genetics And Evolution**, v. 11, p.1499-1504, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-fourth Informational Supplement. V.34 No.1, M100-S24, 2014.

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

COUDRON, Philip E. Inhibitor-Based Methods for Detection of Plasmid-Mediated AmpC. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p.4163-4167, ago. 2005.

CURRIE, Brian. The Emergence of Carbapenemase-Producing *Enterobacteriaceae*. **Infectious Disease Special Edition**, v. 1, n. 1, p.9-13. 2012.

CURY, Ana Paula *et al.* The modified Hodge test is a useful tool for ruling out *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase. **Clinics**, v. 67, n. 12, p.1427-1431, 2012.

D’COSTA, Vanessa M. Antibiotic resistance is ancient. **Nature**, v. 477, p.457-461, set. 2011.

DALLENNE, Caroline *et al.* Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important β -lactamases in *Enterobacteriaceae*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p.490-495, jan. 2010.

DAUR, Alessandra Vale. **AVALIAÇÃO DE MÉTODOS FENOTÍPICOS DE DETECÇÃO DE β LACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO EM *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca* E *Escherichia coli***. 2009. 91 f. Dissertação (Mestre) - Curso de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Parasitologia e Patologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

DAVIES, J; DAVIES, D. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p.417-433, set. 2010.

DAVIES, Julian. Antibiotic Resistance in and from Nature. **Microbiol Spectrum**, v. 1, n. 1, p.1-7, out. 2013.

DENISUIK, Andrew J. *et al.* Molecular epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-, AmpC β -lactamase- and carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolated from Canadian hospitals over a 5 year period: CANWARD 2007–11. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 68, n. 1, p.i57-i65, 2013.

DHILLON, Rishi H.-p.; CLARK, John. ESBLs: A Clear and Present Danger? **Critical Care Research And Practice**, v. 2012, p.1-12, abr. 2012.

DICK, Andrew W. *et al.* A decade of investment in infection prevention: A cost-effectiveness analysis. **American Journal Of Infection Control**, v. 43, p.4-9, 2015.

DOI, Yohei; PATERSON, David L.. Detection of plasmid-mediated class C β -lactamases. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 11, p.191-197, set. 2007.

DONG, Y *et al.* Investigation of Genetic Diversity of the bla_{SHV} Gene and Development of an Oligonucleotide Microarray to Detect Mutations in the bla_{SHV} Gene. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 6, p.539-545, 2012.

DRIEUX, L. *et al.* Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.90-103, 2008.

DROPA, M. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum β -lactamase gene variants bla_{SHV-40} , $bla_{TEM-116}$ and the class 1 integron associated bla_{GES-7} in Brazil. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 16, n. 6, p.630-632, June 2010.

EDELSTEIN, M. *et al.* Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p.3724-3732, Dec. 2003.

ELLINGTON, Matthew J. *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- β -lactamases. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.321-322, dez. 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_121222.pdf>. Acesso em: 12 jan. 2014.

EUZÉBY, J. **LPSN Bacterio. net.** Disponível em: <<http://www.bacterio.net>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

FALAGAS, M.E.; KARAGEORGOPOULOS, D.E. Extended-spectrum β -lactamase-producing organisms. **Journal of Hospital Infection**, v. 73, p.345-354, 2009.

FALLAH, F *et al.* Determination of Integron Frequency by a Polymerase Chain Reaction–Restriction Fragment Length Polymorphism Method in Multidrug-Resistant *Escherichia coli*, Which Causes Urinary Tract Infections. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 6, p.546-549, 2012.

FANG, Hong *et al.* Molecular Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamases among *Escherichia coli* Isolates Collected in a Swedish Hospital and Its Associated Health Care Facilities from 2001 to 2006. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 2, p.707-712, fev. 2008.

FERNANDES, Rúben *et al.* Molecular Characterization of ESBL-Producing *Enterobacteriaceae* in Northern Portugal. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p.1-6, fev. 2014.

FIGUEIREDO, Deuseli Quaresma de *et al.* First report of the *bla*_{OXA-58} gene in a clinical isolate of *Acinetobacter baumannii* in Rio de Janeiro, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 106, n. 3, p.368-370, maio 2011.

FRIEDRICH, Torben *et al.* High-throughput microarray technology in diagnostics of enterobacteria based on genome wide probe selection and regression analysis. **Bmc Genomics**, v. 11, n. 591, p.1-22, 2010.

GALES, Ana C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY *Antimicrobial Surveillance Program* (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 73, p.354-360, 2012.

GANN, Patrick Mc *et al.* Complete Sequence of a Novel 178-Kilobase Plasmid Carrying *bla*_{NDM-1} in a *Providencia stuartii* Strain Isolated in Afghanistan. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p.1673-1679, jan. 2012.

GARREC, Helene *et al.* Comparison of Nine Phenotypic Methods for Detection of Extended-Spectrum β -Lactamase Production by *Enterobacteriaceae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 3, p.1048-1057, mar. 2011.

GAZIN, M *et al.* Current Trends in Culture-Based and Molecular Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Harboring and Carbapenem-Resistant *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 4, p.1140-1146, abr. 2012.

GIRLICH, Delphine; POIREL, Laurent; NORDMANN, Patrice. Value of the Modified Hodge Test for Detection of Emerging Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 50, n. 2, p.477-479, fev. 2012.

GISKE, Christian G. *et al.* Redefining extended-spectrum b-lactamases: balancing science and clinical need. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p.1-4, out. 2008.

GUILARDE, A.O *et al.* Bacteremias em pacientes internados em hospital universitário. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 53, n. 1, p.34-42, jan. 2007.

HARADA, Sohei; ISHII, Yoshikazu; YAMAGUCHI, Keizo. Extended-spectrum β -Lactamases: Implications for the Clinical Laboratory and Therapy. **Clinical Microbiology**, v. 28, p.401-412, out. 2008.

HAWKEY. Prevalence and clonality of extended-spectrum b-lactamases in Asia. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.159-165, 2008.

HERITAGE, J *et al.* Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p.309-318, 1999.

HO, P.L *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 6, p.1553-1555, jun. 2012.

HO, Pak-leung *et al.* Identification and characterization of a novel incompatibility group X3 plasmid carrying *bla*_{NDM-1} in *Enterobacteriaceae* isolates with epidemiological links to multiple geographical areas in China. **Emerging Microbes And Infections**, v. 39, n. 1, p.1-6, set. 2012.

HORAN, Teresa C. *et al.* CDC/NHSN surveillance definition of health care-associated infection and criteria for specific types of infections in the acute care settings. **American Journal Of Infection Control**, v. 36, n. 5, p.309-332, 2008.

HU, H *et al.* Novel plasmid and its variant harboring both a *bla*_{NDM-1} gene and type IV secretion system in clinical isolates of *Acinetobacter lwoffii*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 56, n. 4, p.1698-1702, abr. 2012.

JACOBY, George A. B-Lactamases AmpC. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 22, n. 1, p.161-182, jan. 2009.

JACOBY, George A.; MILLS, Debra M.; CHOW, Nancy. Role of β -Lactamases and Porins in Resistance to Ertapenem and Other β -Lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 48, n. 8, p.3203-3206, ago. 2004.

JONES-DIAS, Daniela *et al.* Diversity of Extended-Spectrum and Plasmid-Mediated AmpC β -Lactamases in *Enterobacteriaceae* Isolates from Portuguese Health Care Facilities. **Journal Of Microbiology**, v. 52, n. 6, p.496-503, 2014.

KAR, Debasish *et al.* Molecular and phylogenetic characterization of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Escherichia coli* isolated from poultry and cattle in Odisha, India. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 29, p.82-90, 2015.

KATUZNA, Ewelina; ZALAS-WIĘCEK, Patrycja; GOSPODAREK, Eugenia. Comparison of detection methods for extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* strains. **Postepy Hig Med Dosw**, v. 68, p.808-813, 2014.

KAUR, Jaspal *et al.* Modified Double Disc Synergy Test to Detect ESBL Production in Urinary Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. **Journal Of Clinical And Diagnostic Research**, v. 7, n. 2, p.229-233, 2013.

KIM, Eu Suk; HOOPER, David C.. Clinical Importance and Epidemiology of Quinolone Resistance. **Infection Chemotherapy**, v. 46, n. 4, p.226-238, 2014.

KIM, Jungmin; LIM, Yu-mi. Prevalence of Derepressed AmpC Mutants and Extended-Spectrum. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p.2452-2455, May 2005.

KONEMAN, E. *et al.* **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 1465p.

KRAKER, Marlieke E. A. de *et al.* Mortality and Hospital Stay Associated with Resistant *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Bacteremia: Estimating the Burden of Antibiotic Resistance in Europe. **Plos Medicine**, v. 8, n. 10, p.1-8, out. 2011.

LEE, Jung Hun *et al.* New Definitions of Extended-Spectrum b-Lactamase Conferring Worldwide Emerging Antibiotic Resistance. **Medicinal Research Reviews**, v. 32, n. 1, p.216-232, 2012.

LEE, Kyungwon *et al.* Biochemical Characterization of the TEM-107 Extended-Spectrum. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 12, p.5930-5932, Dec. 2011.

LEISER, Jacir Júlio; TOGNIM, Maria Cristina Bronharo; BEDENDO, João. Infecções Hospitalares Em Um Centro de Terapia Intensiva De Um Hospital De Ensino No Norte Do Paraná. **Ciência Cuidado em Saúde**, v. 2, n. 6, p.181-186, abr. 2007.

LIN, Chin-fu *et al.* Genotypic detection and molecular epidemiology of extended-spectrum b-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a regional hospital in central Taiwan. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, p.665-671, 2010.

LINA, Taslima T. *et al.* Phenotypic and Molecular Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* in Bangladesh. **Plos One**, v. 9, n. 10, p.1-7, out. 2014.

LING, Thomas K. W. *et al.* Multicenter Antimicrobial Susceptibility Survey of Gram-Negative Bacteria Isolated from Patients with Community-Acquired Infections in the People's Republic of China. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p.374-378, jan. 2006.

LIVERMORE, D. M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.3-10, 2008.

LIVERMORE, David M. B-Lactamases in Laboratory and Clinical Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 4, p.557-584, out. 1995.

LIVERMORE, David M.. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v. 27, p.128-142, 2012.

LIVERMORE, David M.. Fourteen years in resistance. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 39, p.283-294, jan. 2012.

LIVERMORE, David M.; BROWN, Derek F. J.. Detection of b-lactamase-mediated resistance. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 1, p.59-64, 2001.

LIVERMORE, David M.; BROWN, Derek F. J.. **Detection of β -lactamase-mediated resistance**. Cambridge: 2005. 16 p.

LÓPEZ-CEREROA, Lorena *et al.* Characterization of the first ongoing outbreak due to KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* (ST512) in Spain. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 00, p.538-540, ago. 2014.

MARCOS, M *et al.* Effect of antimicrobial therapy on mortality in 377 episodes of *Enterobacter* spp. bacteremia. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 62, p.397-403, 2008.

MARSIK, Frederic J.; NAMBIAR, Sumathi. Review of Carbapenemases and AmpC- β Lactamases. **Pediatric Infectious Diseases**, v. 30, n. 12, p.1094-1095, Dec. 2011.

MARTINEZ, J.L; BAQUERO, F. Antibiotics and the Evolution of Antibiotic Resistance. **Encyclopedia of Life Sciences**, p.1-9, 2009.

MARTÍNEZ, Julio *et al.* How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of *Klebsiella*. **International Microbiology**, v. 7, p.261-268, 2004.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.. Extended-spectrum b-lactamases and the permeability barrier. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, p.82-89, 2008.

MEDEIROS, Antone A. Evolution and Dissemination of β -Lactamases Accelerated by Generations of (3-Lactam Antibiotics: RECENT INCREASES IN RESISTANCE: MECHANISMS AND ORGANISMS. **Clinical Infectious Diseases**, v. 24, n. 11, p.19-45, jan. 1997.

MEYER, Gabriela; PICOLI, Simone Ulrich. Fenótipos de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* de hospital de emergência de Porto Alegre. **Jornal Brasileiro Patologia Medicina Laboratorial**, v. 47, n. 1, p.25-31, fev. 2011.

MEZZATESTA, M.L; GONA, F; STEFANI, S. *Enterobacter cloacae* complex: clinical impact and emerging antibiotic resistance. **Future Medicine**, v. 7, p.887-902, 2012.

MIRIAGOU, V. *et al.* Acquired carbapenemases in Gram-negative bacterial pathogens: detection and surveillance issues. **Clinical Microbiology And Infection**, v. 16, n. 2, p.112-122, fev. 2010.

MOLAND, Ellen Smith *et al.* Newer β -Lactamases: Clinical and Laboratory Implications, Part II. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 11, p.70-85, jun. 2008.

MONTEIRO, Jussimara *et al.* First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 1, p.333-334, jan. 2009.

MULLER, Sophia *et al.* Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamases and qnr Plasmid-Mediated Quinolone Resistance in German Isolates of *Enterobacter* Species. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p.99-103, 2011.

NAAS, Thierry *et al.* Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the b-lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 52, n. 4, p.1257-1263, abr. 2008.

NASEER, Umaer; SUNDSFJORD, Arnfinn. The CTX-M Conundrum: Dissemination of Plasmids and *Escherichia coli* Clones. **Microbial Drug Resistance**, v. 17, n. 1, p.83-97. 2011.

NOGUEIRA, Keite da Silva *et al.* Cefepime versus extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal Infection Disease**, v. 15, n. 2, p.167-169, 2011.

NOGUEIRA, Keite da Silva *et al.* Emergence of extended-spectrum b-lactamase producing *Enterobacter* spp. in patients with bacteremia in a tertiary hospital in southern Brazil. **Enfermedades Infecciosas Microbiología Clínica**, v. 32, n. 2, p.87-92, 2014.

NOGUEIRA, Paula Sacha Frota *et al.* Perfil da Infecção Hospitalar Em Um Hospital Universitário. **Revista de Enfermagem**, Rio de Janeiro, v. 17, n. 1, p.96-101, jan. 2009.

NOGUEIRA-MIRANDA, Keite da Silva *et al.* Detection of Extended-Spectrum b-Lactamase in *Enterobacter* spp.– Evaluation of Six Phenotypic Tests. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 1, p.66-70, 2012.

NORDMANN, Patrice; CUZON, Gaelle; NASS, Thierry. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase producing bacteria. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 9, p.228-236, abr. 2009.

NORDMANN, Patrice; NAAS, Thierry; POIREL, Laurent. Global Spread of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 10, p.1791-1798, out. 2011.

NORDMANN, Patrice; POIREL, Laurent; DORTET, Laurent. Rapid Detection of Carbapenemase producing *Enterobacteriaceae*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 9, p.1503-1507, set. 2012.

ODEH, R. *et al.* Broad Resistance Due to Plasmid-Mediated AmpC b-Lactamases in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 35, p.140-145, 2002.

OLIVEIRA, Adriana Cristina de; KOVNER, Christine Tassone; SILVA, Rafael Souza da. Infecção hospitalar em unidade de tratamento intensivo de um hospital universitário brasileiro. **Revista Latino Americana Enfermagem**, v. 2, n. 18, p.97-104, mar. 2010.

OLIVEIRA, Adriana Cristina *et al.* Infecções Relacionadas À Assistência Em Saúde E Gravidade Clínica Em Uma Unidade De Terapia Intensiva. **Revista Gaúcha Enfermagem**, v. 33, n. 3, p.89-96,2012.

ONNBERG, Anna *et al.* Molecular and phenotypic characterization of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum b-lactamases with focus on CTX-M in a low-endemic area in Sweden. **Apmis**, v. 119, p.287-295, 2011.

PAGE, Malcolm Gp; BUSH, Karen. Discovery and development of new antibacterial agents targeting Gram-negative bacteria in the era of pandrug resistance: is the future promising? **Current Opinion In Pharmacology**, v. 18, p.91-97, jul. 2014.

PALMER, Adam C.; KISHONY, Roy. Understanding, predicting and manipulating the genotypic evolution of antibiotic resistance. **Nature Reviews**, v. 14, p.243-248, abr. 2013.

PASTERAN, Fernando *et al.* Controlling False-Positive Results Obtained with the Hodge and Masuda Assays for Detection of Class A Carbapenemase in Species of

Enterobacteriaceae by Incorporating Boronic Acid. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p.1323-1332, abr. 2010.

PATERSON, David L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Association For Professionals In Infection Control And Epidemiology**, p.20-29, 2006.

PATERSON, David L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Ajic**, v. 34, n. 5, p.20-28, 2006.

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

PEIRANO, Gisele *et al.* Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, p.265-268, nov. 2008.

PEREIRA, Andrea dos Santos *et al.* Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 4, p.301-308, 2003.

PHILIPPON, Alain *et al.* MINIREVIEW. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 46, n. 1, p.1-11, jan. 2002.

PITOUT, J. D. D. *et al.* Detection of AmpC β -lactamases in *Escherichia coli*, *Klebsiella* spp., *Salmonella* spp. and *Proteus mirabilis* in a regional clinical microbiology laboratory. **Clinical Microbiology And Infection**, p. 165-170. fev. 2010.

PITOUT, Johann D D; LAUPLAND, Kevin B. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p.159-166, 2008.

PITOUT, Johann D D; LAUPLAND, Kevin B. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, p.159-166, 2008.

POIREL, L *et al.* Biochemical Sequence Analyses of GES-1, a Novel Class A Extended-Spectrum β -Lactamase, and the Class 1 Integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 44, n. 3, p.622-632, mar. 2000.

POIREL, L *et al.* ISCR2, Another Vehicle for bla_{VEB} Gene Acquisition. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 53, n. 11, p.4940-4943, nov. 2009.

POIREL, Laurent; BONNIN, Rémy A.; NORDMANN, Patrice. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum b-lactamases in Gram-negative rods, **Genetics And Evolution**, v. 12, p.883-893, 2012.

POIREL, Laurent; PITOUT, Johann D; NORDMANN, Patrice. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. **Future Microbiology**, v. 2, n. 5, p.501-512. 2007.

POURNARAS, Spyros; POULOU, Aggeliki; TSAKRIS, Athanassios. Inhibitor-based methods for the detection of KPC carbapenemase producing *Enterobacteriaceae* in clinical practice by using boronic acid compounds. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, p.1319-1321, 2010.

QUEENAN, Anne Marie; BUSH, Karen. Carbapenemases: the Versatile - Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p.440-458, jul. 2007.

QUEENAN, Anne Marie; BUSH, Karen. Carbapenemases: the Versatile. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p.440-458, July 2007.

QUILES, M.g. *et al.* Unusual association of NDM-1 with KPC-2 and armA among Brazilian Enterobacteriaceae isolates. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, v. 0, n. 0, p.1-4, out. 2014.

RAMAZANZADEH, Rashid; ZAMANI, Serveh; ZAMANI, Saman. Genetic diversity in clinical isolates of *Escherichia coli* by enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC)-PCR technique in Sanandaj hospitals. **Iran Journal Microbiology**, v. 5, n. 2, p.126-131, June 2013.

REINERT, Ralf Rene *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. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, p.1018-1029, jul. 2007.

RIBAS, Rosineide M. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections: Organisms, Risk Factors and Resistant Phenotypes in the Brazilian University Hospital. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 11, n. 3, p.351-354, jan. 2007.

RODRÍGUEZ-BANÑO, J.; NAVARRO, M. D.. Extended-spectrum b-lactamases in ambulatory care: a clinical perspective. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.104-110, 2008.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, Jose Manuel *et al.* Plasmid-mediated quinolone resistance: an update. **Journal Infection Chemotherapy**, v. 17, p.149-182, set. 2011.

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

ROZALES, Franciéli P. *et al.* Emergence of NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* in Porto Alegre, Brazil. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 25, p.79-81, 2014.

SADER, Helio S. *et al.* Pathogen Frequency and Resistance Patterns in Brazilian Hospitals: Summary of Results from Three Years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p.200-214, ago. 2001.

SALVERDA *et al.* Natural evolution of TEM-1 b-lactamase: experimental reconstruction and clinical relevance. **Fems Microbiology Reviews**, v. 15, n, p.1015-1036, Mar. 2010.

SANDERS JR, W. E; SANDERS, C.C. *Enterobacter* spp.: Pathogens Poised To Flourish at the Turn of the Century. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 2, p.220-241, abr. 1997.

SASIREKHA, B.; SHIVAKUMAR, Srividya. Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC b-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. **Indian Journal Microbiology**, v. 2, n. 52, p.174-179, June 2012.

SASIREKHA, B.; SHIVAKUMAR, Srividya. Occurrence of Plasmid-Mediated AmpC b-Lactamases Among *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates in a Tertiary Care Hospital in Bangalore. **Indian Journal Microbiology**, v. 52, n. 2, p.174-179, abr. 2012.

SEKI, Liliane M. *et al.* Molecular epidemiology of KPC-2- producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, v. 70, p.274-277, 2011.

SILBERT, Suzane *et al.* Evaluation of Three Molecular Typing Techniques for Non fermentative Gram-Negative Bacilli. **Infection Control And Hospital Epidemiology**, Chicago, v. 25, n. 10, p.847-851, 2004.

SILVA, Ketrin Cristina da; LINCOPAN, Nilton. Epidemiologia das β -lactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** , v. 48, n. 2, p.91-99, abr. 2012.

SINGH, Rajkumar Manojkumar; SINGH, Huidrom Lokhendro. Comparative evaluation of six phenotypic methods for detecting extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Journal Infection Dev. Ctries**, v. 8, n. 4, p.408-415, 2014.

SOMPOLINSKY, David *et al.* Integron-mediated ESBL resistance in rare serotypes of *Escherichia coli* causing infections in an elderly population of Israel. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 55, n. 1, p.119-122, Dec. 2004.

SOUNA, D. *et al.* Molecular typing and characterization of TEM, SHV, CTX-M, and CMY-2-lactamases in *Enterobacter cloacae* strains isolated in patients and their hospital environment in the west of Algeria. **Médecine Et Maladies Infectieuses**, v. 44, p.146-152, 2014.

SPANU, Teresa *et al.* Evaluation of the New VITEK 2 Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) Test for Rapid Detection of ESBL Production in *Enterobacteriaceae* Isolates. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 9, p.3257-3262, set. 2006.

STUMPF, Anita N.; ROGGENKAMP, Andreas; HOFFMANN, Harald. Specificity of enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic palindromic polymerase chain reaction for the detection of clonality within the *Enterobacter cloacae* complex. **Diagnostic Microbiology And Infectious Disease**, n. 53, p.9-16, 2005.

SUPERTI, Silvana Vargas; AUGUSTI, Gustavo; ZAVASCKI, Alexandre Prehn. Risk Factors for and mortality of extended-Spectrum-b-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* And *Escherichia coli* Nosocomial Bloodstream Infections. **Revista do Instituto Medicina Tropical**, São Paulo, v. 55, n. 4, p.211-216, jul. 2009.

SURVEILLANCE REPORT: Annual epidemiological report on communicable diseases in Europe. Stockholm, 2010. <http://www.ecdc.europa.eu> acesso em 15 de janeiro de 2014.

TAN, T *et al.* Evaluation Screening Methods To Detect Plasmid-Mediated AmpC in *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, p.146-149, jan. 2009.

TANI, Zaket Baba Ahmed-kazi *et al.* Molecular and Epidemiological Characterization of Enterobacterial Multidrug-Resistant Strains in Tlemcen Hospital (Algeria) (2008–2010). **Microbial Drug Resistance**, v. 19, n. 3, p.185-190. 2013.

TENOVER, Fred C. *et al.* Identification of Plasmid-Mediated AmpC. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 47, n. 2, p.294-299, Fev. 2009.

THEURETZBACHER, Ursula. Resistance drives antibacterial drug development. **Science Direct**, v. 11, p.433-438, 2011.

THAI, Q.K; PLEISS, J. SHV Lactamase Engineering Database: a reconciliation tool for SHV b-lactamases in public databases. **BMC Genomics**, v. 11, p.1-8, out. 2010.

THOMSON, Kenneth S. Controversies about Extended-Spectrum and AmpC B-Lactamases. **Special Issue**, v. 7, n. 2, p.333-336, Mar. 2001.

THOMSON, Kenneth S. Extended-Spectrum--Lactamase, AmpC, and Carbapenemase Issues. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p.1019-1025, abr. 2010.

TOFTELAND, Stale *et al.* Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum--Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 1, p.199-205, jan. 2007.

TRECARICHI, E.M; CAUDA, R; TUMBARELLO, M. Detecting risk and predicting patient mortality in patients with extended-spectrum b-lactamase producing *Enterobacteriaceae* bloodstream infections. **Future Medicine**, v. 7, n. 10, p.1173-1189, 2012.

TSAI, Yu-kuo *et al.* *Klebsiella pneumoniae* Outer Membrane Porins OmpK35 and OmpK36 Play Roles in both Antimicrobial Resistance and Virulence. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 55, n. 4, p.1485-1493, abr. 2011.

TUON, F.F; BIANCHET, L.C; PENTEADO-FILHO, S.R. Epidemiology of extended spectrum β -lactamase producing *Enterobacter* bacteremia in a Brazilian hospital. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 4, p.452-454, jul. 2010.

TUON, Felipe F. *et al.* Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p.416-419, June 2012.

TUON, Felipe F. *et al.* Risk factors for KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* bacteremia. **The Brazilian Journal Of Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p.416-419, 2012.

TZELEPI, Eva *et al.* Detection of Extended-Spectrum b-Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacter cloacae* and *Enterobacter aerogenes*. **Journal Of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p.542-546, fev. 2000.

VIALE, Pierluigi *et al.* Predictors of mortality in multidrug resistant *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infections. **Expert Review Of Anti-infective Therapy**, Itália, v. 11, n. 10, p.1053-1063, out. 2013.

VILLEGAS, M. V.. Prevalence of extended-spectrum b-lactamases in South America. **Clinical Microbiology And Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p.154-158, 2008.

VILLEGAS, Maria Virginia *et al.* First Detection of the Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2 in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p.2880-2882, ago. 2006.

WAGENLEHNER *et al.* Incidence of nosocomial urinary tract infections on a surgical intensive care unit implications for management. **International Journal Antimicrobial Agents**. 2006; 28(1): 86-90.

WALSH, Timothy R. Emerging carbapenemases: a global perspective. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, p.8-14, 2010.

WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. Class A carbapenemases. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 1, p.470-482, jun. 2007.

WATANABE, Tsutomu. Episome-Mediated Transfer of Drug Resistance in *Enterobacteriaceae*: High-Frequency Resistance Transfer System in *Escherichia Coli*. **Journal Bacteriology**, v. 85, p.788-794, 1963.

WIEGAND, Irith *et al.* Detection of Extended-Spectrum B-Lactamases among *Enterobacteriaceae* by Use of Semi automated Microbiology Systems and Manual Detection Procedures. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p.1167-1174, abr. 2007.

WIELER, Lothar H. *et al.* Methicillin-resistant staphylococci (MRS) and extended-spectrum beta-lactamases (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in companion animals: Nosocomial infections as one reason for the rising prevalence of these potential zoonotic pathogens in clinical samples. **International Journal Of Medical Microbiology**, v. 301, n. 00, p.635-641, 2011.

WILLEMS, Elise *et al.* Towards a phenotypic screening strategy for emerging -lactamases in Gram-negative bacilli. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 41, p.99-109, 2013.

WILSON, Lindsay A.; SHARP, Paul M. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus (ERIC) Sequences in *Escherichia coli*: Evolution and Implications for ERIC-PCR. **Molecular Biology And Evolution**, v. 23, n. 6, p.1157-1168, Mar. 2003.

WISPLINGHOFF, Hilmar *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **MAJOR ARTICLE**, v. 39, n. 00, p.309-317, ago. 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report on the burden of endemic health care-associated infection worldwide: Clean Care is Safer Care, Geneva, 2011. p. 40.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action. Geneva: World Health Organization, 2012. p.12.

ZARKOTOU, O. *et al.* Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, p.1798-1803, mar. 2011.

ZHANG, Youjiang *et al.* Characterization of Clinical Multidrug-Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Isolates, 2007–2009, China. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 5, p.465-470, 2012.

ZHAO *et al.* Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Critical Reviews In Microbiology**, v. 39, n. 1, p.79-101, fev. 2013.

KAPER, J.b; NATARO, J.p; MOBLEY, H.l.t. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews**, v. 2, p.123-140, fev. 2004.

APÊNDICE IA

Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Klebsiella pneumoniae* (n=51) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Código da Amostra	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS											
			ERT		MER		IMP		AMI		GEN		CIP	
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT
10	SP	CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
11		CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
12		CTI	>=8	R	1	S	1	R*	8	S	<=1	S	>=4	R
13		ENF	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
14		CTI	>=8	R	1	S	2	I	4	S	<=1	S	>=4	R
15		ENF	>=8	R	1	S	2	I	8	S	<=1	S	>=4	R
19		ENF	>=8	R	4	R	2	I	<=2	S	>=16	R	>=4	R
20		CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
30		CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
31		CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
32		CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
33		CTI	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	>=4	R
34		CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
35		CTI	4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
25		SC	CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	16	S	>=16	R	>=4
26	ENF		<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
27	CTI		4	R	1	S	<=1	S	4	S	<=1	S	>=4	R
28	BERÇARIO		<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	16	S	>=16	R	1	S

29		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
16		SALA DE URGÊNCIA	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
18		CTI	>=8	R	1	S	1	R*	16	S	>=16	R	1	S
17	João XXIII	CTI	4	R	1	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	>=4	R
36		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<=0.25	S
37		ENF 7ºNorte	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
38		ENF 8 º Sul	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	8	S	>=16	R	1	S
39		PA	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	8	S	>=16	R	<=0.25	S
40		ENF 4º Oeste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
41		ENF 7º Leste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	16	S	>=16	R	0.5	S
42		ENF 10º Sul	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	4	S	>=16	R	>=4	R
43		PA	4	R	>=16	R	>=16	R	<=2	S	<=1	S	>=4	R
44		ENF 4º Andar	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	<=0.25	S
45		CTI- Pediatrico	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	<=1	S	<=0.25	S
46	HC	ENF 7º Leste	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	>=4	R
47		CTI-Adulto	4	R	>=16	R	>=16	R	<=2	S	<=1	S	>=4	R
48		ENF 10º Norte	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	1	S
49		CTI-Adulto	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	4	S	>=16	R	>=4	R
50		ENF	4	R	>=16	R	>=16	R	4	S	<=1	S	>=4	R
51		ENF 2º Sul	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	<=0.25	S
52		PA	4	R	>=16	R	>=16	R	<=2	S	<=1	S	>=4	R
53		ENF 7º Norte	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	>=4	R
54		ENF 7º Norte	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	>=4	R
55		ENF 2º Sul	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	1	S

56		CTI - Adulto	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	8	S	>=16	R	>=4	R
57		CTI - NEO	4	R	>=16	R	>=16	R	<=2	S	>=16	R	>=4	R
58		ENF 2º Sul	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	>=4	R
59		PA	<=0.5	S	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	<=0.25	S
60		Unidade Coronariana	4	R	>=16	R	0.5	S	8	S	<=1	S	<=0.25	S

Continuação

Código da Amostr a	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS											
			COL		TIG		CFO		CTX/CRO		CAZ		CPM	
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT
10	SP	CTI	<=0.5	S	2	I	8	R*	4	R	16	R	<=1	S
11		CTI	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	8	R
12		CTI	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	64	R
13		ENF	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	>=64	R
14		CTI	<=0.5	S	1	S	16	I	>=64	R	16	R	>=64	R
15		ENF	<=0.5	S	1	S	16	R	>=64	R	16	R	>=64	R
19		ENF	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R
20		CTI	<=0.5	S	2	I	<=4	S	>=64	R	>=64	R	16	R
30		CTI	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	16	R
31		CTI	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	8	R
32		CTI	<=0.5	S	1	S	8	R*	2	I	16	R	<=1	S
33		CTI	>=16	R	2	I	64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
34		CTI	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	>=64	R
35		CTI	<=0.5	S	1	S	8	R*	4	R	16	R	<=1	S
25		SC	CTI	<=0.5	S	2	I	8	S	>=64	R	4	I	16

26		ENF	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	16	R
27		CTI	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	16	R	8	R
28		BERÇARIO	<=0.5	S	2	I	<=4	S	32	R	4	I	2	I
29		ENF	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	16	R
16		S. URGÊNCIA	<=0.5	S	2	I	<=4	S	>=64	R	>=64	R	16	R
18		CTI	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	32	R	>=64	R
17	João XXIII	CTI	<=0.5	S	2	I	8	S	>=64	R	16	R	>=64	R
36		ENF	<=0.5	S	2	I	<=4	S	8	R	2	I	2	I
37	HC	ENF 7º Norte	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	2	I
38		ENF 8º Sul	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R
39		PA	>=16	R	2	I	<=4	S	>=64	R	4	I	2	I
40		ENF 4º Oeste	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R
41		ENF 7º Leste	>=16	R	2	I	<=4	S	>=64	R	16	R	32	R
42		ENF 10º Sul	>= 16	R	2	I	<= 4	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R
43		PA	<=0.5	S	2	I	32	R	8	R	16	R	2	I
44		ENF 4º Andar	>= 16	R	1	S	<=4	S	>=64	R	16	R	2	I
45		CTI- Pediatrico	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	16	R	<=1	S	2	I
46		ENF 7º Leste	>=16	R	4	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R
47		CTI-Adulto	<=0.5	S	2	I	16	I	>=64	R	>=64	R	32	R
48		10º Norte	<=0.5	S	1	S	<=4	S	32	R	4	I	2	I
49		CTI-Adulto	>=16	R	2	I	8	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R
50		ENF	<=0.5	S	4	R	16	I	>=64	R	>=64	R	8	R
51		ENF 2º Sul	4	R	<=0.5	S	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
52		PA	<=0.5	S	4	R	16	I	>= 64	R	>= 64	R	16	R
53		ENF 7º Norte	>=16	R	2	I	16	I	16	R	16	R	2	I
54		ENF 7º Norte	>=16	R	2	I	16	I	16	R	16	R	2	I
55		ENF 2º Sul	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>= 64	R	4	I	2	I

56		CTI - Adulto	<=0.5	S	2	I	<=4	S	16	R	4	I	2	I
57		CTI - NEO	<=0.5	S	1	S	<=4	S	>= 64	R	>= 64	R	>= 64	R
58		ENF 2º Sul	<=0.5	S	4	R	>=64	R	>= 64	R	>= 64	R	>= 64	R
59		PA	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	4	R	<=1	S	<=1	S
60		Unid. Coronária	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>= 64	R	4	I	2	I

RES: resultado; INT: interpretação; S: sensível; I: intermediário; R: resistente; SP: SEMPER; HC: Hospital das Clínicas; SC: Santa Casa de Misericórdia; ENF: enfermaria; CTI: centro de tratamento intensivo; PA: pronto atendimento; ERT: ertapenem; MER: meropenem; IMP: imipenem; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; COL: colistina; TIG: tigeciclina; CFO: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime.

*Modificado pelo sistema AES VITEK® 2

APÊNDICE IB

Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Enterobacter spp.* (n=27) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Código da Amostra	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS											
			ERT		MER		IMP		AMI		GEN		CIP	
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT
70	SP	ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	0.5	S
71	João XXIII	UTQ	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	4	S	8	I	>=4	R
72		CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<=0.25	S
73	SC	CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	<=0.25	S
74		ENF	1	I	<=0.25	S	<=1	S	16	S	>=16	R	<=0.25	S
75		CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	<=0.25	S
76		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	1	S
77		ENF	4	R	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
78		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
82		CO	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	8	I	<=0.25	S
83		PA	4	R	<=0.25	S	<=1	S	>=64	R	>=16	R	>=4	R
80	OB	ENF	>=8	R	1	S	<=1	S	16	S	>=16	R	>=4	R
81		CTI	>=8	R	1	S	<=1	S	16	S	>=16	R	>=4	R
84	HC	ENF	>=8	R	1	S	<=1	S	16	S	>=16	R	>=4	R
85		ENF	>=8	R	1	S	<=1	S	16	S	>=16	R	>=4	R
86		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<=0.25	S
87		ENF 3º A	>=8	R	8	R	4	R	16	S	>=16	R	>=4	R
88		ENF 3º A	1	I	<= 0.25	S	<=1	S	16	S	<=1	S	2	I
89		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	<= 0.25	S

90		ENF 6ºLeste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	4	S	>=16	R	1	S
91		CTI - Adulto	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	<= 0.25	S
92		CTI - Adulto	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	<= 0.25	S
93		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	0,5	S	<=2	S	>=16	R	1	S
94		ENF	>=8	R	>=16	R	>=16	R	16	S	<=1	S	2	I
95		ENF 7º Leste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	<=1	S	1	S
96		ENF 10º Norte	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	1	S

Continuação

Código da Amostra	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS												
			COL		TIG		CFO		CTX/CRO		CAZ		CPM		
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	
70	SP	ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	16	R	4	I	
71	João XXIII	UTQ	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	16	R	2	I	
72		CTI	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R	<= 1	S	
73	SC	CTI	<=0.5	S	<=0.5	S	>=64	R	>=64	R	4	I	2	I	
74		ENF	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	>=64	R	2		
75		CTI	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	R*	>=64	R	4	I	2	I	
76		ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R	8	R	
77		ENF	<=0.5	S	>=8	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R	
78		ENF	<=0.5	S	1	S	8	R*	>=64	R	>=64	R	16	R	
82		CO	<=0.5	S	<=0.5	S	>=64	R	8	R	>=64	R	<= 1	S	
83		PA	<=0.5	S	>=8	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R	16	R	
80		OB	ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
81			CTI	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
84	HC	ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	16	R	4	I	
85		ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R	

86		ENF	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	>=64	R	2	I
87		ENF 3ªA	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R
88		ENF 3ªA	<=0.5	S	2	I	>=64	R	8	R	16	R	<=1	S
89		ENF	<=0.5	S	<= 0.5	S	>=64	R	8	R	16	R	<=1	S
90		ENF 6ªLeste	<=0.5	S	1	S	>=64	R	>=64	R	16	R	4	I
91		CTI - Adulto	<=0.5	S	<= 0.5	S	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
92		CTI - Adulto	<=0.5	S	<= 0.5	S	>=64	R	>=64	R	16	R	>=64	R
93		ENF	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	16	R	2	I
94		ENF	<=0.5	S	2	I	>=64	R	>=64	R	>=64	R	>=64	R
95		ENF 7ª Leste	<=0.5	S	2	I	>=64	R	16	R	>=64	R	<=1	S
96		ENF 10ª Norte	<=0.5	S	<= 0.5	S	>=64	R	>=64	R	16	R	4	I

RES: resistente; INT: interpretação; S: sensível; I: intermediário; R: resistente; SP: SEMPER; HC: Hospital das Clínicas; SC: Santa Casa de Misericórdia; ENF: enfermaria; CTI: centro de tratamento intensivo; PA: pronto atendimento; UTQ: unidade de tratamento de queimados; CO: centro obstétrico; ERT: ertapenem; MER: meropenem; IMP: imipenem; AMI: ampicilina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; COL: colistina; TIG: tigeciclina; CFO: ceftazidima; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime.

*Modificado pelo sistema AES VITEK® 2

APÊNDICE IC

Dados referentes aos setores de origem e perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das amostras de *Escherichia coli* (n=10) recuperadas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Código da Amostra	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS											
			ERT		MER		IMP		AMI		GEN		CIP	
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT
101	SC	ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	<=0.25	S
102	João XXIII	ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	<=1	S	>=4	R
103		CTI	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
104	HC	ENF 4º Oeste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=1	S	<=2	S	4	S	<=0.25	S
105		3º Sul	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	<=1	S	>=4	R
106		2º Sul	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	<=1	S	>=4	R
107		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	<=0.25	S
108		ENF	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
109		ENF 3º Leste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R
110		ENF 3º Leste	<=0.5	S	<=0.25	S	<=0.25	S	<=2	S	>=16	R	>=4	R

Continuação

Código da Amostra	Hospital	Setor	SUSCEPTIBILIDADE AOS ANTIMICROBIANOS											
			COL		TIG		CFO		CTX/CRO		CAZ		COM	
			RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT	RES	INT
101	SC	ENF	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>=64	R	16	R	8	R
102	João XXIII	ENF	<=0.5	S	<=0.5	S	8	S	>=64	R	4	I	2	I
103		CTI	<=0.5	S	<=0.5	S	16	I	>=64	R	>=64	R	16	R
104	HC	ENF 4º Oeste	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>=64	R	<=1	S	2	I
105		ENF 3º Sul	<=0.5	S	<=0.5	S	32	R	>=64	R	<=1	S	8	R
106		ENF 2º Sul	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>=64	R	<=1	S	2	I
107		ENF	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	>=64	R	16	R	8	R

108		ENF	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	16	R	4	I	2	I
109		ENF 3ºLeste	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	16	R	4	I	2	I
110		ENF 3º Leste	<=0.5	S	<=0.5	S	<=4	S	16	R	4	I	2	I

RES: resistente; INT: interpretação; S: sensível; I: intermediário; R: resistente; SP: SEMPER; HC: Hospital das Clínicas; SC: Santa Casa de Misericórdia; ENF: enfermaria; CTI: centro de tratamento intensivo; ERT: ertapenem; MER: meropenem; IMP: imipenem; AMI: amicacina; GEN: gentamicina; CIP: ciprofloxacina; COL: colistina; TIG: tigeciclina; CFO: cefoxitina; CTX: cefotaxima; CRO: ceftriaxona; CAZ: ceftazidima; CPM: cefepime.

APÊNDICE IIA

Dados referentes aos testes fenotípicos e genotípicos para detecção de β -lactamases em amostras de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Amostra	Setor	TESTE FENOTÍPICO					GENÓTIPO <i>bla</i>									
		ESBL			Carbap.	AmpC	Genes - ESBL				Genes - Carbapenemase		Genes - AmpC Plasmidial			Gene AmpC
		TSDD	ETEST	AES/VITEK	THM	CFO + AFB	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{KPC1-3}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{FOX}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{AmpC}
10	CTI	NEG	NEG	POS	NEG	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
11	CTI	NEG	POS	POS	POS	-	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
12	CTI	POS	POS	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
13	Outros	POS	ND	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
14	CTI	NEG	ND	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
15	Outros	NEG	ND	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
16	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
17	CTI	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
18	CTI	NEG	ND	POS	NEG	NEG	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
19	Outros	NEG	ND	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
20	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
21	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
22	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
23	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
24	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
25	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
26	Outros	POS	ND	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
27	CTI	NEG	POS	POS	POS	-	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
28	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-

29	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
30	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
31	CTI	NEG	NEG	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
32	CTI	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG							
33	CTI	NEG	ND	NEG	POS	-	POS	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
34	CTI	POS	POS	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
35	CTI	NEG	NEG	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
36	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
37	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
38	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
39	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
40	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
41	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
42	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
43	Outros	NEG	NEG	POS	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
44	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
45	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
46	Outros	NEG	ND	NEG	POS	-	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
47	CTI	POS	ND	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
48	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
49	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
50	Outros	POS	ND	POS	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
51	Outros	NEG	ND	NEG	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
52	Outros	POS	ND	POS	POS	-	NEG	POS	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
53	Outros	NEG	NEG	NEG	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
54	Outros	NEG	NEG	NEG	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-

55	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
56	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
57	CTI	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
58	Outros	NEG	ND	NEG	POS	-	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
59	Outros	NEG	NEG	NEG	POS	-	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-
60	Outros	POS	POS	POS	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	POS	NEG	-	-	-	-

TSDD: Teste do Sinergismo do Duplo Disco; THM: Teste de Hodge Modificado; CFO: cefoxitina; AFB: ácido fenilborônico; Carbap. (carbapenemase); CTI: centro de tratamento intensivo; Outros: outros setores de internação hospitalar; POS: positivo; NEG: negativo.

89	Outros	NEG	ND	NR	NEG							
90	Outros	POS	POS	NR	NEG							
91	CTI	NEG	ND	NR	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
92	CTI	NEG	ND	NR	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
93	Outros	NEG	ND	NR	NEG							
94	Outros	NEG	ND	NR	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	NEG
95	Outros	NEG	ND	NR	NEG							
96	Outros	POS	POS	NR	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG

TSDD: Teste do Sinergismo do Duplo Disco; THM: Teste de Hodge Modificado; TDA: Teste do Disco de Aproximação; Carbap. (carbapenemase); CTI: centro de tratamento intensivo; Outros: outros setores de internação hospitalar; POS: positivo; NEG: negativo.

APÊNDICE IIC

Dados referentes aos testes fenotípicos e genotípicos para detecção de β -lactamases em amostras de *Escherichia coli* isoladas de hemoculturas de pacientes internados em Hospitais de Belo Horizonte

Amostra	Setor	TESTE FENOTÍPICO						GENÓTIPO <i>bla</i>									
		ESBL			Carbap.	AMPC		GENES - ESBL				GENES CARBAPENEMASE		GENES - AmpC PLASMIDIAL			Gene AmpC
		TSDD	ETEST	AES/VITEK	THM	TDA	CFO+ AFB	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX}	<i>bla</i> _{GES}	<i>bla</i> _{KPC1-3}	<i>bla</i> _{NDM}	<i>bla</i> _{CMY-2}	<i>bla</i> _{FOX}	<i>bla</i> _{DHA}	<i>bla</i> _{AmpC}
101	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
102	Outros	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
103	CTI	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
104	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
105	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS
106	Outros	NEG	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
107	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
108	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
109	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-
110	Outros	POS	POS	POS	NEG	NEG	-	POS	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	-	-	-	-

TSDD: Teste do Sinergismo do Duplo Disco; THM: Teste de Hodge Modificado; Teste do Disco de Aproximação; CFO; cefoxitina; AFB: ácido fenilborônico; Carbap. (carbapenemase); CTI: centro de tratamento intensivo; Outros: outros setores de internação hospitalar; POS: positivo; NEG: negativo.

APÊNDICE III

Fotos da Reação em Cadeia da Polimerase exemplificando algumas amostras produtoras de genes *bla*.

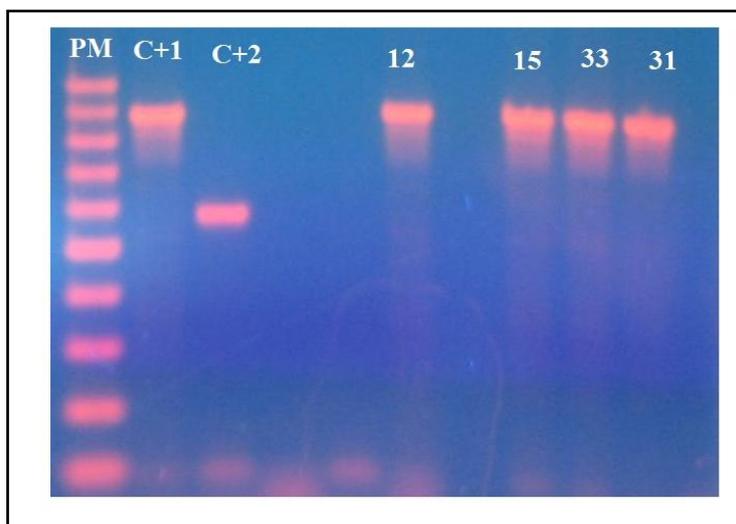


Figura XX: Detecção do gene *bla*_{KPC1-3} nas amostras (12, 15, 33, 31) em gel de agarose. PM: marcador molecular de 100 pb; C+1: fragmento de 892 pb caracterizando *bla*_{KPC1-3}; C+2: fragmento de 562 pb caracterizando *bla*_{CTX-M}.

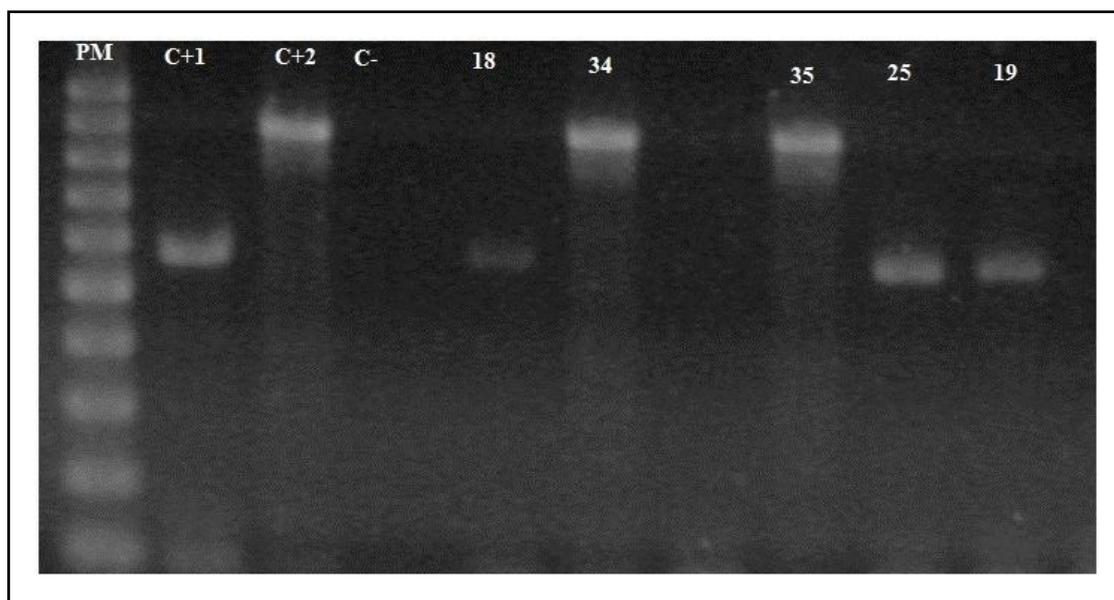


Figura XX: Detecção do gene *bla*_{KPC1-3} nas amostras (34 e 35) e detecção do gene *bla*_{CTX-M} nas amostras (18, 25 e 19) em gel de agarose. PM: marcador molecular de 100 pb; C+1: controle positivo, fragmento de 892 pb caracterizando *bla*_{KPC1-3}; C+2: fragmento de 562 pb caracterizando *bla*_{CTX-M}; C-: controle negativo.

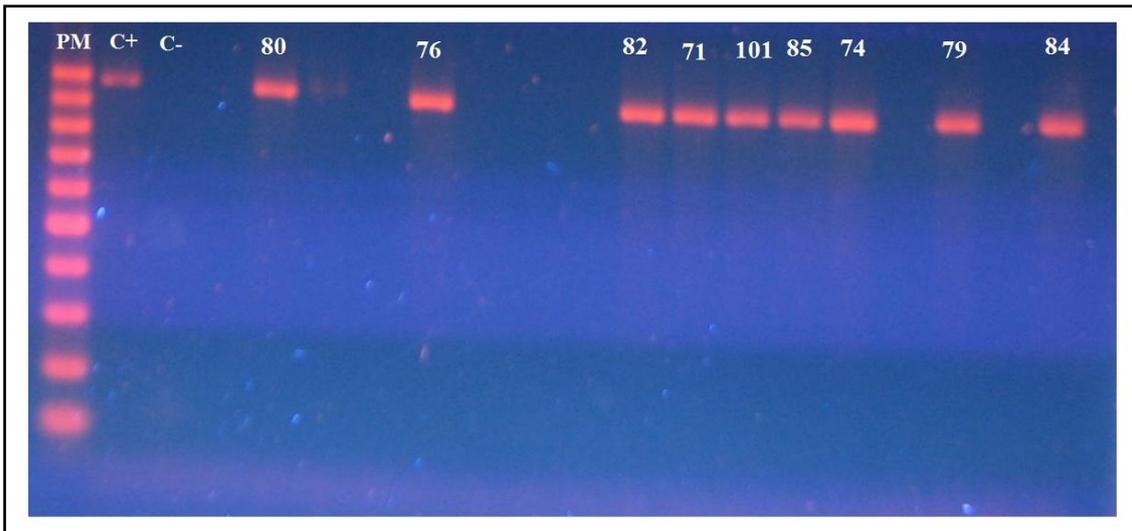


Figura XX: Detecção do gene *bla*_{TEM} nas amostras (80, 76, 82, 71, 101, 85, 74, 79 e 84) em gel de agarose. PM: marcador molecular de 100 pb; C+: controle positivo, fragmento de 968 pb caracterizando *bla*_{TEM}; C-: controle negativo.

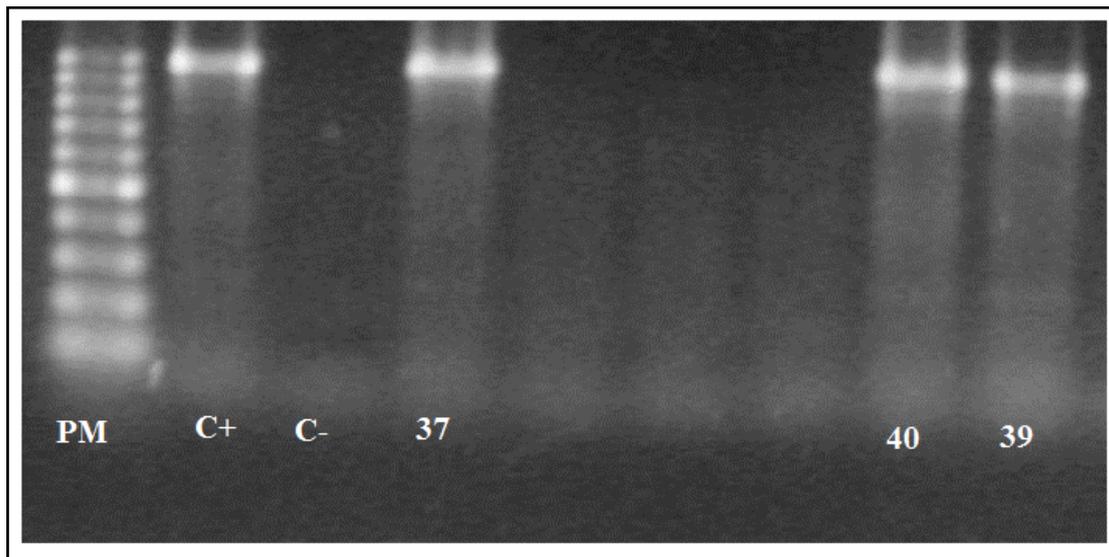
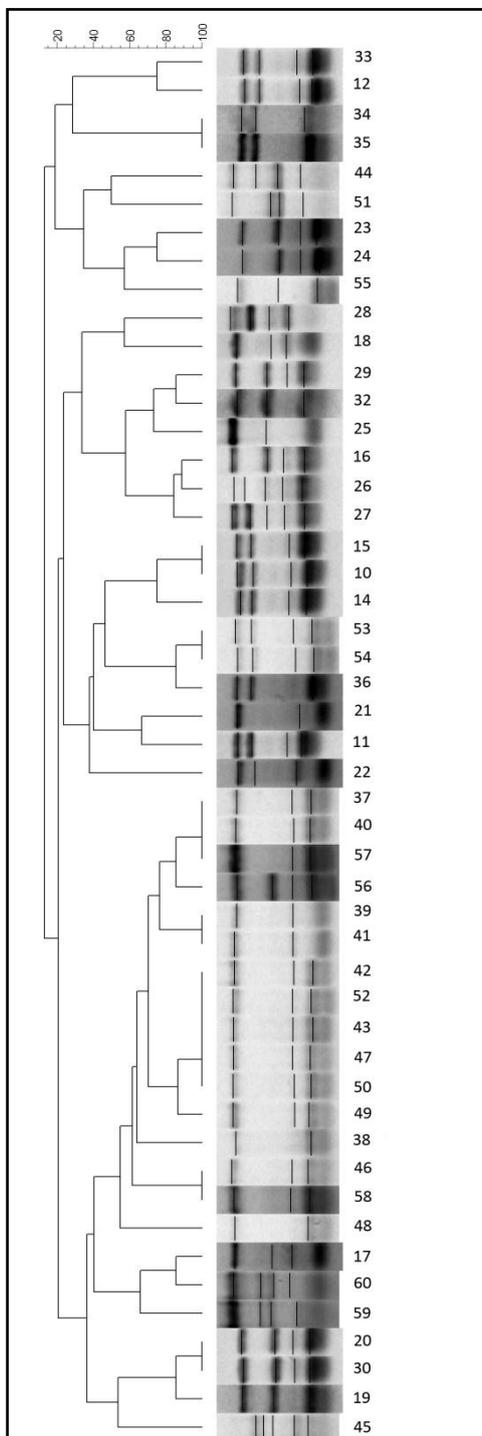
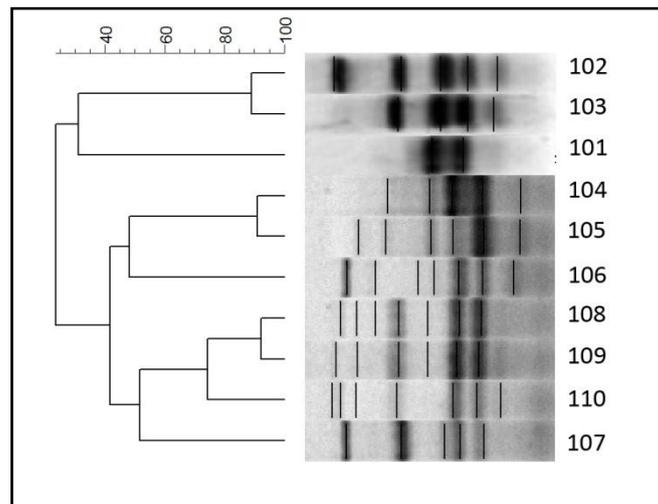
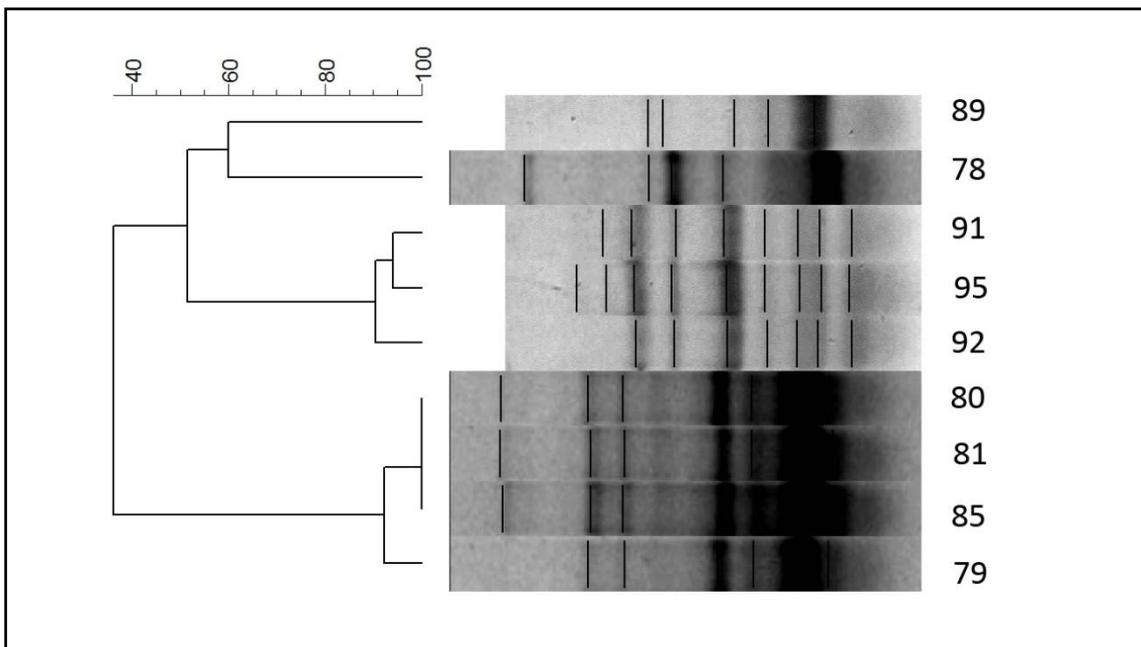


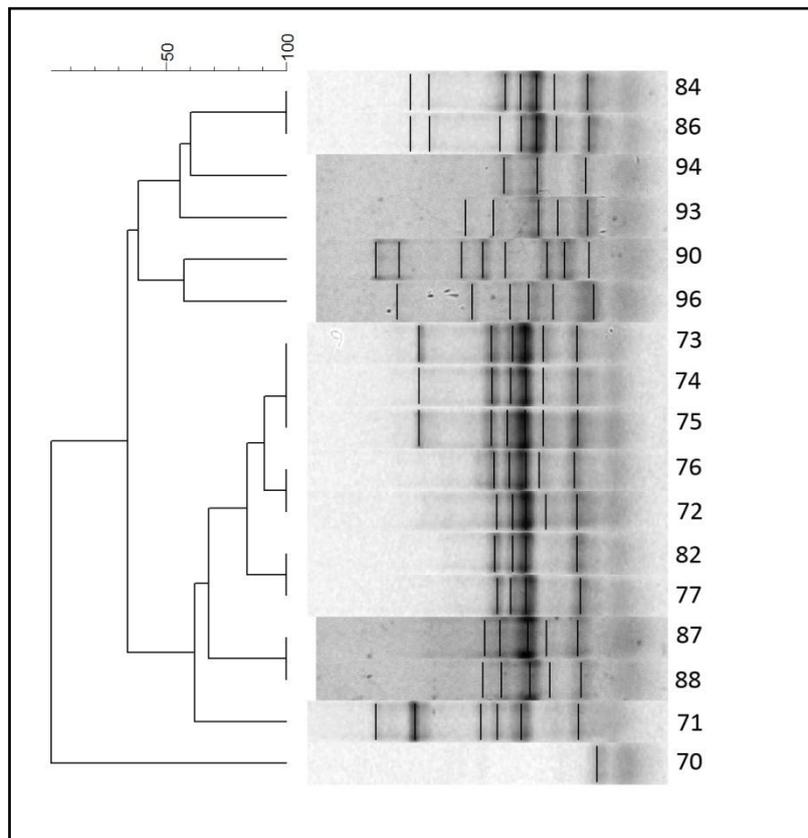
Figura XX: Detecção do gene *bla*_{SHV} nas amostras (37, 40, 39) em gel de agarose. PM: marcador molecular de 100 pb; C+: controle positivo, fragmento de 982 pb caracterizando *bla*_{SHV}; C-: controle negativo.

APÊNDICE IV
Fotos do gel de agarose utilizado para construção dos dendrogramas para as análises de
similaridade genética

Klebsiella pneumoniae



Escherichia coli*Enterobacter aerogenes*

Enterobacter cloacae

APÊNDICE V

**Quadro representativo dos antimicrobianos contidos na Carta AST-N105/AST-N239 -
Vitek® 2**

Composição da Carta AST/N105 - VITEK® 2 Compact			
Antimicrobiano	Código	Intervalo de CMI (µg/ml)	
		≤	≥
Amicacina	AN	2	64
Ampicillina	AM	2	32
Ampicillina/Sulbactam	SAM	2/1	32/16
Aztreonam	ATM	1	64
Cefalotina	CF	2	64
Cefepime	FEP	1	64
Cefotaxima	CTX	1	64
Ceftriaxona	CRO	1	64
Cefoxitina	FOX	4	64
Ceftazidima	CAZ	1	64
Ciprofloxacina	CIP	0.25	4
Colistina	CS	0.5	16
Ertapenem	ETP	0.5	8
ESBL	ESB	NEG	POS
Gentamicina	GM	1	16
Imipenem	IPM	1	16
Meropenem	MEM	0.25	16
Piperacillina/Tazobactam	TZP	4	128
Tigeciclina	TGC	0.55	8

APÊNDICE VI**LABORATÓRIOS ENVOLVIDOS E COLABORADORES**

Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Prof. Luiz de Macêdo Farias
- Profa. Paula Prazeres Magalhães
- Profa. Sueli Diniz Lima

Laboratório de Genética de Microrganismos, Departamento de Genética, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Profa. Andréa Maria Amaral Nascimento
- Msc. Mariana de Paula Reis