

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

LUANA LUZIA SANTOS PIRES

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO (ESBL) E CARBAPENEMASE KPC PRODUZIDAS POR
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES DE ALAGOAS**

**Maceió
2011**

LUANA LUZIA SANTOS PIRES

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO (ESBL) E CARBAPENEMASE KPC PRODUZIDAS POR
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES DE ALAGOAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da
Silva Filho

**Maceió
2011**

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central
Divisão de Tratamento Técnico
Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

P667e Pires, Luana Luzia Santos.

Epidemiologia molecular de Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e carbapenemase KPC produzidas por enterobactérias isoladas de pacientes de Alagoas / Luana Luzia Santos Pires. – 2011.

106 f. : il.

Orientador: Eurípedes Alves da Silva Filho.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde. Maceió, 2011.

Bibliografia: f. 94-106.

1. Infecção hospitalar – Alagoas. 2. Bactérias resistentes. 3. Epidemiologia molecular. 4. Beta-Lactamases. 5. Carbapenemase. I. Título.

CDU: 616-022:614.4

LUANA LUZIA SANTOS PIRES

**EPIDEMIOLOGIA MOLECULAR DE BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO
ESTENDIDO (ESBL) E CARBAPENEMASE KPC PRODUZIDAS POR
ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE PACIENTES DE ALAGOAS**


Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Alagoas para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

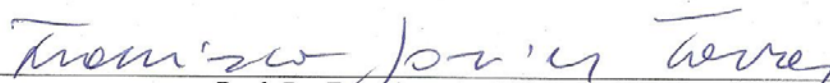
Orientador: Prof. Dr. Eurípedes Alves da Silva Filho

Data de Aprovação: 13 de Dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a. Dr.^a. Sônia Maria Soares Ferreira – CESMAC


Prof. Dr. Dalmo Azevedo – UFAL


Prof. Dr. Francisco Javier Tovar – UFAL

OFEREÇO

Aos meus pais Gilvan Eduardo da Silva Pires e Marinalva Santos Pires pela oportunidade de vida com amor, carinho, educação e apoio nos momentos mais difíceis da minha vida. Aos meus irmãos Lucas Eduardo e Gilvan Júnior por terem sempre acreditado na sua irmã.

DEDICO

Ao meu marido Luiz Fábio e a minha sogra Arlinda Maria sem os quais não poderia ter chegado até aqui e aos meus filhos Maria Eduarda e Fábio Júnior por me fazerem capaz de lutar pela vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, Jesus Cristo e aos seres iluminados pela elevação espiritual nos momentos de angústia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior/ Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Alagoas (CAPES/FAPEAL) pelo apoio financeiro.

Aos colegas microbiologistas Flávia Soares e Renato Cavalcante pela concessão das bactérias isoladas na Santa Casa e Hospital Geral e pela boa vontade de me atenderem em todos os momentos que precisei.

Ao colega de curso Daniel Coimbra pela concessão das bactérias da Unidade de Emergência do Agreste.

Aos diretores dos laboratórios da Santa Casa e Hospital Geral, Zenaldo Porfírio e Alice Maria Pereira Leite, pelo interesse em participar as instituições à pesquisa.

À Professora Márcia Maria Camargo de Moraes da Universidade do Estado de Pernambuco (UPE/PE) pela concessão da cepa-controle *Klebsiella pneumoniae* KP4M.

Ao corpo docente do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde pelos ensinamentos e incentivos recebidos durante o curso, especialmente às Professoras Salete Smaniotto e Magna Suzana e ao Professor Emiliano Barreto.

À coordenação do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde por lutar pela qualificação do curso.

À secretaria do curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, na pessoa de Melânia Pedrosa, pela atenção recebida.

Ao Professor Francisco Tovar que disponibilizou algumas horas do seu tempo para me ensinar eletroforese em gel de poliacrilamida.

Aos Professores Emiliano Barreto e Francisco Tovar pela enorme contribuição na qualificação.

Aos colegas do curso de mestrado pelos momentos inesquecíveis vividos juntos.

Aos colegas Daniel, Altair e Júnior pelos momentos de descontração, desabafo e apoio.

Às colegas do Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada (BIOGEN), Aryanna, Kristiannelly, Marília e Guacyra pelas experiências vividas durante a nossa convivência no laboratório.

Às colegas do BIOGEN, Gabryelle Barbosa e Larissa Isabela pela paciência e boa vontade em me ajudar nos momentos mais difíceis da pesquisa.

Ao meu orientador, Eurípedes Alves da Silva Filho, pela oportunidade de aprender os seus conhecimentos, por me incentivar na carreira docente e pelas suas palavras amigas em situações difíceis da minha vida.

E a algumas pessoas do ICBS que atuaram na manutenção do laboratório, ajudando indiretamente para a realização deste trabalho.

Meu Obrigada.

RESUMO

A resistência bacteriana representa um dos problemas mundiais de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo caracterizar geneticamente espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras fenotípicas de ESBL e KPC obtidas de pacientes de Alagoas. As bactérias foram identificadas por testes semi-automatizados. Confirmadas como produtoras de ESBL e KPC por testes fenotípicos de triagem. O teste de susceptibilidade *in vitro* aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão. O DNA foi extraído pelo método de fervura à 95°C. Os genes de resistência *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC foram identificados com oligonucleotídeos específicos e a tipagem genética foi realizada pela PCR com o microssatélite (GTG)₅. Foram obtidos 254 isolados de enterobactérias, dos quais 92,12% (234/254) apresentaram alguns dos genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV ou *bla*KPC, sendo 87,18% (204/234) ESBL (*bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV) e 12,82% (30/234) KPC (*bla*KPC). Desses 234 isolados, 4,7% (11/234) foram de infecções comunitárias com os genes que expressam ESBL e 95,3% (223/234) de infecções hospitalares, dos quais 86,55% (193/223) ESBL e 13,45% (30/223) KPC. *Bla*CTX-M (> 80%) foi o tipo gênico mais frequente nas enterobactérias. As infecções urinárias foram os casos mais frequentes de infecção na comunidade por *Escherichia coli* (54,55%) e *Klebsiella pneumoniae* (39,46%) no ambiente hospitalar. *Bla*KPC foi identificado apenas em bactérias causadoras de infecção hospitalar, principalmente em *K. pneumoniae* (30%). Nas UTIs (38,57%) foram obtidos o maior número de isolados produtores de ESBL e KPC. Estas enterobactérias apresentaram fenótipos de multidroga resistência com elevados níveis para os aminoglicosídeos, fluoroquinolonas e sulfametoxazol/trimetoprim. Associações entre os genótipos e à resistência aos antibióticos foram observadas. Casos de disseminação clonal foram identificados no ambiente hospitalar de Alagoas por enterobactérias produtoras de ESBL e KPC. Há uma predominância dos genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC entre os isolados de enterobactérias resistentes aos beta-lactâmicos, com prevalência do elemento genético *bla*CTX-M. A disseminação clonal tem contribuído para os elevados níveis de resistência aos beta-lactâmicos entre os isolados de enterobactérias nos hospitais deste estudo.

Palavras-chave: ESBL. KPC. Infecção hospitalar. Infecção comunitária. Disseminação clonal. (GTG)₅.

ABSTRACT

Bacterial resistance is one of the worldwide public health issues. This work aimed to genetically characterize species of the family *Enterobacteriaceae* phenotypic producing ESBL and KPC obtained from patients of Alagoas. Bacteria were identified by semi-automated tests. Confirmed as producing ESBL and KPC by phenotypic screening tests. The antimicrobial *in vitro* susceptibility test was performed by disk-diffusion method. DNA was extracted by boiling method at 95°C. The resistance genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC were identified with specific primers and genetic typing was performed by PCR with the microsatellite (GTG)₅. 254 isolates of enterobacteria were obtained, of which 92,12% (234/254) had some of the genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV or *bla*KPC, 87,18% (204/234) ESBL (*bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV) and 12,82% (30/234) KPC (*bla*KPC). Of these 234 isolates, 4,7% (11/234) were community-acquired infections with genes that express ESBL and 95,3% (223/234) of hospital infections, of which 86,55% (193/223) ESBL and 13,45% (30/223) KPC. *Bla*CTX-M (> 80%) was the most frequent type gene in enterobacteria. Urinary infections were the most frequent cases of infection in the community by *Escherichia coli* (54,55%) and *Klebsiella pneumoniae* (39,46%) in the hospital. *Bla*KPC was identified only in bacteria of hospital infections, especially in *K. pneumoniae* (30%). At the ICUs (38,57%) were obtained the most number of isolates producing ESBL and KPC. These enterobacteria showed multidrug resistance phenotypes with high levels for aminoglycosides, fluoroquinolones and sulfamethoxazole/trimethoprim. Associations between genotypes and antibiotic resistance were observed. Cases of clonal spread were identified in the hospital of Alagoas by enterobacteria producing ESBL and KPC. There is a predominance of genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV and *bla*KPC among isolates of enterobacteria resistant to beta-lactam, with the prevalence of the genetic element *bla*CTX-M. The clonal spread have contributed to the high levels of beta-lactam resistance among isolates of enterobacteria at hospitals in this study.

Keywords: ESBL. KPC. Hospital infection. Community infection. Clonal spread. (GTG)₅.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ação de uma serina beta-lactamase	31
Figura 2	Número de beta-lactamases do grupo 1, 2 e 3 de 1970 a 2009	34
Figura 3	Ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas.....	40
Figura 4	Distribuição geográfica de KPC no mundo.....	43
Figura 5	Esquema de detecção de ESBL por disco-aproximação	50
Figura 6	Positividade no teste de ESBL. B1 – Aumento do halo de inibição; B2 – “zona fantasma”	50
Figura 7	Produtos da amplificação dos genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV e <i>bla</i> KPC em gel de agarose a 1%	59
Figura 8	Frequência dos genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV e <i>bla</i> KPC detectados nos 11 isolados bacterianos obtidos dos pacientes com infecções comunitárias entre Março de 2008 a Dezembro de 2010.....	61
Figura 9	Frequência dos genes de resistência <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M e <i>bla</i> SHV por espécies isoladas das infecções comunitárias entre Março de 2008 a Dezembro de 2010.....	62
Figura 10	Frequência dos genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV e <i>bla</i> KPC detectados nos 223 isolados bacterianos obtidos dos pacientes com infecções hospitalares entre Março de 2008 a Dezembro de 2010.....	63
Figura 11	Frequência dos genes resistência <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV e <i>bla</i> KPC por espécies isoladas das infecções hospitalares entre Março de 2008 a Dezembro de 2010.....	65
Figura 12	Frequência das enterobactérias produtoras de ESBL e KPC isoladas de pacientes internados nos diversos setores hospitalares e os tipos gênicos mais frequentes nas UTIs entre Março de 2008 a Dezembro de 2010	66
Figura 13	Dendrograma dos perfis de amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Providencia stuartii</i> , obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard	70
Figura 14	Dendrograma dos perfis de amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Enterobacter aerogenes</i> , obtido pelo método de	

	agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard	71
Figura 15	Dendrograma dos perfis de amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ em isolados de <i>Enterobacter cloacae</i> , obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard	73
Figura 16	Dendrograma dos perfis de amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ de 60 isolados de <i>Escherichia coli</i> , obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard	75
Figura 17	Dendrograma dos perfis de amplificação de ISSR com o iniciador (GTG) ₅ de 128 isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , obtido pelo método de agrupamento UPGMA, utilizando o coeficiente de similaridade de Jacard	77

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Frequência da identificação dos genes de resistência *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC entre Março de 2008 a Dezembro de 2010... 60
- Tabela 2** Frequência dos casos de infecções comunitária e hospitalar por bactérias multirresistentes com os genes de resistência *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC entre Março de 2008 a Dezembro de 2010 60
- Tabela 3** Frequência das amostras clínicas por espécies detectadas com os genes *bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*SHV obtidas de infecções comunitárias entre Março de 2008 a Dezembro de 2010 61
- Tabela 4** Frequência das amostras clínicas por espécies detectadas com os genes *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC obtidas de infecções hospitalares entre Março de 2008 a Dezembro de 2010..... 64
- Tabela 5** Perfis de resistência dos isolados bacterianos produtores de ESBL (*bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*SHV) aos antibióticos beta-lactâmicos e não-beta-lactâmicos entre Março de 2008 a Dezembro de 2010 67
- Tabela 6** Associação do perfil de resistência aos antibióticos ativos contra as bactérias produtoras de ESBL com os tipos gênicos 68
- Tabela 7** Perfis de resistência dos isolados bacterianos produtores de KPC (*bla*KPC) aos antibióticos beta-lactâmicos e não-beta-lactâmicos entre Março de 2008 a Dezembro de 2010 69

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Principais antimicrobianos, sítios alvos de ação e os diversos mecanismos de resistência	30
Quadro 2	Esquemas de classificação de beta-lactamases bacterianas.....	33
Quadro 3	Famílias de beta-lactamases de maior importância clínica nas enterobactérias.....	34
Quadro 4	Pontos de corte definido pelo CLSI M100-S18 (2008) para a triagem inicial de carbapenemase em <i>Enterobacteriaceae</i>	51
Quadro 5	Sequência de iniciadores específicos, tamanho dos fragmentos e número de acesso em bancos genéticos para detecção dos genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV e <i>bla</i> KPC.....	53
Quadro 6	Protocolo da reação de amplificação para os genes <i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M e <i>bla</i> KPC	54
Quadro 7	Protocolo da reação de amplificação para o gene <i>bla</i> SHV	54
Quadro 8	Protocolo da reação de amplificação com o microssatélite (GTG) ₅	56
Quadro 9	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos, perfil de genes <i>bla</i> , padrão genético, setor hospitalar e amostras clínicas obtidas dos isolados bacterianos de <i>Providencia stuartii</i>	71
Quadro 10	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos, perfil de genes <i>bla</i> , padrão genético, setor hospitalar e amostras clínicas obtidas dos isolados bacterianos de <i>Providencia stuartii</i>	72
Quadro 11	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos, perfil de genes <i>bla</i> , padrão genético, setor hospitalar e amostras clínicas obtidas dos isolados bacterianos de <i>Enterobacter cloacae</i>	74
Quadro 12	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos, perfil de genes <i>bla</i> , padrão genético, setor hospitalar e amostras clínicas obtidas dos isolados bacterianos de <i>Escherichia coli</i> com relação clonal	76
Quadro 13	Fenótipo de resistência aos antimicrobianos, perfil de genes <i>bla</i> , padrão genético, setor hospitalar e amostras clínicas obtidas dos isolados bacterianos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> com relação clonal	80

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Área Amarela
AC	Ácido clavulânico
AMC	Amoxicilina-ácido clavulânico
AMI	Amicacina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AZT	Aztreonam
AV	Área Vermelha
AZ	Área Azul
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
BIOGEN	Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada
BSA	Albumina sérica bovina
C	CTX-M
CAZ	Ceftazidima
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CFX	Ceftriaxona
CIP	Ciprofloxacina
CLM	Clínica Médica
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO	Centro obstétrico
CPM	Cefepime
CTQ	Centro de Tratamento de Queimados
CTX	Cefotaxima
DNA	Acido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfatado
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ESBL	Beta-Lactamases de Espectro Estendido
Fer	Ferida
GEN	Gentamicina

HAG	Unidade de Emergência Dr. Daniel Houly
HAP 1ºAND	Hospital Álvaro Peixoto 1º andar
HAP 3ºAND	Hospital Álvaro Peixoto 3º andar
HCl	Ácido clorídrico
HEHA	Hospital Escola Dr. Hélvio Auto
HGE	Hospital Geral do Estado Dr. Osvaldo Brandão Vilela
HJF	Hospital João Fireman
HOBV	Hospital Osvaldo Brandão Vilela
HSC	Hospital Santa Casa de Maceió
HSM	Hospital Sampaio Marques
ICARE	<i>Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology</i>
ISSRs	<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>
ITUs	Infecções do trato urinário
K	KPC
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LEV	Levofloxacina
MESM	Maternidade Escola Santa Mônica
NaCl	Cloreto de sódio
NI	Não incluído
NOR	Norfloxacina
OMPs	Proteínas de membrana externa
Pav I	Pavilhão I
Pav II	Pavilhão II
pb	pares de base
PBPs	Proteínas ligadoras de penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Eletroforese em campo pulsado
PIT	Piperacilina/tazobactam
RAPD	Amplificação aleatória de polimorfismos no DNA
rDNA	DNA ribossomal
Sec	Secreção
SENTRY	<i>Antimicrobial Resistance Surveillance Program</i>
SSRs	Sequências simples repetidas

SUT	Sulfametoxazol/trimetoprim
T	TEM
TBE	Tampão tris-borato-EDTA
TE	Tris-HCl EDTA
TZB	Tazobactam
UCIs	Unidades de Cuidados Intensivos
UFC	Unidade formadora de colônia
UFAL	Universidade Federal de Alagoas
UNCISAL	Universidade Estadual de Ciências da Saúde
UPE	Universidade do Estado de Pernambuco
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average</i>
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTI neo	UTI neonatal
UTI ped	UTI pediátrica
UTI card	UTI cardíaca
UTI neurol	UTI neurológica

LISTA DE SÍMBOLOS

β	Beta
%	Porcentual
\leq	Menor ou igual a
$>$	Maior
μg	Micrograma
μL	Microlitro
I	Intermediário
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	MiliMolar
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3 REVISÃO DE LITERATURA	24
3.1 Família <i>Enterobacteriaceae</i> Ranh 1937	24
3.2 Antibióticos Beta-Lactâmicos	25
3.2.1 Espectro Antibacteriano dos Beta-Lactâmicos	25
3.2.2 Mecanismo de Ação dos Beta-Lactâmicos.....	26
3.3 Resistência aos Antimicrobianos	27
3.3.1 Origem Genética da Resistência Bacteriana.....	27
3.3.1.1 <i>Mecanismos de Transferência Genética de Elementos Móveis de DNA</i> 28	
3.3.2 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos e Beta-Lactâmicos	29
3.4 Enzimas Beta-Lactamases	30
3.5 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)	35
3.5.1 ESBL Tipo TEM.....	36
3.5.2 ESBL Tipo SHV	37
3.5.3 ESBL Tipo CTX-M.....	38
3.5.4 Epidemiologia Global de ESBLs.....	39
3.5.4.1 <i>Epidemiologia de ESBLs na América do Sul e Brasil</i>	40
3.6 <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase (KPC)	41
3.7 Vigilância e Epidemiologia Molecular da Resistência Bacteriana	44
3.7.1 Microssatélites.....	45
4 METODOLOGIA	48
4.1 Local de Realização do Trabalho	48
4.2 Obtenção dos Isolados Bacterianos	48
4.3 Identificação dos Isolados Bacterianos	48
4.4 Análise Fenotípica da Resistência Bacteriana	48
4.4.1 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos <i>in vitro</i>	49
4.4.2 Teste Confirmatório para Detecção de ESBLs.....	49
4.4.3 Teste de Triagem para Detecção de KPC.....	51

4.5 Controle de Qualidade dos Testes	51
4.6 Extração e Quantificação do DNA Total Bacteriano	52
4.7 Análise Molecular da Resistência Bacteriana.....	52
4.7.1 Amplificação dos Genes de Resistência aos Beta-Lactâmicos	53
4.7.1.1 Condições para Reações de Amplificação dos Genes de Resistência ..	53
4.7.1.2 Programa da Reação de Amplificação dos Genes de Resistência	55
4.8 Tipagem Genética das Bactérias Multirresistentes.....	55
4.9 Análises Estatísticas.....	56
5 RESULTADOS.....	59
5.1 Identificação e Frequência dos Genes de Resistência	59
5.2 Perfil Epidemiológico das Infecções Comunitárias	60
5.3 Perfil Epidemiológico das Infecções Hospitalares.....	62
5.4 Perfis de Resistência aos Antibióticos e Associação com os	
Tipos Gênicos.....	66
5.4.1 Bactérias Produtoras de ESBL (<i>bla</i> TEM, <i>bla</i> CTX-M, <i>bla</i> SHV).....	66
5.4.2 Bactérias Produtoras de KPC (<i>bla</i> KPC)	68
5.5 Disseminação Clonal das Bactérias Multirresistentes.....	70
5.5.1 Tipagem Molecular em <i>Providencia stuartii</i>	70
5.5.2 Tipagem Molecular de <i>Enterobacter aerogenes</i>	71
5.5.3 Tipagem Molecular de <i>Enterobacter cloacae</i>	73
5.5.4 Tipagem Molecular de <i>Escherichia coli</i>	75
5.5.5 Tipagem Molecular de <i>Klebsiella pneumoniae</i>	77
6 DISCUSSÃO	82
6.1 Identificação e Frequência dos Genes de Resistência	82
6.2 Perfil Epidemiológico das Infecções Comunitárias	84
6.3 Perfil Epidemiológico das Infecções Hospitalares.....	85
6.4 Perfis de Resistência aos Antibióticos e Associação com os	
Tipos Gênicos.....	87
6.5 Disseminação Clonal por Bactérias Produtoras de ESBL e KPC	90
7 CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS	94

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

A ausência de novos antibióticos contra as bactérias gram-negativas e o surgimento de mecanismos de resistência que eliminam as opções terapêuticas de escolha para diversas infecções representam sérias ameaças para o tratamento das doenças infecciosas (GNIADKOWSKI, 2001; CONLY, 2002; THOMSON, 2010).

Estes fatores tornaram a resistência bacteriana como um dos principais problemas de saúde pública do mundo. No Brasil, o panorama da resistência bacteriana também é preocupante, devido ao crescente surgimento de bactérias resistentes nos hospitais brasileiros, causando infecções com altos níveis de mortalidade (SANTOS, 2004).

As enterobactérias são as maiores causadoras de infecção hospitalar e nos últimos anos vêm emergindo na comunidade (AL-JASSER, 2006). Relatos do estudo multicêntrico *SENTRY Antimicrobial Surveillance Program* (SENTRY), demonstraram que no Brasil e nos países da América Latina as enterobactérias estão entre as bactérias causadoras de infecções em humanos com os mais altos níveis de resistência às penicilinas, cefalosporinas e monobactâmico (SADER et al., 2004). Por esse motivo, o uso dos carbapenêmicos tem aumentado para o tratamento das infecções por enterobactérias multirresistentes produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs, *Extended Spectrum Beta-Lactamase*) (ALBA et al., 2005).

Entretanto, uma nova ameaça está emergindo: a difusão de enterobactérias resistentes a todos antibióticos comumente utilizados, inclusive os carbapenêmicos (QUALE, 2008). Apesar de rara, a resistência aos carbapenêmicos nas enterobactérias tem deixado pouquíssimas opções terapêuticas para os pacientes infectados com tais patógenos (WALTHER-RASMUSSEN e HOIBY, 2007).

As ESBLs são enzimas expressas, em sua maioria, pelos genes *bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*SHV que inativam a ação das penicilinas, cefalosporinas e aztreonam (PATERSON e BONOMO, 2005). A beta-lactamase KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) é expressa pelo gene *bla*KPC com ação inibitória sobre todos os beta-lactâmicos, inclusive os carbapenêmicos (QUEENAN e BUSH, 2007). As bactérias produtoras de ESBL e KPC causam infecções severas com elevados níveis de mortalidade (DRAWZ e BONOMO, 2010).

A codificação genética dessas enzimas está localizada em elementos genéticos móveis, os quais facilitam a transferência dos genes de resistência entre as bactérias, com conseqüente aumento da disseminação da resistência bacteriana (CARATTOLI, 2009).

Para elucidar os mecanismos genéticos da resistência bacteriana, os métodos moleculares podem ser utilizados, pois detectam a presença dos genes de resistência. Quando utilizados em conjunto com os métodos de tipagem molecular como o *fingerprinting* (GTG)₅-PCR podem auxiliar no diagnóstico da fonte de contaminação, rastrear a disseminação de clones e controlar os surtos de infecção (TOSIN et al., 2003; SADER et al., 2004; HUYS et al., 2005).

No Brasil e no mundo, em conseqüência dos elevados níveis de surtos de infecção hospitalar por bactérias multirresistentes, diversos programas de vigilância foram criados para monitorar a resistência bacteriana (TOSIN et al., 2003). A Rede de Hospitais Sentinela monitorada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em hospitais públicos brasileiros foi associada ao programa de vigilância SENTRY, o qual utiliza a tipagem molecular para permitir aos profissionais de saúde em fazer o controle de disseminação dos patógenos geneticamente relacionados (SADER, 2000; SINGH et al., 2006).

Em Alagoas não se conhece a presença dos genes de resistência (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC) e nem as suas relações genéticas, por isso o estudo local é de extrema relevância para se obter informações epidemiológicas relacionadas às infecções hospitalares e comunitárias para que medidas quanto ao uso racional dos antimicrobianos e ao controle de disseminação dos patógenos multirresistentes sejam adotadas.

2 OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar geneticamente espécies da família *Enterobacteriaceae* produtoras fenotípicas de ESBL e KPC obtidas de pacientes de Alagoas.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar por PCR os genes de resistência *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC nas enterobactérias fenotipicamente produtoras de ESBL e KPC;
2. Determinar a frequência dos casos de infecções comunitária e hospitalar por bactérias multirresistentes com os genes *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC;
3. Identificar qual o gene (*bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC), a espécie, o setor e a amostra clínica mais frequentes envolvidas nos casos de infecções comunitária e hospitalar;
4. Analisar os perfis de resistência aos antibióticos nas bactérias produtoras de ESBL e KPC e associar com os tipos gênicos;
5. Investigar a disseminação clonal desses patógenos por tipagem molecular com o microssatélite (GTG)₅.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família *Enterobacteriaceae* Rahn 1937

A família *Enterobacteriaceae* é um dos maiores e heterogêneos grupos de bacilos gram-negativos com importância médica por representarem 80% dos bacilos gram-negativos significantes clinicamente (HAWKEY, 2006).

Os membros da família *Enterobacteriaceae* são bacilos gram-negativos de tamanho médio (0,3 a 1,0 x 1,0 a 6,0 µm). Podem ser imóveis ou móveis com flagelos peritríquios e não formam esporos. Exigem requerimentos nutricionais simples e são capazes de crescer rapidamente em vários meios de cultura entre 22 a 35°C em condições aeróbicas ou anaeróbicas (aeróbios facultativos). Produzem ácidos e/ou gás durante a fermentação da glicose, reduzem nitratos a nitritos, muitos são catalase positivos e oxidase negativos (BRENNER e FARMER, 1994; MURRAY et al., 2003).

As enterobactérias são micro-organismos ubíquos, distribuídos de forma universal na natureza sendo encontrados no solo, água e vegetações, e também fazem parte da microbiota intestinal de muitos animais, incluindo o homem (MURRAY et al., 2003).

Atualmente, se tem descrito mais de 40 gêneros com quase 200 espécies (JANDA e ABBOTT, 2006). As principais espécies associadas com doenças humanas são *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis* e *Salmonella* spp. (HAWKEY, 2006).

Alguns micro-organismos são patogênicos (*Salmonella typhi*, *Shigella* spp. e *Yersinia pestis*) estando sempre associados a doenças humanas, enquanto outros fazem parte da microbiota intestinal (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis*), podendo causar infecções oportunistas (MURRAY et al., 2003).

Klebsiella spp. são patógenos oportunistas que causam infecções intra-abdominais, septicemia, pneumonia e infecções do trato urinário (ITUs) em pacientes imunocomprometidos hospitalizados. A incidência das infecções hospitalares causadas por *Klebsiella pneumoniae* varia de 5 a 7% de todas as infecções no ambiente hospitalar. Na comunidade é conhecida por causar

pneumonia, particularmente em etilistas crônicos (PODSCHUN e ULLMANN, 1998).

Escherichia coli é um dos agentes etiológicos que mais causam ITUs (SADER et al., 2001; 2004), sepse e meningite (HONG et al., 2005). Em pacientes da comunidade, tem sido responsável por causar surtos de infecção, principalmente do trato urinário (PITOUT et al., 2005).

Outras enterobactérias não menos clinicamente importantes, que produzem uma beta-lactamase AmpC cromossômica-induzível (*Serratia* spp., *Enterobacter* spp., *Morganella morganii*, *Citrobacter* spp., *Providencia* spp., *Proteus* spp. e *Hafnia alvei*), têm sido envolvidas nos mais variados tipos de infecção hospitalar, principalmente em pacientes imunocomprometidos como ITUs, de feridas, pneumonia e bacteremia (SADER et al., 2001; 2004; JANDA e ABBOTT, 2006; LOCKHART et al., 2007; ASHOUR e EL-SHARIF, 2009).

3.2 Antibióticos Beta-Lactâmicos

Os antibióticos beta-lactâmicos constituem a família mais numerosa e mais utilizada na prática médica, representando um consumo médio de 72% na atenção primária e de 67% nos hospitais da Espanha. Isso se deve pela sua elevada eficácia, baixo custo, facilidade de obtenção e o mínimo de efeitos colaterais (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

A presença de um anel beta-lactâmico define a estrutura química dessa família de antibióticos. A associação de diferentes tipos de cadeias lineares, junto com as características próprias do esqueleto básico formado por dois anéis (chamado núcleo), modifica as propriedades do composto resultante e origina diferentes grupos de beta-lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmico e inibidores das beta-lactamases (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

3.2.1 Espectro Antibacteriano dos Beta-Lactâmicos

Em geral, o espectro dos beta-lactâmicos inclui bactérias gram-positivas,

gram-negativas e espiroquetas. Não são antimicrobianos ativos sobre os micoplasmas (carência de parede celular) e nem sobre as bactérias intracelulares como as clamídias e riquetsias (baixa penetração no interior das células por serem compostos hidrofílicos polares) (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Os antibióticos do grupo das penicilinas incluem as penicilinas naturais (penicilina G, penicilina V), penicilinas resistentes às penicilinases (oxacilina), penicilinas de amplo espectro (aminopenicilinas: ampicilina e amoxicilina; ureidopenicilinas: piperacilina e mezlocilina; carboxipenicilinas: carbenicilina e ticarcilina) e penicilinas com inibidores das beta-lactamases (ampicilina/sulbactam, amoxicilina/ácido clavulânico, ticarcilina/ácido clavulânico e piperacilina/tazobactam). Estes antibióticos são muito utilizados para o tratamento de infecções causadas por cocos gram-positivos, cocos gram-negativos, bacilos gram-positivos, bacilos gram-negativos, incluindo multirresistentes e bactérias anaeróbias (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

As cefalosporinas são divididas em quatro gerações de acordo com o seu espectro de ação, que foi ampliado para os gram-negativos. São elas: 1ª geração (cefazolina, cefalotina e cefalexina), 2ª geração (cefuroxima e cefoxitina), 3ª geração (ceftriaxona, cefotaxima e ceftazidima) e de 4ª geração (cefepime) (SUÁREZ e GUDIOL, 2009; RUBTSOVA et al., 2010).

O monobactâmico, aztreonam, possui atividade sobre bactérias gram-negativas aeróbias e facultativas (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Os carbapenêmicos (imipenem, meropenem e ertapenem) são os beta-lactâmicos de maior espectro contra os gram-negativos, incluindo os microorganismos multirresistentes produtores de ESBL (ALBA et al., 2005; SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

3.2.2 Mecanismo de Ação dos Beta-Lactâmicos

Os beta-lactâmicos são antibióticos bactericidas que produzem seus efeitos por dois mecanismos: inibição da síntese da parede celular e indução da autólise bacteriana (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

Eles são incorporados na parede celular bacteriana e inibem a ação das

transpeptidases conhecidas como proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs, *Penicillin-Binding Proteins*) que atuam na síntese do peptidoglicano, levando ao aumento da permeabilidade na parede com consequente lise e morte celular (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003).

Os beta-lactâmicos também atuam ativando uma autolisina bacteriana endógena que destrói o peptidoglicano. Os isolados bacterianos que carecem da autolisina inibem seu crescimento na presença do beta-lactâmico, porém não se destroem completamente (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

3.3 Resistência aos Antimicrobianos

Desde a introdução para a terapêutica humana há 70 anos atrás, os antibióticos têm se mostrado em ser um dos maiores sucessos para a redução da morbidade e mortalidade por doenças microbianas (RICE, 2008).

A primeira beta-lactamase descrita por Abraham e Chain (1940) foi obtida em isolados de *Escherichia coli* na década de 40, antes do uso clínico da penicilina. Esta enzima se chamava penicilinase e não se pensou em ser clinicamente relevante. Logo após, a penicilina foi introduzida para tratar infecções por estafilococos e estreptococos. Quatro anos depois, foi extraída de *Staphylococcus aureus* uma substância que inativava penicilina, a qual prenunciava a emergência de um problema clínico (DRAWZ e BONOMO, 2010).

Informações relevantes sobre a resistência bacteriana apareceram nos anos de 1970, que a partir do final desse século a maioria dos isolados bacterianos eram resistentes a quase todos os antimicrobianos utilizados na época (RUBTSOVA et al., 2010).

3.3.1 Origem Genética da Resistência Bacteriana

A resistência aos antimicrobianos em bactérias é uma característica codificada geneticamente, podendo ser intrínseca ou adquirida (MULVEY e SIMOR,

2009).

A resistência natural, também dita intrínseca, está associada aos genes cromossomais. No entanto, existe outra forma de resistência aos antimicrobianos que pode ser adquirida. Esta envolve mudanças na composição genética do micro-organismo, podendo ocorrer por dois mecanismos principais: mutação ou aquisição de genes de resistência por transferência horizontal em elementos móveis de ácido desoxirribonucléico (DNA) (MULVEY e SIMOR, 2009).

As mutações são eventos incomuns que ocorrem numa frequência de 1 evento por 10^7 - 10^{10} bactérias, resultando no desenvolvimento da resistência durante a terapia em micro-organismos que são inicialmente sensíveis. Esta forma de resistência não é transferível para outros micro-organismos (MULVEY e SIMOR, 2009).

O maior problema na aquisição de resistência se deve pela presença de elementos genéticos móveis como os plasmídios, transposons ou integrons, que contribuem para a rápida disseminação dos genes de resistência aos antibióticos entre vários gêneros de bactérias (HARBOTTLE et al., 2006).

Os plasmídios de resistência são moléculas de DNA circular extracromossomais que se replicam independente do cromossomo bacteriano, nos quais são encontrados diversos genes de resistência aos antibióticos. Esses plasmídios podem servir como veículo para outros elementos de resistência, como os transposons e integrons. Os transposons são sequências de genes que podem se mover para o mesmo cromossomo, para outro cromossomo, para um plasmídio ou para um bacteriófago. Um integron é uma estrutura de DNA capaz de capturar e imobilizar genes de resistência contidos em cassetes por meio de um sistema de recombinação sítio-específica (NORMARK e NORMARK, 2002; HARBOTTLE et al., 2006; MULVEY e SIMOR, 2009).

3.3.1.1 Mecanismos de Transferência Genética de Elementos Móveis de DNA

Os mecanismos fundamentais pelos quais os elementos genéticos podem ser transferidos são conjugação, transformação e transdução.

A transformação é o processo que envolve a incorporação de uma molécula

livre de DNA em uma bactéria competente. Na transdução, o DNA é encapsulado em partículas de bacteriófagos que agirão como vetor para serem inseridos em uma célula receptora. A conjugação, que é mais facilmente demonstrada entre os membros da família *Enterobacteriaceae* e o principal mecanismo de disseminação de resistência, ocorre por contato entre as células bacterianas, receptora e doadora, por meio de *pili* sexual nas bactérias gram-negativas (DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003; DALE e PARK, 2004).

3.3.2 Mecanismos de Resistência aos Antimicrobianos e Beta-Lactâmicos

A resistência bacteriana pode ser causada por diversos mecanismos: (1) inativação enzimática do antimicrobiano; (2) síntese de enzimas protetoras dos ribossomos; (3) mutação no sítio alvo do antimicrobiano; (4) modificação do sítio alvo do antimicrobiano; (5) reduzida ligação do antimicrobiano no sítio alvo; (6) efluxo ativo do antimicrobiano; (7) aumento na síntese de substratos com o qual o antibiótico compete (GUILFOILE, 2007).

Há quatro principais mecanismos de resistência pelos quais as bactérias podem ser resistentes aos antibióticos beta-lactâmicos: (1) inativação enzimática pela produção de beta-lactamases, que é o mais comum e o mais importante mecanismo de resistência nas bactérias gram-negativas; (2) modificação no sítio alvo das PBPs, que podem diminuir a afinidade para os beta-lactâmicos e conseqüentemente aumentar a resistência a estes antibióticos; (3) diminuição na expressão das proteínas de membrana externa, porinas, (OMPs, *Outer Membrane Proteins*), modificando a penetração e conseqüente ação dos antibióticos; (4) bombas de efluxo, que são capazes de exportar um grande número de substratos do periplasma para o meio externo (DRAWZ e BONOMO, 2010).

No **Quadro 1** se ilustram os principais grupos de antimicrobianos, os mecanismos de ação e os diversos mecanismos de resistência.

Quadro 1 - Principais antimicrobianos, sítios alvos de ação e os diversos mecanismos de resistência.

Sítios Alvos	Antimicrobianos	Mecanismos de Resistência
Síntese da parede celular		
PBPs	Penicilinas	Inativação enzimática; Modificação do sítio alvo; Diminuição da captação pela perda de porinas; Bombas de efluxo.
	Cefalosporinas	
	Carbapenêmicos	
	Monobactâmico	
Ligação D-alanina-D-alanina	Glicopeptídeos	Alvos alterados por mutação.
Síntese protéica		
Subunidade 30S	Tetraciclinas	Bombas de efluxo; Diminuição da captação pela perda de porinas.
	Aminoglicosídeos	Alteração enzimática; Alvos alterados por mutação; Diminuição da captação pela perda de porinas; Bombas de efluxo.
Subunidade 50S	Cloranfenicol	Alteração enzimática; Diminuição da captação pela perda de porinas.
	Ácido Fusídico	Bombas de efluxo.
	Macrolídeos	Alteração enzimática; Alvos alterados por mutação; Bombas de efluxo.
	Lincosamidas	
	Estreptograminas	
Síntese do ácido nucléico		
DNA	Fluoroquinolonas	Diminuição da captação pela perda de porinas; Alvos alterados por mutação; Bombas de efluxo.
RNA	Rifampicina	Alteração de alvo enzimático por mutação.
Metabolismo do ácido fólico		
	Sulfonamidas	Inibição metabólica; Alteração do alvo enzimático.
	Trimetoprim	

Fonte: Quadro adaptado de GUILFOILE, 2007; MULVEY e SIMOR, 2009.

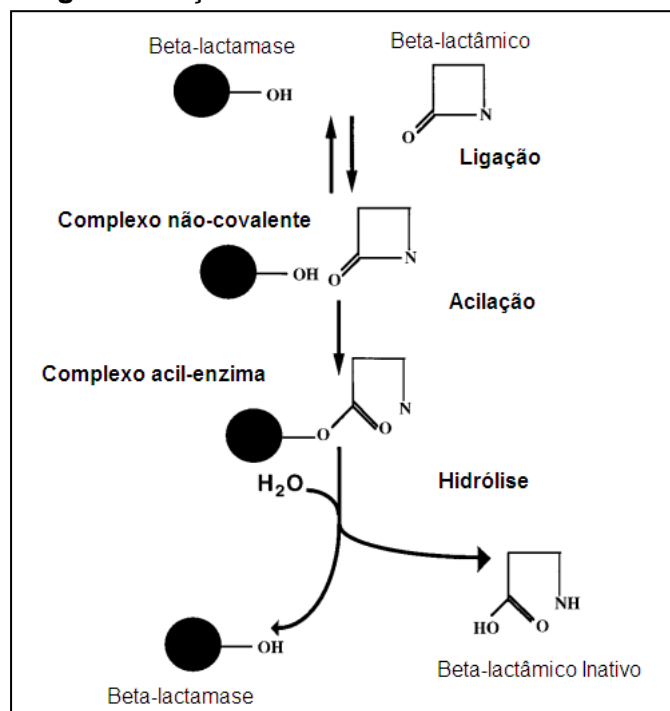
3.4 Enzimas Beta-Lactamases

As beta-lactamases compreendem uma superfamília de diferentes enzimas

relacionadas geneticamente e funcionalmente, sendo elas a causa mais comum de resistência bacteriana aos antibióticos beta-lactâmicos (RUBTSOVA et al., 2010).

Algumas beta-lactamases utilizam o íon zinco, mas a maioria apresenta resíduos de serina no sítio ativo da enzima para romper o anel beta-lactâmico com consequente inativação do antibiótico (SAMAH-KFOURY e ARAJ, 2003). A **Figura 1** demonstra a ação de uma serina beta-lactamase.

Figura 1 - Ação de uma serina beta-lactamase.



Fonte: Figura adaptada de LIVERMORE, 1995.

Vários fatores são determinantes para que uma beta-lactamase confira resistência a um antibiótico beta-lactâmico. Entre eles estão: a localização celular das beta-lactamases; (2) a taxa de hidrólise da enzima, dependente da concentração do antibiótico e da velocidade com que o antibiótico penetra pela membrana externa das bactérias gram-negativas; (3) a afinidade do beta-lactâmico pela beta-lactamase; (4) o tipo de beta-lactamase (LIVERMORE, 1995).

Nas bactérias gram-positivas são secretadas para o meio extracelular, diluindo-se no meio. Já nas bactérias gram-negativas são encontradas no espaço periplasmático e por isso podem alcançar altas concentrações e maior eficácia. Os

genes que codificam a produção dessas enzimas podem estar localizados no cromossomo bacteriano, como exemplo *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase SHV-1, ou extracromossomais (plasmídios, transposons ou integrons) (SAMAHA-KFOURY e ARAJ, 2003; RUBTSOVA et al., 2010). As beta-lactamases cromossômicas são produzidas de forma constitutiva (a enzima pode ser detectada na ausência do beta-lactâmico) ou induzível, as plasmídio-mediadas são constitutivamente expressas (LIVERMORE, 1995).

Elas são classificadas em dois grandes grupos: a classificação molecular de Ambler e a classificação funcional de Bush-Jacoby-Medeiros (BUSH e JACOBY, 2010). O **Quadro 2** demonstra as diferenças entre os dois principais esquemas de classificação.

A mais simples e estável classificação por não ser interferida por mutações é a classificação molecular de Ambler, que é baseada no nível de homologia e regiões conservadas na estrutura da enzima e do sítio ativo, as quais foram separadas em quatro classes A, B, C e D (RUBTSOVA et al., 2010).

As enzimas da classe A são penicilinasas e cefalosporinasas normalmente encontradas em plasmídios ou transposons; as da classe B são metalo-beta-lactamases; as da classe C são cefalosporinasas cromossômicas ou plasmídio-mediadas; e, as da classe D são oxacilinasas. As enzimas das classes A, C e D têm serina como resíduo catalítico no seu sítio ativo. As metalo-enzimas da classe B possuem zinco no seu sítio ativo. As classes A e C são as mais frequentes entre as bactérias (BONNET, 2004; BUSH e JACOBY, 2010).

A classificação funcional agrupou as enzimas de acordo com perfil preferencial de hidrólise de substratos e inibidores das beta-lactamases. Este modelo de classificação é de relevância imediata para os clínicos e microbiologistas no diagnóstico laboratorial porque correlaciona as características fenotípicas dos isolados (PATERSON e BONOMO, 2005; BUSH e JACOBY, 2010).

As beta-lactamases do grupo 1 são cefalosporinasas cromossômicas fracamente inibidas pelo ácido clavulânico. O grupo 3 são metalo-enzimas encontradas em *Pseudomonas* spp., *Bacteroides* spp. e *Serratia marcescens* (BUSH e JACOBY, 2010).

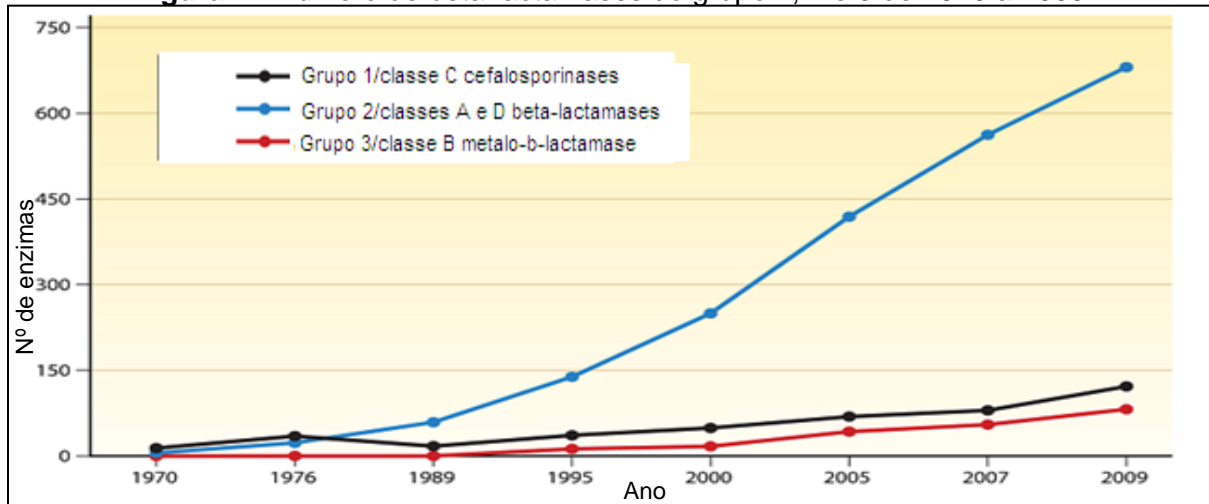
Quadro 2 - Esquemas de classificação de beta-lactamases bacterianas.

Grupo Bush-Jacoby (2009)	Grupo Bush-Jacoby-Medeiros (1995)	Classe Molecular (subclasse)	Substrato	Inibido por		Características	Enzimas Representativas
				AC ou TZB ^a	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrolisam cefalosporinas melhor que benzilpenicilinas; hidrolisam cefamicinas	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX-1, MIR-1
1e	NI ^b	C	Cefalosporinas	Não	Não	Crescente atividade hidrolítica de ceftazidima e outros oximino-beta-lactâmicos	GC1, CMY-37
2a	2a	A	Penicilinas	Sim	Não	Hidrolisam benzilpenicilinas melhor que cefalosporinas	PC1
2b	2b	A	Penicilinas e Cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de amplo-espectro e monobactâmico	Sim	Não	Crescente atividade hidrolítica de oximino-beta-lactâmicos	TEM-3, SHV-2, CTX-M-15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de amplo-espectro e monobactâmico	Não	Não	Crescente atividade hidrolítica de oximino-beta-lactâmicos e resistência ao ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Crescente atividade hidrolítica de carbenicilina	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina e Cefepime	Sim	Não	Crescente atividade hidrolítica de carbenicilina, cefepime e cefpirome	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Crescente atividade hidrolítica de cloxacilina ou oxacilina	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de amplo-espectro	Variável	Não	Crescente atividade hidrolítica de cloxacilina ou oxacilina e oximino-beta-lactâmico	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenêmicos	Variável	Não	Crescente atividade hidrolítica de cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de amplo-espectro	Sim	Não	Hidrólise de cefalosporinas, inibidas por ácido clavulânico, mas não aztreonam	CepA
2f	2f	A	Carbapenêmicos	Variável	Não	Crescente atividade hidrolítica de carbapenêmicos, oximino-beta-lactâmicos e cefamicinas	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Amplo-espectro hidrolítico, incluindo os carbapenêmicos, mas não aztreonam	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (B2)	Carbapenêmicos	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconhecidas					

a – AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam; b – NI, não incluído; Fonte: Quadro adaptado de BUSH e JACOBY, 2010.

As beta-lactamases do grupo 2 são o maior grupo devido, principalmente, ao aumento da identificação de ESBLs nos últimos 20 anos. São compostas por penicilinases, cefalosporinases, ESBLs, oxacilinases e carbapenemases (**Figura 2**) (BUSH e JACOBY, 2010).

Figura 2 - Número de beta-lactamases do grupo 1, 2 e 3 de 1970 a 2009.



Fonte: Figura adaptada de BUSH e JACOBY, 2010.

Atualmente há mais de 890 beta-lactamases descritas, sendo a maioria ESBL dos tipos TEM, SHV e CTX-M os mais disseminados pelo mundo na família *Enterobacteriaceae* (BUSH e JACOBY, 2010) (**Quadro 3**).

Quadro 3 - Famílias de beta-lactamases de maior importância clínica nas enterobactérias.

Família de Enzima ^a	Grupo Funcional	Nº de Enzimas	Enzimas Representativas
TEM	2b, 2be, 2br, 2ber	172	
	2b	12	TEM-1, TEM-2, TEM-13
	2be	79	TEM-3, TEM-10, TEM-26
	2br	36	TEM-30, TEM-31, TEM-163
	2ber	9	TEM-50, TEM-158
SHV	2b, 2be, 2br	127	
	2b	30	SHV-1, SHV-11, SHV-89
	2be	37	SHV-2, SHV-3, SHV-115
CTX-M	2br	5	SHV-10, SHV-72
	2be	90	CTX-M-1, CTX-M-44 a CTX-M-92
KPC	2f	9	KPC-2 a KPC-10

Fonte: Quadro adaptado de BUSH e JACOBY, 2010. a – identificados até 2009.

3.5 Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBLs)

Para combater a resistência bacteriana em resposta à emergência de beta-lactamases clássicas em certos micro-organismos (*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de TEM-1 e SHV-1), bem como em outros micro-organismos já disseminadas (*Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae*), as cefalosporinas de amplo espectro foram introduzidas na prática clínica no começo dos anos de 1980 (DRAWZ e BONOMO, 2010).

Estes antibióticos passaram a ser adotados para o tratamento de pneumonias, infecções intra-abdominais e do trato urinário, devido ao seu amplo espectro de ação contra as bactérias resistentes e seus efeitos menos tóxicos (PATERSON e BONOMO, 2005; DRAWZ e BONOMO, 2010).

Entretanto, o uso abusivo e inadequado das cefalosporinas exerceu forte pressão seletiva sobre as bactérias produtoras das beta-lactamases clássicas, selecionando um novo mecanismo de resistência, denominado de Beta-Lactamase de Espectro Estendido (ESBL) (SAMAHAKFOURY e ARAJ, 2003).

As ESBLs surgiram de mutações pontuais ocorridas em genes estruturais, que codificavam as beta-lactamases clássicas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 em locais próximos a seus sítios ativos, ampliando seus espectros hidrolíticos (SAMAHAKFOURY e ARAJ, 2003).

Estas enzimas agem catalisando a hidrólise do anel beta-lactâmico, inativando a ação das penicilinas, cefalosporinas e aztreonam. Não apresentam atividade contra cefamicinas ou carbapenêmicos e são inibidas pelos inibidores das beta-lactamases como o ácido clavulânico (PATERSON e BONOMO, 2005).

São encontradas principalmente na família *Enterobacteriaceae* (RUBTSOVA et al., 2010), sendo *Klebsiella pneumoniae* a principal produtora, seguida por *Escherichia coli* (SADER et al., 2004). Nas espécies com beta-lactamases AmpC induzíveis a detecção de ESBLs tem se tornado prevalente. Entre os não-fermentadores, as ESBLs já foram observadas em *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Burkholderia cepacia* e *Alcaligenes fecalis* (AL-JASSER, 2006).

As bactérias produtoras de ESBLs podem causar diversos tipos de doenças, desde colonização até sérias infecções como bacteremia e do trato urinário (ALCANTAR-CURIEL et al., 2004; FRIEDMANN et al., 2009).

As ESBLs são enzimas adquiridas, mediadas em sua maioria por genes plasmidiais, embora são localizadas em outros elementos móveis como os transposons, elementos de *IS* (*Insertion Sequence*), classe 1 de integrons e *ISCR1*, o que facilita a sua rápida disseminação (RUBTSOVA et al., 2010).

Algumas bactérias produtoras de ESBL podem conter apenas um gene de resistência, mas múltiplos genes também podem estar presentes em um único isolado bacteriano, dificultando a identificação de um regime terapêutico adequado. Frequentemente, estas bactérias estão associadas com fenótipo de multidroga resistência (MDR), porque no mesmo plasmídeo podem ser encontrados genes com outros mecanismos de resistência como aos aminoglicosídeos, quinolonas, sulfametoxazol/trimetoprim, cloranfenicol e tetraciclina (WINOKUR et al., 2001; SAMAHA-KFOURY e ARAJ, 2003).

Por estes motivos, que as infecções por bactérias produtoras de ESBLs mesmo sendo sensíveis aos carbapenêmicos, representam um risco significativo para a saúde pública, pois estão associadas com altas taxas de morbidade e mortalidade (PATERSON e BONOMO, 2005).

3.5.1 ESBL Tipo TEM

As ESBLs do tipo TEM são derivadas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi relatada pela primeira vez em 1965 de um isolado de *Escherichia coli* em uma paciente de Atenas, Grécia, denominada **Temoneira** (por isso a designação TEM) (JACOBY, 2006).

TEM-1, TEM-2 e TEM-13 não são ESBLs. Possuem capacidade hidrolítica menos eficiente que as TEM-ESBL, sendo capazes de hidrolisar apenas penicilinas e cefalosporinas de 1ª geração. TEM-2, a primeira enzima derivada de TEM-1, apresenta uma única substituição na sequência de aminoácidos da beta-lactamase original. TEM-1 e TEM-2 apresentam o mesmo perfil hidrolítico, diferindo apenas no

promotor (mais ativo em TEM-2) e no ponto isoelétrico (5,6 e 5,4, respectivamente). TEM-13 apresenta perfil similar as TEM-1 e TEM-2 (PATERSON e BONOMO, 2005).

A primeira descrição de uma ESBL do tipo TEM foi detectada em isolados de *Klebsiella pneumoniae* na França em 1984. Estes isolados possuíam uma beta-lactamase plasmídeo-mediada, CTX-1, que recebeu essa denominação devido a sua atividade hidrolítica aumentada contra cefotaxima. Posteriormente, denominada de TEM-3, difere de TEM-2 por duas substituições nas sequências dos aminoácidos (DU BOIS et al., 1995).

Atualmente são descritos mais de 180 tipos de TEM, a maioria das quais são ESBLs (Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>> Acesso em: 06/09/2011).

3.5.2 ESBL Tipo SHV

A designação SHV se refere às propriedades bioquímicas da enzima (*SulphHydryl Variable*) (JACOBY, 2006).

SHV-1 e SHV-11 não exibem fenótipo ESBL. A beta-lactamase SHV-1 é principalmente encontrada em *Klebsiella pneumoniae* como uma beta-lactamase cromossômico-constitutiva conferindo resistência à ampicilina, amoxicilina e carboxipenicilinas (BRADFORD, 2001).

Em 1983 na Alemanha, isolados de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Serratia marcescens* foram detectados com uma beta-lactamase que hidrolisava cefotaxima e em menor grau ceftazidima. Técnicas de sequenciamento mostraram que a nova beta-lactamase SHV-2 diferia da SHV-1 por uma substituição de serina por glicina na posição 238, que é fundamental para a hidrólise eficiente de ceftazidima. Além disso, alguns isolados com SHV-5 têm uma substituição de lisina por glutamato na posição 240, fundamental para a hidrólise eficiente de cefotaxima (PATERSON e BONOMO, 2005).

Atualmente são descritos mais de 100 variedades, sendo a maioria ESBLs (Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>> Acesso em: 06/09/2011).

3.5.3 ESBL Tipo CTX-M

São designadas de CTX-M devido a sua potente atividade hidrolítica contra cefotaxima e por ter sido descoberta em Munique (JACOBY, 2006). Contudo, existem diversas enzimas do tipo CTX-M (CTX-M-15, CTX-M-16, CTX-M-19 e CTX-M-27) que hidrolisam eficazmente a ceftazidima, assim como cefepime (PATERSON e BONOMO, 2005).

A primeira enzima do tipo CTX-M foi descoberta por Bauernfeind e colaboradores em 1989 em um isolado clínico de *Escherichia coli* na Alemanha que produzia uma ESBL não-TEM e não-SHV, designada de CTX-M-1 com potente atividade hidrolítica contra cefotaxima (BONNET, 2004).

A expansão dessas enzimas se tornou significativa a partir de 1995, tornando-se endêmicas em diversas regiões geográficas, incluindo: América Latina, Europa, América do Norte, África, América do Sul e Ásia (BONNET, 2004).

Entre os tipos de ESBL, CTX-M é o mais frequente, tanto no ambiente hospitalar como na comunidade, devido a sua rápida emergência e disseminação pelo mundo (AL-JASSER, 2006; CANTON e COQUE, 2006).

Diferentes elementos genéticos estão envolvidos na mobilização dos genes *bla*CTX-M, são eles: elementos de inserção (*ISECp1* e *ISCR1*) e integrons (*InS21*, *In35* e *In60*), facilitando a sua disseminação entre diferentes espécies ou gêneros da família *Enterobacteriaceae* (BONNET, 2004).

As ESBLs do tipo CTX-M são estreitamente relacionadas com os genes cromossomais de *Kluyvera cryocrescens* (*bla*KLUC-1), *Kluyvera ascorbata* (*bla*KLUA) e *Kluyvera georgiana* (*bla*KLUG-1). Espécies ambientais que apresentam resistência natural aos beta-lactâmicos (BONNET, 2004). Para confirmar este fato, estas enzimas não se relacionam com as beta-lactamases TEM e SHV, as quais mostram apenas 40% de similaridade com estas duas enzimas (TZOUVELEKIS et al., 2000), sugerindo uma origem diferente para a beta-lactamase CTX-M (PATERSON e BONOMO, 2005).

Atualmente existem mais de 110 enzimas agregadas em seis grupos filogenéticos: grupos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9, CTX-M-25 (BONNET, 2004) e CTX-M-45 (ROSSOLINI et al., 2008), de acordo com as sequências dos

seus nucleotídeos (Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>> Acesso em: 06/09/2011).

3.5.4 Epidemiologia Global das ESBLs

A primeira enzima ESBL foi identificada na Alemanha em 1983 em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Serratia marcescens* com a descoberta de uma nova variante SHV, SHV-2 (VILLEGAS et al., 2008).

Em 1985, o primeiro surto de infecção hospitalar causado por isolados de *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBLs emergiu na França. No final dos anos de 1980 foram detectadas nos Estados Unidos e, logo depois disso, houve uma explosão de relatos de ESBLs pelo mundo. Na América do Sul não foi exceção e foi detectado que entre as ESBLs, o tipo CTX-M, se tornou o mais comum desde 1989 (VILLEGAS et al., 2008).

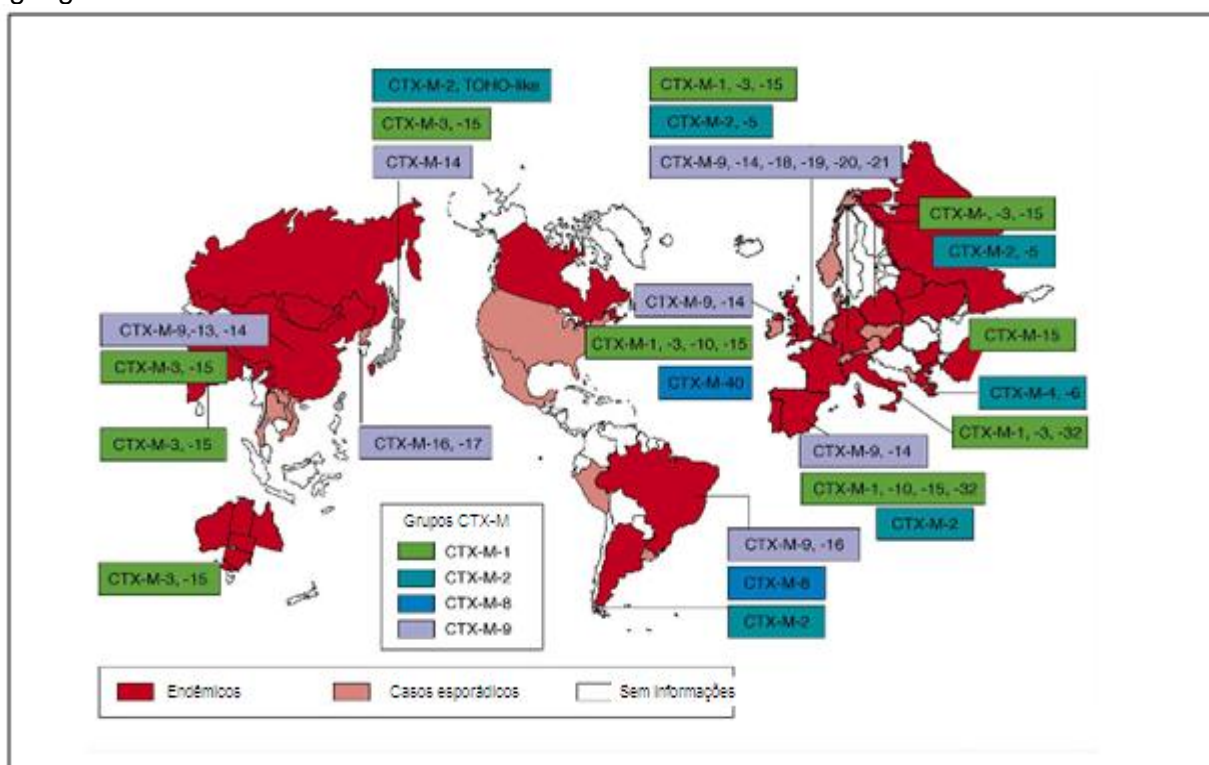
Durante os anos de 1990 houve um grande número de relatos de ESBLs tipos TEM e SHV em associação com surtos de infecção hospitalar em muitas partes do mundo, sendo raramente descritas *Enterobacteriaceae* produtoras de enzimas do tipo CTX-M (DENTON, 2007).

Inicialmente, as bactérias produtoras de ESBLs eram apenas causadoras de infecções hospitalares, causando frequentes surtos de infecção. *Klebsiella pneumoniae* é a principal espécie associada com os surtos, dos quais a maioria ocorre por disseminação clonal, especialmente em UCIs. O trato digestivo inferior dos pacientes colonizados foi reconhecido como a principal fonte de micro-organismos produtores de ESBLs e as disseminações entre os pacientes têm sido atribuídas às mãos dos profissionais de saúde (AL-JASSER, 2006).

Mas, no começo do século 21 esta realidade mudou e nos últimos nove anos houve um aumento da emergência de ESBLs do tipo CTX-M, particularmente em associação com infecções adquiridas na comunidade. A principal bactéria isolada das infecções adquiridas na comunidade é *Escherichia coli*, principalmente de infecções urinárias em micro-organismos produtores de CTX-M (DENTON, 2007; CANTON et al., 2008).

A **Figura 3** apresenta a corrente situação da ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas. Verifica-se uma situação endêmica na maior parte dos países Europeus, na Ásia e na América do Sul (CANTON e COQUE, 2006). Nos Estados Unidos são reportados casos esporádicos de isolados produtores de CTX-M (PATERSON e BONOMO, 2005).

Figura 3 - Ocorrência e diversidade de ESBLs do tipo CTX-M em diferentes áreas geográficas.



Fonte: Figura adaptada de CANTON e COQUE, 2006.

3.5.4.1 Epidemiologia de ESBLs na América do Sul e Brasil

Os níveis de ESBLs na América do Sul estão entre os maiores do mundo (VILLEGAS et al., 2008).

A ESBL tipo TEM foi descrita pela primeira vez na América do Sul por Paterson e colaboradores em 2003 quando foi descoberta a enzima TEM-10 em isolados de *Klebsiella pneumoniae* obtidos do sangue de pacientes em hospitais da Argentina (JACOBY e MUNOZ-PRICE, 2005).

As ESBLs SHV-5 e SHV-12 são os tipos mais comuns de beta-lactamase SHV na América do Sul. Entretanto em países da América do Sul, as ESBLs CTX-M se tornaram dominantes e endêmicas em alguns países como o Brasil, Peru e Bolívia (VILLEGAS et al., 2008).

No Brasil, a prevalência de isolados produtores de ESBLs é bastante expressiva. Já foram detectadas em diversas regiões do país como São Paulo (DROPA et al., 2009), Rio de Janeiro, Florianópolis (SADER et al., 2004), Curitiba (NOGUEIRA et al., 2006), Porto Alegre (FREITAS et al., 2003), Salvador (SILVA et al., 2006), Ceará (MOTTA et al., 2003), Goiânia (SANTOS et al., 2008).

3.6 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC)

O uso dos carbapenêmicos durante as últimas duas décadas tem aumentado devido, principalmente, ao seu espectro de ação contra as bactérias produtoras de ESBLs (ALBA et al., 2005). Com isso, diversos mecanismos de resistência aos carbapenêmicos têm surgido e entre eles a produção de beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos têm se tornado uma ameaça a essa classe de antibióticos (NORDMANN et al., 2011).

Embora seja um fenótipo raro de resistência em *Enterobacteriaceae*, tem aumentado pelo mundo, especialmente devido à emergência e disseminação de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) (QUEENAN e BUSH, 2007).

KPCs são carbapenemases classificadas no grupo funcional 2f de Bush-Jacoby-Medeiros e classe A de Ambler com capacidade de hidrolisarem todos os antibióticos beta-lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, cefalosporinas, penicilinas e aztreonam, e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (QUEENAN e BUSH, 2007; BUSH e JACOBY, 2010).

São enzimas adquiridas com implicações epidemiológicas pela facilidade de disseminação entre as espécies de enterobactérias por serem carregadas em genes plasmidiais, transposons (Tn4401) e integrons (NAAS et al., 2008). Frequentemente, estes genes carregam resistência às ESBLs, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e sulfametoxazol/trimetoprim (NORDMANN et al., 2009), limitando as opções terapêuticas.

Embora sejam, especialmente, detectadas em *Klebsiella pneumoniae*, um micro-organismo notório pela sua habilidade de acumular e transferir determinantes de resistência (QUEENAN e BUSH, 2007), as KPCs têm sido detectadas em outros bacilos gram-negativos como *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter gergoviae*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Salmonella enterica*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* (KITCHEL et al., 2009) e mais recentemente em *Acinetobacter baumannii* (ROBLEDO et al., 2010).

O primeiro membro da família KPC foi descoberto em uma pesquisa realizada pelo projeto de resistência aos antimicrobianos ICARE, *Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology*, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* resistente ao imipenem em hospitais dos Estados Unidos na Carolina do Norte em 1996, que identificaram esta beta-lactamase como KPC-1 (QUEENAN e BUSH, 2007).

KPC-2 foi descrita com resultado de uma mutação pontual em KPC-1 obtida de isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes ao imipenem de Baltimore, Maryland entre 1998 a 1999, *Salmonella enterica* sorovar Cubana também em Maryland, bem como em isolados de *Klebsiella oxytoca* e *Klebsiella pneumoniae* de Nova Iorque. Estes casos estavam possivelmente relacionados com a disseminação das enzimas KPC-1 ao leste dos Estados Unidos. Posteriormente, ficou demonstrado que as enzimas KPC-1 e KPC-2 eram geneticamente idênticas (QUEENAN e BUSH, 2007; NORDMANN et al., 2009).

Surtos de infecção hospitalar em Nova Iorque entre 2000 a 2001 por isolados de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos produziram uma nova variante KPC, denominada KPC-3 (QUEENAN e BUSH, 2007).

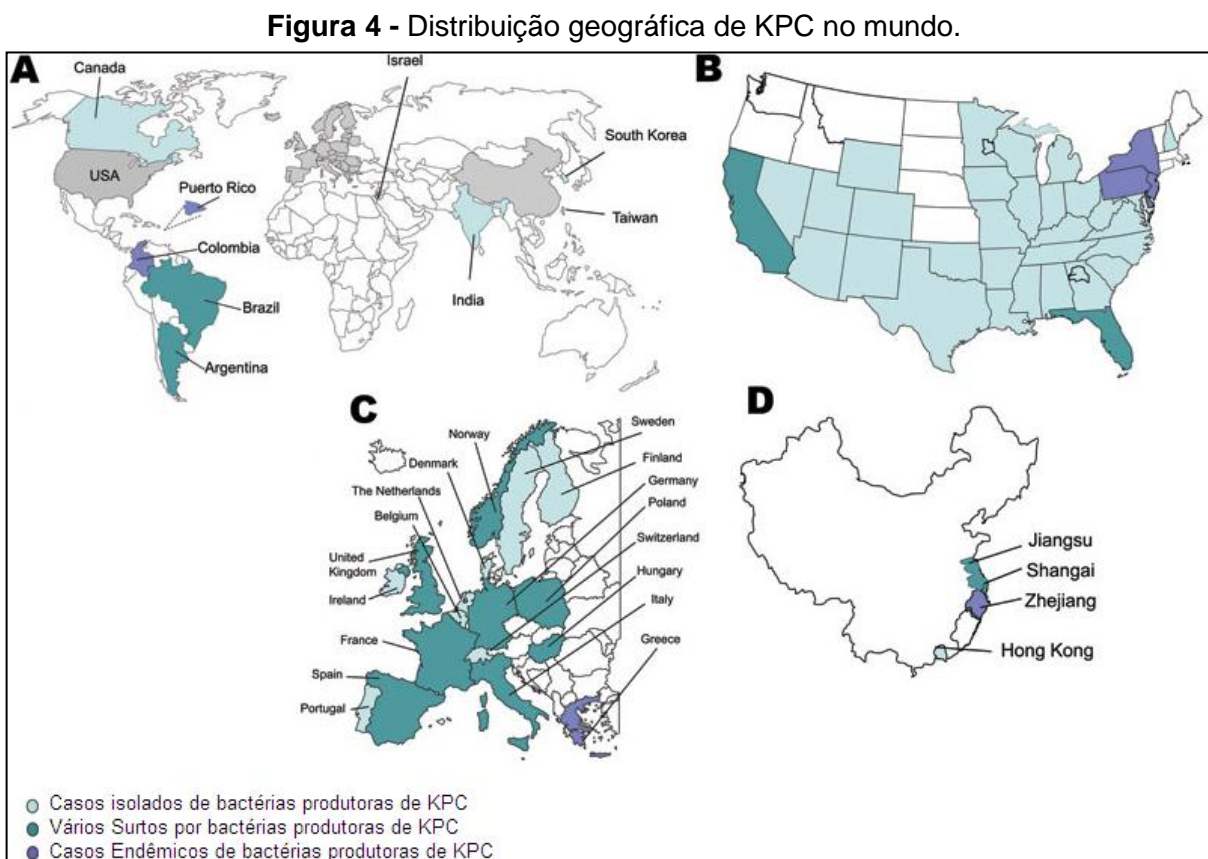
Atualmente existem 10 variantes da família KPC (KPC-2 a KPC-11), das quais KPC-2 e KPC-3 têm sido relatadas como as mais frequentes na família *Enterobacteriaceae* (CHEN et al., 2011).

Até 2005, a distribuição geográfica destas enzimas em membros da família *Enterobacteriaceae*, particularmente em *Klebsiella pneumoniae*, era limitada ao leste dos Estados Unidos (QUEENAN e BUSH, 2007).

Logo depois, a distribuição de KPC se tornou mundial com relatos de surtos de infecção hospitalar em diversos países como França, China, Suécia, Noruega, Colômbia, Brasil, Escócia, Trinidad, Tobago e Polônia (HIRSCH e TAM, 2010). Casos endêmicos têm sido detectados em Israel, Grécia, nordeste dos Estados

Unidos, Colômbia, Porto Rico e em uma República Chinesa (NORDMANN et al., 2011).

Na **Figura 4** se observa a distribuição geográfica de KPC no mundo e os países onde têm casos endêmicos.



A – Distribuição mundial; B – Estados Unidos; C – Europa; D – China.

Fonte: Figura adaptada de NORDMANN et al., 2011.

Muitas das infecções por enterobactérias produtoras de KPC ocorrem de forma sistêmica em pacientes com dispositivos invasivos (catéter venoso central, tubo nasogástrico, catéter urinário), particularmente em imunocomprometidos (NORDMANN et al., 2009).

Entre os fatores de risco para a aquisição das infecções por bactérias produtoras de KPC estão o uso prévio de múltiplos antibióticos (beta-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas), hospitalização prolongada, internação em UCIs e imunossupressão (NORDMANN et al., 2009).

A detecção de carbapenemase no laboratório de microbiologia é de muita importância e extrema necessidade, porque nem sempre a presença do gene *blaKPC* resulta em resistência aos carbapenêmicos *in vitro* e conseqüentemente os testes fenotípicos podem sugerir que os produtores de KPC sejam produtores de ESBLs, permitindo terapia inadequada com elevado nível de mortalidade (THOMSON, 2010).

O tratamento das infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de KPC é limitado, sendo basicamente restritos a tigeciclina e polimixinas ou combinações destes com aminoglicosídeos, embora essa última opção apresente elevado grau de toxicidade (HIRSCH e TAM, 2010).

3.7 Vigilância e Epidemiologia Molecular da Resistência Bacteriana

A presença de alguns fatores como o uso de antibióticos e de dispositivos (cateteres e ventilação mecânica) viabiliza o prolongamento da sobrevivência do paciente, porém são determinantes para o desenvolvimento de infecção hospitalar. No ambiente comunitário, o principal fator que determina o desenvolvimento de infecções por bactérias multirresistentes é consumo de forma indiscriminada dos antibióticos (PEREIRA et al., 2000; HAWKEY e JONES, 2009).

Classicamente, a infecção hospitalar é qualquer infecção adquirida após a internação do paciente e que se manifeste durante a internação, ou mesmo após a alta, quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares. Já a infecção comunitária é a infecção constatada ou em incubação no ato de admissão do paciente, desde que não relacionada com internação anterior no mesmo hospital (BRASIL, 1998).

Um dos principais problemas da resistência bacteriana está nas bactérias produtoras de ESBL e KPC, em que seus genes estão localizados em elementos genéticos móveis e frequentemente possuem mecanismos de resistência a outras classes de antibióticos (SINGH et al., 2006), permitindo a sua rápida disseminação com limitadas opções terapêuticas, as quais estão relacionadas à grande mortalidade, ocasionando maior tempo de internação e alto custo com exames e medicamentos (MARTINS et al., 2006). As infecções comunitárias dificultam a

terapia empírica e importam as bactérias multirresistentes para o ambiente hospitalar (PITOUT e LAUPLAND, 2008).

Para se conter o surgimento e a rápida disseminação dos mecanismos de resistência aos antibióticos entre vários isolados bacterianos, programas de vigilância da resistência têm sido conduzidos em vários países (MASTERTON, 2008).

Nestes programas, a aplicação das técnicas moleculares para a tipagem de isolados bacterianos resistentes permite a obtenção de informações não acessíveis pela utilização exclusiva de métodos fenotípicos, como a identificação das fontes de contaminação (pessoal ou ambiental), rastreamento da disseminação dos clones e o controle dos surtos de infecção (TOSIN et al., 2003; SINGH et al., 2006).

A descoberta de clones dentro de um ambiente hospitalar tem um impacto direto sobre o método de intervenção. Se os isolados em um agrupamento são genotipicamente diferentes (policlonais), o agrupamento pode ser devido à pressão excessiva de antibióticos, resultando na seleção de um fenótipo de resistência dentro um grupo de isolados não-relacionados, os quais são limitados pelo uso restrito de determinada classe de antibiótico. Quando geneticamente idênticos, são ditos clonais, demonstrando a transferência cruzada entre os pacientes. Este caso é focado na adoção de barreiras para limitar a disseminação, como isolamento dos pacientes necessários e métodos de assepsia para a lavagem das mãos (WEINSTEIN, 2001; TOSIN et al., 2003).

Consequentemente para se fazer o controle da disseminação da resistência aos antibióticos, a vigilância contínua deve ser realizada por meios de tipagem molecular (WEINSTEIN, 2001).

Atualmente diversos métodos de tipagem genética se tornaram acessíveis. A eletroforese em campo pulsado (PFGE, *Pulsed-field Gel Electrophoresis*) é um dos métodos mais amplamente utilizados, entretanto apresenta desvantagens na execução e alto custo. Outros métodos com elevado poder discriminatório estão sendo utilizados, são eles: amplificação aleatória de polimorfismos no DNA (RAPD, *Randomly Amplified Polymorphic DNA*), ribotipagem e amplificação por PCR de sequências repetidas no genoma bacteriano (SINGH et al., 2006).

3.7.1 Microssatélites

As sequências simples repetidas (SSRs, *Simple Sequence Repeats*) são regiões denominadas de microssatélites com 1 a 6 nucleotídeos que se repetem em *tandem* (blocos) em um dado *locus* distribuído ao longo do genoma, principalmente em regiões não codificantes (VAN BELKUM et al., 1998).

Os microssatélites são utilizados como marcadores moleculares devido ao alto nível de polimorfismo encontrado em seus *loci*, o que proporciona sua utilização em diversos propósitos de estudo como identificação de clones, linhagens, híbridos, cultivares, paternidade, estimativas de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, parentesco e na construção de mapas genéticos (VERSALOVIC e LUPSKI, 2002).

O deslizamento (*slippage*) da DNA polimerase durante a replicação do DNA é tida como a principal causa da variação no número de repetições nesses *loci*. Os diferentes números de repetições caracterizam os diferentes alelos, que podem ser detectados em gel de eletroforese (BZYMEK e LOVETT, 2001).

O iniciador (GTG)₅ é utilizado para amplificação de regiões repetidas, produzindo padrão de amplificação que revela polimorfismos de DNA nas sequências de nucleotídeos entre dois sítios de microssatélites no genoma. Em estudos recentes, as análises de *fingerprinting* com (GTG)₅-PCR têm sido utilizadas para a tipagem molecular de *Acinetobacter baumannii* (HUYS et al., 2005), *Salmonella enterica* (RASSCHAERT et al., 2005), *Campylobacter concisus* (MATSHEKA et al., 2006), *Enterococcus faecium* (JURKOVIC et al., 2007), *Escherichia coli* (MOHAPATRA et al., 2008), *Streptococcus mutans* (SVEC et al., 2008), *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca* (RYBERG et al., 2011) e para a identificação de bactérias produtoras de ácido láctico (SVEC et al., 2007) e *Staphylococcus coagulase-negativos* (BRAEM et al., 2011).

4 METODOLOGIA

4.1 Local de Realização do Trabalho

O trabalho foi realizado no Laboratório de Genética e Microbiologia Aplicada da Universidade Federal de Alagoas (BIOGEN/UFAL) com aprovação do Comitê de Ética e Pesquisa da UFAL sob o número 009285/2009-31.

4.2 Obtenção dos Isolados Bacterianos

Foram obtidos 254 isolados bacterianos da família *Enterobacteriaceae* fenotipicamente produtores de ESBL de diversas amostras clínicas de pacientes atendidos em cinco hospitais de alta complexidade hospitalar de Alagoas, sendo quatro localizados em Maceió (Hospital Santa Casa, Hospital Geral de Alagoas, Maternidade Escola Santa Mônica e Hospital Escola Dr. Hêlvio Auto) e um em Arapiraca (Unidade de Emergência do Agreste) entre Março de 2008 a Dezembro de 2010. Somente um isolado bacteriano por paciente fez parte do estudo.

4.3 Identificação dos Isolados Bacterianos

A identificação das espécies de enterobactérias foi realizada como de rotina pelos profissionais do setor de microbiologia clínica dos hospitais. Todos os isolados bacterianos foram identificados pelo método enzimático/colorimétrico em um aparelho semi-automatizado AutoScan-4 (Dade Behring®), com exceção dos isolados obtidos da Unidade de Emergência do Agreste, os quais foram cedidos previamente identificados pelo método de sequenciamento do gene rDNA 16S.

4.4 Análise Fenotípica da Resistência Bacteriana

4.4.1 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos *in vitro*

Para determinação do perfil de resistência das enterobactérias aos antibióticos foram realizados antibiogramas pelo método de disco-difusão desenvolvido por Kirby-Bauer e padronizado pelo CLSI M2-A9 (CLSI, 2006).

Os isolados foram semeados em caldo Müeller-Hinton e incubados a 37°C até obtenção de turvação conforme a escala 0,5 de Mac Farland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Com auxílio de um swab, as suspensões bacterianas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton. Após 5 minutos, foram aplicados os discos de antibióticos: aminoglicosídeos (amicacina 30 µg e gentamicina 10 µg), carbapenêmicos (imipenem 10 µg, ertapenem 10 µg e meropenem 10 µg), fluoroquinolonas (ciprofloxacina 5 µg e levofloxacina 5 µg), monobactâmico (aztreonam 30 µg), cefalosporina de 4º geração (cefepime 30 µg), cefalosporinas de 3º geração (cefotaxima 30 µg, ceftazidima 30 µg e ceftriaxona 30 µg), penicilina/inibidor da beta-lactamase (piperacilina/tazobactam 100 µg/10 µg) e inibidor da via metabólica do folato (sulfametoxazol/trimetoprim 23,75 µg/1,25 µg).

As placas foram incubadas em estufa por 16-18 horas à 35°C ± 2°C. Os resultados foram lidos com auxílio de um paquímetro em resistente, intermediário e sensível, segundo CLSI M100-S18 (CLSI, 2008).

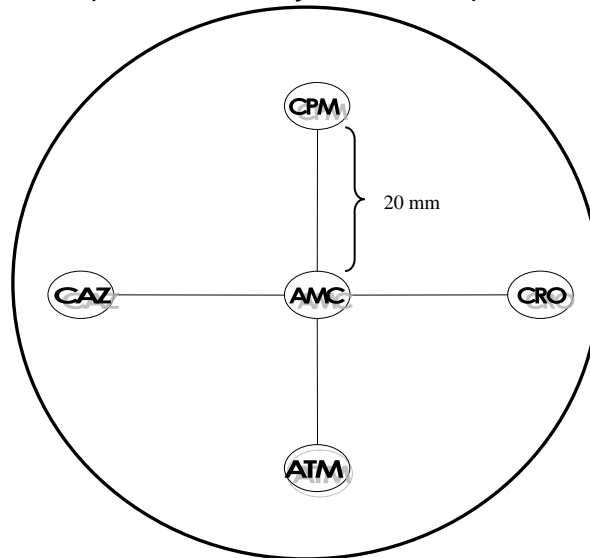
4.4.2 Teste Confirmatório para Detecção de ESBL

A detecção de enterobactérias produtoras de ESBL baseou-se no perfil de resistência dos isolados bacterianos às cefalosporinas de amplo espectro e aztreonam na placa do antibiograma. Os halos sugestivos de ESBL definidos pelo CLSI M100-S18 (CLSI, 2008) foram para aztreonam ≤ 27 mm, ceftriaxona ≤ 25 mm, cefotaxima ≤ 27 mm e ceftazidima ≤ 22 mm. A partir desse perfil, foi realizado um teste fenotípico para se confirmar a produção de ESBL.

Denominado de disco-aproximação, esse teste foi idealizado por Jarlier e colaboradores (1988) e consiste na colocação de discos de ceftazidima, ceftriaxona, cefepime e aztreonam distantes 20 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina contendo um inibidor da beta-lactamase, como o ácido clavulânico, conforme representação esquemática demonstrada na **Figura 5**.

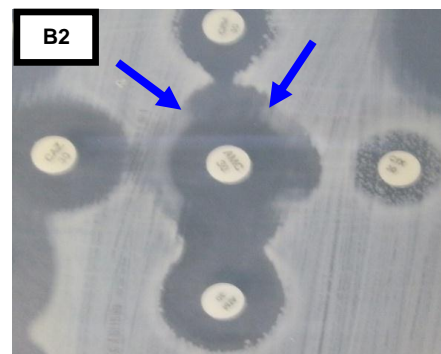
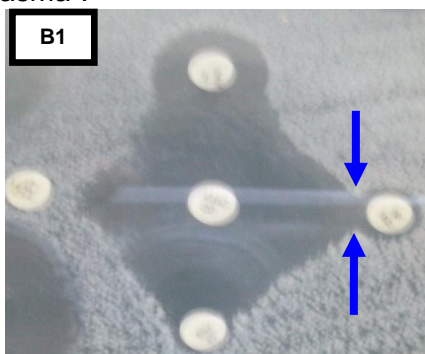
A presença de um aumento ou a deformação no halo de inibição em qualquer um dos discos testados em direção ao disco de amoxicilina-ácido clavulânico confirmou a positividade para a produção de ESBL (**Figura 6**). Esta zona de deformação, conhecida como zona fantasma, caracteriza a ação inibitória da beta-lactamase.

Figura 5 - Esquema de detecção de ESBL por disco-aproximação.



Abreviatura: CPM – cefepime; CAZ – ceftazidima; CRO – ceftriaxona; ATM – aztreonam; AMC – amoxicilina-ácido clavulânico.

Figura 6 - Positividade no teste de ESBL. B1- Aumento do halo de inibição; B2 - “zona fantasma”.



Fonte: Autor, 2009.

4.4.3 Teste de Triagem para Detecção de KPC

A detecção de KPC foi baseada no teste de triagem padronizado pelo CLSI M100-S18 (CLSI, 2008) realizada pelo método de disco-difusão em ágar Müller-Hinton. No **Quadro 4** se observa os pontos de corte para os carbapenêmicos definido CLSI. Os isolados classificados como intermediário ou resistente para ertapenem e/ou meropenem foram fenotipicamente produtores de carbapenemase.

Quadro 4 - Pontos de corte definido pelo CLSI M100-S18 (2008) para a triagem inicial de carbapenemase em *Enterobacteriaceae*.

Carbapenêmicos	Resistente (R)	Intermediário (I)	Sensível (S)
Ertapenem	≤ 18 mm	19-21 mm	≥ 22 mm
Meropenem	≤ 15 mm	16-21 mm	≥ 22 mm

Fonte: CLSI, 2008.

4.5 Controle de Qualidade dos Testes

Cepas-controle da coleção *American Type Culture Collection* (ATCC®) foram utilizadas nos testes microbiológicos e moleculares para confirmar a reprodutibilidade dos mesmos. Foram utilizadas cepas das seguintes espécies: *E. coli* ATCC 25922 (ESBL negativa), *K. pneumoniae* ATCC 700603 (ESBL positiva SHV), *K. pneumoniae* ATCC BAA-1705 (KPC positiva) e *K. pneumoniae* 4M (ESBL positiva TEM, CTX-M e SHV), esta última cedida pela Professora Márcia Maria Camargo de Moraes da Universidade do Estado de Pernambuco (UPE/PE).

4.6 Extração e Quantificação do DNA Total Bacteriano

A extração do DNA total dos isolados foi realizada segundo Chapman e colaboradores (2001), com algumas modificações (substituição do caldo Luria 0,5% de NaCl por caldo *Brain Heart Infusion* – BHI).

Cada isolado foi ressemeado em ágar *Eosin Methylene Blue* (EMB) e incubado à 35°C ± 2°C por 16-18 horas para confirmação da pureza da colônia bacteriana. De cada placa, foi transferida uma colônia para 5 mL de caldo BHI que foi incubado à 35°C ± 2°C por 16-18 horas.

Em um microtubo do tipo eppendorf® foi adicionado 1 mL da suspensão bacteriana que então foi centrifugado a 5000 g por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células do sedimento (*pellet*) foram ressuspensas em 1 mL de água ultrapura (Milli-Q®) esterilizada e centrifugadas a 12000 g por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi ressuspensão em 200 µL de tampão TE pH 8,0 (10 mM Tris/HCl; 1mM EDTA).

A suspensão foi então submetida ao banho de água fervente à 95°C por 10 minutos e, em seguida, colocada em freezer à -20°C por 30 minutos. Os microtubos foram retirados do freezer e colocados à temperatura ambiente até o descongelamento. Em seguida, os microtubos foram centrifugados a 12000 g por 10 minutos e 200 µL do sobrenadante contendo o material genético foi transferido para um novo tubo eppendorf®. Os tubos contendo o DNA foram armazenados em freezer à -20°C.

A quantificação foi realizada por espectrofotometria, utilizando-se comprimento de onda de 260 nm após diluições das amostras de 1:200. Para o cálculo da concentração do DNA, a relação utilizada foi de 1DO = 50 µg/mL (SAMBROOK et al., 1989).

4.7 Análise Molecular da Resistência Bacteriana

4.7.1 Amplificação dos Genes de Resistência aos Beta-Lactâmicos

A confirmação genotípica das beta-lactamases *blaSHV*, *blaTEM*, *blaCTX-M* e *blaKPC* foi realizada pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando-se pares de iniciadores específicos (*primers*) (**Quadro 5**).

A programação de amplificação de ESBL (*blaSHV*, *blaTEM* e *blaCTX-M*), bem como os iniciadores específicos utilizados foram baseados na metodologia descrita por Cao e colaboradores (2002). Os iniciadores para pesquisar *blaCTX-M* são degenerados, capazes de alinhar e amplificar fragmentos internos de 544 pb específicos do gene *blaCTX-M* que codificam enzimas dos grupos CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-9.

Na pesquisa da carbapenemase *blaKPC*, um fragmento de 246 pb foi amplificado com os iniciadores descritos por Hindiyeh e colaboradores (2008) e a técnica de amplificação realizada foi descrita por Schechner e colaboradores (2009).

Quadro 5 - Sequência de iniciadores específicos, tamanho dos fragmentos e número de acesso em bancos genéticos para detecção dos genes *blaTEM*, *blaCTX-M*, *blaSHV* e *blaKPC*.

Genes	Sequência (5' - 3')	Tamanho (pb)	Nº Acesso
<i>blaKPC</i>	F- GAT ACC ACG TTC CGT CTG G R - GCA GGT TCC GGT TTT GTC TC	246	AF297554
<i>blaSHV</i>	F - TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC R - GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG	797	Y11069
<i>blaTEM</i>	F - TCG GGG AAA TGT GCG CG R - TGC TTA ATC AGT GAG GCA CC	972	AF467990
<i>blaCTX-M</i>	F - SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA R - CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG	544	X92506

Abreviatura: S = C ou G; Y = C ou T; R = A ou G

Fonte: CAO et al., 2002; HINDIYEH et al., 2008.

4.7.1.1 Condições para Reações de Amplificação dos Genes de Resistência

A PCR para detecção de *bla*TEM, *bla*CTX-M, *bla*SHV e *bla*KPC foi realizada em volume final de 25 µL.

Os protocolos das reações de amplificação para os genes *bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*KPC podem ser vistos no **Quadro 6** e para o gene *bla*SHV no **Quadro 7**.

Quadro 6 - Protocolo da reação de amplificação para os genes *bla*TEM, *bla*CTX-M e *bla*KPC.

Componentes	Concentração Estoque	Vol. na Reação (µl)	Concentração Final
Água Milli-Q®		12,40	
Tampão PCR (sem Mg ⁺²) ^a	10X	2,50	1X
BSA (albumina sérica bovina)	0,25 µg/µL	2,50	0,025 µg/µL
dNTP's ^a	2,0 mM	2,50	0,2 mM
Iniciador 1	12,5 µM	1,25	0,625 µM
Iniciador 2	12,5 µM	1,25	0,625 µM
MgCl ₂ ^a	50,0 mM	1,50	3,0 mM
Taq Polimerase ^a	5,0 U/µL	0,10	0,02 U/µL
DNA	50,0 ng/µL	1,00	2,0 ng/µL

a – Invitrogen® Fonte: Autor, 2009.

Quadro 7 - Protocolo da reação de amplificação para o gene *bla*SHV.

Componentes	Concentração Estoque	Vol. na Reação (µl)	Concentração Final
Água Milli-Q®		11,40	
Tampão PCR (sem Mg ⁺²) ^a	10X	2,50	1X
BSA (albumina sérica bovina)	0,25 µg/µL	2,50	0,025 µg/µL
dNTP's ^a	2,0 mM	2,50	0,2 mM
Iniciador 1	12,5 µM	1,25	0,625 µM
Iniciador 2	12,5 µM	1,25	0,625 µM
MgCl ₂ ^a	50,0 mM	1,50	3,0 mM
Taq Polimerase ^a	5,0 U/µL	0,10	0,02 U/µL
DNA	50,0 ng/µL	2,00	4,0 ng/µL

a – Invitrogen® Fonte: Autor, 2009.

4.7.1.2 Programa da Reação de Amplificação dos Genes de Resistência

As reações de amplificação ocorreram em um termociclador Biocycler MJ25 (Biosystems®).

Para amplificação dos genes *bla*TEM e *bla*CTX-M, o DNA foi inicialmente desnaturado à 94°C por 2 minutos, seguidos de 30 ciclos consistindo de: desnaturação à 94°C por 45 segundos, hibridização à 52°C por 1 minuto, extensão à 72°C por 1 minuto; e, uma etapa final de extensão à 72°C por 10 minutos.

O gene *bla*SHV foi amplificado por desnaturação inicial do DNA à 94°C por 2 minutos, 30 ciclos de desnaturação à 94°C por 30 segundos, hibridização à 60°C por 30 segundos e extensão à 72°C por 1 minuto, seguida de uma extensão final à 72°C por 4 minutos.

*Bla*KPC foi amplificado por desnaturação do DNA, inicialmente, à 95°C por 15 minutos, seguidos de 38 ciclos (desnaturação à 94°C por 1 minuto, hibridização à 62°C por 1 minuto e extensão à 72°C por 1 minuto), finalizando com uma extensão à 72°C por 10 minutos.

Os produtos da PCR foram avaliados após corrida eletroforética a 10 V/cm em gel de agarose 1,0%, utilizando tampão TBE 0,5X pH 8,0. Como referência foi utilizado um marcador de peso molecular de DNA de 100 pb (Amresco® e Invitrogen®). Após eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e fotografados em sistema Doc-Print II (Vilber Lourmat®).

4.8 Tipagem Genética das Bactérias Multirresistentes

A tipagem genética foi realizada com o microssatélite (GTG)₅-PCR para amplificação de sequências simples entre repetições (ISSRs, *Inter Simple Sequence Repeats*) no genoma das enterobactérias estudadas, segundo Silva-Filho (2005).

A reação de amplificação foi realizada para um volume final de 25 µL, seguindo o protocolo do **Quadro 8**.

Quadro 8 - Protocolo da reação de amplificação com o microssatélite (GTG)₅.

Componentes	Concentração Estoque	Vol. na Reação (µl)	Concentração Final
Água Milli-Q [®]		9,75	
Tampão PCR (sem Mg ⁺²) ^a	10X	2,50	1X
BSA (albumina sérica bovina)	0,25 µg/µL	2,50	0,025 µg/µL
dNTP's ^a	2,0 mM	2,50	0,2 mM
Iniciador (GTG) ₅	1,0 µM	5,00	0,2 µM
MgCl ₂ ^a	50,0 mM	1,50	3,0 mM
Taq Polimerase ^a	5,0 U/µL	0,25	0,05 U/µL
DNA	50,0 ng/µL	1,00	2,0 ng/µL

a – Invitrogen[®]

Fonte: Silva-Filho, 2005.

A amplificação com o marcador (GTG)₅ ocorreu em um termociclador Biocycler MJ25 (Biosystems[®]) e foi programada para um ciclo de desnaturação de 5 minutos à 94°C; seguidos de 40 ciclos de desnaturação à 94°C por 15 segundos, hibridização à 55°C por 45 segundos, extensão à 72°C por 90 segundos; e, extensão final à 72°C por 6 minutos.

Os produtos da PCR foram avaliados após corrida eletroforética a 7,5 V/cm em gel de agarose 1,7% por 120 minutos, utilizando tampão TBE 0,5X pH 8,0. Foi utilizado um marcador molecular de DNA de 100 pb para estimar o tamanho dos fragmentos amplificados. A qualidade das reações de amplificação foi monitorada utilizando-se uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com padrão conhecido do BIOGEN. Após eletroforese, o gel foi corado em solução de brometo de etídio (0,5 mg/mL), visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (312 nm) e fotografados em sistema Doc-Print II (Vilber Lourmat[®]).

4.9 Análises Estatísticas

As correlações entre os padrões de banda a partir das imagens dos géis, um índice de similaridade foi determinado para cada par de isolado bacteriano, pelo

programa BioNumerics[®] versão 6.5 (Applied Maths, St. Martens Latem, Bélgica) utilizando o método de Jacard com uma otimização de 0,5% e tolerância de posição de banda de 1% e posteriormente foi construído um dendrograma pelo método hierárquico aglomerativo da média aritmética entre os pares não-ponderados (UPGMA – Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average).

**SEÇÕES 5 ATÉ 6 (RESULTADOS E DISCUSSÃO – PÁGINAS 59 A 91)
FORAM BLOQUEADAS PELA AUTORA**

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

1. Há uma prevalência dos genes de resistência aos beta-lactâmicos *bla*TEM, *bla*SHV, *bla*CTX-M e *bla*KPC em enterobactérias causadoras de infecções em Alagoas;
2. Os genes que expressam a produção de ESBL (*bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M) foram identificados tanto em bactérias causadoras de infecções comunitárias quanto hospitalares. Já, o gene *bla*KPC não foi identificado em bactérias causadoras de infecções comunitárias, estando restrito aos casos de infecção hospitalar em Alagoas;
3. Na comunidade, o caso mais frequente de infecção foi a do trato urinário por *Escherichia coli*, assim como no ambiente hospitalar por *Klebsiella pneumoniae*, ambas, com predomínio do tipo gênico *bla*CTX-M, principalmente nas UTIs;
4. As enterobactérias produtoras de ESBL e KPC apresentaram perfis de multidroga resistência para as diversas classes de antibióticos testados e os tipos gênicos estavam relacionados com a resistência para alguns antibióticos;
5. Clones de bactérias multirresistentes produtoras de ESBL (*bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M) e KPC (*bla*KPC) foram identificados se disseminando entre os pacientes internados nos hospitais de Alagoas, provavelmente por contaminação cruzada, contribuindo para os elevados níveis de resistência aos beta-lactâmicos.

REFERÊNCIAS

- ABBOUD, C. S.; BERGAMASCO, M. D.; DOI, A. M.; ZANDONADI, E. C.; BARBOSA, V.; CORTEZ, D.; SARAIVA, C. R.; DOY, C.; GARCIA, D. O. First report of investigation into an outbreak due to carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary Brazilian hospital, with extension to a patient in the community **British Journal of Infection Control**, v. 12, n. 4, p. 150-153, 2011.
- ABREU, A. G.; MARQUES, S. G.; MONTEIRO-NETO, V.; CARVALHO, R. M.; GONCALVES, A. G. Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum beta-lactamases-producing Enterobacteriaceae in Northeast Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 4, p. 441-6, 2011.
- AL-JASSER, A. M. Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs): A Global Problem. **Kuwait Medical Journal** v. 38, n. 3, p. 171-185, 2006.
- ALBA, J.; ISHII, Y.; THOMSON, K.; MOLAND, E. S.; YAMAGUCHI, K. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4760-2, 2005.
- ALCANTAR-CURIEL, D.; TINOCO, J. C.; GAYOSSO, C.; CARLOS, A.; DAZA, C.; PEREZ-PRADO, M. C.; SALCIDO, L.; SANTOS, J. I.; ALPUCHE-ARANDA, C. M. Nosocomial bacteremia and urinary tract infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* with plasmids carrying both SHV-5 and TLA-1 genes. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 8, p. 1067-74, 2004.
- ALEGRÍA, C. R.; RODRÍGUEZ-BAÑO, J.; CANO, M. E.; HERNÁNDEZ-BELLO, J. R.; CALVO, J.; ROMÁN, E.; DÍAZ, M. A.; PASCUAL, A.; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, L.; (GEIH), F. T. S. G. F. N. I. *Klebsiella pneumoniae* Strains Producing Extended-Spectrum β -Lactamases in Spain: Microbiological and Clinical Feature. **J Clin Microbiol.**, v. 49, n. 3, p. 1134–1136, 2011.
- ARPIN, C.; QUENTIN, C.; GROBOST, F.; CAMBAU, E.; ROBERT, J.; DUBOIS, V.; COULANGE, L.; ANDRE, C. Nationwide survey of extended-spectrum {beta}-lactamase-producing Enterobacteriaceae in the French community setting. **J Antimicrob Chemother**, v. 63, n. 6, p. 1205-14, 2009.
- ASHOUR, H. M.; EL-SHARIF, A. Species distribution and antimicrobial susceptibility of gram-negative aerobic bacteria in hospitalized cancer patients. **Journal of Translational Medicine**, v. 7, n. 14, 2009.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 1, p. 1-14, 2004.
- BRADFORD, P. A. Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin Microbiol Rev**, v. 14, n. 4, p. 933-51, table of contents, 2001.

BRAEM, G.; DE VliegHER, S.; SUPRE, K.; HAESEBROUCK, F.; LEROY, F.; DE VUYST, L. (GTG)5-PCR fingerprinting for the classification and identification of coagulase-negative Staphylococcus species from bovine milk and teat apices: a comparison of type strains and field isolates. **Vet Microbiol**, v. 147, n. 1-2, p. 67-74, 2011.

BRASIL. **Portaria 2616/MS/GM, de 12 de Maio de 1998**. Brasília: Diário Oficial da União 1998.

BRENNER, D. J.; FARMER, J. J. Enterobacteriales. In: BRENNER, D. J. K., N. R.; STALEY, J. T. (Ed.). **Bergey' s Manual of Systematic Bacteriology**. 2 ed. Baltimore: Springer, v.2, 1994. cap. Order XIII p.1136.

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

BZYMEK, M.; LOVETT, S. T. Instability of repetitive DNA sequences: the role of replication in multiple mechanisms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 15, p. 8319-25, 2001.

CANTON, R.; COQUE, T. M. The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v. 9, n. 5, p. 466-75, 2006.

CANTON, R.; NOVAIS, A.; VALVERDE, A.; MACHADO, E.; PEIXE, L.; BAQUERO, F.; COQUE, T. M. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, p. 144-53, 2008.

CAO, V.; LAMBERT, T.; NHU, D. Q.; LOAN, H. K.; HOANG, N. K.; ARLET, G.; COURVALIN, P. Distribution of extended-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of Enterobacteriaceae in Vietnam. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, n. 12, p. 3739-43, 2002.

CARATTOLI, A. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2227-38, 2009.

CARATTOLI, A.; LOVARI, S.; FRANCO, A.; CORDARO, G.; DI MATTEO, P.; BATTISTI, A. Extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolated from dogs and cats in Rome, Italy, from 2001 to 2003. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 2, p. 833-5, 2005.

CARMO-FILHO, J. R. **Correlação Epidemiológica, microbiológica e clínica das infecções hospitalares em Unidades de Terapia Intensiva causadas por Klebsiella pneumoniae**. 2003. (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo.

CELENZA, G.; PELLEGRINI, C.; CACCAMO, M.; SEGATORE, B.; AMICOSANTE, G.; PERILLI, M. Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 57, n. 5, p. 975-8, 2006.

CHAPMAN, P. A.; ELLIN, M.; ASHTON, R.; SHAFIQUE, W. Comparison of culture, PCR and immunoassays for detecting *Escherichia coli* O157 following enrichment culture and immunomagnetic separation performed on naturally contaminated raw meat products. **Int J Food Microbiol**, v. 68, n. 1-2, p. 11-20, 2001.

CHEN, L.; MEDIAVILLA, J. R.; ENDIMIANI, A.; ROSENTHAL, M. E.; ZHAO, Y.; BONOMO, R. A.; KREISWIRTH, B. N. Multiplex real-time PCR assay for detection and classification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase gene (*bla* KPC) variants. **J Clin Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 579-85, 2011.

CHMELNITSKY, I.; CARMELI, Y.; LEAVITT, A.; SCHWABER, M. J.; NAVON-VENEZIA, S. CTX-M-2 and a new CTX-M-39 enzyme are the major extended-spectrum beta-lactamases in multiple *Escherichia coli* clones isolated in Tel Aviv, Israel. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 11, p. 4745-50, 2005.

CLSI. **M2-A9. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard**,. 9 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2006.

CLSI. **M100-S18. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. 8 ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2008.

COLODNER, R.; ROCK, W.; CHAZAN, B.; KELLER, N.; GUY, N.; SAKRAN, W.; RAZ, R. Risk factors for the development of extended-spectrum beta-lactamase-producing bacteria in nonhospitalized patients. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 3, p. 163-7, 2004.

CONLY, J. Antimicrobial resistance in Canada. **CMAJ**, v. 167, n. 8, p. 885-91, 2002.

DALE, J. W.; PARK, S. F. Gene Transfer. In: DALE, J. W. e PARK, S. F. (Ed.). **Molecular Genetics of Bacteria**. 4 ed. United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd 2004. cap. 6, p.360.

DENTON, M. Enterobacteriaceae. **Int J Antimicrob Agents**, v. 29 Suppl 3, p. S9-S22, 2007.

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

DROPA, M.; BALSALOBRE, L. C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V. C.; FRANCO, F.; GUIDA, S. M.; BALABAKIS, A. J.; PASSADORE, L. F.; SANTOS, S. R.; MATTE, G. R.; MATTE, M. H. Extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae isolated in a public hospital in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 51, n. 4, p. 203-9, 2009.

DU BOIS, S. K.; MARRIOTT, M. S.; AMYES, S. G. B. TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamases: relationship between selection, structure and function. **J. Antimicrob. Chemother**, v. 35, n. 1, p. 7-22, 1995.

DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacol Sin**, v. 24, n. 6, p. 519-26, 2003.

ESSACK, S. Y.; HALL, L. M.; PILLAY, D. G.; MCFADYEN, M. L.; LIVERMORE, D. M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum beta-lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 1, p. 88-95, 2001.

FREITAS, A. L. P.; MACHADO, D. P.; SOARES, F. S. C.; BARTH, A. L. Extended-spectrum-beta-lactamase in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing. **Braz J Microbiol**, v. 34, p. 344-348, 2003.

FRIEDMANN, R.; RAVEH, D.; ZARTZER, E.; RUDENSKY, B.; BROIDE, E.; ATTIAS, D.; YINNON, A. M. Prospective evaluation of colonization with extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing enterobacteriaceae among patients at hospital admission and of subsequent colonization with ESBL-producing enterobacteriaceae among patients during hospitalization. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 30, n. 6, p. 534-42, 2009.

GNIADKOWSKI, M. Evolution and epidemiology of extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) and ESBL-producing microorganisms. **Clin Microbiol Infect**, v. 7, n. 11, p. 597-608, 2001.

GUILFOILE, P. G. **Antibiotic-resistant bacteria (Deadly Diseases & Epidemics)** 1 ed. New York: Chelsea House, 2007.

HARBOTTLE, H.; THAKUR, S.; ZHAO, S.; WHITE, D. G. Genetics of antimicrobial resistance. **Anim Biotechnol**, v. 17, n. 2, p. 111-24, 2006.

HAWKEY, P. M. Identification of Enterobacteriaceae. In: GILLESPIE, S. H. H., P. M. (Ed.). **Principles and Practice of Clinical Bacteriology**. 2ed. United Kingdom: John Wiley & Sons Ltd., 2006. cap. 27, p.355.

HAWKEY, P. M.; JONES, A. M. The changing epidemiology of resistance. **J Antimicrob Chemother**, v. 64 Suppl 1, p. i3-10, 2009.

HINDIYEH, M.; SMOLLEN, G.; GROSSMAN, Z.; RAM, D.; DAVIDSON, Y.; MILEGUIR, F.; VAX, M.; BEN DAVID, D.; TAL, I.; RAHAV, G.; SHAMISS, A.; MENDELSON, E.; KELLER, N. Rapid detection of blaKPC carbapenemase genes by real-time PCR. **J Clin Microbiol**, v. 46, n. 9, p. 2879-83, 2008.

HIRSCH, E. B.; TAM, V. H. Detection and treatment options for *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPCs): an emerging cause of multidrug-resistant infection. **J Antimicrob Chemother**, v. 65, n. 6, p. 1119-25, 2010.

HO, P. L.; POON, W. W.; LOKE, S. L.; LEUNG, M. S.; CHOW, K. H.; WONG, R. C.; YIP, K. S.; LAI, E. L.; TSANG, K. W. Community emergence of CTX-M type extended-spectrum beta-lactamases among urinary *Escherichia coli* from women. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 1, p. 140-4, 2007.

HONG, T.; MOLAND, E. S.; ABDALHAMID, B.; HANSON, N. D.; WANG, J.; SLOAN, C.; FABIAN, D.; FARAJALLAH, A.; LEVINE, J.; THOMSON, K. S. Escherichia coli: development of carbapenem resistance during therapy. **Clin Infect Dis**, v. 40, n. 10, p. e84-6, 2005.

HUYS, G.; CNOCKAERT, M.; VANEECHOUTTE, M.; WOODFORD, N.; NEMEC, A.; DIJKSHOORN, L.; SWINGS, J. Distribution of tetracycline resistance genes in genotypically related and unrelated multiresistant Acinetobacter baumannii strains from different European hospitals. **Res Microbiol**, v. 156, n. 3, p. 348-55, 2005.

JACOBY, G. A. Beta-lactamase nomenclature. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 4, p. 1123-9, 2006.

JACOBY, G. A.; MUNOZ-PRICE, L. S. The new beta-lactamases. **N Engl J Med**, v. 352, n. 4, p. 380-91, 2005.

JANDA; ABBOTT. The enterobacteria In: JANDA, J. M. e ABBOTT, S. L. (Ed.). **The enterobacteria** 2 ed. Washington, D.C: ASM Press, 2006. cap. Historical Perspective on the Family *Enterobacteriaceae*, p.411.

JANDA; ABBOTT. The genus Hafnia: from soup to nuts. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 1, p. 12-8, 2006.

JARLIER, V.; NICOLAS, M. H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev Infect Dis**, v. 10, n. 4, p. 867-78, 1988.

JEAN, S. S.; HSUEH, P. R. High burden of antimicrobial resistance in Asia. **Int J Antimicrob Agents**, v. 37, n. 4, p. 291-5, 2011.

JURKOVIC, D.; KRIZKOVA, L.; SOJKA, M.; TAKACOVA, M.; DUSINSKY, R.; KRAJCOVIC, J.; VANDAMME, P.; VANCANNEYT, M. Genetic diversity of Enterococcus faecium isolated from Bryndza cheese. **Int J Food Microbiol**, v. 116, n. 1, p. 82-7, 2007.

KIRATISIN, P.; APISARNTHANARAK, A.; LAESRIPA, C.; SAIFON, P. Molecular characterization and epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae isolates causing health care-associated infection in Thailand, where the CTX-M family is endemic. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 8, p. 2818-24, 2008.

KITCHEL, B.; RASHEED, J. K.; PATEL, J. B.; SRINIVASAN, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CARMELI, Y.; BROLUND, A.; GISKE, C. G. Molecular epidemiology of KPC-producing Klebsiella pneumoniae isolates in the United States: clonal expansion of multilocus sequence type 258. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 8, p. 3365-70, 2009.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S. R.; FUENTEFRIA, D. B. [ESBL-producing enterobacteria in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 43, n. 4, p. 430-4, 2010.

LIVERMORE, D. M. beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clin Microbiol Rev**, v. 8, n. 4, p. 557-84, 1995.

LOCKHART, S. R.; ABRAMSON, M. A.; BEEKMANN, S. E.; GALLAGHER, G.; RIEDEL, S.; DIEKEMA, D. J.; QUINN, J. P.; DOERN, G. V. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. **J Clin Microbiol**, v. 45, n. 10, p. 3352-9, 2007.

LOMAESTRO, B. M.; TOBIN, E. H.; SHANG, W.; GOOTZ, T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. **Clin Infect Dis**, v. 43, n. 3, p. e26-8, 2006.

LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; PERILLI, M.; STEFANI, S.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G. M.; TONIOLO, A. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among enterobacteria of medical interest: report of the second Italian nationwide survey. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 5, p. 1659-64, 2006.

MACHADO, E.; COQUE, T. M.; CANTON, R.; BAQUERO, F.; SOUSA, J. C.; PEIXE, L. Dissemination in Portugal of CTX-M-15-, OXA-1-, and TEM-1-producing Enterobacteriaceae strains containing the *aac(6')-Ib-cr* gene, which encodes an aminoglycoside- and fluoroquinolone-modifying enzyme. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 9, p. 3220-1, 2006.

MANTILLA, J. R.; REGUERO, M. T.; GONZALEZ, E. B.; GARCIA, I. A.; LEAL, A. L.; ESPINAL, P. A.; ALPUCHE, C.; VALDERRAMA, I. A.; GARZON, M. I.; OLARTE, N. M. [Molecular characterization of an outbreak caused by CTX-M-12-producing *Klebsiella pneumoniae* in a Colombian hospital's neonatal intensive care unit]. **Biomedica**, v. 26, n. 3, p. 408-14, 2006.

MARTINS-LOUREIRO, M.; DE MORAES, B. A.; DE MENDONCA, V. L.; ROCHA-QUADRA, M. R.; DOS SANTOS-PINHEIRO, G.; DUTRA-ASENSI, M. Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated from neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 43, n. 2, p. 88-95, 2001.

MARTINS, I. S.; PESSOA-SILVA, C. L.; NOUER, S. A.; PESSOA DE ARAUJO, E. G.; FERREIRA, A. L.; RILEY, L. W.; MOREIRA, B. M. Endemic extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* at an intensive care unit: risk factors for colonization and infection. **Microb Drug Resist**, v. 12, n. 1, p. 50-8, 2006.

MASTERTON, R. The importance and future of antimicrobial surveillance studies. **Clin Infect Dis**, v. 47 Suppl 1, p. S21-31, 2008.

MATSHEKA, M. I.; LASTOVICA, A. J.; ZAPPE, H.; ELISHA, B. G. The use of (GTG)₅ oligonucleotide as an RAPD primer to type *Campylobacter concisus*. **Lett Appl Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 600-5, 2006.

MINARINI, L. A.; CLIMACO, E. C.; GUIMARAES, D. B.; FERREIRA, J. C.; PALAZZO, I. C.; MARTINEZ, R.; DARINI, A. L. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Curr Microbiol**, v. 56, n. 6, p. 587-91, 2008.

MINARINI, L. A.; GALES, A. C.; PALAZZO, I. C.; DARINI, A. L. Prevalence of community-occurring extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Brazil. **Curr Microbiol**, v. 54, n. 5, p. 335-41, 2007.

MOHAPATRA, B. R.; BROERSMA, K.; MAZUMDER, A. Differentiation of fecal *Escherichia coli* from poultry and free-living birds by (GTG)₅-PCR genomic fingerprinting. **Int J Med Microbiol**, v. 298, n. 3-4, p. 245-52, 2008.

MONTEIRO, J.; SANTOS, A. F.; ASENSI, M. D.; PEIRANO, G.; GALES, A. C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 1, p. 333-4, 2009.

MOTTA, R. N.; OLIVEIRA, M. M.; MAGALHAES, P. S.; DIAS, A. M.; ARAGAO, L. P.; FORTI, A. C.; CARVALHO, C. B. Plasmid-mediated extended-spectrum beta-lactamase-producing strains of Enterobacteriaceae isolated from diabetes foot infections in a Brazilian diabetic center. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 129-34, 2003.

MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, F.; DE LUCA, F.; BRIGANTE, G.; PERILLI, M.; AMICOSANTE, G.; STEFANI, S.; TONIOLO, A.; ROSSOLINI, G. M. CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in Italy: molecular epidemiology of an emerging countrywide problem. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 50, n. 8, p. 2700-6, 2006.

MULVEY, M. R.; BRYCE, E.; BOYD, D.; OFNER-AGOSTINI, M.; CHRISTIANSON, S.; SIMOR, A. E.; PATON, S. Ambler class A extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian hospitals. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 4, p. 1204-14, 2004.

MULVEY, M. R.; SIMOR, A. E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? **CMAJ**, v. 180, n. 4, p. 408-15, 2009.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. **Manual of Clinical Microbiology**. 8 ed. Washington, D.C: American Society for Microbiology Press, 2003. 2322.

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M. V.; LARTIGUE, M. F.; QUINN, J. P.; NORDMANN, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase bla KPC gene. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 52, n. 4, p. 1257-63, 2008.

NOGUEIRA KDA, S.; HIGUTI, I. H.; DO NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; DE OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; DE SOUZA, H. A.; COGO, L. L.; DALLA COSTA, L. M. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated

from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 6, p. 390-5, 2006.

NOGUEIRA, K. S.; HIGUTI, I. H.; DO NASCIMENTO, A. J.; TERASAWA, L. B.; DE OLIVEIRA, S.; MATOS, A. P.; DE SOUZA, H. A.; COGO, L. L.; DALLA COSTA, L. M. Occurrence of extended-spectrum beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolated from hospitalized patients in Curitiba, southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 6, p. 390-5, 2006.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NAAS, T. The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **Lancet Infect Dis**, v. 9, n. 4, p. 228-36, 2009.

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global Spread of Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae. **Emerg Infect Dis**, v. 17, n. 10, p. 1791-8, 2011.

NORMARK, B. H.; NORMARK, S. Evolution and spread of antibiotic resistance. **J Intern Med**, v. 252, n. 2, p. 91-106, 2002.

OLIVEIRA, C. F.; DAL FORNO, N. L.; ALVES, I. A.; HORTA, J. A.; RIEGER, A.; ALVES, S. H. [Prevalence of the TEM, SHV and CTX-M families of extended-spectrum beta-lactamases in *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp at the University Hospital of Santa Maria, State of Rio Grande do Sul]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 42, n. 5, p. 556-60, 2009.

OTEO, J.; NAVARRO, C.; CERCENADO, E.; DELGADO-IRIBARREN, A.; WILHELMI, I.; ORDEN, B.; GARCIA, C.; MIGUELANEZ, S.; PEREZ-VAZQUEZ, M.; GARCIA-COBOS, S.; ARACIL, B.; BAUTISTA, V.; CAMPOS, J. Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. **J Clin Microbiol**, v. 44, n. 7, p. 2359-66, 2006.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clin Microbiol Rev**, v. 18, n. 4, p. 657-86, 2005.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E. M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 53, n. 6, p. 2702, 2009.

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

PEREIRA, M. S.; PRADO, M. A.; SOUSA, J. T.; TIPPLE, A. F. V.; SOUZA, A. C. S. **Controle de Infecção Hospitalar em Unidade de terapia Intensiva: desafios e perspectivas.** Revista Eletrônica de Enfermagem. Goiânia: Universidade Federal de Goiás 22000.

PITOUT, J. D.; GREGSON, D. B.; CHURCH, D. L.; ELSAYED, S.; LAUPLAND, K. B. Community-wide outbreaks of clonally related CTX-M-14 beta-lactamase-producing

Escherichia coli strains in the Calgary health region. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 6, p. 2844-9, 2005.

PITOUT, J. D.; HANSON, N. D.; CHURCH, D. L.; LAUPLAND, K. B. Population-based laboratory surveillance for Escherichia coli-producing extended-spectrum beta-lactamases: importance of community isolates with blaCTX-M genes. **Clin Infect Dis**, v. 38, n. 12, p. 1736-41, 2004.

PITOUT, J. D.; LAUPLAND, K. B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. **Lancet Infect Dis**, v. 8, n. 3, p. 159-66, 2008.

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

POURNARAS, S.; TSAKRIS, A.; IKONOMIDIS, A.; MARKOGIANNAKIS, A.; KRISTO, I.; MANIATIS, A. N. Detection of a novel variant bla(CTX-M-3) extended spectrum beta-lactamase gene in a community-acquired Escherichia coli isolate. **Scand J Infect Dis**, v. 38, n. 3, p. 213-6, 2006.

QUALE, J. Global spread of carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Microbe**, v. 3, n. 11, p. 516-520, 2008.

QUEENAN, A. M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clin Microbiol Rev**, v. 20, n. 3, p. 440-58, table of contents, 2007.

QUENTIN, C.; ARPIN, C.; DUBOIS, V.; ANDRE, C.; LAGRANGE, I.; FISCHER, I.; BROCHET, J. P.; GROBOST, F.; JULLIN, J.; DUTILH, B.; LARRIBET, G.; NOURY, P. Antibiotic resistance rates and phenotypes among isolates of Enterobacteriaceae in French extra-hospital practice. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 23, n. 3, p. 185-93, 2004.

RASSCHAERT, G.; HOUF, K.; IMBERECHTS, H.; GRIJSPEERDT, K.; DE ZUTTER, L.; HEYNDRIKX, M. Comparison of five repetitive-sequence-based PCR typing methods for molecular discrimination of Salmonella enterica isolates. **J Clin Microbiol**, v. 43, n. 8, p. 3615-23, 2005.

RICE, L. B. Federal funding for the study of antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: no ESKAPE. **J Infect Dis**, v. 197, n. 8, p. 1079-81, 2008.

ROBLEDO, I. E.; AQUINO, E. E.; SANTE, M. I.; SANTANA, J. L.; OTERO, D. M.; LEON, C. F.; VAZQUEZ, G. J. Detection of KPC in Acinetobacter spp. in Puerto Rico. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, n. 3, p. 1354-7, 2010.

RODRIGUEZ-BANO, J.; NAVARRO, M. D.; ROMERO, L.; MARTINEZ-MARTINEZ, L.; MUNIAIN, M. A.; PEREA, E. J.; PEREZ-CANO, R.; PASCUAL, A. Epidemiology and clinical features of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase-producing Escherichia coli in nonhospitalized patients. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 3, p. 1089-94, 2004.

- RODRIGUEZ-VILLALOBOS, H.; BOGAERTS, P.; BERHIN, C.; BAURAING, C.; DEPLANO, A.; MONTESINOS, I.; DE MENDONCA, R.; JANS, B.; GLUPCZYNSKI, Y. Trends in production of extended-spectrum beta-lactamases among Enterobacteriaceae of clinical interest: results of a nationwide survey in Belgian hospitals. **J Antimicrob Chemother**, v. 66, n. 1, p. 37-47, 2011.
- ROSSOLINI, G. M.; D'ANDREA, M. M.; MUGNAIOLI, C. The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, p. 33-41, 2008.
- RUBTSOVA, M. Y.; ULYASHOVA, M. M.; BACHMANN, T. T.; SCHMID, R. D.; EGOROV, A. M. Multiparametric determination of genes and their point mutations for identification of beta-lactamases. **Biochemistry (Mosc)**, v. 75, n. 13, p. 1628-49, 2010.
- RUPPE, E.; HEM, S.; LATH, S.; GAUTIER, V.; ARIEY, F.; SARTHOU, J. L.; MONCHY, D.; ARLET, G. CTX-M beta-lactamases in Escherichia coli from community-acquired urinary tract infections, Cambodia. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 5, p. 741-8, 2009.
- RYBERG, A.; OLSSON, C.; AHRNE, S.; MONSTEIN, H. J. Comparison of (GTG)₅-oligonucleotide and ribosomal intergenic transcribed spacer (ITS)-PCR for molecular typing of Klebsiella isolates. **J Microbiol Methods**, v. 84, n. 2, p. 183-8, 2011.
- SADER, H. S. Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. **Braz J Infect Dis**, v. 4, n. 2, p. 91-9, 2000.
- SADER, H. S.; GALES, A. C.; PFALLER, M. A.; MENDES, R. E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R. N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz J Infect Dis**, v. 5, n. 4, p. 200-14, 2001.
- SADER, H. S.; JONES, R. N.; GALES, A. C.; SILVA, J. B.; PIGNATARI, A. C. SENTRY antimicrobial surveillance program report: Latin American and Brazilian results for 1997 through 2001. **Braz J Infect Dis**, v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.
- SAMAHA-KFOURY, J. N.; ARAJ, G. F. Recent developments in beta lactamases and extended spectrum beta lactamases. **BMJ**, v. 327, n. 7425, p. 1209-13, 2003.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2 ed. New york: Cold Spring Harbor, 1989.
- SANTOS, D. F.; PIMENTA, F. C.; ALVES, R.; MONTALVÃO, E. R.; SANTOS, D. B.; CARMO-FILHO, J. R. Extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Braz. J. Microbiol**, v. 39, n. 4, p. 608-612, 2008.
- SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SCHECHNER, V.; STRAUS-ROBINSON, K.; SCHWARTZ, D.; PFEFFER, I.; TARABEIA, J.; MOSKOVICH, R.; CHMELNITSKY, I.; SCHWABER, M. J.; CARMELI, Y.; NAVON-VENEZIA, S. Evaluation of PCR-based testing for surveillance of KPC-producing carbapenem-resistant members of the Enterobacteriaceae family. **J Clin Microbiol**, v. 47, n. 10, p. 3261-5, 2009.

SCHWABER, M. J.; NAVON-VENEZIA, S.; SCHWARTZ, D.; CARMELI, Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 49, n. 5, p. 2137-9, 2005.

SEKI, L. M.; PEREIRA, P. S.; DE SOUZA MDA, P.; CONCEICAO MDE, S.; MARQUES, E. A.; PORTO, C. O.; COLNAGO, E. M.; ALVES CDE, F.; GOMES, D.; ASSEF, A. P.; SAMUELSEN, O.; ASENSI, M. D. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagn Microbiol Infect Dis**, v. 70, n. 2, p. 274-7, 2011.

SHIRAKI, Y.; SHIBATA, N.; DOI, Y.; ARAKAWA, Y. *Escherichia coli* producing CTX-M-2 beta-lactamase in cattle, Japan. **Emerg Infect Dis**, v. 10, n. 1, p. 69-75, 2004.

SILVA-FILHO, E. A.; BRITO DOS SANTOS, S. K.; RESENDE ADO, M.; DE MORAIS, J. O.; DE MORAIS, M. A., JR.; ARDAILLON SIMOES, D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 88, n. 1, p. 13-23, 2005.

SILVA, N.; OLIVEIRA, M.; BANDEIRA, A. C.; BRITES, C. Risk factors for infection by extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Salvador, Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 10, n. 3, p. 191-3, 2006.

SINGH, A.; GOERING, R. V.; SIMJEE, S.; FOLEY, S. L.; ZERVOS, M. J. Application of molecular techniques to the study of hospital infection. **Clin Microbiol Rev**, v. 19, n. 3, p. 512-30, 2006.

SRINIVASAN, A.; PATEL, J. B. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. **Infect Control Hosp Epidemiol**, v. 29, n. 12, p. 1107-9, 2008.

STEINKE, D. T.; SEATON, R. A.; PHILLIPS, G.; MACDONALD, T. M.; DAVEY, P. G. Prior trimethoprim use and trimethoprim-resistant urinary tract infection: a nested case-control study with multivariate analysis for other risk factors. **J Antimicrob Chemother**, v. 47, n. 6, p. 781-7, 2001.

SUÁREZ, C.; GUDIOL, F. Antibióticos betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**, v. 27, n. 2, p. 116-129, 2009.

SVEC, P.; NOVAKOVA, D.; ZACKOVA, L.; KUKLETOVA, M.; SEDLACEK, I. Evaluation of (GTG)₅-PCR for rapid identification of *Streptococcus mutans*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 94, n. 4, p. 573-9, 2008.

SVEC, P.; SEVCIKOVA, A.; SEDLACEK, I.; BEDNAROVA, J.; SNAUWAERT, C.; LEFEBVRE, K.; VANDAMME, P.; VANCANNEYT, M. Identification of lactic acid bacteria isolated from human blood cultures. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 49, n. 2, p. 192-6, 2007.

THOMSON, K. S. Extended-spectrum-beta-lactamase, AmpC, and Carbapenemase issues. **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 4, p. 1019-25, 2010.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H. S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian hospitals. **Braz J Infect Dis**, v. 7, n. 6, p. 360-9, 2003.

TZOUVELEKIS, L. S.; TZELEPI, E.; TASSIOS, P. T.; LEGAKIS, N. J. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int J Antimicrob Agents**, v. 14, n. 2, p. 137-42, 2000.

VAN BELKUM, A.; SCHERER, S.; VAN ALPHEN, L.; VERBRUGH, H. Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 62, n. 2, p. 275-93, 1998.

VERSALOVIC, J.; LUPSKI, J. R. Molecular detection and genotyping of pathogens: more accurate and rapid answers. **Trends Microbiol**, v. 10, n. 10 Suppl, p. S15-21, 2002.

VILLEGAS, M. V.; KATTAN, J. N.; QUINTEROS, M. G.; CASELLAS, J. M. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. **Clin Microbiol Infect**, v. 14 Suppl 1, p. 154-8, 2008.

WALTHER-RASMUSSEN, J.; HOIBY, N. Class A carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 3, p. 470-82, 2007.

WEILL, F. X.; LAILLER, R.; PRAUD, K.; KEROUANTON, A.; FABRE, L.; BRISABOIS, A.; GRIMONT, P. A.; CLOECKAERT, A. Emergence of extended-spectrum-beta-lactamase (CTX-M-9)-producing multiresistant strains of *Salmonella enterica* serotype Virchow in poultry and humans in France. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 12, p. 5767-73, 2004.

WEINSTEIN, R. A. Controlling antimicrobial resistance in hospitals: infection control and use of antibiotics. **Emerg Infect Dis**, v. 7, n. 2, p. 188-92, 2001.

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

WISKIRCHEN, D. E.; KOOMANACHAI, P.; NICASIO, A. M.; NICOLAU, D. P.; KUTI, J. L. In vitro pharmacodynamics of simulated pulmonary exposures of tigecycline alone and in combination against *Klebsiella pneumoniae* isolates producing a KPC carbapenemase. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 55, n. 4, p. 1420-7, 2011.

WOLLHEIM, C.; GUERRA, I. M.; CONTE, V. D.; HOFFMAN, S. P.; SCHREINER, F. J.; DELAMARE, A. P.; BARTH, A. L.; ECHEVERRIGARAY, S.; COSTA, S. O. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum beta-lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 138-43, 2011.

WONG-BERINGER, A.; HINDLER, J.; LOELOFF, M.; QUEENAN, A. M.; LEE, N.; PEGUES, D. A.; QUINN, J. P.; BUSH, K. Molecular correlation for the treatment outcomes in bloodstream infections caused by *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* with reduced susceptibility to ceftazidime. **Clin Infect Dis**, v. 34, n. 2, p. 135-46, 2002.