

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
TESE DE DOUTORADO**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BACTERIANOS APRESENTANDO MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS QUE ATUAM NA
PAREDE CELULAR**

MARINALDA ANSELMO VILELA

VIRTUS IMPAVIDA

**RECIFE
2009**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ISOLADOS
BACTERIANOS APRESENTANDO MECANISMOS DE
RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS QUE ATUAM NA
PAREDE CELULAR**

MARINALDA ANSELMO VILELA

Tese apresentada ao Programa
de Pós-graduação em Genética
da Universidade Federal de
Pernambuco como requisito para
obtenção do grau de doutor em
Genética pela UFPE

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Co-orientador: Profa. Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes

**RECIFE
2009**

Vilela, Marinalda Anselmo

Caracterização molecular de isolados bacterianos apresentando mecanismos de resistência a antimicrobianos que atuam na parede celular / Marinalda Anselmo Vilela. – Recife: O Autor, 2009.

132 f., il., fig., tab.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCB. Departamento de Genética, 2009.

Inclui bibliografia e anexos

1. Genética de microorganismos 2. Bactérias- infecção hospitalar 3. *Enterococcus faecalis* 4. *Klebsiella pneumoniae* I Título.

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB – 2009- 190



Serviço Público Federal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
Av. Prof. Moraes Rego, S/N, Cidade Universitária
50.732-970, Recife – PE.
Fone/Fax: (81) 21268522

Ata da 1ª sessão de Defesa Pública de Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco, realizada no dia 27 de julho de 2009 pela aluna Marinalda Anselmo Vilela.

Às nove horas do dia 27 de julho de 2009, no anfiteatro Aloísio Bezerra Coutinho no Departamento de Genética da UFPE, foi efetuada em ato público a Defesa de Tese de Doutorado intitulada “Caracterização Molecular de Isolados Bacterianos Apresentando Mecanismos de Resistência a Antimicrobianos que Atuam na Parede Celular”, desenvolvida pela aluna **Marinalda Anselmo Vilela**. Inicialmente o **Dr. Valdir de Queiroz Balbino**, vice-coordenador do Programa de Pós-Graduação em Genética, abriu a sessão e informou que a Banca Examinadora desta defesa de Tese de Doutorado seria composta pelos seguintes membros: **Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro** (Departamento de Medicina Tropical da UFPE), **Dr. Lauro Santos Filho** (Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPB), **Dra. Suely Lins Galdino** (Departamento de Antibióticos da UFPE), **Dra. Vera Magalhães da Silveira** (Departamento de Medicina Tropical da UFPE) e a **Dra. Tereza Cristina Leal Balbino** (Departamento de Microbiologia, CPqAM-FIOCRUZ). Logo após, o vice-coordenador **Valdir de Queiroz Balbino** entregou a presidência dos trabalhos para o orientador **Marcos Antonio de Moraes Junior**, que convidou a candidata a apresentar seu trabalho em cerca de 50 minutos. Após a apresentação, o presidente da banca convidou os membros da Banca Examinadora para comporem a mesa e iniciou a sessão de arguição na seguinte ordem: **Célia Maria Machado Barbosa de Castro** (membro externo), **Lauro Santos Filho** (membro externo), **Suely Lins Galdino** (membro externo), **Vera Magalhães da Silveira** (membro externo) e **Tereza Cristina Leal Balbino** (membro interno). Finalizadas as arguições, todas em forma de diálogo e tendo, a aluna, respondido a todas as questões formuladas, a Banca Examinadora deliberou em sessão secreta, tendo atribuído à doutoranda a menção final “Aprovada” por unanimidade. O resultado foi apresentado pelo presidente dos trabalhos **Marcos Antonio de Moraes Junior** que anunciou que a aluna **Marinalda Anselmo Vilela** faz jus doravante ao título de **DOUTORA EM GENÉTICA** pela Universidade Federal de Pernambuco. A sessão foi encerrada às 13:30h e, para constar, eu, **Arismar Lobo da Silva**, secretário, lavrei e assinei a presente ata, assinada também pelo Orientador e pelos membros da Banca Examinadora. Recife, 27 de julho de 2009.

Banca Examinadora:

Célia Maria Machado B. de Castro
Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Lauro Santos Filho
Dr. Lauro Santos Filho

Suely Lins Galdino
Dra. Suely Lins Galdino

Vera Magalhães da Silveira
Dra. Vera Magalhães da Silveira

Tereza Cristina Leal Balbino
Dra. Tereza Cristina Leal Balbino

Orientador:


Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Vice-coordenador do Programa:


Dr. Valdir de Queiroz Balbino

Secretário do Programa:


Arismar Lobo da Silva

Agradecimentos

- Em primeiro lugar a Deus por ter me concedido a vida, permitir que tivesse condições de aprender e hoje eu caminhar ao lado de pessoas tão especiais.
- Ao meu marido Ronaldo Honório de Albuquerque pelo apoio e companheirismo.
- Aos meus filhos: Felipe Vilela e Carolina Vilela por todo carinho e compreensão nos momentos de ausência.
- A minha inesquecível mãe Maria Jose Anselmo Vilela, que aprouve a Deus chamá-la a eterna glória no desenvolvimento desse estudo, ao meu pai Irnaldo Peixoto Vilela que sempre acreditou em mim.
- Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior, pela competência, pelos ensinamentos valiosos. Expresso a minha admiração e enorme gratidão.
- A minha querida co-orientadora Profa. Dra. Márcia Maria Camargo de Moraes pelas orientações, estímulos nas horas difíceis, além da força desde o princípio.
- Ao Prof. Carlos Cabral pela amizade e pelo apoio e contribuição no trabalho.
- A Profa. Dra Maria de Mascena Diniz Maia, pelo seqüenciamento dos genes que codificam β -lactamases de espectro ampliado, na Universidade Federal Rural de Pernambuco.
- A Profa. Dra. Nilma Cintra Leal e ao Prof. Dr. Oswaldo Pompílio, do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães, pelo apoio.
- Ao amigo e doutorando Christian Reis pelo apoio no seqüenciamento e a Cássia e Viviane do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães pelo seqüenciamento dos genes relacionados a integrons de classe 1, realizado no CPqAM.
- Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular de Vírus da UPE, Beathriz, Ana Carolina, Felipe Lira e Katiússia.
- Aos colegas do laboratório de Engenharia Metabólica do Departamento de Bioquímica da UFPE, principalmente o doutorando Rodrigo Mendonça Lucena, pelos ensinamentos da técnica de clonagem e Fernanda, por compartilhar comigo parte do seu conhecimento.
- A equipe do laboratório de Bacteriologia do Hospital Universitário Oswaldo Cruz
- A amiga Marildes Falcão que mesmo sem entender aceitou uma amiga ausente.
- A minha turma do doutorado (primeira turma), Christian e Nara.

- A prof^a Dra. Tereza Cristina Leal Albino e a prof^a Dra. Suely Lins Galdino pelo cuidado e atenção com que examinaram esse trabalho.

Sumário

1. Revisão da Literatura.....	1
1.1. Introdução a resistência bacteriana.....	1
1.1.2. Mecanismos de ação dos principais grupos de antimicrobianos.....	4
1.1.2.1. Inibidores da síntese protéica.....	4
1.1.2.2. Alteração da permeabilidade e função de membrana.....	5
1.1.2.3. Interferência na síntese do ácido nucléico.....	5
1.1.2.4. Inibição da síntese da parede celular bacteriana.....	6
1.1.3. Antimicrobianos glicopeptídeos.....	9
1.1.4. Antimicrobianos β -lactâmicos.....	10
2. Capítulo I: <i>Enterococcus faecalis</i>.....	12
2.1. Enterococos.....	12
2.1.2. O gênero <i>Enterococcus</i>	12
2.1.3. Mecanismo de ação dos glicopeptídeos.....	13
2.1.4. Resistência aos antimicrobianos nos enterococos.....	13
2.2. Mecanismo de resistência bacteriana aos glicopeptídeos.....	14
2.2.1. Resistência aos glicopeptídeos.....	14
2.2.2. Descrição dos fenótipos de resistência a vancomicina.....	15
2.2.3. Fenótipo VanA de resistência.....	16
2.2.4. Fenótipo VanB de resistência.....	18
2.2.5. Resistência intrínseca aos glicopeptídeos.....	19
2.2.6. Enterococos dependentes de vancomicina.....	20
2.3. Origem do Enterococos resistente a vancomicina (VRE).....	20
2.4. Objetivos.....	23
2.4.1. Objetivo geral.....	23
2.4.2. Objetivos específicos.....	23
2.5. Material e Métodos.....	24
2.5.1. Isolados bacterianos.....	24
2.5.2. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	24

2.5.3. Epidemiologia.....	25
2.5.4. Identificação da espécie e do gene <i>vanA</i>	25
2.5.5. Perfil Plasmidial.....	27
2.5.6. Análise Genotípica.....	27
2.5.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)-fingerprinting.....	27
2.5.6.2. . Eletroforese de campo pulsado (PFGE).....	27
2.5.7. Amplificação e caracterização do Tn1546-like elements.....	28
2.5.8. Southern hibridização e digestão com <i>EcoRI</i>	29
2.6. Resultados	30
2.6.1. Susceptibilidade bacteriana.....	30
2.6.2. Identificação bacteriana.....	30
2.6.3. Detecção do gene <i>vanA</i>	30
2.6.4. Análise por genotipagem do DNA cromossômico.....	31
2.6.5. Detecção de elementos como Tn1546-like e plasmídios.....	31
2.7. Discussão.....	33
2.8. Conclusão.....	35
2.9 Referências bibliográficas do <i>E. faecalis</i>).....	36
3. Capítulo II: <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	49
3.1. <i>Klebsiella pneumoniae</i>.....	49
3.2. Estrutura dos β-lactâmicos.....	50
3.2.1. Resistência aos antibióticos β -lactâmicos.....	51
3.3. β-lactamases.....	51
3.3.1. β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	53
3.3.2. Caracterização das β -lactamases.....	54
3.3.3. Significado clínico e importância das ESBLs	57
3.3.4. Mecanismo de ação das β -lactamases.....	57
3.4. β-lactamases em <i>K. Pneumoniae</i>.....	58
3.4.1. Tipos de β -lactamases de espectro ampliado “ESBL”.....	58
3.4.1.1. ESBL tipo TEM.....	59
3.4.1.2. ESBL tipo SHV.....	60
3.4.1.3. ESBL tipo CTX.....	61

3.4.1.4. Outras β -Lactamases.....	62
3.5. β-lactamases no mundo, América do Sul e Brasil.....	63
3.5.1. Epidemiologia molecular das bactérias produtoras de ESBLs.....	63
3.5.2. Distribuição das β -lactamases nas espécies de enterobacteriaceas.....	64
3.6. Localização bacteriana das β-lactamases.....	64
3.6.1. β -Lactamases Cromossômicas em enterobacteriaceas.....	64
3.6.2. β -Lactamases Plasmidiais em enterobacteriaceas e <i>K. pneumoniae</i>	64
3.6.3. Síntese e Transferência das ESBLs.....	65
3.6.4. Integrans.....	66
3.6.5. Infecções por <i>K. pneumoniae</i> ESBL positiva em Recife.....	68
3. 7. Objetivos	69
3.7.1. Objetivo Geral.....	69
3.7.2. Objetivos Específicos.....	69
3. 8. Material e Métodos.....	70
3.8.1. Isolados bacterianos	70
3.8.2. Ribotipagem por PCR.....	70
3.8.3. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos.....	71
3.8.4. Screening para ESBL e confirmação do fenótipo de ESBL	71
3.8.5. Detecção dos genes de ESBL no DNA genômico por PCR.....	72
3.8.6. Extração do DNA plasmidial.....	73
3.8.7. Detecção dos genes de ESBL no DNA plasmidial por PCR.....	74
3.8.8. Detecção de Integron por PCR.....	74
3.8.9. Clonagem dos produtos de PCR para seqüenciamento.....	74
3.8.10. Extração plasmidial (mini-prep) para seqüenciamento.....	77
3.8.11. Sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos clonados.....	78
3.9. Resultados.....	80
3.9.1. Resultado do fenótipo de resistência dos isolados produtores de ESBL...	80
3.9.2. Ribotipagem por PCR dos isolados clínicos.....	82
3.9.3. Detecção dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX} e <i>bla</i> _{SHV}	83
3.9.4. Análise do conteúdo plasmidial	85
3.9.5. Detecção de integrans em isolados de <i>K. pneumoniae</i>	87

3.9.6. Mapeamento dos integrons.....	87
3.9.7. Análise genética e fenotípica geral dos isolados de <i>K. pneumoniae</i>	90
4. Discussão.....	94
4.1. Ribotipagem por PCR	94
4.2. Hidrólise de cefotaxima e ceftazidima.....	95
4.3. Resistência ‘in vitro’ a drogas relevantes.....	95
4.4. β -lactamases de espectro estendido.....	97
4.4.1. Gene <i>bla</i> _{TEM}	98
4.4.2. Gene <i>bla</i> _{CTX}	98
4.4.3. Gene <i>bla</i> _{SHV}	99
4.4.4. Associações dos genes de ESBL por isolado.....	99
4.4.5. Codificação plasmidial de ESBL.....	100
4.5. Detecção de integrons de classe 1.....	101
4.5.1. Mapeamento do integron.....	103
5. Conclusões.....	105
6. Referências bibliográficas de <i>K. pneumoniae</i>.....	106
7. Anexos.....	128
7.1. Memorial.....	128
7.2. Resumos gerados a partir desse estudo publicados em anais de congressos..	130
7.3. Artigos:.....	132

Lista de abreviaturas

%	Porcentagem
AMC	Amoxicilina/ácido clavulânico
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepima
CTX	Cefotaxima
CS	“Conserved segment” – segmento conservado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>E. faecium</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
ESBL	“ <i>Extended-spectrum β-lactamase</i> ” – β -lactamase de espectro ampliado
GEN	Gentamicina
HUOC	Hospital Universitário Oswaldo Cruz
UPE	Universidade de Pernambuco
IMP	Imipenem
<i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
PBP	“ <i>Penicillin-Binding Proteins</i> ” - Proteínas ligadoras de penicilinas
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PIP/TAZ	Piperacilina/Tazobactam
rpm	Rotação por minuto
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VRE	Enterococos resistente a vancomicina

Lista de Figuras

Figura 1	Inibição do crescimento da bactéria <i>S. aureus</i> por uma colônia do <i>Penicillium notatum</i>	2
Figura 2	Sítios de ação e potencial mecanismo de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos.....	6
Figura 3	Estrutura básica do antimicrobiano glicopeptideo vancomicina.....	7
Figura 4	Estrutura geral do anel β -lactâmico das cefalosporinas.....	7
Figura 5	Arquitetura da camada de mureína.....	8
Figura 6	Atuação dos antimicrobianos na parede celular.....	9
Figura 7	Esquema do peptidoglicano e membrana de bactérias Gram-positivas.....	10
Figura 8	Esquema da parede celular de organismos Gram-negativos.....	11
Figura 9	Esquema do mecanismo de resistência a vancomicina.....	15
Figura 10	Identificação da espécie de enterococos e do gene <i>vanA</i> por PCR específica	30
Figura 11	Análise molecular de isolados clínicos de <i>E. faecalis</i> por tDNA-PCR.....	31
Figura 12	Análise molecular de isolados clínicos de <i>E. faecalis</i> por rDNA-PCR.....	31
Figura 13	PFGE do <i>E. faecalis</i>	32
Figura 14	Análise molecular do Tn1546 e DNA plasmidial em isolados VRE.....	32
Figura 15	Células de <i>K. pneumoniae</i> rodeadas por grossas camadas de material capsular.....	50
Figura 16	Estrutura molecular de uma ESBL.....	52
Figura 17	Estrutura esquemática de integron de classe 1.....	67
Figura 18	Seqüenciamento automatizado de DNA utilizando iniciadores fluorescentes.....	79
Figura 19	Foto representativa do teste confirmatório do fenótipo para ESBL.	82
Figura 20	Percentual dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> distribuídos de acordo com os diferentes ribotipos.....	83
Figura 21	Gel representativo da amplificação dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX}</i> de isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i>	84
Figura 22	Diagrama de Venn apresentando o número de isolados bacterianos com um, dois ou os três genes	85
Figura 23	Gel representativo da detecção dos plasmídios em <i>K.pneumoniae</i>	86
Figura 24	Gel representativo da amplificação dos genes <i>bla_{SHV}</i> , <i>bla_{TEM}</i> e <i>bla_{CTX}</i> nas amostras de DNA plasmidial de isolados de <i>K. pneumoniae</i>	86
Figura 25	Gel representativo da presença do integron pela amplificação dos genes <i>Int1</i> e <i>sul 1</i>	87
Figura 26	Gel representativo da amplificação de vários genes do integron de classe 1.....	88
Figura 27	Gel representativo da região variável 5'-3'CS de integrons de classe 1.....	89
Figura 28	Esquema representativo da estrutura do integron de classe 1.....	90

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características dos diferentes elementos envolvidos na disseminação de genes de resistência.....	3
Tabela 2	Cepas de controle utilizadas no estudo do <i>E. faecalis</i>	26
Tabela 3	Seqüência dos iniciadores e condições de PCR para detecção de espécie dos enterococos, padrão de resistência e genotipagem	27
Tabela 4	Classificação das β -lactamases pelo sistema molecular.....	55
Tabela 5	Seqüência dos iniciadores e condições de PCR para detecção do <i>bla</i> genes para cepas de <i>K. pneumoniae</i>	73
Tabela 6	Seqüência dos iniciadores e condições de PCR para detecção de integrons de classe 1	75
Tabela 7	Reação de ligação para clonagem no vetor pGEM-t.....	76
Tabela 8	Percentual de resistência a vários antimicrobianos, apresentada por isolados clínicos de <i>K.pneumoniae</i>	81
Tabela 9	Percentual de resistência “in vitro” para β -lactâmicos de espectro estendido, frente a isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> de 2002 a 2005.....	81
Tabela 10	Distribuição dos genes <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX} e <i>bla</i> _{SHV} dentre os isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> no período de estudo.....	85
Tabela 11	Perfil fenotípico e genético de isolados de <i>K. pneumoniae</i> 2002/2005.....	91

Resumo

O objetivo desse estudo foi caracterizar bactérias causadoras de infecção hospitalar que apresentam resistência aos dois principais grupos de antibióticos que afetam a síntese da parede celular representados pelos glicopeptídeos e β -lactâmicos. Neste, reportamos o isolamento e caracterização das primeiras amostras de *Enterococcus faecalis* resistentes ao glicopeptídeo vancomicina (VRE) no Nordeste do Brasil e isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes aos antibióticos β -lactâmicos envolvidos em episódios de infecções hospitalar. Estes isolados foram testados quanto a susceptibilidade aos antimicrobianos de escolha. Os enterococos foram tipificados por meio de macro-restrição do DNA cromossomal e analisados quanto a presença dos genes de resistência e de elementos genéticos móveis. Os isolados apresentaram resistência a múltiplos antimicrobianos e apenas um perfil genético foi encontrado, sugerindo a disseminação de uma linhagem clonal entre os pacientes infectados, também a presença específica do gene *vanA* e do elemento de transposição *Tn1546-like* associado a plasmídios mostram capacidade de disseminação dos mecanismos de resistência aos glicopeptídeos por meio de processos de conjugação genética entre as bactérias. Os isolados de *K. pneumoniae* foram tipificados por ribotipagem e analisados quanto a presença dos genes de resistência e de elementos genéticos móveis. Os isolados apresentaram o fenótipo de ESBL, ou seja, produtoras de β -lactamases de espectro ampliado. Este fenótipo foi associado a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} tanto no cromossomo como em plasmídios naturais dos isolados. Estes genes foram detectados em diferentes associações, como genes únicos (25,5%), duplos (41,8%) e triplos (32,7%). A presença dos três genes no mesmo isolado foi detectada em percentuais superiores àqueles relatados na literatura. Em adição, foram também detectadas as presenças do integron de classe 1 carreando outros genes de resistência, gerando o fenótipo de co-resistência dessas bactérias a outros antimicrobianos. A detecção de várias linhagens clonais mostra o surgimento de vários eventos de resistência ou a transferência dos marcadores genéticos entre as bactérias. Assim, os resultados puderam mostrar o crescimento da disseminação dos elementos genéticos de resistência bacteriana a antibióticos entre isolados de bactérias causadoras de infecção hospitalar, diminuindo, assim, as possibilidades terapêuticas para o tratamento dessas infecções.

Palavras chave: disseminação, transposons, plasmídios, integrons.

Abstract

This work aimed to characterize bacterial isolates involved in hospital infections in Recife, Brazil, that were resistant to the two main groups of antibiotics that affect cell wall synthesis: glycopeptides and β -lactams. For the first group of antibiotics we reported the isolation of and characterization of the first samples of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis* in Northern Brazil. These isolates were tested for the resistance to several antibiotics, typed by chromosome DNA macrorestriction analysis and PCR-ribotyping and for the presence of resistance genes and mobile genetic elements. All the isolates presented multiple resistances and the same genetic profile, indicating the same clonal origin spread over the infected patients. The specific presence of *vanA* gene and of the Tn1546-like element in plasmid DNA indicates the capacity of dissemination of such resistance to glycopeptides through bacterial conjugation mechanism. Concerning to the second group of antibiotics, clinical isolates of β -lactams resistant *Klebsiella pneumoniae* involved in hospital infection in the period of 2002 to 2005 were analyzed. These isolates were tested to resistance of several antibiotics, typed by PCR-ribotyping and for the presence of resistance genes and mobile genetic elements. All isolates showed extended spectrum β -lactamase (ESBL) phenotype, which were associated to the presence of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV} genes in bacterial chromosomes as well as in plasmids. All possible combinations of the three *bla* genes were found among the bacterial isolates, and the percentage of isolates containing the three genes all together was higher than those currently related in the literature. All isolates, but four, were harboring type 1 integrons that carried other resistance genes. It resulted in the high co-resistance phenotype observed. The detection of different clonal lineages indicates that bacterial resistance rose through different events in the different hospital sites. However, the presence of several plasmid DNA and the spread of type 1 integron also point out for an intense mechanism of horizontal gene transfer via bacterial conjugation. The results of the present work show the increase of bacterial resistance mostly induced by the dissemination of genetic determinants among the nosocomial bacteria such as genes and/or mobile elements, which may substantially affect the possibilities of therapeutically treat the infected patients.

Words key: dissemination, transposons, plasmids, integrons.

Introdução

Os antibióticos surgiram como opção terapêutica de infecções bacterianas muitas vezes fatais. Contudo, a utilização de antimicrobianos em escala mundial durante as últimas décadas exerceu uma enorme pressão seletiva sobre bactérias, surgindo isolados apresentando resistência a quase todos os antimicrobianos disponíveis. Os antimicrobianos que atuam na parede celular bacteriana inibem a síntese da mesma, como os β -lactâmicos e glicopeptídeos (vancomicina). Os *Enterococcus* resistentes a vancomicina estão disseminados pelo mundo todo e, após a primeira descrição de um caso no Brasil, vários outros casos foram descritos, indicando uma rápida disseminação desse mecanismo de resistência. Os *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*), para expressar resistência aos glicopeptídeos, modificam o alvo de atuação do antimicrobiano, as enterobacteriaceas entre elas a *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), produzem enzimas (ESBLs) que inativam os β -lactâmicos. Apesar da disseminação de *K. pneumoniae* produtora de enzimas do tipo ESBL em várias regiões do Brasil, dados sobre a ocorrência desse mecanismo de resistência ainda são raros nos hospitais do Nordeste, especialmente em Pernambuco, e muito pouco é conhecido sobre os tipos moleculares de ESBL presentes nesses ambientes. Esses patógenos além de portadores de genes que conferem resistência a atuação desses antimicrobianos, rapidamente evoluem e se disseminam no meio ambiente sob pressão seletiva. Uma eficiente rota para aquisição e disseminação vertical e horizontal de genes de resistência é através de elementos genéticos moveis como plasmídios, transposons e cassetes gênicos em integrons. Este trabalho apresenta a caracterização molecular de isolados de *E. faecalis* resistente a vancomicina (*vanA*) e de *K. pneumoniae* produtora de ESBL (*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV}) que conferem resistência as cefalosporinas e monobactam. Foi identificada a presença do gene *vanA* nos plasmídios e cromossomo do *E. faecalis*, além da identificação do transposon Tn1546 associado aos plasmídios e portador do gene *vanA*. Os dados de tipagem mostraram a presença de um único clone em quatro isolados de *E. faecalis* portadores do gene *vanA* associado ao transposon. Adicionalmente, são apresentados os resultados sobre os estudos de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL, bem como a identificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{SHV} que conferem resistência as cefalosporinas e monobactam como aztreonam, nesses isolados. Um importante mecanismo de disseminação baseado na presença de plasmídeos e integrons do tipo I portando o gene *bla*_{CTX-M} foi identificado nos isolados locais. A presença desses genes em

elementos móveis facilita a transferência horizontal de genes de resistência e aumentam as possibilidades de infecções causadas por isolados bacterianos multirresistentes.

1. Revisão da Literatura

1.1. Introdução a resistência bacteriana

O primeiro antibiótico, a penicilina foi descoberto em 1928 por Alexander Fleming, ao observar que na placa de ágar com estafilococos havia uma zona de inibição do crescimento da bactéria ao redor do fungo contaminante *Penicillium*. O princípio ativo dessa inibição foi chamado de penicilina (Figura 1). A nova droga entrou em uso clínico em 1946 e essa descoberta revolucionou a medicina moderna e preparou o caminho para o desenvolvimento de muitos outros antibióticos naturais (STERNBACH e VARON, 1992).

A euforia produzida pelo uso clínico da penicilina na década de 1940 levou a previsões confiantes de que as doenças bacterianas poderiam ser em breve eliminadas, mas pouco depois surgiram os primeiros isolados de *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) resistente à penicilina (ABRAHAM et al., 1941; RAMMELKAMP e MAXON, 1942). Considerando que antes de 1946 cerca de 90% dos estafilococos isolados em hospitais eram sensíveis à penicilina, em 1952, somente 25% dos isolados apresentavam sensibilidade a penicilina (FINLAND, 1955). Ao longo das duas décadas seguintes as cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina passaram para 90% dos isolados, tanto de comunidade quanto de origem hospitalar. Durante décadas sucessivas, a introdução de inúmeros agentes antimicrobianos foi seguida, após intervalos variáveis, pelo aparecimento de resistência bacteriana entre muitas espécies. A resistência foi inicialmente observada em isolados clínicos de origem hospitalar, um ambiente caracterizado por uso intenso de agentes antimicrobianos e pela proximidade dos pacientes, o que pode favorecer a disseminação.

A estreita associação entre uso intenso de antimicrobianos e o posterior aparecimento de cepas resistentes foi uma forte evidência do poderoso efeito seletivo dessa utilização (SWARTZ, 1997). Ao longo das últimas décadas, a emergência e disseminação de resistência antimicrobiana têm aumentado a taxas alarmantes (JONES, 2001). Este aumento tem sido atribuído a uma combinação de características microbianas, pressão seletiva causada pela utilização de agentes

antimicrobianos e a disseminação dos genes de resistência por transferência horizontal. Os principais patógenos capazes de apresentar resistência são as *Enterobacteriaceas*, principalmente *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro ampliado, os estafilococos resistentes a meticilina e os enterococos resistentes a vancomicina (DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003; BELISSIMO-RODRIGUES, 2006).

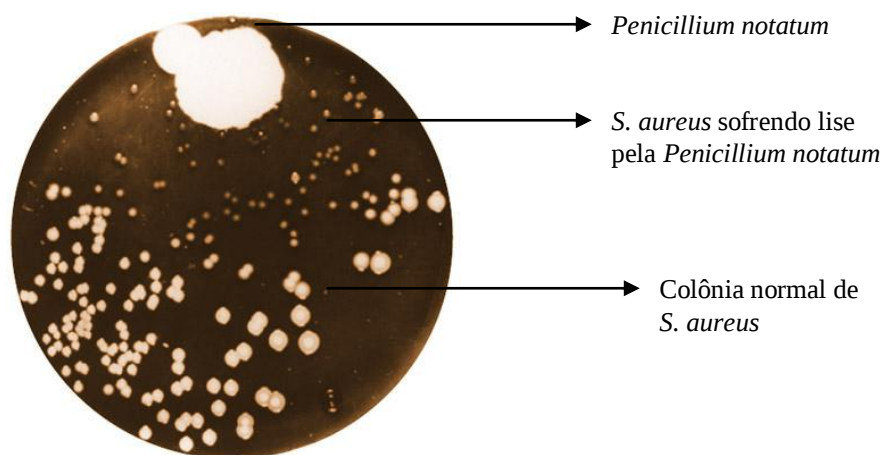


Figura 1. Inibição do crescimento da bactéria *S. aureus* por uma colônia do *Penicillium notatum* (HALLER e MASON, 2001).

A produção em larga escala de antimicrobianos parece exercer uma vantagem temporária na luta contra microrganismos. Porém, se o ritmo atual de aumento da resistência aos agentes antimicrobianos continuar, é possível que entremos na era pós-antimicrobiana (TENOVER e HUGHES, 1996). Centenas ou milhares de células resistentes podem estar presentes antes da administração do antimicrobiano, já que a frequência de mutação é muito alta, na ordem de 10^{-6} a 10^{-8} por geração, enquanto que infecções bacterianas podem conter 10^{10} organismos. Antimicrobianos em contato com esta população podem permitir crescimento a parcela da população por seleção dos mutantes (DRLICA, 2003).

Quando os episódios de infecção são breves o microrganismo mutante presente no paciente pode não ser detectado facilmente. No entanto, com a passagem do patógeno por vários pacientes tratados com antimicrobianos é de se esperar que a fração mutante venha a aumentar na

população bacteriana de forma gradual. Mesmo que a infecção surja a partir de uma única célula patogênica, sua disseminação pode ser muito rápida. Assim, um agente antimicrobiano pode curar 99% dos casos, mas quando milhões de pessoas são consideradas, o desenvolvimento de resistência é uma consequência inevitável (DRLICA, 2003).

Existem duas formas principais de aquisição de genes de resistência pelas bactérias: mutação cromossômica e aquisição de genes exógenos de resistência (RADMAN et al., 1981; COLLIS e HALL, 1995). O potencial de resistência aos antibióticos por mutação cromossômica é intrínseco a todas as bactérias, porque mutações cromossômicas ocorrem espontaneamente na replicação do DNA bacteriano devido à imperfeita fidelidade da replicação (RADMAN et al., 1981). A resistência aos antibióticos pode se desenvolver também através da aquisição de resistência transmitida por plasmídios, transposons, integrons e bacteriófagos (COLLIS e HALL, 1995) (Tabela 1). Genes de resistência a vários antimicrobianos têm sido relacionados a elementos genéticos móveis e podem ser transferidos para cepa susceptível através de um único evento gênico.

Tabela 1. Características dos diferentes elementos envolvidos na disseminação de genes de resistência. Adaptado de Salyers, et al., (1997).

Elementos	Características	Papel na disseminação de genes de resistência
Plasmídios auto-transmissíveis	Circular, replicação autônoma; transporta genes necessários para a conjugação do DNA	Transferência de genes de resistência; mobilização de outros elementos que transportam genes de resistência.
Plasmídios móveis	Circular, replicação autônoma; transporta genes que lhe permite utilizar o material fornecido na conjugação por plasmídios auto-transmissíveis	Transferência de genes de resistência
Transposons	Pode deslocar-se de um segmento de DNA para outro dentro da mesma célula	Podem transportar genes de resistência para o cromossomo, para o plasmídio ou vice-versa.
Cassetes gênicos	Circular, segmento de DNA não-replicativo que contém só "open reading frames"; associada ao integron	Transferência de genes de resistência
Integron	Segmento de DNA integrado que contém uma integrase, um promotor, e um local para a integração de cassetes gênicos. Hábeis na captura e expressão de genes exógenos (cassetes)	Forma aglomerado de genes de resistência, sob o controle do promotor do integron.

Muitos desses genes foram achados na natureza antes da introdução dos antibióticos (GARDNER et al., 1969). Quando esses genes são adquiridos, podem ser incorporados no genoma bacteriano. Contudo quando o antimicrobiano é removido do ambiente a resistência bacteriana não confere mais vantagem seletiva. A transmissibilidade de determinantes de resistência adquirida é geralmente afetada pela sua localização nos elementos genéticos móveis. O potencial para a disseminação da resistência é então relacionado a quantidade de cópias desses elementos na célula hospedeira e sua eficiência em transferir esses elementos (HOOPER, 2001b).

O nível de resistência observado nas bactérias do ambiente hospitalar é bem mais alto do que na comunidade, devido a vários fatores desencadeantes, contato entre pacientes portadores de bactérias resistentes através de vários transportadores (mãos, equipamentos, aerossóis e outros) e pressão seletiva dos antimicrobianos, o que leva a microrganismos expressar resistência a várias drogas (SADER et al., 1998; 1999; 2001; HOOPER, 2001b; DZIDIC e BEDEKOVIC, 2003).

1.1.2. Mecanismos de ação dos principais grupos de antimicrobianos

Os antimicrobianos atuam na célula bacteriana em alvos específicos, com os principais efeitos sendo descritos como: inibição da biogênese da parede celular (β -lactâmicos e glicopeptídeos), inibição da síntese protéica (macrolídeo e tetraciclina), interferência com a síntese de ácidos nucleicos (quinolonas e rifampicina) e modificação da estrutura da membrana (polimixina) (MIMS et al., 1995; TENOVER, 2006; WINN et al., 2008) (Figura 2).

1.1.2.1. Inibidores da síntese protéica

Atuam para dificultar a tradução do mRNA, levando a formação de proteínas defeituosas, causando inibição do crescimento e consequente eliminação da célula bacteriana (MIMS et al., 1995; WINN, et al., 2008). Por exemplo, o cloranfenicol, por ser lipossolúvel, difunde-se através da membrana celular bacteriana e atua inibindo a reação da peptidiltransferase na síntese protéica, através da ligação à subunidade ribossomal 50S. Já as tetraciclinas se ligam reversivelmente com alta afinidade à subunidade 30S ribossomal, rompendo a interação códon-

anticodon, interagindo entre o aminoacil-tRNA e mRNA e, desse modo, inibindo a ligação do aminoacil-tRNA no ribossomo. Os aminoglicosídeos penetram através de uma porina independente na membrana externa, e seu mecanismo de ação envolve sua ligação ao sítio “A” da subunidade 16S ribossomal, impedindo a tradução (WAX et al., 2008) (Figura 2).

1.1.2.2. Alteração da permeabilidade e função de membrana

A membrana citoplasmática de uma bactéria regula ativamente a passagem de substâncias necessárias à célula, além de possuir enzimas importantes ao metabolismo celular. Alguns antimicrobianos agem como um detergente catiônico ligando-se fortemente aos fosfolipídios da membrana citoplasmática levando a interrupção de algumas dessas funções da membrana causando danos à célula bacteriana e sua ruptura (atividade bactericida), o principal agente com esse mecanismo de ação é a polimixina (MIMS et al., 1995; WINN et al., 2008) (Figura 2).

1.1.2.3. Interferência na síntese do ácido nucléico

Os antimicrobianos que interferem na síntese de ácidos nucléicos, como ciprofloxacina, atuam inibindo as enzimas bacterianas DNA girase e Topoisomerase IV, complexo enzimático importante para a replicação do DNA (HOOPER, 2001a). Em organismos Gram-negativos a DNA girase é o alvo primário, enquanto que em bactérias Gram-positivas é a Topoisomerase IV. O cromossomo bacteriano é formado por uma molécula de DNA circular, com estrutura compactada. Após a duplicação do DNA torna-se necessária a compactação, que é obtida pela ação da DNA girase que introduz uma super torção na dupla hélice, resultando no DNA altamente condensado (DRLICA, 1999).

Os antimicrobianos ligam-se à DNA girase ou topoisomerase IV na presença de DNA, alterando a conformação das enzimas, inibindo sua função e ainda promovendo um efeito tóxico para a célula, por capturar uma ou ambas as enzimas do cromossomo bacteriano, criando um complexo ternário, medicamento-enzima-DNA. O bloqueio da replicação do DNA pode ocorrer por duas vias, a principal envolve a remoção do complexo antimicrobiano-DNA Girase, liberando a dupla fita rompida de DNA. O DNA tem relaxadas suas espirais e passa a ocupar maior espaço que o limite do corpo bacteriano permite. Além disso, as extremidades livres do DNA induzem a síntese descontrolada de RNA mensageiro e de proteínas, a produção de

exonucleases e a degradação cromossomal (TAVARES, 1996; HOOPER, 1998). A segunda via consiste na dissociação da enzima complexada ao DNA. Ocorre liberação das pontas de DNA ligadas às subunidades da enzima levando à morte celular. Esta via ocorre quando as células são tratadas com altas concentrações de quinolonas (HOOPER, 1998, HOOPER, 2001a) (Figura 2).

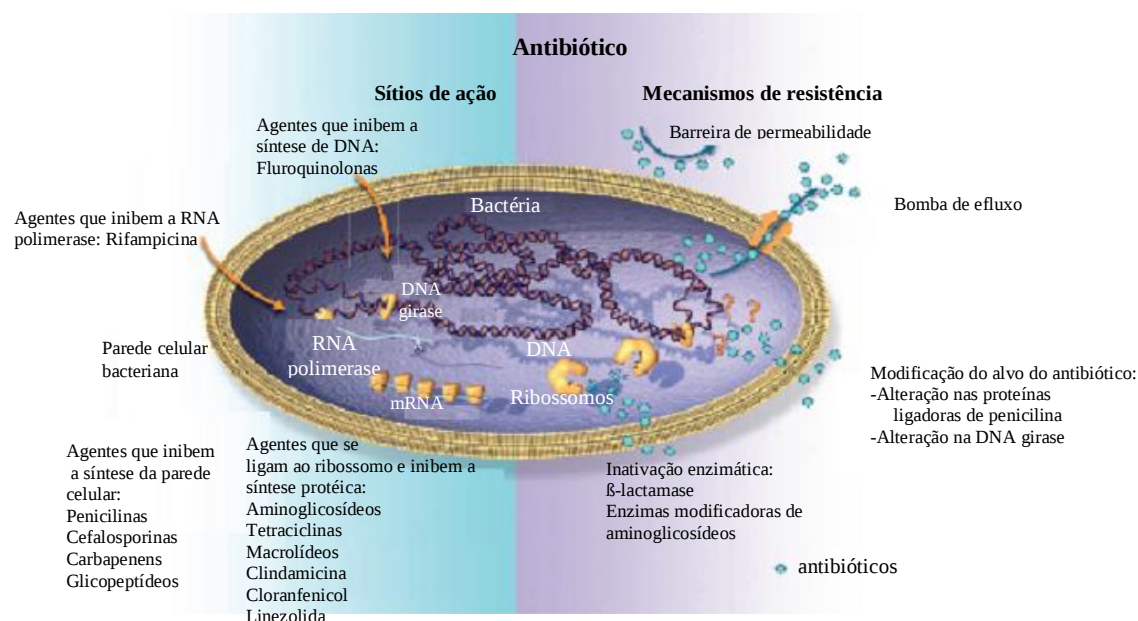


Figura 2. Sítios de ação e potencial mecanismo de resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos (Fonte: MULVEY e SIMOR, 2009. Modificado).

1.1.2.4. Inibição da síntese da parede celular bacteriana

Os dois principais grupos de antimicrobianos que atuam na síntese da parede bacteriana são os β -lactâmicos e os glicopeptídeos. Os β -lactâmicos compreendem uma grande família de diferentes grupos de compostos que compartilham um anel β -lactâmico (Figura 4). Os diferentes grupos dentro da família são distintos pela estrutura do anel ligado ao anel β -lactâmico e também por suas cadeias laterais. Os principais glicopeptídeos conhecidos até o momento são a vancomicina (Figura 3) e teicoplanina (MARÍN e GUDIOL, 2003).

A síntese dos precursores do peptidoglicano consiste em várias etapas que se iniciam no citoplasma de onde são transportadas e inseridas na molécula do peptidoglicano em formação. A transpeptidase, uma enzima ligada a membrana celular, e outras proteínas ligadoras de penicilina

participam na formação da célula bacteriana. Essas proteínas de ligação estão inseridas na membrana celular nas bactérias gram-positivas e na membrana plasmática interna nas gram-negativas. Os antimicrobianos que inibem a síntese da parede celular (Figura 2) variam muito em estrutura química, sendo os grupos mais importantes β -lactâmicos e os glicopeptídios (WINN et al., 2008).

Os glicopeptídeos atuam interferindo com a síntese da parede celular por se ligarem ao terminal D-ala-D-ala nas cadeias terminais do peptidoglicano em crescimento das bactérias Gram positivas. Por outro lado, os β -lactâmicos atuam em uma fase posterior, se ligando a enzimas chamadas PBP (proteínas ligadoras de penicilina) responsáveis pela fase final da síntese da parede celular (SCHEFFERS e PINHO, 2005) (Figura 3).

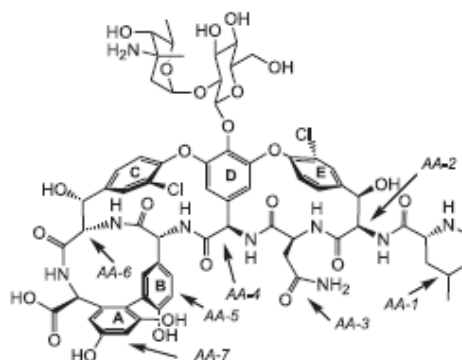


Figura 3. Estrutura geral do antimicrobiano glicopeptideo vancomicina (Fonte: SILVEIRA et al., 2006).

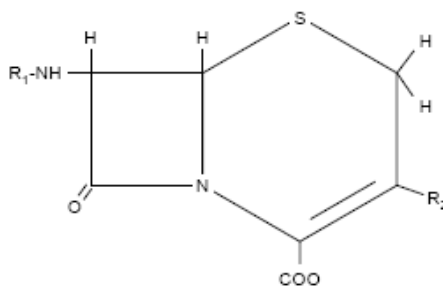


Figura 4. Estrutura geral do anel β -lactâmico das cefalosporinas. Adicionando grupos laterais nas posições R1 e R2 do anel com seis membros surgem variantes do antimicrobiano (Fonte: MARIN e GUDIOL, 2003).

A parede celular bacteriana está situada na porção mais externa, acima da membrana citoplasmática. Devido à sua grande rigidez, a parede celular é responsável pela manutenção da forma do microrganismo. Como o ambiente intracelular é bastante concentrado em relação ao meio externo (variando de 2 a 10 atm), a parede atua como uma barreira física rígida, mantendo a forma celular, impedindo que a célula se rompa. Além disso, a parede celular atua como uma barreira de proteção contra determinados agentes físicos e químicos externos, tais como o choque osmótico, sua integridade é de importância crítica para a viabilidade celular (DE PEDRO et al., 2003; POPHAM e YOUNG, 2003). Em ambas as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a parede celular é constituída por polímero com ligações cruzadas formando o peptidoglicano (Figura 5) (SCHEFFERS e PINHO, 2005).

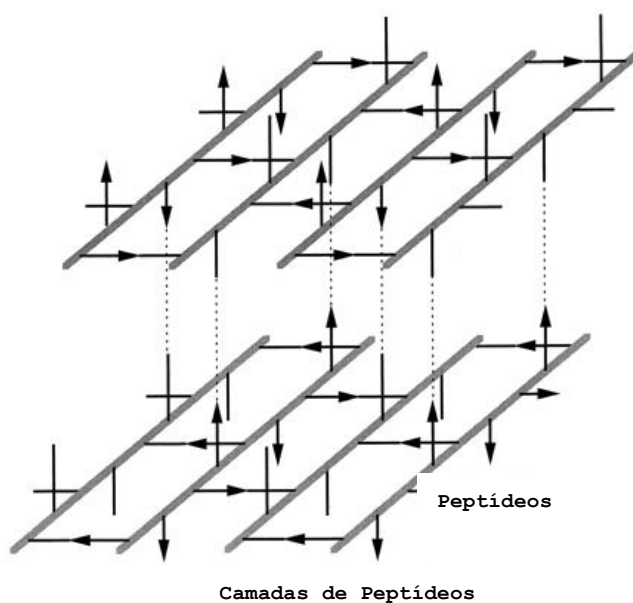


Figura 5. Arquitetura da camada de mureína. A figura mostra duas camadas de mureína e indica (por linhas pontilhadas) como elas podem ser empilhadas, uma sobre a outra, para formar várias camadas de mureína. Peptidoglicano são representadas pelas barras sólidas (Fonte: HOLTJE, 1998).

Quando observadas sob microscopia eletrônica de transmissão, as bactérias Gram-positivas apresentam uma parede celular espessa (20 a 80 nm), de aspecto homogêneo, enquanto as células Gram-negativas exibem uma parede mais delgada (9 a 20 nm) e de aspecto bastante complexo, aparentemente apresentando mais de uma camada. O peptidoglicano corresponde a um enorme polímero complexo que, em bactérias Gram-positivas, pode ser formado por até 20

camadas; já em células Gram-negativas este polímero pode constituir uma ou duas camadas (HOLTJE, 1998; SCHEFFERS e PINHO, 2005).

Os antibióticos β -lactâmicos e glicopeptídios agem como inibidores da síntese do peptidoglicano tendo dois efeitos gerais sobre a parede celular de uma bactéria em divisão: (1) inibição da ação das transpeptidases, reduzindo a quantidade de ligações cruzadas em uma rede de peptidoglicano crescente, enfraquecendo a estrutura da parede celular e (2) ativação de autolisinas que digerem o peptidoglicano, causando a lise da bactéria (Figura 6).

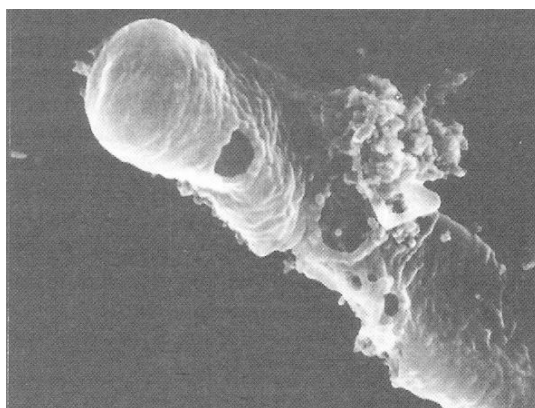


Figura 6. Atuação dos antimicrobianos na parede celular. Os glicopeptídeos e β -lactâmicos ao inibir a síntese da parede, permitem a atuação de autolisinas que rompem a parede celular (fonte: TORTORA et al., 2000).

1.1.3. Antimicrobianos glicopeptídeos

Os glicopeptídeos são drogas de alto peso molecular, constituídos de açúcares e aminoácidos e com estrutura molecular cíclica e complexa. Estes têm como mecanismo de ação sua fixação à membrana citoplasmática das bactérias Gram-positivas sensíveis, (Figura 7) alterando sua permeabilidade seletiva e interferindo na síntese dos peptidoglicano, desse modo inibindo a síntese da parede celular num sítio diferente dos β -lactâmicos.

Devido ao seu alto peso molecular, a vancomicina e teicoplanina são incapazes de penetrar a membrana externa das bactérias Gram-negativas e sua atividade é restrita às Gram-positivas (CETINKAYA et al., 2000; SHINOHARA e NOBRE, 2005).

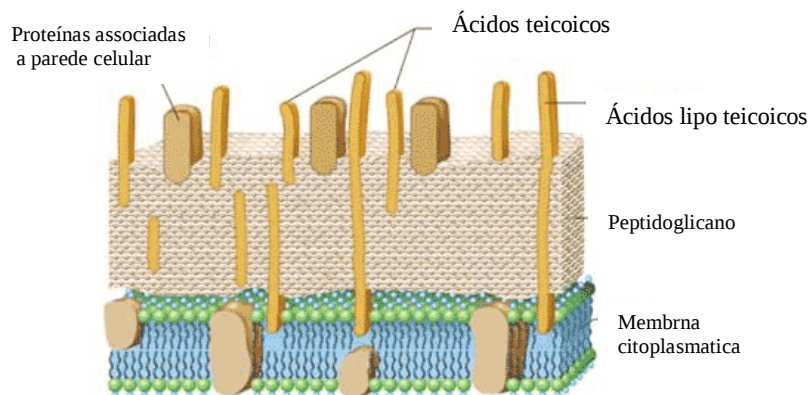


Figura 7. Esquema do peptidoglicano e membrana de bactérias Gram positivas (Fonte: MADIGAN et al., 2003).

1.1.4. Antibimicrobianos β -lactâmicos

Antimicrobiano β -lactâmico é aquele que possui em sua forma estrutural o anel β -lactâmico, que é essencial para a atividade antimicrobiana. Lateralmente ao anel existem cadeias acíclicas variáveis e formam os diversos grupos: a) penicilínicos, derivados semi-sintéticos da penicilina, como penicilina V, penicilina G, amoxicilina e ampicilina; b) cefalosporínicos de 1ª, 2ª, 3ª e 4ª gerações, c) carbapenêmicos como imipenem e meropenem.

A destruição da parede celular bacteriana acontece como consequência da inibição da última etapa da síntese do peptidoglicano. As bactérias Gram-negativas têm uma parede mais fina e completa que consta de uma membrana externa formada por lipídeos e proteínas e uma delgada camada interna de peptidoglicano (Figura 8). O peptidoglicano é constituído por grandes cadeias de glicídios, formadas pela repetição de moléculas do ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglicosamina (GHUYSEN et al., 1996; GOFFIN e GHUYSEN, 1998).

O ácido murâmico fixa cadeias de tetrapeptídeos que se unem entre si para formar uma malha. Os β -lactâmicos inibem precisamente esta transpeptidação, última etapa da síntese da parede celular. Desse modo, a parede debilitada pode romper-se pela pressão osmótica intracelular. Para a atuação dos β -lactâmicos é necessário que a bactéria esteja em fase de multiplicação, quando justamente sintetiza a parede celular (SCHEFFERS e PINHO, 2005).

Os componentes do peptidoglicano são sintetizados no citoplasma e transportados através da membrana citoplasmática para o espaço periplasmático. Nesse local as transpeptidases e carboxipeptidases são encarregadas de formar os tetrapeptídeos unidos. Estas enzimas (transpeptidases e carboxipeptidases) são os alvos de atuação das penicilinas e outros β -

lactâmicos sendo conhecidas como proteína ligadoras de penicilina (*Penicillin-Binding Proteins* – PBP), cujas funções são o alargamento da forma celular e a promoção da divisão. O anel β -lactâmico possui uma estrutura similar a dos últimos aminoácidos do pentapeptídeo (D-alanina-D-alanina) e isso permite a união covalente no lugar do sítio ativo da transpeptidase. Também pode ocorrer a inibição das carboxipeptidases e algumas endopeptidases. Os β -lactâmicos também atuam ativando uma autolisina endógena que destrói o peptidoglicano (MARIN e GUDIOL, 2003; SCHEFFERS e PINHO, 2005).

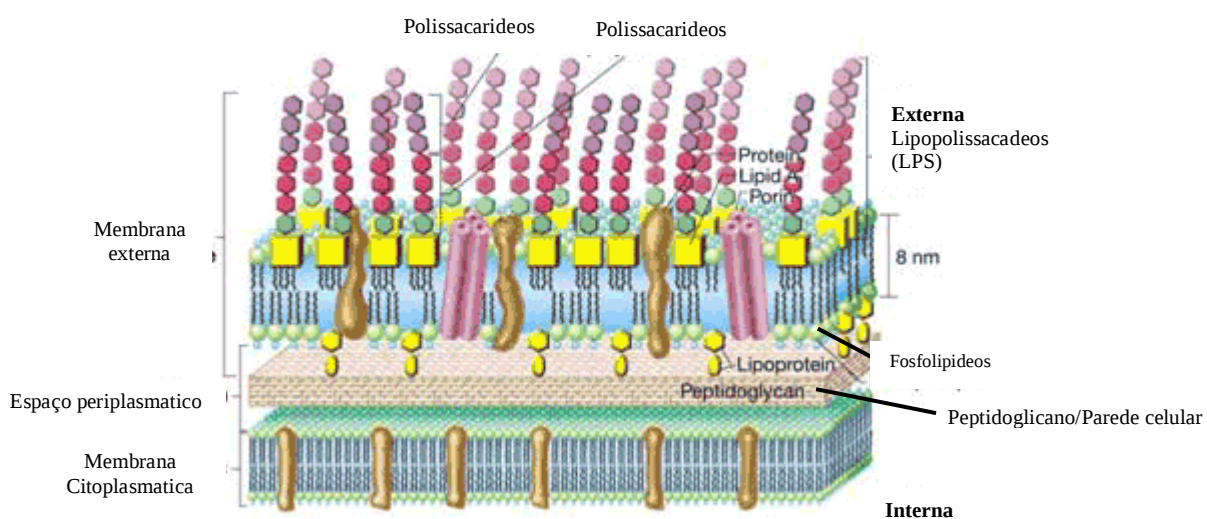


Figura 8. Esquema da parede celular de organismos Gram negativos (fonte: MADIGAN et al., 2003).

2. Capítulo I: *Enterococcus faecalis*

2.1. *Enterococcus*

As bactérias do gênero *Enterococcus* foram originalmente classificadas como cocos entéricos Gram-positivos e incluídos no gênero *Streptococcus* (MURRAY, 1997). Em meados de 1930, com o estabelecimento do sistema de triagem sorológica de Lancefield, os enterococos foram classificados como estreptococos do grupo D. Em 1980, com base em análises das diferenças genéticas, o grupo foi retirado do gênero *Streptococcus* e passou a compor o novo gênero *Enterococcus* (FACKLAM et al., 2002).

2.1.2. O gênero *Enterococcus*

É formado por cocos Gram-positivos, com temperatura de crescimento entre 10 a 45°C, com capacidade de crescer em meios de cultura com NaCl a 6,5% e pH 9,6, hidrolisam a esculina na presença de sais biliares. Dezesete espécies de enterococos são conhecidas, sendo os *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) e *Enterococcus faecium* (*E. faecium*) os mais freqüentes nas infecções, 80 a 90% das infecções são causadas pelo *E. faecalis* e *E. faecium* de 5 a 15%, as outras espécies correspondem a menos que 5% das amostras clínicas (RUOFF et al., 1990; GORDON et al., 1992; MOELLERING, 1992; CETINKAYA et al., 2000; HARBARTH et al., 2002).

O principal reservatório humano dos enterococos é o trato gastrointestinal, no entanto, ele pode ser encontrado com menos freqüência na cavidade oral, vesícula biliar, uretra e vagina (MURRAY, 1990; MOELLERING, 1992). As fezes de adultos saudáveis contêm altas concentrações de *E. faecalis* ($>10^6$ UFC/gr), enquanto que o *E. faecium* é encontrado em concentrações menores nas fezes, de aproximadamente 25% dos adultos saudáveis (HAYDEN et al, 1993).

Enterococos fazem parte da microbiota comensal intestinal de animais e humanos, mas podem tornar-se patógenos importantes, causando endocardites, infecção do trato urinário,

bacteremia e infecções de feridas, sendo causa de infecções hospitalares desde de 1970 (HARBARTH et al., 2002).

2.1.3. Mecanismo de ação dos glicopeptídeos

Os principais glicopeptídeos utilizados no combate às bactérias Gram positivas são a vancomicina e teicoplanina. A vancomicina é um antimicrobiano extraído de culturas de *Streptomyces orientalis*. A teicoplanina também é um antimicrobiano glicopeptídeo, obtido a partir de *Actinoplanes teichomyceticus* e apresenta mecanismo de ação semelhante a vancomicina (REYNOLDS, 1989; TAVARES, 1996).

A vancomicina e a teicoplanina afetam o metabolismo de construção da parede celular bacteriana ligando-se na porção terminal D-Ala-D-Ala de um pentapeptídeo encontrado nos precursores do peptidoglicano, interferindo na etapa de transpeptidação e transglicosilação (CHIOSIS e BONECA, 2001).

O peptidoglicano é um heteropolímero formado por cadeias extensas de polissacarídeos e peptídeos. Esta estrutura molecular é responsável pela rigidez e forma da parede celular bacteriana, além de protegê-las da osmose quando em meio hipotônico. A polimerização do lipídeo é catalisada pela enzima transglicosilase que produz peptidoglicano imaturo, constituído de longas cadeias de polissacarídeos, os quais são transversalmente ligados por transpeptidases (permite a formação de pontes cruzadas) para formar o peptidoglicano maduro (EGGERT et al., 2001).

2.1.4. Resistência aos antimicrobianos nos enterococos

Enterococcus têm uma notável habilidade de sobreviver em ambientes com uso intenso de antimicrobianos devido a sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos como também adquirida por mutação ou recepção de material genético por transferência de plasmídios e transposons (CLEVEL, 1990).

A resistência aos antimicrobianos em enterococos é de dois tipos: inerente ou resistência intrínseca e resistência adquirida. Resistência intrínseca é característica dos enterococos e está presente em todos os membros da espécie sendo mediada por genes cromossômicos. Enterococos

exibem resistência intrínseca a penicilinas, cefalosporinas, lincosamidas, ácido nalidíxico, baixo nível de aminoglicosídeos e baixo nível de clindamicina (MAROTHI et al., 2005).

Isso foi coincidente e provavelmente relacionado ao aumento do uso de cefalosporinas de terceira geração às quais os enterococos são naturalmente resistentes (MURRAY, 1990).

2.2. Mecanismo de resistência bacteriana aos glicopeptídeos

Nas condições normais, a síntese do peptidoglicano em enterococos ocorre pela união de duas moléculas de D-alanina pela enzima ligase para formar D-Ala-D-Ala que é adicionada ao UDP-*N*-acetilmuramil-tripeptídeo para formar o UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptídeo. O UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptídeo quando é incorporado ao peptidoglicano (transglicosilação) permite a formação de pontes cruzadas (transpeptidação) e contribui para a manutenção da forma da camada do peptidoglicano (ELIOPOULOS, 1997).

A resistência bacteriana a vancomicina e teicoplanina ocorre através de modificação genética no loco que abriga os genes *vanA* e *vanB*, os quais codificam enzimas relacionadas que passam a sintetizar o pentapeptídeo terminado em D-Ala-D-Lac ao invés do dipeptídeo D-Ala-D-Ala (REYNOLDS, 1989; WALSH, 1993). A modificação do aminoácido terminal D-alanina por D-lactato introduz uma interação eletrostática repulsiva no lugar da ligação de hidrogênio (WALSH, 1993). Em consequência, a afinidade da vancomicina com o seu alvo (peptidoglicano) diminui em mais de 1000 vezes, impedindo a atuação do glicopeptídeo (LAI et al., 1998; ROPER et al., 2000; ARTHUR e QUINTILIANI, 2001; MCCOMAS et al., 2003; REYNOLDS e COURVALIN, 2005) (Figura 9).

2.2.1. Resistência aos glicopeptídeos

A vancomicina foi isolada em 1956 e introduzida na prática clínica em 1958 (REIS e GRISI, 1996). No entanto, a resistência aos glicopeptídeos não foi reportada nos primeiros 30 anos após a introdução da vancomicina. Acredita-se que este longo período foi devido às dificuldades das bactérias em desenvolver mecanismos de resistência a um antimicrobiano que se liga a um substrato essencial, em vez de uma proteína ou ácido nucléico (REYNOLDS e

COURVALIN, 2005). Mas os primeiros enterococos resistentes a vancomicina (VRE), *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*, foram identificados em 1986 na França (LECLERCQ et al., 1988) e na Inglaterra (UTTLEY et al., 1989) e vários outros isolados foram relatados. Desde então, cepas VRE têm sido reportadas em muitos países ao redor do mundo (CLARK et al., 1993; BELL et al., 1998; SUPPOLA et al., 1999; ZHENG et al., 2007). VRE tem sido detectado como causa de surtos hospitalares ou de forma endêmica nas regiões sul e sudeste do Brasil (ZANELLA et al., 2003).

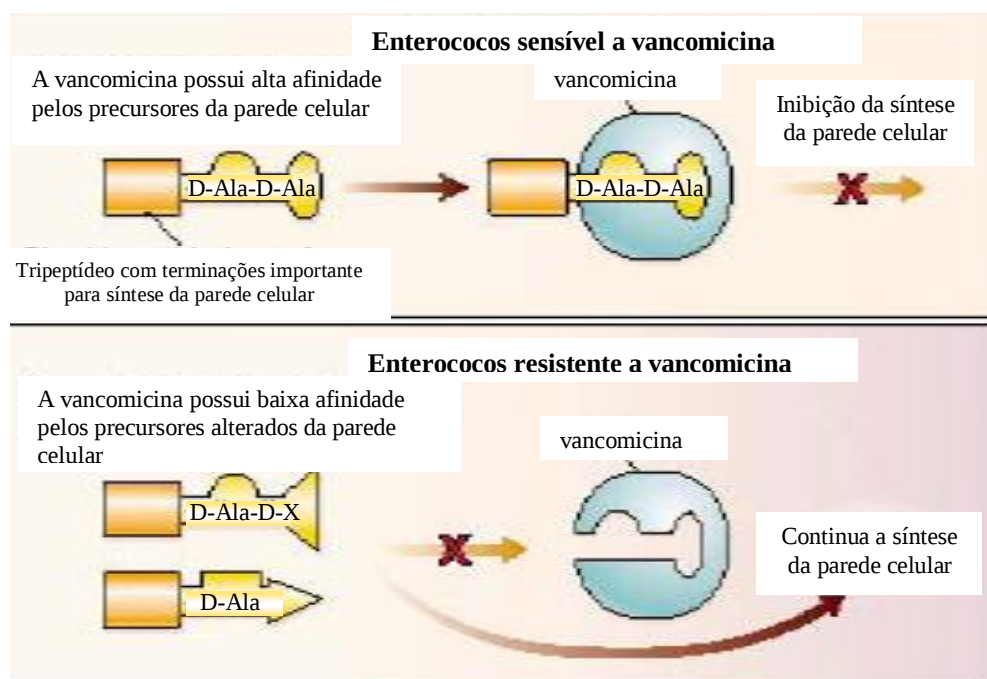


Figura 9. Esquema do mecanismo de resistência a vancomicina. Em “A” a vancomicina se liga aos precursores da parede celular inibindo a síntese de parede, a bactéria morre. Em “B” a vancomicina não se liga aos precursores da parede alterados, a síntese da parede continua e a bactéria sobrevive (Fonte: Murray, 2000. Modificado).

2.2.2. Descrição dos fenótipos de resistência a vancomicina

Existem seis fenótipos de resistência aos glicopeptídeos em enterococos (VanA, VanB, VanC, VanD, VanE e VanG) que podem ser distintos com base na sequência do gene estrutural da ligase (DEPARDIEU et al., 2004).

O fenótipo VanA, mediado pelo gene *vanA*, exibe um alto nível de resistência à vancomicina e à teicoplanina, enquanto que VanB (gene *vanB*) é susceptível à teicoplanina. Baixo ou moderado nível de resistência à vancomicina e susceptibilidade à teicoplanina relaciona-se a enterococos com resistência intrínseca, pertencentes ao fenótipo VanC. Os genes responsáveis por este fenótipo são *vanC1* e *vanC2/3*, normalmente identificados nas espécies *E. gallinarum* e *E. casseliflavus*, respectivamente. Assim, a identificação dos genes *vanA*, *vanB*, *vanC1* e *vanC2/3* é indicativa dos respectivos fenótipos de resistência à vancomicina VanA, VanB e VanC (DUTKA-MALEN et al., 1995).

Duas dessas classes (VanA e VanB) são mediadas por agrupamento gênicos recém adquiridos. Cepas do tipo VanD são caracterizadas por nível de resistência moderada a vancomicina e teicoplanina. Isolados do tipo VanC, VanE, e VanG apresentam baixo nível de resistência a vancomicina somente (DEPARDIEU et al., 2004).

Os fenótipos de resistência VanA e VanB foram descritos principalmente em *E. faecalis* e *E. faecium* (ARTHUR e COURVALIN, 1993). A resistência pode ser induzida pelos glicopeptídeos vancomicina, teicoplanina, avoparcina, e ristocetina e não pelos glicopeptídeos robenidina usado no tratamento de aves (LAI e KIRSCH, 1996). Para o fenótipo VanB inicialmente acreditava-se que a resistência era induzível à baixos níveis de vancomicina, mas sensíveis a teicoplanina. Agora, se sabe que os níveis de vancomicina que medeiam resistência entre isolados VanB são altos (Concentração Inibitória Mínima alta). O determinante de resistência a VanB também reside em operons presentes em grandes elementos móveis que podem ser transferidos de um enterococos a outro, semelhante ao que ocorre com o fenótipo VanA (QUINTILIANI et al., 1993; QUINTILIANI e COURVALIN, 1994).

2.2.3. Fenótipo VanA de resistência.

O gene *vanA* e outros genes envolvidos na regulação e expressão da resistência a vancomicina (*vanR*, *vanS*, *vanH*, *vanA*, e *vanX*) são normalmente adquiridos através do transposon Tn1546 com 10.581 bp, em *E. faecium*, que muitas vezes se encontra em plasmídeo (ARTHUR et al., 1993). Portanto, a transferência horizontal de genes de resistência entre enterococos tem um impacto mais significativo sobre a disseminação clonal do VRE em enterococos (ZHENG et al., 2007). A expressão desses genes resulta na síntese anormal dos

precursores do D-Ala–D-Lactato em vez de D-Ala–D-Alanina. A vancomicina se liga a D-Ala–D-Lac com acentuada redução de afinidade em relação ao dipeptídeo normal (BUGG et al., 1991a).

O fenotipo VanA é induzível e determinado por um agrupamento de cinco genes dos quais *vanH*, *vanA*, e *vanX* são críticos para determinação da resistência. Juntos com dois genes reguladores *vanR* e *vanS*, eles formam uma região altamente conservada *vanRSHAX* do transposon do tipo Tn1546 que são transportados por plasmídios (ARTHUR et al., 1993; ARTHUR e COURVALIN, 1993; KAWALEC et al., 2000).

Assim as funções dos genes do operon *vanA* são descritas:

- A ligase da proteína VanA é alterada especificamente para produzir D-Ala–D-Lac em lugar de D-Ala–D-Ala (BUGG et al., 1991b).
- O gene *vanH* codifica a produção de uma proteína responsável pela produção de D-lactato, que será incorporado no lugar de D-Ala no peptidoglicano em formação (ARTHUR et al., 1991).
- O gene *vanX* codifica a produção de uma dipeptidase responsável por clivar a D-Ala–D-Ala, reduzindo as reservas de precursores normais do dipeptídeo, os radicais D-Ala clivados se incorporam aos radicais D-Lac formando D-Ala–D-lac (REYNOLDS et al., 1994; WU et al., 1995; DEPARDIEU et al., 2007).
- VanR e VanS são proteínas que constituem dois componentes que regulam o sistema de transcrição do cluster gênico *vanHAX* (ARTHUR et al., 1997).
- VanS aparentemente funciona como sensor para detectar a presença de vancomicina (ARTHUR e COURVALIN 1993; ARTHUR et al., 1993) ou, mais provavelmente, os primeiros efeitos da vancomicina na síntese da parede celular (HANDWERGER e KOLOKATHIS, 1990). VanS então sinaliza para VanR, a resposta reguladora, que resulta em ativação da síntese de algumas outras proteínas (VanH, VanA, e VanX) envolvidos na resistência.

VanA sozinho não confere resistência a vancomicina. Assim, para sintetizar D-Lactato, o enterococos deve adquirir os genes do operon *vanA* inteiro, necessário para produzir o fenotipo para VanA (LECLERCQ e COURVALIN, 1997).

O transposon Tn 1546 existe intacto em algumas cepas, mas com sequencias de inserção entre VanA e VanH em outras. Na maioria das linhagens de VRE encontradas no Brasil, esse Tn1546 encontra-se intacto. O agrupamento gênico de resistência a vancomicina pode incorporar grandes elementos móveis contendo seqüências de inserção adicional (HANDWERGER et al., 1995; HANDWERGER e SKOBLE, 1995).

A localização dos genes responsáveis pelo fenótipo VanA nos transposons e plasmídios facilita a transferência horizontal entre as bactérias (ARTHUR, et al., 1993; ARTHUR e COURVALIN, 1993; HANDWERGER et al., 1995; HANDWERGER e SKOBLE 1995). Numerosos surtos nosocomiais de VRE são atribuídos a essa transferência horizontal de genes de resistência (DE LENCASTRE et al., 1999; SUPPOLA et al., 1999). Plasmídios são moléculas de DNA extra-cromossômico que possuem replicação independente do cromossomo (BARON et al., 1996). Quantidade variável de plasmídios já foi descrita em enterococos (COLERI et al., 2004) e tamanhos variáveis de 3,5 a 200 kb (ZHENG et al., 2007; SIMJEE et al., 2002), e plasmídios portando o gene *vanA*, foram descritos em plasmídios de 39 a 100 kb (LECLERCQ et al., 1988; SLETVOLD et al., 2007; WERNER et al., 1999).

2.2.4. Fenótipo VanB de resistência

O fenótipo VanB de resistência em enterococos é mediado por uma ligase anormal VanB que é estruturalmente relacionada a ligase de VanA. A proteína VanB também favorece a produção do pentapeptídeo com terminação em D-Ala–D-Lac (EVERS, et al., 1993). Genes análogos ao perfil de resistência classe A são designados *vanHB*, *vanXB*, *vanYB*, *vanRB*, e *vanSB* (BAPTISTA et al., 1996).

A diferença na disseminação das características de resistência VanA e VanB podem ser relacionadas à observação de que o agrupamento do gene *vanA* é frequentemente localizado em um transposon semelhante ao Tn1546, que pode ser parte de um plasmídio conjugativo (transferível) (HANDWERGER et al., 1990; ARTHUR et al., 1993; HANDWERGER et al., 1995; HANDWERGER e SKOBLE, 1995). Tal disposição genética é uma excelente via para a

disseminação destes genes. O “cluster” VanB é freqüentemente localizado no cromossomo do hospedeiro e inicialmente se pensou que não fosse transferível para outra bactéria. No entanto, também pode ocorrer em plasmídios, e, mesmo quando de localização cromossômica, este agrupamento gênico pode ser transferível como parte de grandes elementos móveis, talvez relacionado com grandes transposons conjugativos (QUINTILIANI e COURVALIN, 1994).

VanA é mais largamente distribuído e predomina como tipo de resistência reportado (MURRAY, 2000). Além disso, a resistência a vancomicina tem aparecido preferencialmente em *E. faecium*, que é intrinsecamente mais resistente a múltiplas drogas (MURRAY, 1997). Na região sul e sudeste do Brasil também é mais freqüente esse tipo de resistência aos glicopeptídeos, sendo caracterizado pela presença do Tn1546, que é transportado por plasmídio conjugativo (PALAZZO et al., 2006). O Tn1546 contém o grupamento de genes que codifica resistência aos glicopeptídeos e está intacto na maioria das linhagens de VRE até então isoladas no Brasil (CAMARGO et al., 2005). Alterações no Tn1546 de algumas linhagens foram detectadas sendo adequado denominá-los Tn1546-like elements ou elementos VanA, uma vez que estas alterações os diferenciam do protótipo inicialmente descrito (CAMARGO et al., 2004). O Tn1546 presente em linhagens de enterococos com fenótipo VanA apresenta o grupamento de genes necessários e suficientes para a expressão de resistência aos glicopeptídeos (CETINKAYA et al., 2000).

2.2.5. Resistência intrínseca aos glicopeptídeos

Baixo nível de resistência intrínseca a vancomicina e suscetibilidade a teicoplanina foi pela primeira vez determinada em *E. gallinarum*, que exibe resistência constitutiva (LECLERCQ et al., 1992), e subseqüentemente detectada em *E. casseliflavus* (VanC) e *E. flavescens* (VanC) (NAVARRO e COURVALIN, 1994). O conjunto gênico *vanC*, que é localizado no cromossomo, codifica cinco genes *vanC-1*, *vanXYC*, *vanT*, *vanRC* e *vanSC*, (ARIAS et al., 2000). A síntese dos precursores do peptidoglicano que terminam em D-Ala-D-Ser foram detectada em dois outros tipos de resistência a vancomicina em *E. faecalis* chamado VanE (FINES et al., 1999) e VanG (DEPARDIEU et al., 2003; MC KESSAR et al., 2000). Em ambos os casos, a resistência adquirida é de baixo nível, os genes que conferem essa resistência são cromossômicos (REYNOLDS e COURVALAN, 2005).

Enterococos intrinsecamente resistentes a vancomicina, com fenótipos de resistência VanC, VanD, VanE, e VanG, apresentam baixo nível de resistência a vancomicina e pobre ou nenhuma resistência a teicoplanina (BELTRAMETTI et al., 2007). *Enterococcus casseliflavus*, *flavescens* e *gallinarum*, além das espécies *Lactobacillus casei*, *Pediococcus pentosaceus*, e *Leuconostoc mesenteroides* são naturalmente resistentes aos glicopeptídeos (DUTKA-MALEN, 1995; CETINKAYA et al., 2000; PATEL, 2003).

2.2.6 Enterococos dependentes de vancomicina

Um interessante fenômeno tem se desenvolvido em algumas cepas VanA e Van-B, é a chamada dependência a vancomicina (DEVER et al., 1995; WOODFORD et al., 1995). Esses enterococos não são resistentes a vancomicina, mas dependem dela para seu crescimento. Os enterococos dependentes de vancomicina foram recuperados de amostras clínicas de culturas negativas que foram plaqueados em ágar contendo vancomicina.

Uma provável explicação para o fenômeno da dependência a vancomicina é que estes enterococos desligam sua produção normal de D-Ala-D-Ala e, em seguida, só podem crescer se for colocado um substituto com estrutura semelhante ao D-Ala-D-Ala, o que ocorre apenas na presença de vancomicina. A razão para a célula não sintetizar D-Ala-D-Ala é que enquanto a vancomicina esta presente o dipeptídeo D-Ala-D-Ala não é necessário para a síntese da parede celular pelo VRE (MURRAY, 1997). Na verdade esses vão sendo destruídos pela ação do VanX. Assim que a vancomicina é removida, D-Ala-D-Lac já não é sintetizada, e sem D-Ala-D-Ala ou D-Ala-D-Lac, a célula não pode continuar a crescer ou replicar. A reversão à independência da vancomicina ocorre provavelmente por uma mutação que leva a produção constitutiva de D-Ala-D-Lac ou uma mutação que leva a síntese de D-Ala-D-Ala (WOODFORD et al., 1995).

2.3. Origem do VRE

Alto nível de resistência a vancomicina em enterococos (VanA ou VanB) é associado à aquisição de segmentos de DNA de aproximadamente 10 kb codificando polipeptídios que podem ser associados a diferentes atividades biológicas, como transposição, regulação, síntese de

pentapeptídeo anormal, precursores do peptidoglicano ao qual nem vancomicina nem teicoplanina se ligam com alta afinidade (PATEL, 1999).

Existe a hipótese de que a resistência aos glicopeptídios está associada a agrupamentos gênicos presentes no meio ambiente como fonte dos genes de resistência em VRE (PATEL, 2000). Os únicos organismos ambientais até o momento identificados que carregavam genes homólogos foram *Paenibacillus popilliae* em menor extensão, organismos que produziam glicopeptídios (por exemplo, *Amycolatopsis orientalis* que produz vancomicina), esse último presumivelmente requer esses genes para inibir a ação do antimicrobiano que produzem (prevenção do suicídio) (PATEL, 2000). É improvável que os genes nesses organismos tenham sido a fonte direta dos genes de resistência a vancomicina, pois embora suas seqüências sejam similares, não são idênticas aos genes do enterococos.

É possível que a transferência tenha ocorrido de um ancestral bacteriano comum, ou através de um ou mais intermediários bacterianos. Em relação às diferenças de conteúdo G + C, bem como a seqüência homóloga entre os diferentes organismos, os genes reguladores (*vanR*, *vanS*) e os genes acessórios (*vanY*, *vanZ*), parecem ser derivados de uma fonte diferente em comparação com os genes estruturais (*vanH*, *vanA*, *vanX*) (PATEL, 2003).

Os VRE são geneticamente diversificados. Surto hospitalares podem ser monoclonais ou policlonais e alguns clones podem se estabelecer como cepas endêmicas. A epidemiologia molecular do VRE em uma instituição pode variar ao longo do tempo (PATEL, 2003).

Após trinta anos do uso clínico de vancomicina surgiram relatos de enterococos com resistência de alto nível a vancomicina. O aparecimento desses VRE depois desse tempo sugere que esses genes de resistência foram transferidos aos enterococos, e selecionados devido à pressão seletiva ocasionada pelo aumento do uso de vancomicina, na prática clínica e do glicopeptídeo avoparcina na pecuária (LECLERCQ et al., 1988; UTTLEY et al., 1988). Antes de 1970 havia pouco uso clínico de vancomicina nos Estados Unidos da América, depois disso, com o aumento da prevalência de estafilococos resistentes a meticilina, houve um grande aumento no uso da vancomicina, contribuindo, provavelmente para o aparecimento de VRE naquele país (PATEL, 2000; INGERMAN e SANTORO, 1989). O primeiro relato de enterococcus resistente a vancomicina foi em 1988 no Reino Unido, França e Estados Unidos da América (LECLERCQ et al., 1988; SAHM et al., 1989; UTTLEY et al., 1988). Em alguns países europeus, a origem do

VRE parece estar relacionada ao uso de avoparcina como suplemento alimentar na pecuária. Especula-se que a pressão seletiva exercida por esse antimicrobiano no trato digestivo desses animais tenha selecionado cepas resistentes aos glicopeptídios que foram transmitidos a população humana (PATEL, 2003).

O primeiro enterococo resistente a vancomicina relatado no Brasil e provavelmente o primeiro na América do Sul, foi um isolado de *E. faecium* descrito em 1996 (DALLA COSTA et al. 1998) com genótipo *vanD*, resistente a vancomicina (MIC, 256 µg/ml) e sensível a teicoplanina. Os enterococos resistentes a vancomicina no Brasil parecem ter surgido primeiro nos hospitais, devido à pressão seletiva ocasionada pelo uso aumentado de vancomicina semelhante ao que aconteceu nos EUA (POETA et al., 2005).

Os enterococos resistentes a vancomicina estão disseminados pelo mundo todo (MCDONALD e JARVIS, 1997; MALATHUM e MURRAY, 1999) e, após a primeira descrição de um caso brasileiro de VRE, no Paraná (DALLA COSTA et al. 1998), vários outros casos foram descritos (ZANELLA et al. 1999, 2003, DALLA COSTA et al. 2000, CEREDA et al. 2001, REIS et al. 2001, ALMEIDA et al. 2004, CAMARGO et al. 2004, FURTADO et al. 2005), indicando uma rápida disseminação desse mecanismo de resistência. Contudo, como os estudos realizados foram restritos às regiões do Sudeste, Centro e Sul do Brasil, a investigação da possibilidade de existência de VRE no Nordeste contribui para um melhor conhecimento da ocorrência e disseminação dos isolados VRE no Brasil, bem como das espécies e dos perfis genéticos dos isolados VRE presentes no Nordeste.

2.4. Objetivos

2.4.1. Objetivo geral

Realizar a caracterização molecular de isolados bacterianos de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina coletados no Hospital Universitário Oswaldo Cruz da Universidade de Pernambuco (HUOC-UPE), em Recife-PE.

2.4.2. Objetivos específicos

- Caracterizar os isolados bacterianos em relação à susceptibilidade a antimicrobianos
- Determinar a variabilidade genotípica dos isolados
- Investigar a presença de genes de resistência a vancomicina
- Investigar a presença de estruturas genéticas relacionadas à disseminação de genes de resistência

2.5. Material e Métodos

2.5.1. Isolados bacterianos

Quatro isolados clínicos não repetidos de cepas com identificação presumível de *Enterococcus faecalis* isoladas em 2004, de pacientes internados no HUOC-UPE, hospital universitário de alta complexidade e com 342 leitos. Amostras clínicas foram colhidas de quatro pacientes processadas usando técnicas convencionais, como morfologia da colônia no ágar-sangue, não produtor de catalase, coloração de Gram, produção de pirrolidonil arilamidase (Becton, Dickinson & Co. Franklin Lakes, NJ), tolerância a NaCl a 6.5%, habilidade de crescimento a 10°C e 45°C, crescimento em ágar bile-esculina, com hidrólise da esculina e crescimento em ágar telurito. As cepas foram estocadas a -80°C para trabalhos futuros.

2.5.2. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

O ensaio para resistência aos antimicrobianos foi realizado pelo método de disco-difusão no ágar Mueller-Hinton de acordo com o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2005) para os seguintes agentes antimicrobianos: cloranfenicol, penicilina, eritromicina, vancomicina, teicoplanina, ciprofloxacina, gentamicina, streptomomicina, ampicilina, linezolida e tetraciclina.

A concentração inibitória mínima (CIM) para vancomicina e teicoplanina foi determinada pelo Etest® (AB BIODISK), de acordo com o Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI 2005). O CLSI estabelece que a resistência para vancomicina ocorre quando há inibição do crescimento bacteriano em concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL e sensibilidade quando esta inibição ocorre em concentrações menores ou iguais a 4 µg/mL. Para teicoplanina a bactéria é considerada sensível quando ocorre inibição do crescimento bacteriano em concentrações do antibiótico menores ou iguais a 8 µg/mL e resistente quando a inibição do crescimento bacteriano acontece em concentrações maiores ou iguais a 32 µg/mL. Após crescimento bacteriano de 18 h em ágar sangue (preparo com ágar Mueller Hinton acrescido de sangue de carneiro 5%), foi preparado um inóculo bacteriano em solução fisiológica esterilizada, equivalente a 0,5 da escala Mac Farland (1×10^8 UFC/mL). A suspensão bacteriana foi semeada por meio de swab estéril, em ágar Mueller Hinton, após a secagem do inóculo bacteriano foi colocada a fita de Etest® e incubada a 37° C, a leitura foi realizada após 24 horas de incubação. Foram utilizadas as cepas de

controle *Enterococcus casseliflavus* NCTC 12361, *E. faecium* NCTC 7171, *E. faecalis* NCTC 775, *E. gallinarum* NCTC 12359, *E. faecium* BM 4147 *vanA* genotipo, *E. faecium* BM4105, *E. faecalis* JH2-2 e *S. aureus* ATCC 25923.

2.5.3. Epidemiologia

Os quatro pacientes permaneceram de 41 a 60 dias internados na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), em pós-operatório de: gastroplastia (um paciente), laparotomia exploradora (um paciente) e transplante de fígado (dois pacientes), em um espaço de 10 dias, todos eles estiveram na mesma UTI. Dois pacientes foram a óbito, e um deles apresentou cultura de sangue positiva para VRE, o quarto paciente apresentou cultura de líquido ascítico positiva para VRE.

2.5.4. Identificação da espécie e do gene *vanA*

O DNA foi extraído pelo método de lise alcalina e usado como molde para amplificação das reações de acordo com Depardieu et al. (2004).

A identificação dos enterococos *E. faecalis* e *E. faecium* foi baseada na amplificação de um fragmento interno do gene “housekeeping” *ddl* que codifica a D-Ala–D-Ala ligase que é específica no *E. faecalis* e no *E. faecium* (DUTKA-MALEN et al., 1995; DEPARDIEU et al., 2004). O controle das amplificações para a espécie de *E. faecalis* foi realizado usando a cepa de referência *E. faecalis* JH2-2, utilizando os iniciadores DD13(+) e DD3-2(-). Foi gerado um fragmento de 475 pb, correspondente ao gene *ddl* do *E. faecalis*. Adicionalmente, para o *E. faecium*, foram utilizadas as cepas de referência BM4105 e BM4147, utilizando os iniciadores FAC1-1(+) e FAC2-1(-) que produziram um fragmento espécie específico de 1091 pb correspondente ao gene *ddl* do *E. faecium* (Tabelas 2 e 3).

Para detecção do gene *vanA* foram utilizados os iniciadores EA1(+) (5’ GGGAAAACGACAATTGC-3’) e EA2(-) (5’-GTACAATGCGGCCGTTA-3’) de acordo com o descrito por Depardieu et al. (2004). As amplificações foram realizadas com os seguintes parâmetros de ciclagem: 3 min a 94°C seguido de 30 ciclos de amplificação consistindo de 1 min a 94°C, 1 min a 54°C, 1 min a 72°C e para extensão final 7 min a 72°C. Os fragmentos de DNA foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% corados com brometo de etídio. Esses

experimentos foram realizados no Unité des Agents Antibacteriens, Institut Pasteur, Paris, France, por Dr. Florence Depardieu.

Tabela 2. Cepas de controle utilizadas no estudo do *E. faecalis*

Cepas	Identificação	Característica
<i>E. faecium</i>	BM4105	Cepa de <i>E. faecium</i> sensível a vancomicina (sem <i>vanA</i>)
<i>E. faecium</i>	BM4147	Cepa de <i>E. faecium</i> resistente a vancomicina (<i>vanA</i>)
<i>E. faecalis</i>	JH2-2	Cepa de <i>E. faecalis</i> sensível a vancomicina (sem <i>vanA</i>)

Tabela 3. Sequência dos iniciadores e condições de PCR para detecção da espécie dos enterococos, padrão de resistência e genotipagem.

Gene	Primer	Sequência 5'-3'	Posição	Tamanho do produto de PCR (pb)	Referência
<i>Tn1546-like</i>	P 1	GGAAAATGCGGATTTACAACGCTAAG		10.800	Palepou, et al., (1998)
<i>ddl (E. faecalis)</i>	DD13 (+)	CACCTGAAGAAACAGGC	206–222	475	Depardieu, et al (2004)
	DD3-2 (-)	ATGGCTACTTCAATTTACAG	680–661		
<i>ddl (E. faecium)</i>	FAC1-1(+)	GAGTAAATCACTGAACGA	1–18	1.091	Depardieu, et al (2004)
	FAC2-1(-)	CGCTGATGGTATCGATTTCAT	1091–1072		
<i>VanA</i>	EA1(+)	GGGAAAACGACAATTGC	176–192	732	Depardieu, et al (2004)
	EA2(-)	GTACAATGCGGCCGTTA	907–891		
ITS-Rdna	KT01(16S)	TTGTACACACCGCCCGTCA			Kostman et al. (1992).
	KT02(23S)	GGTACCTTAGATTGTTTCAGTTC			
Trna	T5A	AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAC			Welsh e Mcclellan, (1991)
	T3B	AGGTCGCGGGTTCGAATC			
<i>vanRSHAX</i>	P 2	AGACAAGTCTGAGATTGACCTTGCC	4101-8509	4.400	Palepou et al., (1998).
	P 3	ATATGCTTGAAACCCACTGTTTTCC			

(+) sense primer; (-) antisense primer.

2.5.5. Perfil Plasmidial

O DNA Plasmidial foi extraído pela lise alcalina (BIRNBOIM e DOLY, 1979). Os perfis de bandas foram comparados após eletroforese em gel de agarose a 1%. O tamanho dos plasmídios foi medido pela comparação com plasmídios de tamanho conhecido da *E. coli* V517 (NCTC 50193) e *E. coli* 39R861 (NCTC 50192).

2.5.6. Análise Genotípica

2.5.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)-fingerprinting

Para a PCR-fingerprinting o DNA genômico dos quatro isolados de VRE foi obtido pelo método da lise alcalina (SAMBROOK et al. 1989) e usado como molde para as amplificações da ITS-rDNA, utilizando os iniciadores KT03(16S) (5' TTGTACACACCGCCCGTCA-3') e KT04(23S) (5'-GGTACCTTAGATGTTTCAGTTC-3', de acordo com o descrito por Kostman et al. (1992). Adicionalmente, a análise por PCR da região codificadora do tRNA utilizou as seqüências dos iniciadores: T5A (5'- AGTCCGGTGCTCTAACCAACTGAC) e T3B (5'-AGGTCGCGGGTTCGAATCC-3') de acordo com o descrito por Welsh e McClelland (1991). Para ambos os marcadores, foi usada a cepa de referência ATCC *E. faecalis* 12953 Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,2% em 7 V.cm⁻¹ em tampão TBE 0,5 X.

2.5.6.2. Eletroforese de campo pulsado (PFGE)

Os isolados bacterianos de enterococos foram submetidos a tipagem molecular pela comparação dos fragmentos de DNA cromossomal obtidos através da macro-restrição com a enzima *Sma*I após eletroforese em campo pulsado. A análise do DNA bacteriano digerido foi realizada com o equipamento Gene Navigator apparatus (Amersham, Upsalla, Sweden) a 180V for 25 h, at 7°C, conforme descrito previamente por Campanile et al. (2003). O equipamento foi ajustado a pulsos de 20 s por 10 h, 8 s por 10 h, e 3 s por 5 h. O padrão de bandas foi visualizado em luz UV após ser corado com brometo de etídio. A relação entre os isolados foi estabelecida usando os critérios descritos por Tenover et al., (1995) utilizando comparação visual do padrão de bandas das amostras que correram no mesmo gel. Utilizando esses critérios, as amostras que

apresentaram o mesmo perfil na eletroforese foram consideradas pertencentes à mesma linhagem, os isolados que apresentarem perfil com diferença entre 2 a 3 bandas foram considerados intimamente relacionados e possivelmente relacionados os isolados com diferença entre 4 a 6 bandas. Já os isolados que apresentaram mais de sete bandas diferentes foram considerados geneticamente não relacionados (TENOVER et al., 1995). Esses experimentos foram realizados no Laboratório da Dra. Ana Lucia Darini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

2.5.7. Amplificação e caracterização do Tn1546-like elements

A amplificação do elemento Tn1546-like e a região do *vanRSHAX* foi realizada para identificação do gene *vanA* no transposon, utilizando a Long-PCR (L-PCR) (PALEPOU et al., 1998). A reação de Long-PCR foi utilizada para amplificação dos elementos VanA utilizando iniciadores complementares às extremidades invertidas e repetidas do transposon. O DNA genômico das cepas foi extraído (PITCHER et al., 1989) e usado como molde para PCR com um único primer P1 (Tabela 3), complementar ao segmento flanqueado invertido do transposon, usando “Expand Long Template PCR System” (Roche, Germany).

Esta reação tem a finalidade de amplificar longas seqüências (> 5.000 pb), e para tal foi utilizado o kit comercial: “Expand TM Long Template PCR System” (Boehringer Mannheim) que produziu um fragmento de 10.800 pb. A amplificação do elemento Tn1546-like, que foi usado como molde para a L-PCR dos genes do *vanRSHAX*, usando os primers P2 e P3 (Tabela 3), produziu um fragmento de 4.400 pb. O produto de PCR foi analisado em gel de agarose a 1% e digerido por 16 h com a enzima de restrição *ClaI* para o elemento Tn1546-like ou com *DdeI* para os genes *vanRSHAX* (PALEPOU et al. 1998). Os fragmentos resultantes foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2%. Esses experimentos foram realizados no Laboratório da Dra. Ana Lucia Darini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

2.5.8. Southern hibridização e digestão com *EcoRI*

Esse experimento foi realizado para a identificação do gene *vanA* em plasmídios. Os plasmídios foram digeridos com *EcoRI*, transferidos para membrana de nylon (Hybond-N+, Amersham, Upsalla, Sweden) com kit VacuGene vacuum blotting (Amersham) e hibridizados com sonda para o gene *vanA* marcada com digoxigenina (Roche, Mannheim). Esta sonda foi preparada por PCR do DNA genômico da cepa *E. faecium* BM 4147 (resistente a vancomicina) (Tabela 1) com primers e condições descritas anteriormente (COQUE et al. 1998), exceto que a concentração de dTTP (10 mM) foi reduzida e digoxigenin-labelled dUTP (1 mM) foi adicionada de acordo com as instruções do fabricante. A hibridização foi realizada de acordo com as instruções do fabricante do DIG System para hibridização nos filtros (Roche, Mannheim). Esses experimentos foram realizados no Laboratório da Dra. Ana Lucia Darini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP.

2.6. Resultados

2.6.1 Susceptibilidade bacteriana

Os quatro isolados de enterococos exibiram o mesmo perfil de sensibilidade, apresentaram resistência simultânea ao cloranfenicol, penicilina, eritromicina, teicoplanina, ciprofloxacina e tetraciclina. Foi também detectada resistência de alto nível aos aminoglicosídeos (gentamicina 120 µg e estreptomicina 300 µg). Por outro lado, todos os isolados foram sensíveis a ampicilina e linezolida. O MIC para vancomicina e teicoplanina foi maior que 256 µg/ml.

2.6.2 Identificação bacteriana

Os testes bioquímicos convencionais foram confirmados pela amplificação por PCR espécie-específica do fragmento de 475 pb que corresponde ao gene *ddl* do *E. faecalis* o *E. faecium* produz *ddl* com 1091 pb (Figura 10).

2.6.3 Detecção do gene *vanA*

Todos os isolados possuíam o gene *vanA* como demonstrado pela análise por PCR (Figura 10), o que confirma o fenótipo de resistência a ambos os antimicrobianos vancomicina e teicoplanina.

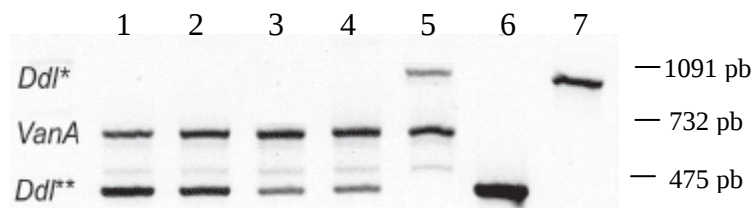


Figura 10. Identificação da espécie de enterococos e do gene *vanA* por PCR específica. Gene *Ddl** - *E. faecium* e *Ddl*** - *E. faecalis*. Linhas 1-4: isolados clínicos de *E. faecalis*; 5: *E. faecium* BM4147 (cepa referencia portadora do gene *vanA*); 6: *E. faecalis* JH2-2 (cepa de referencia sem o gene *vanA*); 7: *E. faecium* BM4105 (cepa de referencia sem o gene *vanA*).

2.6.4 Análise por genotipagem do DNA cromossômico

A análise genética com os marcadores tDNA (Figura 11) e rDNA (Figura 12) apresentaram o mesmo padrão para todos os isolados e para a cepa de referência, o que foi confirmado pelos padrões idênticos de PFGE (Figura 13). Isto indica que os isolados eram intimamente relacionados.

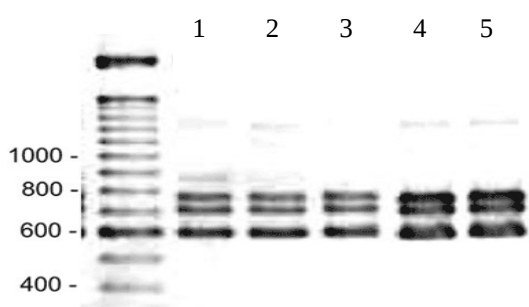


Figura 11. Análise molecular de isolados clínicos de *E. faecalis* por tDNA pela PCR. Os padrões de amplificação correspondem ao *E. faecalis* ATCC 12953 cepa de referência (linha 1) e isolados clínicos de *E. faecalis* Ef-1 to Ef-4 (linhas 2-5). Foi utilizado um marcador de 100pb.

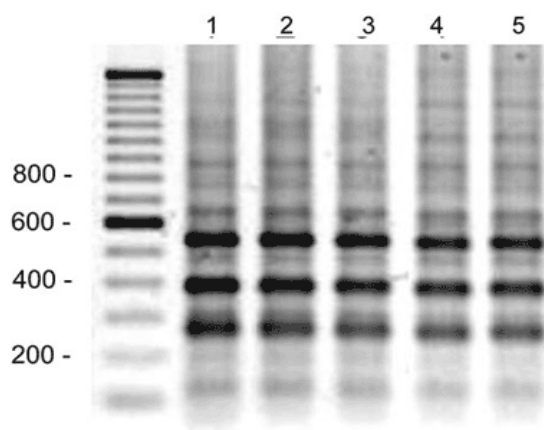


Figura 12. Análise molecular de isolados clínicos de *E. faecalis* por rDNA-PCR. Os padrões de amplificação correspondem ao *E. faecalis* ATCC 12953 cepa de referência (linha 1) e isolados clínicos de *E. faecalis* Ef-1 to Ef-4 (linhas 2-5). Foi utilizado um marcador de 100pb.

2.6.5. Detecção de elementos como Tn1546-like e plasmídios

A presença do Tn1546-like foi confirmada pela L-PCR que resultou na amplificação de um fragmento de 10800 pb. O fragmento amplificado do Tn1546-like foi utilizado como molde para a amplificação por L-PCR do operon *vanRSHAX* que apresentou um fragmento de 4400 pb, confirmando a presença desse operon no Tn1546. Além disso, a digestão enzimática do fragmento do Tn1546-like com *Cla*I e *Dde*I mostrou o resultado esperado para a sequência

completa do transposon em todos os isolados. Todos os resultados indicaram a integridade do Tn1546 nestes isolados de VRE.

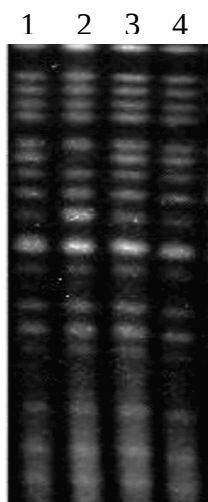


Figura 13: Pulsed field em gel de eletroforese padrões após digestão total com *SmaI* do DNA extraído de quatro cepas de *E. faecalis*. Linhas 1-4: isolados clínicos de *Enterococcus faecalis* Ef-1 to Ef-4.

A análise plasmidial mostrou a presença de um plasmídio de 70 kb (Figura 14-B), resultados também encontrados por Palazzo e colaboradores (2006). A hibridização por Southern blot identificou que os plasmídios abrigavam cópias do gene *vanA* (Figura 14-C). Além da hibridização plasmidial, hibridizou também com o DNA cromossômico, sugerindo uma segunda cópia do Tn1546.

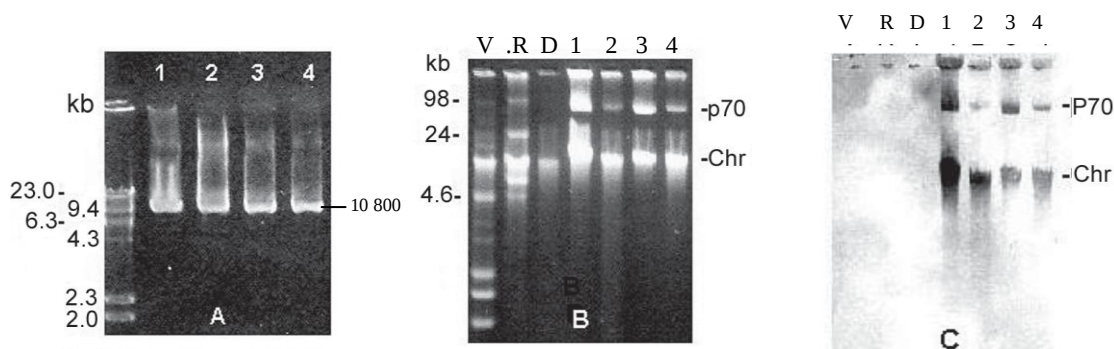


Figura 14: Análise molecular do Tn1546 e DNA plasmidial em isolados VRE. **A:** Long-PCR long polymerase chain reaction (PCR). A amplificação do DNA do Tn1546 identificou um fragmento de 10 800 pb correspondente ao transposon em isolados de *E. faecalis* (linhas 1 a 4). Utilizando marcador fragmentos de λ DNA/HindIII (Gibco Life Technologies, US); **B:** Análise plasmidial dos isolados de VRE (linhas 1 a 4). Amostras de controle conhecido para plasmídios *Escherichia coli* V517 (line V) e *E. coli* 39R861 (linha R), e uma cepa negativa para plasmídios *E. faecalis* JH2 (linha D). **C:** Southern blot correspondente ao painel (B) mostrando a hibridização com a sonda do gene *vanA*. DNA cromossomal (Chr) e plasmidio de 70 kb (p70) são mostrados.

2.7. Discussão

A emergência de enterococos resistentes a vancomicina mudou a relevância clínica das infecções enterocócicas no mundo, estando entre os principais patógenos de origem hospitalar (WOODFORD, 1998; PATEL, 2003). No Sudeste do Brasil, o isolamento desses patógenos é frequente, uma vez que muitos trabalhos têm reportado a rápida emergência de enterococos resistente a vancomicina (ZANELLA et al., 1999; DALLA COSTA et al., 2000; REIS et al., 2001; CEREDA et al., 2001; DALLA COSTA et al., 2003; ALMEIDA et al., 2004; FURTADO et al., 2005).

No presente estudo foi descrito o primeiro isolamento de *Enterococcus faecalis* resistente a vancomicina em Recife, Nordeste do Brasil, indicando que a resistência a vancomicina pode rapidamente se disseminar no país. Devido ao fenótipo de alto nível de resistência a vancomicina, os isolados foram testados para a presença específica do gene *vanA* por PCR, sendo confirmada sua presença. A presença do gene *vanA* em elementos móveis como plasmídios e transposons podem levar a ocorrência de surtos (STAMPONE et al., 2005; SUPPOLA et al., 1999). O VRE pode ser transferido de um paciente a outro através das mãos, de instrumentos de utilização médica, do meio ambiente, de superfícies no ambiente hospitalar, perpetuando a cadeia de transmissão (DUCKRO et al., 2005).

Os isolados estudados apresentaram 100% de suscetibilidade a ampicilina, semelhante aos resultados relatados por Reis et al. (2001). Contudo estes foram altamente resistentes aos aminoglicosídeos, limitando o sucesso da terapia antimicrobiana associada. A concomitante resistência observada ao cloranfenicol, penicilina, eritromicina, teicoplanina, ciprofloxacina, tetraciclina, confirmando que a resistência aos antimicrobianos nos enterococos é múltipla e comum (PANESSO et al., 2002). A linezolida foi altamente efetiva contra todos os isolados, indicando uma apropriada conduta terapêutica.

O agrupamento gênico *vanA* tem sido reportado associado ao Tn1546 ou a elementos relacionados que são transportados por plasmídios. A localização do *vanA* no DNA plasmidial e a integridade do Tn1546 mostraram que os isolados VRE estão de acordo com os dados publicados por Arthur et al. (1996). Além disso, a integridade do elemento Tn1546-like mostrou que os

VREs brasileiros estudados até agora e a resistência aos glicopeptídeos mediada por elementos como o Tn1546 facilitaram a disseminação entre os enterococos, dados também encontrados por Palazzo e colaboradores (2006).

Em relação à evolução da resistência, o uso de métodos baseados na tipagem do DNA oferece alta sensibilidade e especificidade em dois níveis: identificação da cepa e discriminação.

Dados obtidos em estudos epidemiológicos são de grande importância para o controle da disseminação de patógenos, sendo que a técnica de PFGE é tida padrão-ouro para estudo de vários gêneros incluindo os enterococos. A análise por PFGE tem sido usada para monitoramento da disseminação de clones em diferentes países (SUPPOLA et al. 1999, DUCKRO et al., 2005, STAMPONE et al., 2005). Os dados do presente estudo produziram um importante dado epidemiológico sobre o Tn1546-like no Brasil.

A presença do gene *vanA* em DNA móveis, como plamídeos carreando transposons podem se disseminar por conjugação entre os VRE e enterococos sensíveis a vancomicina (VSE) isolados do meio ambiente intestinal dos pacientes (FINES et al. 1999), certamente levará a disseminação da resistência aos glicopeptídeos em enterococos no país.

Nossos isolados apresentaram 100% de similaridade pela análise dos fragmentos de DNA cromossômico obtidos após digestão com enzima de restrição e eletroforese em campo pulsado (PFGE), assim, foi possível sugerir que o elemento VanA foi adquirido horizontalmente, uma vez que esses isolados apresentaram o mesmo perfil no tDNA, rDNA e PFGE, sugerindo fortemente a disseminação de um só clone de VRE entre pacientes hospitalizados na UTI de Hospital Universitário Recife.

O perfil de PFGE observado nos *E. faecalis* analisados no presente estudo eram estreitamente relacionados com os encontrados em outros estados do Brasil (São Paulo, Paraná, Rio Grande do Sul e Minas Gerais), indicando uma disseminação clonal desta espécie no Brasil (PALAZZO et al. 2006).

A amplificação sitio-específica do fragmento do gene *ddl* (DUTKA-MALEN et al., 1995) confirmou a identificação da espécie dos isolados. Adicionalmente, a genotipagem por rDNA e tDNA por PCR conseguiu identificar os isolados em nível de espécie quando se compara com a cepa de referência, como descrito por PCR-tDNA para enterococos (BAELE et al., 2000).

2.8 Conclusão

O primeiro relato de VRE no Recife foi resultado de um clone que se disseminou para quatro pacientes que conviveram na mesma UTI de Hospital Universitário. O transposon Tn1546 e o gene *vanA* associado aos plasmídios está relacionada a rápida disseminação dos enterococos resistentes a vancomicina. Uma importante implicação da infecção por VRE é que o antimicrobiano terapêutico está agora comprometido. Os resultados indicaram a importância do uso racional de vancomicina e a necessidade da execução de medidas de controle da infecção.

2.9. Referências bibliográficas – *E. faecalis*

- ABRAHAM, E.P. CHAIN E, FLETCHER CM, et al. Further observations on penicillin. **Lancet** v. 2, p. 177-89, 1941.
- ALMEIDA, R.T.; FILHO, M.R.; SILVEIRA, C.A.N. et al. Molecular epidemiology and antimicrobial susceptibility of Enterococci from Brazilian Intensive Care Units. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 8, p. 197-205, 2004.
- ARIAS, C.; COURVALIN, P.; REYNOLDS. P. *vanC* cluster of vancomycin- resistant *Enterococcus gallinarum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p. 1660–1666, 2000.
- ARTHUR, M., DEPARDIEU, F.; GERBAUD, G. et al. The *VanS* sensor negatively controls *VanR*-mediated transcriptional activation of glycopeptide resistance genes of Tn1546 and related elements in the absence of induction **Journal of Bacteriology** v.179, p.97–106, 1997.
- ARTHUR, M., REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Glycopeptide resistance in enterococci. **Trends in Microbiology** v.4, p.401–407, 1996.
- ARTHUR, M.; COURVALIN, P. Genetics and mechanisms of glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.37, p.1563–1571, 1993.
- ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DEPARDIEU, F. et al. Characterization of Tn1546, a Tn3-related transposon conferring glycopeptide resistance by synthesis of depsipeptide peptidoglycan precursors in *Enterococcus faecium* **Journal of Bacteriology** v. 175, p.117–127, 1993.
- ARTHUR, M.; MOLINAS, C.; DUTKA-MALEN, S. et al. Structural relationship between the vancomycin resistance protein VanH and 2-hydroxycarboxylic acid dehydrogenases. **Gene**. v.103, p.133–134, 1991.
- ARTHUR, M.; QUINTILIANI, R.J.R. Regulation of VanA- and VanB-type glycopeptide resistance in enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, n. 2, p. 375-81, 2001.

- BAELE, M.; BAELE, P.; VANECHOUTTE, M. et al. Application of tRNA intergenic spacer PCR for identification of *Enterococcus* species. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, n. 4201-4207, 2000.
- BAPTISTA, M.; DEPARDIEU, F.; COURVALIN, P. et al. Specificity of induction of glycopeptide resistance genes in *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.40, p.2291–2295, 1996.
- BARON, S.; PEAKE, R.C.; JAMES, D.A. et al. Medical Microbiology, 4th edition. The University of Texas Medical Branch at Galveston. <http://gsbs.utmb.edu/microbook/1996>.
- BELL, J.M.; PATON, J.C.; TURNIDGE, J. Emergence of vancomycin resistant enterococci in Australia: phenotypic and genotypic characteristics of isolates. **Journal of Clinical Microbiology** v.36, p.2187–2190, 1998.
- BELLÍSSIMO-RODRIGUES, F.; GOMES, A.C.F.; PASSOS, A.D. et al., Clinical outcome and risk factors related to extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* spp. infection among hospitalized patients **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 101, n. 4, p. 415-421, 2006.
- BELTRAMETTI, F.; CONSOLANDI, A.; CARRANO, L. et al., Resistance to glycopeptide antibiotics in the teicoplanin producer is mediated by van gene homologue expression directing the synthesis of a modified cell wall peptidoglycan. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 51, n. 4, p. 1135-41, 2007.
- BIRNBOIM, H.C. e DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Research** v. 7, p.1513-1523, 1979.
- BUGG, T. D. H.; WRIGHT, G. D.; DUTKA-MALEN, S. et al. Molecular basis for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147: biosynthesis of a depsipeptide peptidoglycan precursor by vancomycin resistance proteins VanH and VanA. **Journal of Biochemistry** v. 30, p.1408–1415, 1991-a.
- BUGG, T.D.H.; DUTKA-MALEN, S.. ARTHUR, M. et al.. Identification of vancomycin resistance protein VanA as a D-alanine-D-alanine ligase of altered substrate specificity. **Journal of Biochemistry** v.30, p.2017–1991-b.

- CAMARGO, I.; BARTH, A.; PILGER, K. et al. *Enterococcus gallinarum* carrying the vanA gene cluster: first report in Brazil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 37, n. 11, p. 1669-71, 2004.
- CAMARGO, I.; ZANELLA, R.; BRANDILEONE, M.C. et al. Occurrence of insertion sequences within the genomes and Tn1546-like elements of glycopeptide-resistant enterococci isolated in Brazil, and identification of a novel element, ISEfa5. **International Journal of Medical Microbiology Research** v. 294, n. 8, 513-9, 2005
- CEREDA, R.F.; SADER, H.S.; JONES, R.N. et al. *Enterococcus faecalis* resistant to vancomycin and teicoplanin (VanA phenotype) isolated from a bone marrow transplanted patient in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 5, p. 40-46, 2001.
- CETINKAYA, Y.; FALK, P. e MAYHALL, C.G. Vancomycin-resistant enterococci. **Clinical Microbiology Reviews** v. 13, p. 686–707, 2000.
- CHIOSIS, G.; BONECA, I. G.; **Science**, v. 293, 2001.
- CLARK, N.; COOKSEY, R.; HILL, B. Characterization of glycopeptide-resistant enterococci from U.S. hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 37, p.2311–2317, 1993.
- CLEVEL, D.B. Movable genetic elements and antibiotic resistance in enterococci. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** v. 9, p. 90–102, 1990.
- CLSI-Clinical Laboratory Standards Institute Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA. 2005.
- COLERI, A.; COKMUS, C.; OZCAN, B. et al. Determination of antibiotic resistance and resistance plasmids of clinical *Enterococcus* species **The Journal of General and Applied Microbiology** v. 50, n. 4, p. 213-219, 2004.
- COLLIS, C.M. e HALL, R.M. Expression of antibiotic resistance genes in the integrated cassettes of integrons. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. 39, p.155-162, 1995.
- COQUE, T.M.; SEETULSINGH, P.; SINGH, K.V.; et al. Application of molecular techniques to the study of nosocomial infections caused by enterococci. In N Woodford,

- AP Johnson (eds), **Molecular Bacteriology: Protocols and Clinical Applications**, Humana Press, New Jersey, p. 469-493, 1998.
- D'AGATA, E.M.C.; JIRJIS, J.; GOULDIN, C. Community dissemination of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **American Journal of Infection Control**. v. 29, p. 316–20, 2001.
 - DALLA COSTA L.M.; REYNOLDS, P.E.; SOUZA, HAPHM. et al. Characterization of a divergent vanD-type resistance element from the first glycopeptide-resistant strain of *Enterococcus faecium* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p. 3444-3446, 2000.
 - DALLA COSTA, L.M.; SOUZA, D.C.; MARTINS, L.T.F. et al. Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*: first case in Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 2, p. 160-163, 1998.
 - DE LENCASTRE, H.; BROWN, A.E.; CHUNG, A.E. et al. Role of transposon *Tn5482* in the epidemiology of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* in the pediatric oncology unit of a New York City hospital. **Microbial Drug Resistance** v. 5, p.113–129, 1999.
 - DE PEDRO, M.A.; SCHWARZ, H.; KOCH, A.L. Patchiness of murein insertion into the sidewall of *Escherichia coli*. **Microbiology**. v. 149, p.1753–1761, 2003.
 - DEPARDIEU, F.; BONORA, M.G.; REYNOLDS, P.E. et al. The *vanG* glycopeptide resistance operon from *Enterococcus faecalis* revisited. **Molecular Microbiology** v. 50, p.931–948, 2003.
 - DEPARDIEU, F.; KOLBERT, M.; PRUUL, H. *VanD* type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p.3892–3904, 2004.
 - DEPARDIEU, F.; PERICHON, B.; COURVALIN, P. Detection of the *van* Alphabet and Identification of Enterococci and Staphylococci at the Species Level by Multiplex PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5857–5860, 2004.
 - DEVER, L.L.; SMITH, S.M.; HANDWERGER, S. Vancomycin-dependent *Enterococcus faecium* isolated from stool following oral vancomycin therapy. **Journal of Clinical Microbiology** v. 33, p.2770–2273, 1995.

- DRLICA, K. Mechanism of fluoroquinolone action. **Current Opinion in Microbiology**. v.2, p. 504-508, 1999.
- DRLICA, K. The mutant selection window and antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 52, p. 11-17, 2003.
- DUCKRO, A.N.; BLOM, D.W.; LYLE, E.A. et al. Transfer of vancomycin-resistant enterococci via health care worker hands. **Archives of Internal Medicine** v. 165, p. 302-307, 2005.
- DUTKA-MALEN, S.; EVERS, S.; COURVALIN, P. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. **Journal of Clinical Microbiology** v. 33, p. 24-27, 1995.
- DZIDIC, S.; BEDEKOVIC, V. Horizontal gene transfer emerging multidrug resistance in hospital bacteria. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 24, n. 6, p. 519-526, 2003.
- EGGERT, U.; RUIZ, N.; FALCONE, B. et al. Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolipid derivatives of vancomycin. **Science**. v. 12, n. 294, p. 361-4, 2001.
- FACKLAM, R.; CARVALHO, M.; TEIXEIRA, L. History, Taxonomy, Biochemical Characteristics and Antibiotic Susceptibility Testing of Enterococci. In: GILMORE, M. S. (Ed.). **The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance**. Washington: ASM Press, p. 1-54, 2002.
- FINES, M.; PE'RICHO, B.; REYNOLDS, P. et al. VanE, a new type of acquired glycopeptide resistance in *Enterococcus faecalis* **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, p.2161–2164, 1999.
- FINLAND M. Changing patterns of resistance of certain common pathogenic bacteria to antimicrobial agents. **New England Journal of Medicine** v. 252, p 570-580, 1955.
- FURTADO, G.H.C.; MARTINS, S.T.; COUTINHO, A.P. et al. Prevalence and factors associated with rectal vancomycin-resistant enterococci colonization in two intensive care units in São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 9, n. 64-69, 2005.
- GARDNER P, SMITH DH, BEER H, MOELLERING RC JR. Recovery of resistance (R) factors from a drug-free community. **Lancet**; n. 2, p. 774-776, 1969.

- GHUYSEN, J.M, CHARLIER P, COYETTE J, et al. Penicillin and beyond: evolution, protein fold, multimodular polypeptides, and multiprotein complexes. **Microbial Drug Resistance** v. 2, n. 2, p. 163-75, 1996.
- GOFFIN, C. E GHUYSEN, J.M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 62, n. 4, p. 1079-93, 1998.
- GORDON, S.; SWENSON, J.; HILL, B. et al. Antimicrobial susceptibility patterns of common and unusual species of enterococci causing infections in the United States. **Journal of Clinical Microbiology** v. 30, p.2373–2378, 1992.
- HANDWERGER, S.; SKOBLE, J. Identification of chromosomal mobile element conferring high-level vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, p.2446–2453, 1995.
- HANDWERGER, S.; SKOBLE, J.; DISCOTTO, L. et al. Heterogeneity of the *vanA* gene in clinical isolates of enterococci from the Northeastern United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 39, p.362–368, 1995.
- HARBARTH, S.; COSGROVE, S.; CARMELI, Y.; Effects of Antibiotics on Nosocomial Epidemiology of Vancomycin-Resistant Enterococci. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n.6, p. 1619–1628, 2002.
- HAYDEN, M.K.; TRENHOLME, G.M.; SCHULTZ, J.E. et al. In vivo development of teicoplanin resistance in a *VanB Enterococcus faecium* isolate. **Journal of Infectious Diseases**. v. 167, n. 5, p. 1224-1227, 1993.
- HOLTJE, J. V. Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 62, p.181–203, 1998.
- HOOPER, D.C. Bacterial topoisomerases, anti-topoisomerases and antitopoisomerase resistance. **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, n. 1, p.54-63, 1998.
- HOOPER, D.C. Emerging mechanisms of fluoroquinolone resistance. **Emerging Infectious Diseases**. Atlanta, v. 7, p.337-341, 2001-a.

- HOOPER, D.C. Minimizing Potential Resistance: The Molecular View—A Comment on Courvalin and Trieu-Cuot. **Clinical Infectious Diseases**. v. 3, n.33, p. 157-160, 2001b.
- INGERMAN, M.; SANTORO, J. Vancomycin: a new old agent. **Infectious Disease Clinics of North America** v. 3, p. 641–651, 1989.
- JONES, R.N. Resistance Patterns Among Nosocomial Pathogens Trends Over the Past Few Years. **Chest**, v. 119, n.2, Supplement, 2001.
- KAWALEC, M.; GNIADKOWSKI, M.; HRYNIEWICZ, W. Outbreak of Vancomycin Resistant Enterococci in a Hospital in Gdansk, Poland, due to Horizontal Transfer of Different Tn1546-Like Transposon Variants and Clonal Spread of Several Strains **Journal of Clinical Microbiology**. v. 38, n. 9, p. 3317–3322, 2000.
- KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D.; LIPUMA, J.J. et al., Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology** v. 30, p. 2084- 2087, 1992.
- LAI, M.; KIRSCH, D. Induction signals for vancomycin resistance encoded by the *vanA* gene cluster in *Enterococcus faecium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 40, p.1645–1648, 1996.
- LECLERCQ, R.; COURVALIN, P. Resistance to glycopeptides in enterococci. **Clinical Infectious Diseases** v.24, p.545–556, 1997.
- LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium* **The New England Journal of Medicine**. v. 319, n. 3, p. 157-161, 1988
- LECLERCQ, R.; DERLOT, E.; DUVAL, J. et al. Plasmid mediated resistance to vancomycin and teicoplanin in *Enterococcus faecium*. **New England Journal of Medicine** v. 319, p.157–161, 1988.
- LECLERCQ, R.; DUTKA-MALEN, S.; DUVAL, J. et al. Vancomycin resistance gene *vanC* is specific to *Enterococcus gallinarum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 36, p. 2005–2008, 1992.
- MADIGAN, M.M.; MARTINKO, J.; PARKER, J.E. Brock Biology of Microorganisms, 10^a. Ed. New York NY. Prentice Hall, 2003.

- MALATHUM, K. e MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococci: recent advances in genetics epidemiology and therapeutic options. **Drug Resistance Updates** v. 2, p.224–43, 1999.
- MARIN, M. e GUDIOL, F. Antibióticos betalactamicos. **Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica** v. 21, n. 1, p. 42-55, 2003.
- MAROTHI, Y.; AGNIHOTRI, H.; DUBEY, D. Enterococcal resistance - An overview. **Indian Journal of Medical Microbiology Review**. v. 23, n. 4, p. 214-219, 2005.
- MCCOMAS, C.C.; CROWLEY, B.M.; HWANG, I. et al. Synthesis and evaluation of methyl ether derivatives of the vancomycin, teicoplanin, and ristocetin aglycon methyl esters. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters** v.13, n.17, p. 2933-6, 2003.
- MCDONALD L.C. e JARVIS W.R. The global impact of vancomycin-resistant enterococci. **Current Opinion in Infectious Diseases**. v. 10, p.304-9, 1997.
- MCKESSAR, S.J.; BERRY, A.M.; BELL, J.M. et al. Genetic characterization of *vanG*, a novel vancomycin resistance locus of *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p.3224–3228, 2000.
- MIMS, C.A.; PLAYFAIR, J.H.L.; ROITT, I.M.; WAKELIN, D.; WILLIAMS, R. **Microbiologia Médica**, 1ª edição, ed Manole, p. 1-1 a 39-18, a. 1995.
- MOELLERING, R. C. JR. Emergence of enterococcus as a significant pathogen. **Clinical Infectious Diseases** v. 14, p. 1173–1178, 1992.
- MULVEY, M.R. e SIMOR, A.E. Antimicrobial resistance in hospitals: How concerned should we be? **Canadian Medical Association Journal** v. 180, n. 4, p. 408-415, 2009.
- MURRAY, B. The life and times of the enterococcus. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 3, p. 45–65, 1990.
- MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococcal infections **New England Journal of Medicine** v. 342, p. 710-21, 2000.
- MURRAY, B.E. Vancomycin-resistant enterococci. **American Journal of Medicine** v. 101, p.284–293, 1997.

- NAVARRO, F. e COURVALIN, P. Analysis of genes encoding D-alanine: D-alanine ligase-related enzymes in *Enterococcus casseliflavus* and *Enterococcus flavescens*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 38, p.1788–1793, 1994.
- PALAZZO, I.; CAMARGO, I.; ZANELLA, R. et al. Evaluation of clonality in enterococci isolated in Brazil carrying Tn1546-like elements associated with vanA plasmids. **FEMS Microbiology Letters** v. 258, n.1, p. 29-36, 2006.
- PALEPOU, M.F.; ADEBIYI, A. M.; TREMLETT, C. H. et al. Molecular analysis of diverse elements mediating VanA glycopeptide resistance in enterococci. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 42, p. 605-612, 1998.
- PANESSO, D.; OSPINA, S.; ROBLEDO, J. et al. First characterization of a cluster of VanA-type glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium*, Colombia. **Emerging Infectious Diseases** v. 8, p. 961-965, 2002.
- PATEL R Enterococcal-type glycopeptide resistance genes in non-enterococcal organisms **FEMS Microbiology Letters** v.185, n. 1, p.1-7, 2000.
- PATEL, R. Clinical impact of vancomycin-resistant enterococci. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 51, p. 13-21, 2003.
- PATEL, R. Vancomycin-resistant enterococci in solid organ transplantation. **Current Opinion in Organ Transplantation** v. 4, p. 271–80, 1999.
- PITCHER, D.G.; SANDERS, N.A.; OWEN, R.J. Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. **Letters in Applied Microbiology** v. 8, p. 151-156, 1989.
- POETA, P.; ANTUNES, T.; RODRIGUES, J. Vancomycin-resistant *Enterococcus* isolated from feces of poultry, pigeons, deers and rats. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 57, n. 3, 2005.
- QUINTILIANI, R. JR.; EVERS, S.; COURVALIN, P. The *vanB* gene confers various levels of self-transferable resistance to vancomycin enterococci. **Journal of Infectious Diseases** v.167, p.1220–1223, 1993.
- QUINTILIANI, R.JR. e COURVALIN, P. Conjugal transfer of the vancomycin resistance determinant *vanB* between enterococci involves the movement of large genetic elements

from chromosome to chromosome. **FEMS Microbiology Letters** v.119, p.359–364, 1994.

- RADMAN, M.; DOHET, C.; BOURGINGNON, M.F. et al. High fidelity devices in the reproduction of DNA. Seeberg, K Kleppe, eds, Chromosome Damage and DNA Repair. Plenum Publishing Corp. p 431-445, 1981.
- RAMMELKAMP, C.H.; MAXON, T. Resistance of *Staphylococcus aureus* to the action of penicillin. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**. n. 51, p. 386–389, 1942.
- REIS, A.G. e GRISI, S.J. Monitorization of blood levels of vancomycin in children with multi-resistant bacterial infections. **Jornal de Pediatria**. v. 72, n. 4, p. 225-229, 1996.
- REIS, A.O.; CORDEIRO, J.C.; MACHADO, A.M. et al. In vitro antimicrobial activity against vancomycin-resistant enterococci isolated in Brazilian hospitals. **Brazilian Journal of Infectious Diseases** v. 5, p. 243-251, 2001
- REYNOLDS, P.; COURVALIN, P. Vancomycin Resistance in Enterococci Due to Synthesis of Precursors Terminating in D-Alanyl-D-Serine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n. 1, p. 21–25, 2005.
- REYNOLDS, P.E. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptide antibiotics. **European Journal of Clinical Microbiology and Infection Disease**, v.8, p.943-950, 1989.
- REYNOLDS, P.E.; DEPARDIEU, F.; DUTKA-MALEN, S. et al. Glycopeptide resistance mediated by enterococcal transposon Tn1546 requires production of VanX for hydrolysis of D-alanyl-D-alanine. **Molecular Microbiology** v.13, p.1065–1070, 1994.
- RUOFF, K.L.; DE LA MAZA, L.; MURTAGH, M. J. et al. Species identities of enterococci isolated from clinical specimens. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 435- 437, 1990.
- SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A. et al. Pathogen frequency and resistance patterns in brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 5, p. 200-214, n. 4, 2001.

- SADER, H.S.; JONES, R.N.; GALES, A.C., et al. Antimicrobial susceptibility of patterns for pathogens isolated from patients in Latin American medical centers with a diagnosis of pneumonia: Results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997). **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 32, p. 289-301, 1998.
- SADER, H.S.; SAMPAIO, J.L.M.; ZOCCOLI, C. et al. Results of the SENTRY. Antimicrobial surveillance program results in three Brazilian medical centers for 1997. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 3, p. 63-79, 1999.
- SAHM, D.F.; KISSINGER, J.; GILMORE, M.S. et al. In vitro susceptibility studies of vancomycin resistant *Enterococcus faecalis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 33, p. 1588-1591, 1989.
- SCHEFFERS, D.J. e PINHO, M.G. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. **Microbiology and Molecular Biology Reviews** v. 69, n. 4, p. 585-607, 2005.
- SHINOHARA, G.M.M.; NOBRE, M.A.L. Introdução ao Editor de Estruturas e Equações Químicas Isis Draw 2.4. LaCCeF - Laboratório de Compósitos e Cerâmicas Funcionais. 2005, disponível no site: <http://www2.prudente.unesp.br/isisdraw/Editor%20de%20> consultado 21.03.2009, as 11:40.
- SIMJEE, S.; WHITE, D.G.; MCDERMOTT, P.F. Characterization of Tn1546 in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolated from Canine Urinary Tract Infections: Evidence of Gene Exchange between Human and Animal Enterococci **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 12, p. 4659–4665, 2002.
- SLETVOLD, H.; JOHNSEN, P.J. ; SIMONSEN, G. S. et al. Comparative DNA Analysis of Two vanA Plasmids from *Enterococcus faecium* Strains Isolated from Poultry and a Poultry Farmer in Norway **Antimicrob Agents Chemother.** v. 51, n. 2, p. 736–739, 2007.
- STAMPONE, L.; DEL GROSSO, M.; BOCCIA, D. et al. Clonal spread of a vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strain among bloodstream-infecting isolates in Italy. **Journal of Clinical Microbiology** v. 43, p. 1575-1580, 2005.

- STERNBACH, G.L. e VARON, J. “Designer drugs” Recognizing and managing their toxic effects. **Postgraduate Medicine** v. 91, n. 8, p. 175-6, 1992.
- SUPPOLA, J.; KOLHO, E.; SALMENLINNA, S. et al. *vanA* and *vanB* incorporate into an endemic ampicillin-resistant vancomycin-sensitive *Enterococcus faecium* strain: effect on interpretation of clonality. **Journal of Clinical Microbiology** v. 37, p. 3934–3939, 1999.
- SWARTZ, M.N. Use of antimicrobial agents and drug resistance. **New England Journal of Medicine**. n. 2, v. 337, p.491 –2, 1997.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, cap. 42, p. 684-713, 1999.
- TAVARES, W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos**. 7ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 438-443, 1996.
- TENOVER, F. C.; ARBEIT, R. D.; GOERING, R. V. et al. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p. 2233-2239, 1995.
- TENOVER, F.C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Medicine** v.119, p.62-70, 2006.
- TENOVER, F.C., e HUGHES J.M. The challenges of emerging infectious diseases. Development and spread of multiply-resistant bacterial pathogens. **Journal of the American Medical Association** n. 275, p.300–304 1996.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 6ªed. ed. Artes Medicas Sul, 2000.
- UTTLEY, A.; GEORGE, R.; NAIDOO, J. et al. High-level vancomycin-resistant enterococci causing hospital infections. **Epidemiology and Infection** v. 103, p.173–181, 1989.
- UTTLEY, A.H.C.; COLLINS, C.H.; NAIDOO, J. et al. Vancomycin-resistant enterococci. **Lancet** p.57–58, 1988.
- WALSH, C. T. **Science**, v. 261, n. 308, 1993.

- WAX, R.G.; LEWIS, K.; SALYERS, A.A. et al. Bacterial Resistance to Antimicrobials. 2^a ed. editora CRC Press, cap. 14, pg. 430, 2008.
- WELSH. J.; MCCLELLAND, M. Genomic fingerprints produced by PCR with consensus tRNA gene primers. **Nucleic Acids Research** v. 19, p. 861-866, 1991.
- WERNER, G.; KLARE, I.; WITTE, W. Large Conjugative *vanA* Plasmids in Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* **J Clin Microbiol.** v. 37, n. 7, p. 2383–2384, 1999.
- WINN, JR.W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; et al. **Koneman, Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**, 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.
- WOODFORD, N. Glycopeptide-resistant enterococci: a decade of experience. **Journal of Medical Microbiology**, v 47, p 849-862, 1998.
- WOODFORD, N.; JOHNSON, A.; MORRISON, D. Current perspectives on glycopeptide resistance. **Journal of Clinical Microbiology** Rev. v. 8, p.585–615, 1995.
- WU, Z.; WRIGHT, G.; WALSH, C. Overexpression, purification and characterization of VanX, a D-D-dipeptidase which is essential for vancomycin resistance in *Enterococcus faecium* BM4147. **Biochemistry** v. 34, p. 2455–2463, 1995.
- ZANELLA, R.; BRANDILEONE, M.; BOKERMANN, S. Phenotypic and genotypic characterization of VanA *Enterococcus* isolated during the first nosocomial outbreak in Brazil **Microbial Drug Resistance** v. 9, n. 3, p.283-91, 2003.
- ZANELLA, R.C.; VALDERATO, F.; LOVGREN, M. et al. First confirmed case of vancomycin resistant *Enterococcus faecium* with *vanA* phenotype from Brazil: isolation from meningitis case in São Paulo. **Microbial Drug Resistance** v. 5, p. 159-162, 1999.
- ZHENG, B.; TOMITA, H.; XIAO, Y. et al. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Mainland China **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2813–2818, 2007.
- ZHENG, B.; TOMITA, H.; XIAO, Y.H. et al. Molecular Characterization of Vancomycin-Resistant *Enterococcus faecium* Isolates from Mainland China *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, n. 9, p. 2813–2818, 2007.

3. Capítulo II: *Klebsiella pneumoniae*

3.1 *Klebsiella pneumoniae*

A bactéria *K. pneumoniae* faz parte da família *Enterobacteriaceae* que é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram-negativas. O gênero *Klebsiella* foi assim designado por Trevisan em 1885 em homenagem a Edwin Klebs, microbiologista alemão (MARTINEZ et al, 2004).

Esta espécie é constituída de células em bastonete aeróbios facultativos, com melhor crescimento em condições aeróbias, não esporulado e cujo tamanho varia de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento, imóvel, produz colônias grandes e mucóide quando cultivadas em placas com nutrientes. As colônias formadas são grandes devido à cápsula mucóide polissacarídica (Antígeno K) (Figura 15) que protege contra a fagocitose e contra a ação de fatores bactericidas do soro e ainda tem função de auxiliar na aderência (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; KONEMAN et al., 2006).

As duas espécies mais freqüentemente isoladas de infecções em humanos é *Klebsiella pneumoniae* e *Klebsiella oxytoca*, mas outras espécies de *Klebsiella* também podem ser encontradas como: *Klebsiella ozaenae*, *Klebsiella rhinoscleromatis*, *Klebsiella terrigena*, *Klebsiella planticola*, *Klebsiella ornithinolytica* e *Enterobacter aerogenes* (*Klebsiella mobilis*) (HANSEN, et al., 2004).

A *K. pnuenomiae* constitui-se em um patógeno oportunista responsável por várias infecções nosocomiais (MARTINEZ, et al., 2004). Isolados de *K. pneumoniae* tem aumentado a resistência a múltiplos agentes antimicrobianos como os beta-lactâmicos (DIANCOURT, et al., 2005). Surtos hospitalares são freqüentes e a disseminação inter-hospitalar dessas cepas resistentes têm sido descritas na literatura (JEONG, et al., 2005).

De grande importância é a notável adaptação das *Klebsiellae* ao ambiente hospitalar, pois sobrevivem por mais tempo do que outras bactérias entéricas nas mãos dos profissionais e nas superfícies ambientais, facilitando a disseminação cruzada dentro dos hospitais (PATERSON e BONOMO, 2005). Na América Latina tem sido referida alta prevalência de isolados produtores

de enzimas que promovem resistência múltipla a antibióticos (ARLET, et al 1994; MONNET, et al., 1997; WINOKUR, et al., 2001; DIANCOURT, et al 2005;), sendo o segundo mais freqüente patógeno encontrado pelo SENTRY (Programa de vigilância epidemiológico e resistência antimicrobiana) (BELL et al., 2007). Em países da Ásia e na África do Sul ocorreram surtos importantes de infecção por cepas produtoras de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) entre os anos de 1998 e 2003 (BELL et al., 2007).

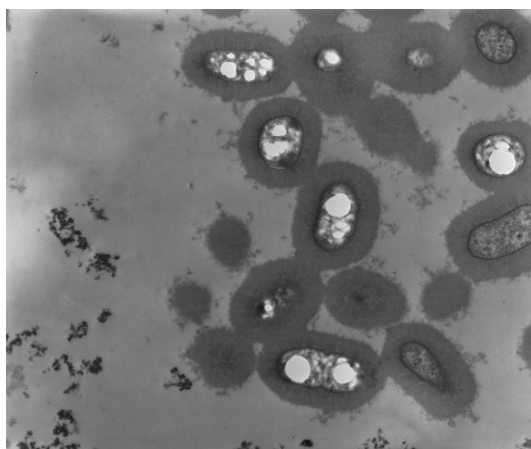


Figura 15. Células de *K. pneumoniae* rodeadas por grossas camadas de material capsular (Fonte: PODSCHUN; ULLMANN, 1998).

3.2. Estrutura dos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos constituem uma família de compostos que apresentam um anel β -lactâmico e são divididos em vários grupos: penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases. As cadeias laterais definem suas propriedades. As cefalosporinas são fármacos estruturalmente similares às penicilinas, a introdução de modificações nas cadeias laterais dá origem às diversas cefalosporinas (MARIN e GUDIOL, 2003). A persistente exposição de cepas bacterianas a múltiplos agentes β -lactâmicos pode levar a uma super-produção e mutação das β -lactamases. Essas β -lactamases são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos. Nas bactérias Gram-negativas essas enzimas ficam no espaço periplasmático, onde atuam no antimicrobiano antes que ele possa alcançar seu receptor específico (STRATTON, 2000).

3.2.1 Resistência aos antibióticos β -lactâmicos

Existem três maneiras principais que a bactéria utiliza para evitar o efeito bactericida dos β -lactâmicos:

(a) **Produção de β -lactamases.** β -lactamases são enzimas bacterianas que hidrolisam o anel β -lactâmico e tornam o antibiótico inativo antes que alcance seu alvo, as PBPs (proteína ligadora de penicilina) (MASSOVA e MOBASHERY, 1998).

(b) **PBPs alteradas que exibem baixa afinidade pelos antibióticos β -lactâmicos.** Como exemplo dessas proteínas pode-se citar as PBP 2x de *Streptococcus pneumoniae* e PBP 2' (PBP2a) de *Staphylococcus aureus*. Essas PBPs são relativamente resistentes a inativação por penicilinas e são hábeis em assumir a função de outras PBPs quando elas estão desativadas (CHAMBERS, 1997).

(c) **Perda ou diminuição da produção de proteínas na membrana externa em bactéria Gram-negativa.** A perda de proteínas na membrana externa restringe a entrada de certos beta-lactâmicos para o espaço periplasmático das bactérias Gram-negativas, impedindo seu acesso as PBPs na membrana externa. A resistência ao imipenem em *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* pode ser resultante da perda de porina Omp (outer membrane porins) (LIVERMORE, 2001; GOOTZ, 2004; JACOBY et al., 2004).

3.3. β -lactamases

Muitos gêneros de bactérias Gram-negativas possuem naturalmente β -lactamase cromossomal (GHUYSEN, 1991). A primeira β -lactamase foi identificada em *Escherichia coli* antes do lançamento da penicilina para utilização em prática médica (ABRAHAM e CHAIN, 1940). A destruição dos β -lactâmicos pelas β -lactamases é o mais importante mecanismo de resistência em bactérias Gram-negativas (BABIC et al., 2006), na figura 16 esta representada a estrutura molecular de uma ESBL.

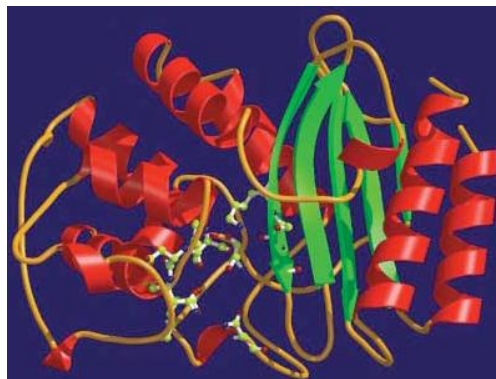


Figura 16. Estrutura molecular de uma ESBL (fonte: Samaha-Kfoury e Araj, 2003)

As β -lactamases são enzimas bacterianas que inativam os antimicrobianos β -lactâmicos pela hidrólise, que terminam em compostos ineficazes (BUSH, 2001). Nos últimos vinte anos muitos novos antimicrobianos β -lactâmicos têm sido desenvolvidos especificamente por apresentarem resistência à ação hidrolítica das β -lactamases. Entretanto, para cada nova classe de antimicrobiano que é utilizado, novas β -lactamases emergem sugerindo que a pressão seletiva e uso intenso dessas novas drogas têm selecionado novas variantes de β -lactamases (MEDEIROS, 1997).

A introdução da terceira geração de cefalosporinas no início de 1980 foi considerada como um importante complemento do arsenal terapêutico no combate à β -lactamases mediando resistência. Lamentavelmente, a emergência de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes a ceftazidima, e outras cefalosporinas comprometeram seriamente a eficácia desses antibióticos (PEREZ et al., 2007). Mutações pontuais nos genes que codificam essas enzimas produziram proteínas capazes de conferir resistência as cefalosporinas de terceira geração (BRUN-BUISSON et al 1987; SIROT, et al., 1987). Devido ao aumento do seu espectro de atividade especialmente contra oximino cefalosporinas, estas enzimas foram chamadas β -lactamases de espectro ampliado (ESBLs). Essas ESBLs emergiram rapidamente e muitas delas são mutantes capazes de remodelar o sítio ativo para torná-las capazes de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro (BRADFORD, 2001). Até o ano de 2007 foram relatados cerca de 700 tipos de β -lactamases (PEREZ et al., 2007), o que mostra o grande processo seletivo pelo qual passam os genes

codificadores em função da constante pressão seletiva pelo desenvolvimento e uso contínuo dos antibióticos.

A mais comum β -lactamase mediada por plasmídio é a chamada TEM-1, que tem sido encontrada em cerca de 75-80% das cepas resistentes por produção de β -lactamase mediada por plasmídios (SHAH et al., 2004). A enzima TEM foi originalmente encontrada em uma cepa de *E. coli* isolada da hemocultura de uma paciente de nome Temoniera, na Grécia, em 1965, recebendo assim seu nome TEM (MEDEIROS, 1984; DATT e KONTOMICHALOU, 1965). A mediação por plasmídios facilitou a disseminação da TEM-1 para outras espécies de bactérias. Depois de poucos anos do isolamento da primeira TEM-1 β -lactamase, esta enzima já estava espalhada no mundo inteiro sendo encontrada atualmente em muitas espécies diferentes de membros da família enterobacteriaceae e em *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (SIROT et al., 1987).

Outra β -lactamase mediada por plasmídios e encontrada em *K. pneumoniae* e *E. coli* é SHV-1 (sulfidril variável). A β -lactamase SHV-1 é codificada no cromossomo da maioria dos isolados de *K. pneumoniae*, mas geralmente é mediada por plasmídios em *E. coli* (De CHAMPS et al., 1989). A primeira dessas enzimas capazes de hidrolisar as cefalosporinas de terceira geração, SHV-2, foi encontrada em cepa de *K. ozaenae* isolada na Alemanha em 1983 (KLIEBE et al., 1985).

3.3.1. β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

ESBLs são β -lactamases capazes de conferir resistência bacteriana as penicilinas e às cefalosporinas de primeira, segunda e terceira geração, e a aztreonam (mas não a cefamicinas ou carbapenêmicos) por hidrólise destes antibióticos, e que são inibidas por inibidores de β -lactamases como ácido clavulânico. Substituições em um ou mais aminoácidos resulta em alterações na configuração e sítio ativo da enzima com aumento do espectro de atividade (PATERSON e BONOMO, 2005).

A prevalência de ESBL, assim como o tipo de enzima predominante pode variar por localização geográfica, por exemplo, na América Latina, a prevalência dessas enzimas tem aumentado a atividade hidrolítica contra cefotaxima e ceftazidima (GUZMAN-BLANCO et al., 2000), sendo importante à realização de estudos epidemiológicos locais com a finalidade de

favorecer a detecção dos isolados produtores dessa enzima, bem como determinar o perfil de cada local (SADER et al., 2001).

Algumas cepas apresentam aparente susceptibilidade a algumas cefalosporinas, isso é o resultado de vários graus de hidrólise das cefalosporinas por diferentes β -lactamases e reforçado pelo seu poder de penetração na membrana externa de algumas bactérias comparadas com outras (PHILIPPON et al., 1989). As β -lactamases nos patógenos Gram-negativos permanecem como o mais importante mecanismo de resistência aos β -lactâmicos, e sua crescente prevalência, assim como a evolução alarmante parece ser ligada diretamente ao uso clínico de novas classes de β -lactâmicos (MEDEIROS, 1997).

A presença de ESBL em uma bactéria nem sempre produz resistência as cefalosporinas detectáveis pelos testes de sensibilidade aos antimicrobianos realizados *in vitro*, ocorrendo, porém, a resistência *in vivo* quando as infecções são tratadas com esses antimicrobianos. A expressão da resistência depende da quantidade da enzima presente, sendo que nem sempre os inóculos padronizados para os testes de sensibilidade aos antimicrobianos são suficientes para visualização da resistência. Disto depende também a afinidade pelo substrato, sendo importante a escolha dos antimicrobianos adequados para os testes de sensibilidade, que variam com o tipo de enzima predominante (BRADFORD, 2001).

3.3.2. Caracterização das β -lactamases

A classificação das β -lactamases pode ser definida de acordo com as propriedades moleculares e funcionais. A classificação molecular das β -lactamases baseada na homologia da sequência de aminoácidos foi inicialmente proposta por Ambler (1980) a partir dos quatro tipos de β -lactamases com seqüências conhecidas: serina- β -lactamases (designadas classe A), metalo- β -lactamases (classe B), cefalosporinas (classe C) e as semelhantes às serina- β -lactamases que hidrolisam oxecilinas (classe D) (BUSH, et al., 1995). Hoje se sabe que as classes A, C e D são β -lactamases dependentes de serina. Ao contrário, as enzimas da classe B são metalo- β -lactamases que necessitam de zinco para sua ação. A Tabela 4 apresenta um resumo das enzimas com sua classificação molecular e seus genes correspondentes.

Dentro das β -lactamases da classe A foram classificadas as beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), encontradas principalmente em *E. coli* e *K. pneumoniae*, e as enzimas que

hidrolisam os carbapenêmicos, IMI-1, NMC, IMI, SME e KPC. Posteriormente foi acrescentada a enzima GES, que juntamente com KPC, apresenta localização plasmidial (AMBLER, 1980; HALL e BARLOW, 2005).

Tabela 4. Classificação das β -lactamases pelo sistema molecular (AMBLER, 1980; PATERSON e BONOMO, 2005; BABIC et al, 2006; QUEENAN e BUSH 2007).

Classe	Enzimas	Genes relacionados
A	Penicilinasas, cefalosporinasas	ESBLs, carbapenemases TEMs, SHVs, PCI, CTX-M, GES, NMC, SME-1, KPC-1, IMP
B	Metalo-beta-lactamases	Carbapenemases verdadeiras SPM, VIM-1, GIM,
C	Cefalosporinasas	Cefalosporinasas cromossomais AmpCs, CMY-2, ACT-1
D	Oxacilinasas	Oxacilinasas OXA-1, OXA-23-like, OXA-24-like, OXA-49, OXA-51-like e OXA-58

A classe molecular B constitui-se de metalo-enzimas com zinco no seu sítio ativo que apresentam eficiente taxa de hidrólise dos carbapenêmicos, resultando em elevação do MIC para essas drogas (NORDMANN e POIREL 2002). O mecanismo de hidrólise é dependente da interação do β -lactâmico com íons de zinco e o sítio ativo da enzima, assim pode-se distingui-la das outras pela sua inibição pelo EDTA, um quelante do Zn^{2+} (BABIC et al., 2006; QUEENAN e BUSH 2007). Estas enzimas hidrolisam virtualmente todos os β -lactâmicos, exceto aztreonam (NORDMANN e POIREL 2002), e seus genes são localizados em plasmídios ou integrons (NORDMANN e POIREL 2002; QUEENAN e BUSH, 2007).

As β -lactamases do grupo C foram originalmente conhecidas como enzimas cromossômicas (AmpC) de *P. aeruginosa* ou enterobacteriaceas. Com a introdução de ceftazidima e cefotaxima, a seleção de cepas hiper produtoras de enzimas começou a ficar mais comum (SHANNON e PHILLIPS, 1986). A hiper produção dessas enzimas está freqüentemente associada com a perda de porinas na membrana externa das bactérias, levando em alguns casos não somente a altos níveis de resistência as cefalosporinas, penicilinas e monobactâmicos, mas

também a carbapenêmicos (POIREL et al., 2004). Pode-se encontrar grande número de cópias dos genes que codificam as enzimas do grupo C em plasmídios, sendo estes transmitidos entre as enterobactérias e freqüentemente associadas a outras beta-lactamases no mesmo organismo (PITOUT et al., 2003; QUEENAN e BUSH, 2007).

As cefalosporinases do grupo D têm em seu sitio ativo o resíduo de serina, e são também conhecidas como carbapenemases ou oxa- β -lactamases (OXA). A grande maioria das OXA carbapenemases foi descoberta em bactérias Gram-negativas oportunistas como *Acinetobacter baumannii*, possuem baixa taxa de hidrólise dos carbapenêmicos e, em consequência, podem ser subestimados devido à dificuldade na detecção (NORDMANN e POIREL 2002; QUEENAN e BUSH, 2007).

Em 1995, Bush-Jacoby-Medeiros apresentou o último sistema de classificação funcional baseado em quatro grupos (1-4) e subgrupos (a-f). O grupo 1 consiste de cefalosporinases que não são inibidas pelo ácido clavulânico, pertencentes à classe molecular C. No grupo 2 estão as penicilinases, cefalosporinases, ou ambos, inibida por ácido clavulânico, correspondendo a classe molecular A e D e representando os genes originais TEM e SHV. No entanto, devido ao crescente número de derivados das β -lactamases TEM e SHV, eles foram divididos em dois subgrupos: 2a e 2b. O subgrupo 2a contém apenas penicilinases; já 2b são as β -lactamases de espectro ampliado, o que significa que as enzimas são capazes de inativar penicilinas e cefalosporinas com a mesma eficiência. Além disso, novos subgrupos foram separados do subgrupo 2b: o subgrupo 2be representa as ESBLs que são capazes de inativar a terceira geração de cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima, e cefpodoxime) bem como monobactâmicos (aztreonam). Já o subgrupo 2br é composto por enzimas com reduzida afinidade pelo ácido clavulânico e sulbactam, também são enzimas derivados do tipo TEM, resistente ao inibidor, mas ainda suscetíveis a tazobactam (BUSH, 1995a).

Depois o subgrupo 2c foi separado do grupo 2b porque estas enzimas inativam carbenicilina melhor que benzilpenicilina, com algum efeito sobre cloxacilina. O subgrupo 2d inativa cloxacilina melhor do que benzilpenicilina, com alguma atividade contra carbenicilina; estas enzimas são pouco inibidas por ácido clavulânico, e alguns deles são ESBLs. O subgrupo 2e contém cefalosporinases que pode também hidrolisar monobactâmicos, e são inibidas por ácido

clavulânico. O subgrupo 2f foi acrescentado porque estas são carbapenemases serina-dependente, em contraste com carbapenemases do grupo 3 que são zinco dependentes (BUSH, 1995a).

Grupo 3 é composto de metalo β -lactamases dependentes de zinco, correspondente à classe molecular B, que são as únicas enzimas que atuam pelo íon metálico de zinco, são capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas, e carbapenêmicos. Assim, os carbapenêmicos são inibidos por ambos os grupos 2f (mecanismo de serina-dependente) e grupo 3 (mecanismo à base de zinco). O grupo 4 inclui penicilinasas que não são inibidas pelo ácido clavulânico, e ainda não têm um correspondente na classe molecular (BUSH, 1995a).

3.3.3. Significado clínico e importância das ESBLs

Os bacilos Gram-negativos produtores de ESBL são uma crescente preocupação, sobretudo porque as espécies de organismos produtores dessas enzimas estão cada vez sendo mais encontradas em infecções. Estes organismos resistentes são clinicamente importantes porque resultam em aumento de morbidade e mortalidade (BLONDEAU, 2001). Além disso, as bactérias produtoras de ESBL são freqüentemente resistentes a muitas classes de antimicrobianos, resultando em dificuldades no tratamento dessas infecções (SAMAHAKFOURY e ARAJ, 2003).

Outros problemas gerados pelas bactérias produtoras de ESBL incluem a dificuldade em detectar sua presença, limitadas opções de tratamento e forte impacto sobre os resultados clínicos. Os profissionais da área deveriam estar familiarizados com o perfil microbiológico dos isolados produtores de ESBL e potenciais estratégias para lidar com este crescente problema (NATHISUWAN et al., 2001). Infelizmente, a detecção laboratorial de ESBLs pode ser complexa e, por vezes, enganosa. A escolha dos antimicrobianos é muitas vezes complicada devido ao perfil de multirresistência. Embora testes *in vitro* de ESBLs possam ser realizados, estes são influenciados pelo inóculo bacteriano e tipo específico de ESBL presente (RUPP e FEY, 2003).

3.3.4. Mecanismo de ação das β -lactamases

Uma das principais formas de resistência bacteriana aos antimicrobianos β -lactâmicos é a produção das enzimas β -lactamases que atuam hidrolisando amidas, amidinas ou outras pontes C-

N, separando as amidas cíclicas do anel β -lactâmico. A maioria age via a formação de um éster de serina (MATAGNE et al., 1993). Primeiramente, a enzima associa-se de forma não covalente ao anel β -lactâmico do antimicrobiano e, então, o radical hidroxila livre do resíduo de serina presente no sítio ativo da enzima ataca o anel β -lactâmico formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e os antimicrobianos hidrolisados e inativos. No caso das metalo- β -lactamase, o ataque ao anel β -lactâmico é feito pelo zinco presente no sítio ativo da enzima (LIVERMORE, 1995).

3.4. β -lactamases em *K. pneumoniae*

As ESBLs são mais freqüentemente encontradas em isolados de *K. pneumoniae* (LIVERMORE, et al., 1995). Acredita-se que bactérias do gênero *Klebsiella* sejam boas hospedeiras para plasmídios e que a evolução dos genes de ESBL aconteceu mais rapidamente neste do que em outros gêneros (LIU et al., 1992), facilitando, assim, a disseminação de infecções no ambiente hospitalar (PATERSON e BONOMO, 2005).

3.4.1. Tipos de β -lactamases de espectro ampliado “ESBL”

As ESBLs têm sido classificadas em nove distintos grupos evolucionários e estruturais, de acordo com sua sequência de aminoácidos: TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES e OXA. As maiores famílias são formadas pelos tipos TEM e SHV, que incluem as primeiras variantes de ESBL identificados e que permaneceram como os tipos prevalentes. As enzimas do tipo OXA, as únicas pertencentes à classe D, representam uma família de ESBL pouco prevalente. As enzimas do tipo TEM variam de TEM-1 e TEM-2, as do tipo SHV de SHV-1 (grupo 2b) e as do tipo OXA de OXA-2 e OXA-10 (grupo 2d). A origem das enzimas não está clara, com exceção das enzimas SHV que parecem ter relação com enzimas cromossômicas SHV-1 de *K. pneumoniae*. As semelhanças estruturais sugerem origens comuns em muitos casos, as mutações mais importantes são aquelas que ampliam o espectro do sítio ativo (BRADFORD, 2001). A prevalência de ESBL positiva em enterobacteriaceas varia bastante entre diferentes áreas geográficas e diferentes países, a mais alta prevalência foi de 44,9%, em enterobacteriaceas na América Latina (SAHLY, 2006). Com poucas exceções, as ESBLs são derivadas da família dos genes de β -lactamase TEM ou SHV (BUSH et al., 1995; JACOBY e MEDEIROS, 1991) e

são localizadas usualmente em plasmídios comumente encontradas em *E. coli* e *K. pneumoniae* (BRADFORD, 2001). Outros grupos podem ter maior importância em determinadas regiões, como é o caso do grupo CTX-M na América do Sul (LIVERMORE e BROWN, 2001).

As β -lactamases diferem apenas em alguns aminoácidos, mas essas alterações influenciam o espectro da atividade destas enzimas. Mutações pontuais nas seqüências de aminoácidos levam a ampliação do espectro de atividade destas β -lactamases (FLUIT et al., 2001). Existem mais de 150 β -lactamases do tipo TEM, 88 enzimas do tipo SHV, 88 do tipo OXA, 53 do tipo CTX-M, 22 do tipo IMP e 12 do tipo VIM, e em menor número outras famílias de enzimas têm sido descritas (JACOBY, 2006).

3.4.1.1. ESBL tipo TEM

TEM-1 é mais comum β -lactamase encontrada em bacilo Gram negativo. TEM-2 foi o primeiro derivativo de TEM-1 por uma simples substituição de aminoácido na β -lactamase original. Já TEM-3 foi a primeira β -lactamase com perfil de ESBL. Desde o primeiro reporte até 2004 existiam cerca de 90 derivativos de TEM (SHAH, 2004), até 2006 eram cerca de 150 (JACOBY, 2006).

Mutações ocorridas na seqüência de aminoácidos da enzima TEM-1 levaram ao surgimento de muitas variantes, sendo que a maioria delas apresenta o fenótipo de ESBL; outras, no entanto, apresentam-se como β -lactamases resistentes à ação de inibidores. As substituições de aminoácidos na enzima TEM ocorrem em um número limitado de posições. As combinações dessas trocas de aminoácidos levam a várias alterações no fenótipo de ESBL, como a capacidade de hidrolise específica das oximino-cefalosporinas, como ceftazidima e cefotaxima, ou mudanças no ponto isoelétrico que variar de 5,2 a 6,5 (BRADFORD, 2001). Alguns aminoácidos são especificamente importantes para produzir o fenótipo ESBL. Existe um relato da ocorrência natural de enzimas semelhantes a TEM que continha um número de substituições de aminoácidos e deleções que não foram observadas em outras enzimas TEM (PERILLI et al., 1997).

Foi sugerido que a ocorrência natural de ESBLs tipo TEM é resultado da pressão seletiva de vários β -lactâmicos dentro de uma determinada instituição, em vez de seleção com um simples agente (BLAZQUEZ et al., 2000). Embora as β -lactamases do tipo TEM sejam mais freqüentes em *E. coli* e *K. pneumoniae*, são também encontrados em outras espécies de bactérias gram

negativas como *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri* e *Salmonella spp* (BONNET et al., 1999). Além disso, ESBLs tipo TEM foram encontradas em bactérias Gram negativas não enterobacteriáceas. O tipo TEM-42 β -lactamases foi encontrado em uma cepa de *P. aeruginosa* (MUGNIER, et al., 1996).

3.4.1.2. ESBL tipo SHV

A ESBL tipo SHV refere-se a sulfidril variável. Em 1983, foi isolada na Alemanha uma *K. ozaenae* que possuía uma β -lactamase que hidrolisava eficientemente cefotaxima e, em menor medida, ceftazidima (KNOTHE et al., 1983). O seqüenciamento mostrou que a β -lactamase era diferente da SHV-1 com a substituição de glicina por serina. Esta mutação sozinha é responsável pela propriedade dessa β -lactamase de espectro ampliado, chamada SHV-2. Depois de 15 anos da descoberta dessa enzima, organismos com SHV-2 foram encontrados em todos os continentes habitados (PATERSON et al., 2003), o que implica que a pressão seletiva da terceira geração de cefalosporinas na primeira década de sua utilização foi a responsável pela mutação (POIREL et al., 2004). O tipo SHV-1 é mais comum em *K. pneumoniae* sendo responsável por mais de 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídios nessa espécie. Em muitas cepas é relatada como estando integrada ao cromossomo ou fazendo parte de um elemento transponível (TZOUVELEKIS e BONOMO, 1999).

O tipo SHV possui menos variantes que o tipo TEM, e as mutações ocorrem em poucas posições nos genes estruturais. Algumas substituições são essenciais para a hidrólise de ceftazidima, e outras para a hidrólise de cefotaxima. Até hoje, a maioria dos derivados SHV descritos possui o fenótipo de ESBL. Apenas uma variante é relatada como resistente aos inibidores de β -lactamases (BRADFORD, 2001). A maioria das enzimas do tipo SHV é encontrada em cepas de *K. pneumoniae* (CORKILL, et al., 2001). No entanto, também podem ser encontradas em *Citrobacter diversus*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) (BRADFORD, 2001).

A alteração no gene *bla_{SHV}* que origina fenótipos de ESBL gera a substituição de uma glicina por serina na posição 238 (Gli238Ser), assim como a substituição de lisina por glutamato na posição 240. Ambas as substituições se espelham às das ESBL do tipo TEM. O resíduo de serina na posição 238 é crítico para a hidrólise eficiente da ceftazidima, e o resíduo de lisina na

posição 240 é crítico para a hidrólise da cefotaxima. O aumento da Concentração Inibitória Mínima (CIM) para a cefotaxima é maior que o da ceftazidima (BRADFORD, 2001; STÜRENBURG e MACK, 2003).

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

3.4.1.3. ESBL tipo CTX

O nome CTX reflete a atividade do potencial hidrolítico dessa β -lactamase contra cefotaxima que tem sido descrito em cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium e *E. coli*, assim como em outras espécies de enterobacteriaceas. Essas enzimas não são muito relacionadas às β -lactamases TEM ou SHV apresentando somente 40% de identidade (BRADFORD, 2001). O número de ESBL tipo CTX rapidamente se expandiu e têm sido relatados surtos em muitas partes do mundo, incluindo Europa, América do Sul e Japão (BUSH e SINGER, 1989; BAUERNFEIND et al., 1996).

Grandes surtos de isolados de *S. enterica* serovar Typhimurium expressando β -lactamases CTX-M ocorreram na América sul e na Europa Ocidental. Estes isolados foram encontrados também expressando uma diversidade de variantes de CTX-M. Curiosamente, β -lactamases idênticas tem sido descobertas em várias partes do mundo bastante separadas, sugerindo evolução independente dessas enzimas (GNIADKOWSKI, et al., 1998; YAN, et al., 2000).

È importante observar que o mesmo organismo pode abrigar tanto ESBLs tipo CTX-M e SHV ou ESBLs tipo CTX-M e CMY ou AmpC β -lactamases, o que pode alterar o fenótipo de resistência aos antimicrobianos, pois a enzima CMY-2 hidrolisa bem a amoxicilina/ácido clavulânico, a CTX-M não hidrolisa a amoxicilina/acido clavulânico, mas hidrolisa com mais eficiência a cefotaxima do que a ceftazidima, a AmpC hidrolisa a cefoxitina, cada enzima tem os alvos preferenciais de hidrólise (YAN et al., 2000).

3.4.1.4. Outras β -lactamases

Uma enzima crescente na família das ESBLs é a β -lactamases tipo OXA, que são caracterizadas por sua atividade hidrolítica contra oxacilina e cloxacilina e por serem pobremente inibidas pelo ácido clavulânico. O primeiro relato dessa enzima foi em cepas de *Acinetobacter baumannii*. A maioria das ESBLs é encontrada em *E. coli*, *K. pneumoniae*, e outras enterobacteriaceas, mas a ESBL tipo OXA é encontrada principalmente em *P. aeruginosa* (BUSH et al., 1995; VILA, et al., 1997).

Embora a maioria das ESBLs seja derivada das β -Lactamases TEM ou SHV, outras podem ser reconhecidas como novas famílias de ESBLs, e poucas ESBLs não estão estreitamente relacionadas com alguma das famílias bem estabelecidas de β -lactamases. A β -lactamase PER-1 foi descrita em cepas de *P. aeruginosa* isolada de um paciente na Turquia, e posteriormente isolada na Argentina (NORDMAN et al., 1993; BAUERNEFEIND et al., 1996). É interessante notar que PER-1 encontra-se quase exclusivamente na Turquia, enquanto PER-2 tem sido encontrada quase exclusivamente na América do Sul. Outra enzima que é algo relacionado ao PER-1 é a β -lactamase VEB-1 (POIREL, et al., 1999), primeiramente encontrada em um único isolado de *E. coli* em um paciente do Vietnã, e posteriormente em *P. aeruginosa* isolada de um paciente da Tailândia (NAAS, et al., 1999).

GES-1 é outra enzima incomum que não está intimamente relacionada com qualquer outra β -lactamase mediada por plasmídeo, mas apresenta 36% de homologia com a carbapenemase presente em *Proteus mirabilis* (POIREL et al., 2000). A enzima SFO-1 esta muito relacionada com uma β -lactamase de classe A de *Serratia fonticola* (MATSUMOTO e INOUE, 1999). Já a enzima KPC confere resistência a todos os β -lactâmicos, incluindo penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos (ALBA, et al., 2005), alguns isolados contendo KPC apresentam baixo nível de resistência aos carbapenêmicos. O gene que codifica a enzima KPC é usualmente flanqueado por seqüências relacionadas com transposons e tem sido identificada em plasmídios conjugativo com significativo potencial para disseminação (WOODFORD, et al., 2004).

3.5. β -lactamases no mundo, América do Sul e Brasil

As bactérias produtoras de ESBL encontram-se disseminadas em todo o mundo. Estão presentes, por exemplo, em países como França (CHAMPS et al., 2000), Itália (PAGANI et al., 2003), Taiwan (WU et al., 2003) e Israel (NAVON-VENEZIA et al., 2003), bem como nas Américas (SCHAWBER et al., 2004; MIRANDA, et al., 2004). A presença de β -lactamases em instituições latino-americanas varia de 30 a 50% dos isolados (JONES, 2001).

No Brasil, em estudo realizado entre os anos de 2004 a 2006, foi identificado um percentual de 35,2% de isolados produtores de ESBL, no estado do Rio Grande do Sul (AUGUSTI et al., 2007). Em outro trabalho com doze hospitais brasileiros, analisando 480 cepas *K. pneumoniae*, foi encontrado que 44,1% dos isolados foram produtores de ESBL (HSIUNG, et al., 2000). Em estudo realizado em Pernambuco e Alagoas, 30% dos isolados de *K. pneumoniae* foram identificados como produtores de ESBL (LOPES, et al., 2004). Além desses, vários outros relatos têm surgido, cada vez mais freqüentes, de isolados expressando resistência aos β -lactâmicos de largo espectro no Brasil (BONNET et al., 2000a; BONNET et al., 2000b; NOGUEIRA et al., 2006).

3.5.1. Epidemiologia molecular das bactérias produtoras de ESBLs

Uma série de surtos têm sido descritos com a disseminação de um único clone (NEUWIRTH et al., 2001) e têm sido encontrados clones persistentes pelo período de três anos (BRANGER, et al., 1997). Relatos recentes têm descrito a disseminação clonal de, pelo menos, cinco diferentes *Klebsiellas* produtoras de ESBL numa mesma unidade, ao mesmo tempo. Cepas geneticamente não-relacionadas podem produzir a mesma ESBL devido a plasmídios de transferência intra-específica (FIETT et al., 2000; BINGEN, et al., 1993). Finalmente, embora a mesma ESBL possa ser prevalente em determinada unidade de um hospital, esta pode ser mediada por plasmídios diferentes (BRADFORD et al., 1994).

3.5.2. Distribuição das β -lactamases nas espécies de enterobacteriaceas

As ESBLs são encontradas principalmente em *K. pneumoniae*, *E. coli* e *Klebsiella oxytoca*, mas essas enzimas já foram identificadas em várias espécies como *Proteus mirabilis*, *Providencia* spp, *Citrobacter freundii*, *Serratia marcescens* entre outras (PAGANI et al., 1994; BRADFORD, 2001; PAGANI et al., 2002; LIU et al., 2007).

3.6. Localização bacteriana das β -lactamases

As β -lactamases são enzimas codificadas pelos genes *bla* de localização variável, podendo ser encontradas em cromossomos ou plasmídios. As β -lactamases em bactérias Gram-positivas são em grande parte extracelular, embora, em função de condições do crescimento, algumas enzimas podem se aderir à membrana citoplasmática. Em contrapartida, as β -lactamases em bactérias Gram-negativas são encontradas no espaço periplasmático, embora em baixa frequência extracelularmente (LIVERMORE, 1995; STRATTON, 2000). A habilidade das β -lactamases em conferir resistência depende da localização das enzimas, da eficiência hidrolítica, da quantidade de enzima produzida e das condições físico-químicas do meio (LIVERMORE, 1995).

3.6.1. β -lactamases Cromossômicas em Enterobacteriaceas

As β -lactamases cromossômicas são quase onipresentes em enterobacterias, exceto nas *Salmonellae*, mas variam muito em quantidade, modo de produção e, conseqüentemente, na sua contribuição para resistência. Algumas espécies possuem tipicamente enzimas de classe molecular A, mas a maioria das bactérias possui o tipo Classe C. A expressão pode ser induzida e constitutiva de alto nível, ou constitutiva de baixo nível, de acordo com as espécies e cepas (LIVERMORE, 1995).

3.6.2. β -lactamases Plasmidiais em Enterobacteriaceas e *K. pneumoniae*

O primeiro plasmídio codificando β -lactamase em bactérias Gram-negativas continha o gene TEM-1 e foi descrito em 1960 (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965). Mais de 75 diferentes β -lactamases mediadas por plasmídios têm sido descritos em bacilos Gram-negativas

desde então (BUSH, et al., 1995). Comumente a enzima mais encontrada em enterobactérias é TEM-1, que é responsável pela maioria da resistência a ampicilina observada em cerca de 50% dos isolados de *E. coli*. Os genes TEM-2, SHV-1 e OXA-1 β -lactamases também são disseminados nas enterobactérias, embora eles sejam mais raros do que TEM-1, e muitos outros tipos têm sido identificados em isolados ocasionais (SANDERS e SANDERS, 1992). Geralmente o perfil plasmidial exibido pelas *K. pneumoniae* é bastante heterogêneo (MONTEROS, et al., 1994), sendo portadora de plasmídios de tamanhos variáveis, já foram descritos plasmídios de 6 a 300 kb (DECRE, et al., 1998; LAKSAI et al., 2000; WINOKUR 2001; SZABO et al., 2005; SCHLESINGER et al., 2005; YU et al., 2006). Devido a essa heterogeneidade o perfil plasmidial não pode ser usado como marcador para diferenciar diferentes cepas de *K. pneumoniae* (MONTEROS, et al., 1994).

3.6.3. Síntese e Transferência das ESBLs

A síntese e transferência das β -lactamases de espectro ampliado pode ser cromossomal (constitutiva) e mediada por plasmídios, a mediada por plasmídios é a maior causa de disseminação da resistência bacteriana e pode ser transferida entre bactérias Gram-negativas por conjugação (VILLA et al., 2000). Essa transferência é responsável por surtos de cepas resistentes. Durante os últimos 20 a 50 anos, β -lactamases mediadas por plasmídios tornaram-se comuns em vários gêneros bacterianos. Em geral estes correspondem a mega-plasmídios de mais de 80 KDa, e geralmente possuem outros genes de resistência antimicrobiana; grandes plasmídios expressando multirresistência são encontrados com maior frequência em *K. pneumoniae* do que em *E. coli* (LIVERMORE, 1995) (Tabela 1).

A distribuição das β -lactamases mediadas por plasmídios reflete a transmissibilidade dos elementos disseminados pelos genes. Muitos dos genes que codificam as enzimas estão em transposons, facilitando a disseminação entre os diferentes plasmídios e organismos (LIVERMORE, 1995) (Tabela 1).

3.6.4. Integrans

Genes que codificam β -lactamases *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES} e *bla*_{VEB-1} são encontrados no DNA cromossômico, plasmídios conjugativos ou transposons (HEDGES e JACOB, 1974; PARTRIDGE et al., 2001; CANTÓN et al., 2003; BONNET, 2004). O gene TEM 1 e TEM 2 são carregados por transposons (HERITAGE, et al., 1992). Os genes de SHV podem ocorrer em plasmídios transmissíveis (PRESTON et al., 2004). Recentemente tem aumentado o número de genes de ESBL descobertos em integrans (WELDHAGEN, 2004).

Integrans são descritos como unidades genéticas compostas por sistema de recombinação sítio específica, capazes de integrar, retirar e rearranjar genes que se localizam nos cassetes gênicos de suas estruturas, e podem ser encontrados no DNA cromossomal e extracromossomal (HALL e COLLIS, 1995; RECCHIA e HALL, 1995; GOLDSTEIN, et al., 2001). Integrans diferem de plasmídios por não possuírem um sistema de replicação e difere de transposons por não possuírem um sistema de transposição. São descritos como derivados de transposons, mas incapazes de autotransposição (BROWN, et al., 1996; PARTRIDGE et al., 2001), podendo estar presentes em plasmídios ou transposons (HALL e VOCKLER, 1987; STOKES e HALL, 1989).

Quando os genes que codificam β -lactamases são adquiridos por cepas que abrigam integrans, ampliam-se as possibilidades de seleção destes isolados por uma variedade de antimicrobianos diferentes e a disseminação de tais elementos genéticos (CANTÓN et al., 2003; BONNET, 2004). Transposons e integrans permitem o intercâmbio de genes entre espécies pouco relacionadas, e possuem a informação genética necessária para expressar uma proteína (integrase) implicada na captura e expressão de genes de resistência a múltiplos antibióticos, representando um meio altamente eficiente nos sistemas de recombinação e expressão de genes (AMABILÉ-CUEVAS e CHICUREL, 1992; SALYERS e AMÁBILE-CUEVAS, 1997; DAVIES, 1997).

As vezes os marcadores de resistência às β -lactamases são parte do integron que têm cassetes gênicos que codificam resistência a outras classes de antimicrobianos (POIREL, et al., 2000), como aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim, sulfonamidas ou quinolononas (JACOBY e SUTTON, 1991; VILLA et al., 2000; PARTRIDGE, 2001; PRESTON et al., 2003; WANG et al., 2003; BAQUERO, 2004). Têm aumentado os relatos em várias partes

do mundo de ESBL localizadas em estruturas semelhantes a integrons (CANTÓN et al., 2003; BONNET, 2004).

De acordo com a sequência da integrase se tem classificado os diferentes tipos de integrons. Cinco classes de integrons tem sido relatadas com resistência aos antimicrobianos (JACOBY e SUTTON, 1991; ARAKAWA, et al., 1995; BIRSKI; MAZEL, 2003). Integrons de classe 1 são mais comumente achados em isolados nosocomiais e da comunidade, apresentando resistência aos antimicrobianos, seguido por integron de classe 2 e outras classes de integrons estão sendo relatadas (ROSSER e YOUNG, 1999; GOLDSTEIN, et al., 2001). Os integrons de classe 1 são constituídos por duas regiões de DNA muito conservadas, situada nos extremos. Na região conservada 5' (5'CS), existem 3 elementos necessários para a captura e expressão de genes exógenos (cassetes): o que codifica uma integrase (*intI*), o sítio específico de recombinação (*attI*), e o promotor (*P_{ant}*) para a expressão dos genes do cassette gênico integrado.

A figura 17 representa um esquema geral de integron de classe 1. O primeiro segmento é a região conservada 5'CS, que consiste de *IntI1* e o sítio de inserção *attI1*. As setas indicam a direção da transcrição. O segundo segmento compreende a região conservada 3'CS, que consiste dos genes *qacEΔ1* e *sul1*, determinantes de resistência a desinfetantes (*qacEΔ1*) e sulfamidas (*sul1*), respectivamente. Esses genes são seguidos da *orf513*, que geralmente está relacionada a um sítio de recombinação. Entre os dois segmentos conservados, podem estar inseridos diferentes tipos de genes (cassetes gênicos) de resistência, na figura representados por "I", e um segundo cassette gênico, representado por "II" (MARTINEZ-FREIJO, et al., 1998).

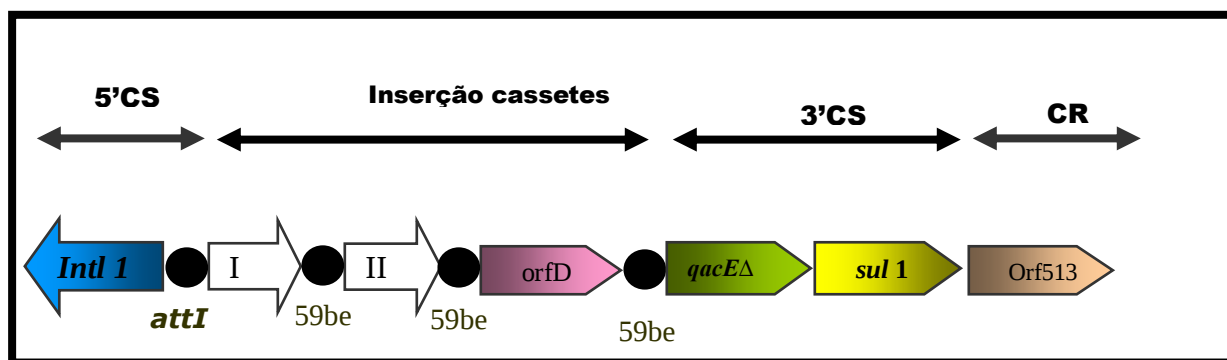


Figura 17. Estrutura esquemática de integron de classe 1. CS: Segmento Conservado; CR: região conservada; I: primeiro cassette gênico integrado na região variável; II: segundo cassette gênico integrado na região variável; 59be: sítios de recombinação.

A definição de um cassete gênico integrado no segmento variável é feita normalmente através do conhecimento do limite do 5'CS e 3'CS (LÉVESQUE, et al., 1995). Oligonucleotídeos que reconhecem o segmento conservado são utilizados para a amplificação da região variável em integrons de classe 1 (Figura 17).

Cassetes gênicos são unidades móveis com um gene geralmente de resistência a antibióticos e um sítio de recombinação que é reconhecido por uma integrase. O cassete associado ao sítio de recombinação, conhecidos como “elemento base 59” (59 be) são localizados adjacentes da inserção dos genes e são de comprimento variável. Esses genes não possuem promotor e o evento de expressão gênica é dependente do promotor presente no integron no qual ele está inserido. Usualmente codificam resistência a antimicrobianos e a desinfetantes (COLLIS e HALL, 1992, RECCHIA e HALL, 1997, BENNETT, 1999; PARTRIDGE et al., 2000).

3.6.5. Infecções por *K. pneumoniae* ESBL-positivas em Recife

Apesar da disseminação de *K. pneumoniae* produtora de enzimas do tipo ESBL em várias regiões do Brasil, dados sobre a ocorrência desse mecanismo de resistência ainda são raros nos hospitais do Nordeste, especialmente em Pernambuco, e muito pouco é conhecido sobre os tipos moleculares de ESBL presentes nesses ambientes (LOPES, et al., 2004). No Hospital Universitário Oswaldo Cruz, reconhecido como hospital de referência para doenças infecciosas na região, um grande número de isolados de *K. pneumoniae* com fenótipo de resistência a cefalosporinas de terceira geração foi identificado nos últimos anos, despertando para a necessidade do conhecimento da frequência com que esse mecanismo de resistência ocorre, bem como dos tipos de ESBL presentes nos isolados bacterianos. A partir dessas informações, condutas terapêuticas adequadas e, conseqüentemente, menores taxas de mortalidade e menores gastos com medicamentos e tempo de internação, serão possíveis. Esse estudo, portanto, se propôs a identificar a prevalência dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, e *bla*_{SHV}, o perfil de susceptibilidade dos isolados ESBL positivos a vários antimicrobianos a presença e caracterização de mecanismos genéticos relacionados a transferência horizontal da resistência, durante um período de quatro anos.

3. 7. Objetivos

3.7.1. Objetivo Geral

Realizar a caracterização molecular de isolados bacterianos de *Klebsiella pneumoniae* com reduzida sensibilidade as cefalosporinas de terceira geração isolados de pacientes internados no HUOC no período de quatro anos.

3.7.2. Objetivos Específicos

- Caracterizar os isolados bacterianos em relação à susceptibilidade a antimicrobianos
- Determinar o polimorfismo genético das linhagens isoladas por técnicas de ribotipagem-PCR
- Investigar a presença de genes de ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX}
- Investigar a presença de estruturas genéticas relacionadas à disseminação de genes de resistência

3.8. Material e Métodos

3.8.1. Isolados bacterianos

Cinquenta e cinco isolados clínicos não repetidos de *K. pneumoniae* foram coletados no período de junho de 2002 a junho de 2005 de pacientes internados no Hospital Universitário Oswaldo Cruz, Recife, Pernambuco, apresentando reduzida sensibilidade as cefalosporinas de terceira geração. Os isolados foram provenientes de amostras clínicas de cultura de sangue, de urina, de cateter, de dreno, de abscesso, e de outras, coletadas a partir de casos de infecções hospitalares classificadas de acordo com os critérios adotados pelo “Centers for Disease Control and Prevention” (CDC) (GARNER, et al. 1998). A identificação dos isolados foi determinada com o uso das técnicas bioquímicas convencionais como: coloração de Gram, fermentação da lactose, produção de indol, utilização de citrato, produção de gás e de urease, motilidade e utilização da ornitina. Os casos que apresentaram alguma dúvida foram confirmados com o aparelho MINI-API 20E (BioMérieux, France).

3.8.2. Ribotipagem por PCR

Para tipificação dos isolados foi utilizada a técnica da ribotipagem por PCR segundo descrito por Lopes et al (2007), com adaptações. A ribotipagem foi realizada através da amplificação das regiões espaçadoras entre os genes do rRNA 16S-23S utilizando os iniciadores descritos por Kostman et al. (1992), K1: 5'-TTG TAC ACA CCG CCC GTCA-3'e K2: 5'-GGT ACC TTA GAT GTT TCA GTT C-3'.

O DNA bacteriano total foi extraído pelo reativo Brazol (LGC Biotecnologia Ltda, São Paulo), conforme instruções do fabricante. As reações de PCR foram realizadas nas seguintes condições (25µl/reação): 20 ng de DNA genômico, 0,25 U de Taq polimerase, 0,16 mM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 1,5 mM MgCl₂, 20 pmol de cada iniciador, 50 mM KCl e 20 mM tris-HCl (pH 8,4). As amplificações consistiram de 30 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C, com um ciclo de alongamento final a 72°C por 7 min. O controle negativo constou de todos os componentes da reação, exceto o DNA genômico.

Os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2.0% em tampão TBE e voltagem constante de 100V, seguido de coloração com brometo de etídio 0,5 g/ml e visualização em transiluminador de luz ultravioleta e fotografados no sistema PhotoCapture. A intensidade de fluorescência de cada banda de DNA foi estimada usando PhotoCap TM software. Todas as reações foram repetidas para confirmação dos resultados.

3.8.3. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

A susceptibilidade a onze antibióticos foi determinada por disco difusão segundo Kirby-Bauer (CLSI, 2005). Os antibióticos testados foram: amoxicilina/ácido clavulânico (20/10 µg), aztreonam (30 µg), cefalotina (30 µg), cefotaxima (30 µg), ceftazidima (30 µg), cefepima (30 µg), ciprofloxacina (5 µg), gentamicina (10 µg), imipenem (10 µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg) e sulfametoxazol/trimetoprim (23,75/1,25 µg). *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram usadas como cepas de controle do teste fenotípico. Os resultados foram interpretados segundo os critérios do CLSI (CLSI, 2005).

3.8.4. Screening para ESBL e confirmação do fenótipo de ESBL

Screening para ESBL foi determinado com o uso de discos de antimicrobianos nas seguintes concentrações: ceftazidima (30µg), aztreonam (30µg) e cefotaxima (30µg), foi considerado sugestivo da produção de ESBL os isolados que apresentaram os seguintes halos: ceftazidima ≤ 17 mm, aztreonam ≤ 22 mm e cefotaxima ≤ 22 mm (CLSI, 2005).

A confirmação da produção de ESBL foi determinada de acordo com Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005). As placas foram inoculadas com suspensão do organismo a testar em turbidez equivalente a 0,5 McFarland. A zona de inibição obtida usando os discos de cefotaxima (30µg) e ceftazidima (30µg) foi comparada com a zona de inibição gerada por cefotaxima adicionada de ácido clavulânico (10µg) e ceftazidima adicionada de ácido clavulânico (10µg) (Oxoid, Madrid, Spain). Os organismos foram classificados como portadores do fenótipo produtor de ESBL quando a zona de inibição produzida pelo disco combinado era 5mm maior do que o correspondente disco impregnado de antimicrobiano sozinho. *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram usadas como controle negativo e positivo da produção de

ESBL, respectivamente (CLSI, 2005). No presente trabalho foi adotado os seguintes perfis de ESBL:

Perfil I: isolado positivo para ESBL apenas com cefotaxima;

Perfil II: positivo para ESBL apenas com ceftazidima;

Perfil III: positivo para ESBL com ambos (cefotaxima e ceftazidima).

3.8.5. Detecção dos genes de ESBL no DNA genômico por PCR

Isolados com fenótipo da produção de ESBL, baseado nos resultados pela técnica de disco-difusão, foram examinados para a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX} por PCR usando iniciadores específicos. Os iniciadores utilizados e as condições de reação estão apresentados na Tabela 5. O DNA molde foi preparado usando uma alça de colônias da bactéria semeada em placa de Agar sangue suspensa em 0,5 ml de água estéril e incubada a 95°C por 10 minutos para lise. Em seguida, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 14.000 rpm durante 10 minutos e o sobrenadante contendo o DNA foi transferido para novo tubo e usado como molde para as amplificações. As condições da PCR foram preparadas em volume total de 25µl por tubo contendo 1 U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), 250 µM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂, 25 pmol de cada iniciador, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 1 µl de sobrenadante do lisado de bactérias contendo DNA. As amplificações foram realizadas em termociclador Hybaid com os programas descritos na Tabela 5. Em cada reação de amplificação foi incluído um controle negativo, que consistia de todos os componentes da mistura de reação, exceto o DNA.

Os produtos de amplificação foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,2% em tampão TBE (Tris-borato 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA 0,002M), visualizados com brometo de etídio (1 µg/ml). Foi utilizado um marcador de peso molecular com 100 pares de base como padrão. Os géis foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados através do software PhotoCap TM, (sistema de foto documentação). A intensidade de fluorescência de cada banda de DNA foi estimada usando PhotoCap TM software. Todas as reações de PCR foram repetidas para confirmação dos resultados.

3.8.6 Extração do DNA plasmidial

Para extração de DNA plasmidial, as linhagens bacterianas foram cultivadas em 2 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion Oxoid)) acrescido de 20µL de uma solução de ceftriaxona 6mg/mL por 16 horas a 37°C. Os plasmídios foram extraídos com uso do kit Wizard®Plus SV Minipreps - DNA Purification System (Promega), de acordo com as orientações do fabricante. As amostras contendo DNA plasmidial foram submetidas à separação eletroforética em gel de agarose a 0,6%, por uma hora, seguida de exposição à luz ultravioleta na presença de brometo de etídio 0,5 µg/ml e captação da imagem em sistema de fotodocumentação. Plasmídios extraídos da linhagem de *E.coli* R861 foram utilizados como padrão para comparação.

Tabela 5. Sequência dos iniciadores e condições de PCR para detecção dos genes *bla* em cepas de *K. pneumoniae* (CAO, et al., 2002).

Gene	Iniciador	Sequência	posição	Condições PCR	Amplicon (pb)
<i>bla</i> _{CTX-M}	MA-1	SCS ATG TGC AGY ACC AGT AA	270–289	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C; 1 min a 56°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	543
	MA-2	CCG CRA TAT GRT TGG TGG TG	794–813		
<i>bla</i> _{SHV}	OS-5	TTA TCT CCC TGT TAG CCA CC	23–42	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 1 min a 53°C; 1 min a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	795
	OS-6	GAT TTG CTG ATT TCG CTC GG	799–818		
<i>bla</i> _{TEM}	C	TCGGGGAAATGTGCGCG	90–105	1 ciclo de 2 min a 94°C; 30 ciclos de 45 seg a 94°C, 45 seg a 52°C; 45 seg a 72°C; 1 ciclo de 10 min a 72°C	972
	D	TGCTTAATCAGTGAGGCACC	1042–1062		

3.8.7. Detecção dos genes de ESBL no DNA plasmidial por PCR

A presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} foi investigada usando-se as preparações plasmidiais como molde, através de PCR com iniciadores específicos (Tabela 5), segundo Cao et al. (2002). As reações de PCR foram realizadas nas mesmas condições do DNA genômico (Tabela 5). Os produtos de amplificação foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados através do software PhotoCap TM, (sistema de foto documentação). A intensidade de fluorescência de cada banda de DNA foi estimada usando PhotoCap TM software. Todas as reações de PCR foram repetidas para confirmação dos resultados.

3.8.8. Detecção de Integron por PCR

A presença de elementos integrons no genoma dos isolados ESBL-positivos foi determinada por PCR em reações de volume de 25µl por tubo contendo 1 U da enzima *Taq*DNA polimerase (Invitrogen), 0,25 mM de cada desoxirribonucleotídeo trifosfato, 1,5 mM de MgCl₂, 25 pmol de cada iniciador, 50 mM de KCl, 20 mM de Tris-HCl pH 8,4 e 1 µl do lisado celular preparado como descrito acima. Foram utilizados os iniciadores IntI1-F/IntI1-R que reconhecem seqüências específicas da integrase de classe 1 (MAZEL et al., 2000). Os iniciadores 5'CS/3'CS são complementares à região variável do integron de classe 1 e amplificam os cassetes gênicos onde podem estar localizados os genes ESBL (LEVESQUE et al., 1995). Os Iniciadores e as condições de PCR estão listados na Tabela 6. Os géis foram visualizados em luz ultravioleta e fotografados através do software PhotoCap TM, (sistema de foto documentação). A intensidade de fluorescência de cada banda de DNA foi estimada usando PhotoCap TM software. Todas as reações de PCR foram repetidas para confirmação dos resultados.

3.8.9. Clonagem dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos da amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV} e da região variável 5'CS-3'CS foram clonados no pGEM-t Vector System (Promega) específico para clonagem de fragmentos de PCR. Os amplicons foram purificados com o kit GFX-TM PCR (Amersham Bioscience, Suécia), conforme instruções do fabricante. Depois de purificados, os amplicons foram quantificados a partir de eletroforese em gel de agarose a partir da comparação visual com

o marcador λ -HindIII (SAMBROOK et al, 1989). A ligação dos amplicons no vetor foi realizada segundo a reação mostrada na Tabela 7, no volume final de 10 μ l. A quantidade de água e do amplicon eventualmente variaram de acordo com a quantificação do DNA purificado e tamanho dos amplicons. A reação foi realizada em microtubo de 200 μ l, incubado a 23°C por 1 hora (termociclador Mj96G Thermo HBPXEO2) e a 4° C por 16 horas (termociclador Mj96G Thermo HBPXEO2).

Tabela 6. Sequência dos iniciadores e condições de PCR para detecção de integrons de classe 1.

Iniciador	Seqüência (5'-3')	Alvo	Condições PCR	Referência
IntI1-F	GGT CAA GGA TCT GGA TTT CG	Gene <i>IntI1</i>	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 62°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C	Mazel et al., (2000)
IntI1-R	ACA TGC GTG TAA ATC ATC GTC	Gene <i>IntI1</i>		
Sul.F	TGG TGA CGG TGT TCG GCA TTC	3'-CS (<i>sul I</i>)	A mesma de IntI1	Mazel et al., (2000)
Sul.R	GCG AAG GTT TCC GAG AAG GTG	3'-CS (<i>sul I</i>)		
5'CS	GGC ATC CAA GCA GCA AG	Cassette gênico	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 5 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C	Levesque et al., (1995)
3'CS	AAG CAG ACT TGA CCT GA	Cassette gênico		
qacEA1F	ATC GCA ATA GTT GGC GAA GT	3'-CS (qacEA1)	A mesma de IntI1	Power et al., (2005)
qacEA1B	CAA GCT TTT GCC CAT GAA GC	3'-CS (qacEA1)		
F12D	GTA TTG CGC CGC TCT TAG AC	<i>Sul1+orf513</i>	1 ciclo de 5 min a 94°C; 30 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 55°C, 1 min a 72°C; 1 ciclo de 8 min a 72°C	Power et al., (2005)
F12R	AAA CCA GCA TGG TTG GCT AC	<i>Sul1+orf513</i>		

Tabela 7. Reação de ligação para clonagem no vetor pGEM-t

Componentes	Produto PCR (100 ng/μl)	Controle positivo (4 ng/μl)
Água Milli-Q estéril	2,0 μl	0,75 μl
Tampão 2X	5,0 μl	5,0 μl
Vetor pGEM-T (50ng/μl)	1,0 μl	1,0 μl
Amplicon	1,0 μl	2,25 μl
T4 DNA ligase	1,0 μl	1,0 μl

Depois da ligação, o DNA recombinante foi introduzido em células de *E. coli* DH10α de acordo com o método de transformação química (SAMBROOK et al., 2001). As células bacterianas foram tornadas quimio-competentes com cloreto de cálcio (SAMBROOK et al., 2001) como descrito a seguir:

1. As células bacterianas foram cultivadas em meio LB a 37°C por cerca de 16 horas.
2. Um volume de 2 ml da pré-cultura foi utilizado para inocular 500 ml de meio LB e as células foram cultivadas a 37°C sob agitação vigorosa até que a cultura atingisse absorbância A600 de 0,5.
3. A cultura foi incubada no gelo por 5 minutos e distribuída em tubos tipo falcon de 50 ml e centrifugada a 4.000 rpm por 8 minutos a 4°C.
4. O meio de cultura foi descartado e o sedimento celular foi suspenso com 30 ml da solução gelada de CaCl₂ a 100 mM em cada tubo.
5. As células foram incubadas no gelo por 30 minutos.
6. Depois da incubação, as células foram centrifugadas a 4.000 rpm por 10 minutos a 4°C e o meio de cultura foi descartado.
7. O sedimento celular em cada tubo foi gentilmente acrescido com 5 ml de solução de transformação gelada contendo CaCl₂ a 100 mM e glicerol a 15%.
8. As células foram aliquotadas em microtubos e armazenadas a -80 °C.

A transformação foi realizada misturando-se 25 μl de tampão de transformação (SAMBROOK et al., 2001) com 50 μl de células competentes. Todo o conteúdo da ligação

(~10µl) foi adicionado por homogeneização gentil e a mistura foi incubada por 30 minutos no gelo, seguido de incubação por 5 minutos em banho-maria a 42°C. Depois da transformação, as células foram semeadas com alça de Drigaski em placas de Petri contendo meio LB/ampicilina (100 µg/ml), IPTG (0,5 mM), X-Gal (0,05mg/ml). Logo após as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 16 horas. As colônias que apresentaram cor branca, ou seja, que possuíam o plasmídeo contendo um inserto dos produtos da PCR, foram transferidas separadamente para frascos contendo 10 ml de meio LB com ampicilina (100µg/ml) e incubadas por 16 horas para extração plasmidial.

3.8.10. Extração plasmidial (mini-prep) para sequenciamento

O DNA plasmidial das bactérias transformadas foi extraído segundo a técnica de mini-prep descrita por Sambrook et al (1989), com as adaptações descritas a seguir:

1. As culturas foram centrifugadas por 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente;
2. O sobrenadante foi desprezado completamente;
3. O sedimento celular foi ressuspensão em 100µl da solução I gelada (Glicose a 50 mM, Tris-HCl (pH 8.0) a 25 mM e EDTA (pH 8.0) a 10 mM) e homogeneizado por agitação em vórtex e transferido para microtubo;
4. Logo após foram adicionados 200 µl da solução II (NaOH a 0,2mM e SDS a 1%) preparada na hora e as células foram lisadas por inversão suave dos tubos por 10 vezes;
5. O lisado foi incubado em gelo por 5 minutos;
6. Foram adicionados 150 µl da solução III (*ver abaixo) gelada seguido de homogeneização por inversão suave por 10 vezes;
7. A mistura foi incubada em gelo por 5 minutos;
8. Os tubos foram centrifugados a 14 000 rpm por 2 minutos e o sobrenadante foi transferido para novo tubo;
9. Ao sobrenadante foi adicionado igual volume de isopropanol gelado (aprox. 400 µl) e a mistura foi homogeneizada por inversão suave por 10 vezes;
10. Os tubos foram centrifugados a 14 000rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi descartado;

11. O sedimento (correspondente ao DNA plasmidial e RNA total) foi lavado com 200 µl de etanol a 70% gelado (adicionou-se etanol, os tubos foram invertidos sem ressuspender o sedimento e centrifugados rapidamente e o etanol foi completamente descartado);
12. O sedimento foi seco a temperatura ambiente por inversão dos tubos em papel de filtro ou por incubação em estufa a 37° por 15 minutos;
13. O sedimento foi ressuspensão em 30 µl de água deionizada e estocado a -20°C.

*solução III: 20 ml de Acetato de Potássio a 5 M; 11,5 ml de Ácido Acético Glacial; 28,5 ml de água deionizada

3.8.11. Sequenciamento de nucleotídeos dos fragmentos clonados

Os fragmentos correspondentes aos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} (CAO, et al., 2002) e o fragmento correspondendo a região variável 5'CS- 3'CS (LEVESQUE et al., 1995) que foram clonados no vetor pGEM-t foram submetidos a seqüenciamento, utilizando o termociclador: 96-Well GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems. Os insertos foram submetidos a dois ciclos de sequenciamento (forward e reverse) contendo 200-500 ng de DNA plasmidial, 3,2 pmol do iniciador M13, Tampão de PCR 1X, BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e Água Milli-Q para volume final de 10 µl. Utilizando o seguinte programa: 94°C por 2 min; 40 ciclos a 94 °C por 15 segundos, 55°C 10 segundos e 60°C 4 minutos; sendo mantido a 4°C sempre. Depois a placa seguiu para o Seqüenciador ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer do fabricante Applied Biosystems (Figura 18).

As seqüências obtidas foram analisadas no programa BioEdit e comparadas às seqüências disponíveis no banco de dados *GenBank* (<http://www.ncbi.nih.gov/BLAST>).

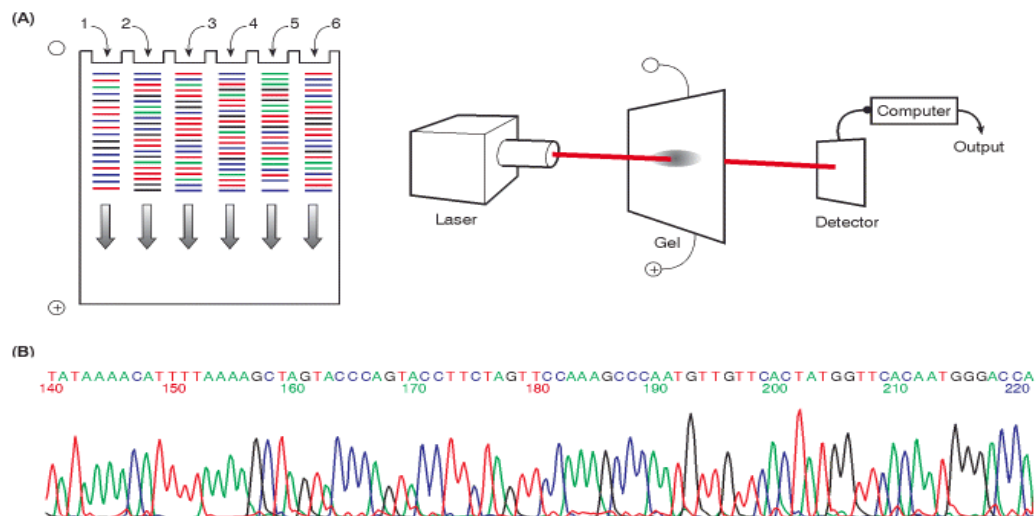


Figura 18. Seqüenciamento automatizado de DNA utilizando iniciadores fluorescentes. (A) Princípio de seqüenciamento automatizado de DNA. (B) Exemplo de cromatograma (picos coloridos) e seqüência de nucleotídeos (STRACHAN e READ, 1999).

3.9. Resultados

3.9.1. Resultado do fenótipo de resistência dos isolados produtores de ESBL

Os dados da atividade de vários agentes antimicrobianos contra isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram resumidos na Tabela 8. Foram testados β -lactâmicos, β -lactâmicos combinados com inibidor de β -lactamase, aminoglicosídeos, fluorquinolona, sulfametoxazol/trimetoprim e os carbapenêmicos que são considerados drogas potencialmente ativas contra organismos produtores de ESBL.

Todos os cinquenta e cinco isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes a cefalotina (dados não mostrados), mas apresentaram variável grau de resistência aos outros antimicrobianos. O percentual de isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim foi de 94,5% (52/55), com apenas três isolados sensíveis na amostragem (Tabelas 8 e 11).

A resistência a gentamicina se manteve com poucas variações durante o período, com exceção de 2004 que apresentou um aumento evidente da resistência e no ano seguinte voltou ao índice anterior. Por outro lado a resistência a ciprofloxacina quadruplicou durante o período de estudo, atingindo 57,1% dos isolados em 2005, sendo freqüente a associação da resistência a ciprofloxacina em isolados produtores de ESBL.

As drogas potencialmente ativas contra isolados de *K. pneumoniae* incluem β -lactâmicos (cefalosporinas), β -lactâmicos combinados com inibidor de β -lactamase, carbapenêmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. Nas Tabelas 8 e 11, podemos identificar o perfil de resistência a drogas potencialmente ativas para *K. pneumoniae* (cefotaxima, ceftazidima, cefepime, aztreonam, piperacilina/tazobactam, ciprofloxacina e gentamicina). Observou-se que 60% dos isolados apresentaram resistência a cefepime, 71% foram resistentes a aztreonam, 36,4% dos isolados apresentaram resistência a piperacilina/tazobactam, 40,0% dos isolados apresentaram resistência a gentamicina e 34,5% apresentaram resistência a ciprofloxacina (Tabela 8).

As cefalosporinas de terceira geração, cefotaxima e ceftazidima, são utilizadas para uma primeira triagem na suspeita da produção de ESBL pelo isolado. Há casos em que a resistência à

cefotaxima é melhor indicador da produção de ESBL; em outros, a ceftazidima se mostra como melhor indicador e há, ainda, aqueles em que a resistências às duas cefalosporinas ocorre igualmente, como foi detectado neste trabalho, com a determinação de diferentes perfis fenotípicos de ESBL (Figura 19). Este efeito depende das beta-lactamases presentes nos isolados. Foi observado que nesse estudo a atividade hidrolítica para cefotaxima apresentou-se como melhor indicadora da produção de ESBL (cefotaxima 45%) não sendo encontrada resistência a ceftazidima sozinha (Tabela 9).

Tabela 8. Percentual de resistência a vários antimicrobianos, apresentada por isolados clínicos de *K. pneumoniae*.

Antimicrobianos	2002	2003	2004	2005	2002/2005
	%	%	%	%	%
Gentamicina	35,7	33,3	53,3	35,7	40,0
Ciprofloxacina	14,3	25,0	40,0	57,1	34,5
Cefepime	35,7	50,0	73,3	78,6	60,0
Aztreonam	57,1	66,6	80,0	78,6	71,0
Piperacilina/tazobactam	28,5	33,3	20,0	64,3	36,4
Sulfatetoxazol-trimetoprim	92,9	100,0	93,3	92,9	94,5
Imipenem	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Tabela 9. Percentual de resistência *in vitro* para β -lactâmicos de espectro estendido, frente a solados clínicos de *K. pneumoniae* de 2002 a 2005.

β -lactâmicos	2002	2003	2004	2005	2002-2005
	(n) %	(n) %	(n) %	(n) %	(n) %
Cefotaxima	7 (50%)	4 (33%)	7 (47%)	7 (50%)	25 (45%)
Ceftazidima	0	0	0	0	0
Ambos	7 (50%)	8 (67%)	8 (53%)	7 (50%)	30 (55%)
Total	14 (100%)	12 (100%)	15 (100%)	14 (100%)	55 (100%)

No presente trabalho, o perfil III foi o mais encontrado em cada ano e durante todo o período do estudo, com 39 dos 55 isolados (71%), seguido do perfil I com 16 dos 55 isolados (29%). Não foi detectado isolado pertencente ao perfil II (Figura 19).

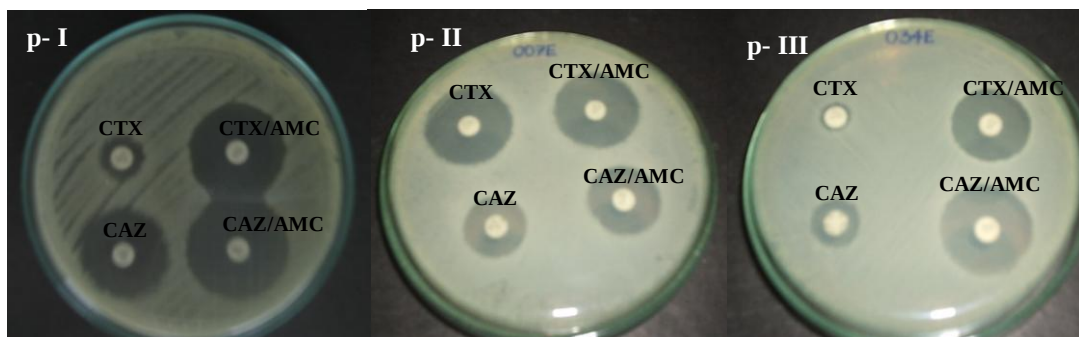


Figura 19. Foto representativa do teste confirmatório do fenótipo para ESBL. Em p-I representação do perfil I em que houve aumento do tamanho do halo de inibição entre o disco de cefotaxima e cefotaxima adicionado de ácido clavulânico, em p-II representação do perfil-II apresentando aumento do halo de inibição entre o disco de ceftazidima e ceftazidima combinada com ácido clavulânico, em p-III representação do perfil III em que houve aumento do halo de inibição de ambos cefotaxima e ceftazidima quando combinados com ácido clavulânico.

3.9.2. Ribotipagem por PCR dos isolados clínicos

A ribotipagem por PCR permitiu identificar oito padrões distintos de amplificação da região intergênica 16S-23S do loco de DNA ribossomal nas amostras clínicas de *K. pneumoniae*, com número e tamanho variáveis dos fragmentos de amplificação. Os amplicons gerados variaram de 545 a 1215 pb, apresentando de dois a quatro amplicons por isolado. As amostras foram agrupadas em oito ribotipos:

- R-1: 833 pb, 731 pb e 577 pb,
- R-2: 904 pb, 764 pb e 602 pb,
- R-3: 1215 pb, 1095 pb e 835 pb,
- R-4: 1165 pb, 1080 pb, 949 pb e 775 pb,
- R-5: 969 pb, 862 pb e 700 pb,
- R-6: 1000 pb e 789 pb,
- R-7: 764 pb, 670 pb e 545 pb e
- R-8: 970 pb, 881 pb, 772 pb e 600 pb.

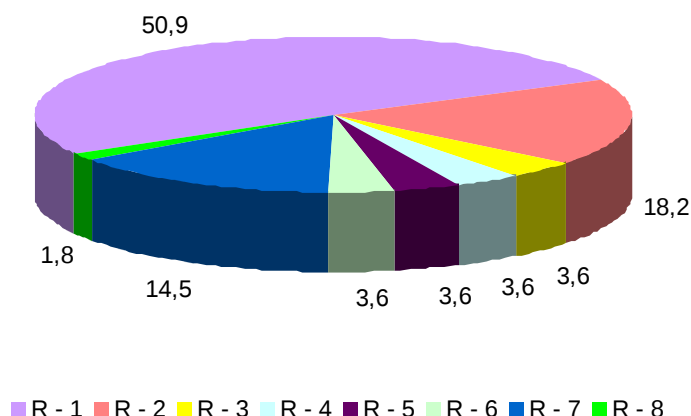


Figura 20. Percentual dos isolados de *K. pneumoniae* distribuídos de acordo com os diferentes ribotipos.

Dos isolados analisados o perfil R-1 foi o mais encontrado, com 50,9% dos isolados, e esteve presente em todo o período estudado, assim como R-2. Os perfis R-3 e R-4 foram observados em 3,6% dos isolados, estiveram presentes em 2002 e logo após desapareceram. O perfil R-5 esteve presente somente em 2002 e 2004, R-6 só surgiu em 2003, R-7 surgiu a partir de 2003 permanecendo até o final do estudo. Já o perfil R-8 esteve presente somente em um isolado de 2004 (Kl-70). Não foi encontrada relação entre os ribotipos e o perfil de susceptibilidade (Figura 20).

3.9.3. Detecção dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV}

Foi investigada a presença dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} codificam a produção de enzimas específicas (ESBLs) por PCR específica (Figura 21) e confirmada posteriormente por seqüenciamento. Todos os 55 isolados tinham no mínimo uma cópia dos genes estudados. Trinta e cinco isolados (63,6%) produziram um fragmento de 972pb correspondente ao gene *bla*_{TEM}, 35 isolados (63,6%) produziram um fragmento de 540pb correspondente ao gene *bla*_{CTX-M} e 44 isolados (80%) produziram um fragmento de 800pb correspondente ao gene *bla*_{SHV}, sendo o SHV o mais prevalente nas amostras estudadas (Tabela 10). A determinação da sequência dos produtos de PCR obtidos dos isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL por testes fenotípicos, confirmaram a identificação dos genes.

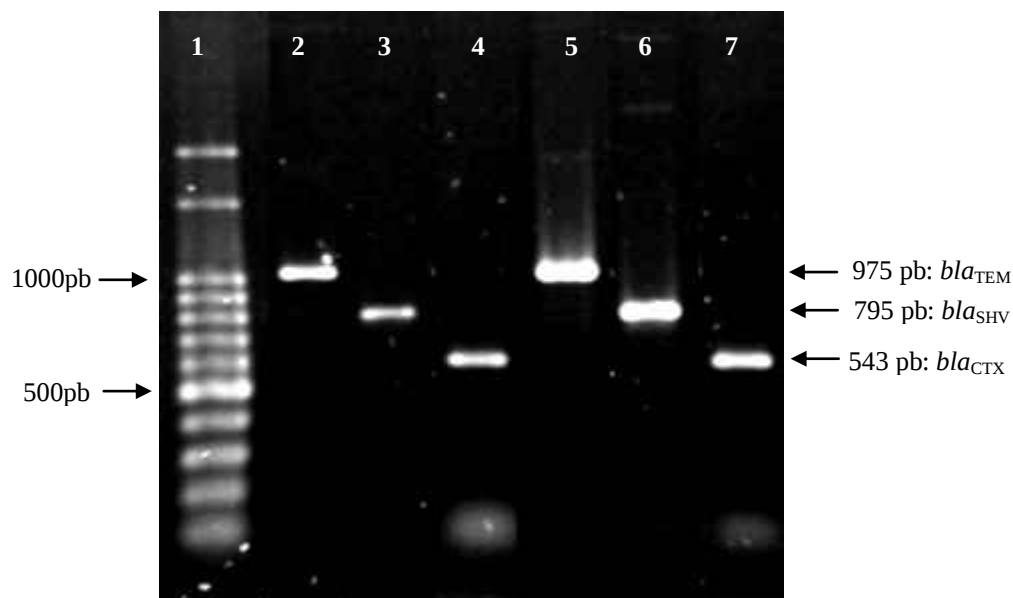


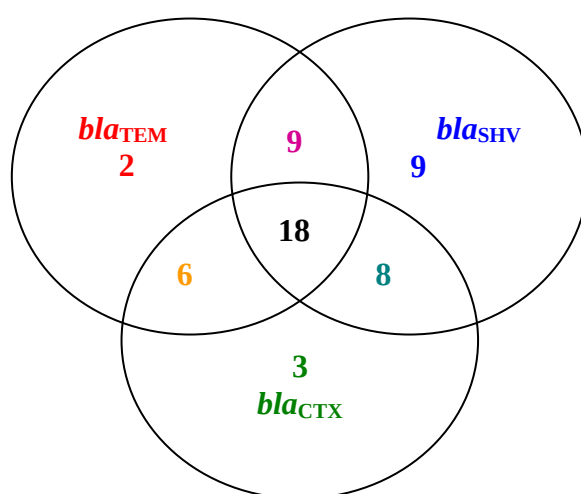
Figura 21 Gel representativo da amplificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX} de isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Linha 1: marcador de 100pb (invitrogen), *bla*_{TEM} (linhas 2 e 5), *bla*_{SHV} (linhas 3 e 6) e *bla*_{CTX}, (linhas 4 e 7) dos isolados: 4M (linhas 2 a 4) e K119 (linhas 5 a 7).

O número de β -lactamases produzidas por isolado foi: uma β -lactamases (25,5%; 14 isolados), duas β -lactamases (41,8%; 23 isolados), três β -lactamases (32,7% 18 isolados) (Tabela 10). O gene *bla*_{SHV} foi detectado como único gene de ESBL em 9 dos 55 isolados (16,4%). Já os genes *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX} foram detectados como genes únicos em apenas 2 isolados (3,6%) cada. A maioria dos isolados (74,5%) apresentou mais de um gene de ESBL (Tabela 10). Seis isolados (10,9%) possuíam associados *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M}, nove isolados (16,4%) possuíam *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV}, oito isolados (14,5%) *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV}. A associação de dois genes esteve presente em 23 isolados (41,8%) e dezoito isolados (32,7%) *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}, e *bla*_{SHV}. Associação entre dois e três genes esteve presente em 74,5% dos isolados (Tabela 10 e Figura 22).

No presente estudo a quantidade dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} por isolado apresentou tendência de aumento ao longo dos anos estudados. Em 2002 foi observada a frequência de 1,71 gene/isolado aumentando para 1,91 gene/isolado em 2003, 2,20 genes/isolado em 2004 e 2,42 genes/isolado em 2005.

Tabela 10. Distribuição dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} dentre os isolados clínicos de *K. pneumoniae* no período de estudo.

Ano	Genes ESBL únicos			Genes associados			
	TEM	SHV	CTX	TEM+CTX	TEM+SHV	CTX+SHV	TEM+CTX+SHV
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	N (%)	n (%)	n (%)
2002	0	6 (42,9)	1 (7,1)	1 (7,1)	3 (21,4)	0	3 (21,4)
2003	1 (8,3)	2 (16,7)	1 (8,3)	0	1 (8,3)	4 (33,3)	3 (25,0)
2004	1 (6,7)	1 (6,7)	0	2 (13,3)	4 (26,7)	2 (13,3)	5 (33,3)
2005	0	0	1 (7,1)	3 (21,4)	1 (7,1)	2 (14,3)	7 (50,0)
Total	2 (3,6)	9 (16,4)	3 (5,5)	6 (10,9)	9 (16,4)	8 (14,5)	18 (32,7)

**Figura 22.** Diagrama de Venn apresentando o número de isolados bacterianos com um, dois ou os três genes ESBL, como representação gráfica da Tabela 10.

3.9.4. Análise do conteúdo plasmidial

A análise do conteúdo plasmidial foi realizada em quatorze isolados, representativos de cada ano estudado. Os tamanhos dos plasmídios variaram de 6,9 a 74,2 kb. Apenas um isolado não apresentou plasmídios. Nos demais, a quantidade de plasmídios variou de um a sete por isolado (Figura 23). Embora alguns isolados tenham mostrado possuir plasmídios de tamanhos muito semelhantes, não foram detectados perfis plasmidiais idênticos.

As amostras de DNA plasmidial dos isolados foram utilizadas para a investigação da presença dos genes de ESBL por PCR específica. Os resultados demonstraram presença do gene *bla*_{TEM} em 83,3 %, do gene *bla*_{SHV} em 61,0 % e do gene *bla*_{CTX} em 75,0 % das amostras estudadas (Figura 24). Nos isolados testados, 44,0% apresentaram a presença simultânea dos três genes investigados.

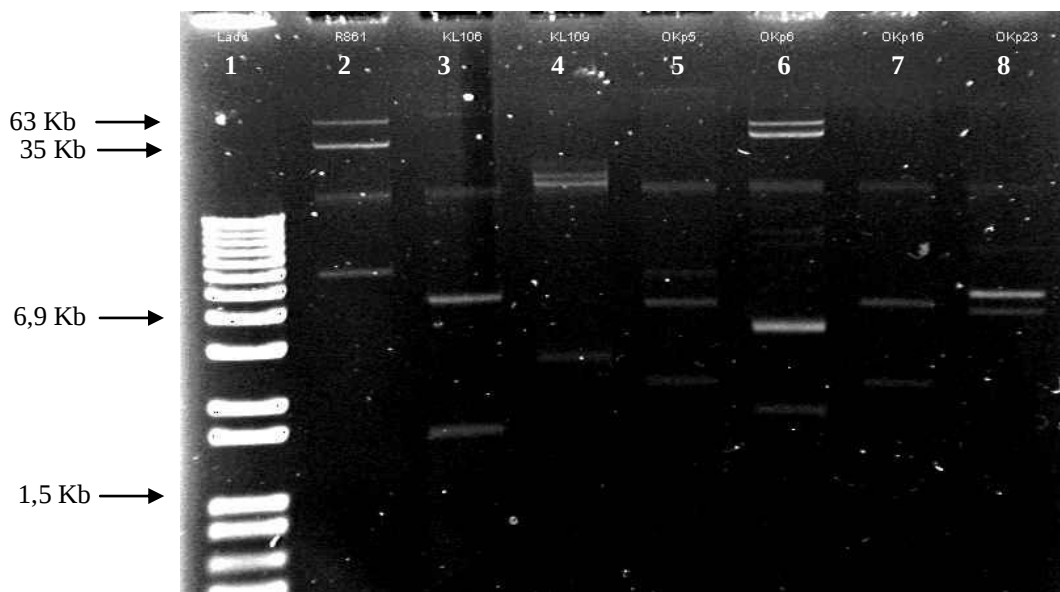


Figura 23. Gel representativo da detecção dos plasmídios em *Klebsiella pneumoniae*. Linha 1: ladder 250 pb, linha 2: DNA plasmidial de *E. coli* R861, linhas 3-8: isolados de *K. pneumoniae*.

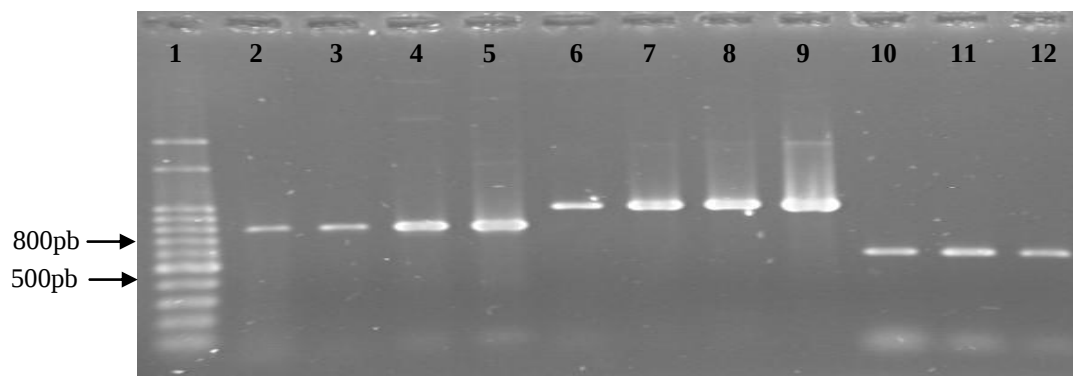


Figura 24. Gel representativo da amplificação dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX} nas amostras de DNA plasmidial de isolados de *Klebsiella pneumoniae*. Linha 1: marcador molecular de 100pb; Linhas 2 a 5: *bla*_{SHV}; Linhas 6 a 9: *bla*_{TEM}. Linhas 10 a 12: *bla*_{CTX}.

3.9.5. Detecção de integrons em isolados de *K. pneumoniae*

Entre os 55 isolados analisados, em 50 (91%) deles foi detectado um fragmento de 500 pb correspondente ao gene *intI1*, codificador da integrase de classe 1, indicador do integron de classe I (Figura 25). A prevalência de isolados portadores do integron de classe 1 manteve-se alta no período de 2002 a 2005, variando de 85,7% em 2002 a 93,3% em 2004.

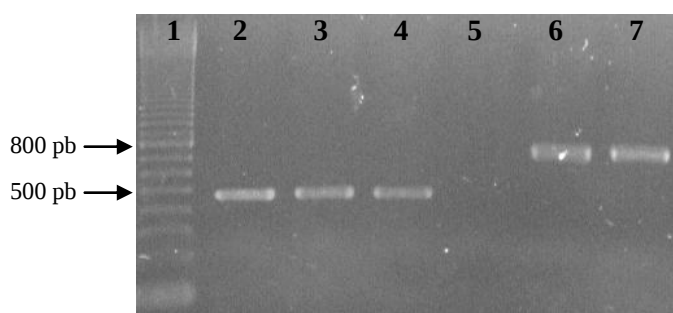


Figura 25. Gel representativo da presença do integron pela amplificação dos genes *IntI1* e *sul 1*. Linha: 1 Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); linhas de 2 a 4 : gene *IntI1*; linha 5: controle negativo; linhas 6 e 7 amplificação do gene *sul 1*.

3.9.6. Mapeamento dos integrons

Os integrons de classe 1 estão constituídos por duas regiões de DNA muito conservadas. Na região conservada 5' (5'CS) existem 3 elementos necessários para a captura e expressão de genes exógenos (cassetes): um gene que codifica uma integrase (*intI*), um sítio de recombinação específica (*attI*) e um promotor (P_{ant})

A região conservada 3' (3'CS) contém os genes *qacEΔ1* (determinante de resistência a compostos de amônia quaternária) e *sulI* (confere resistência a sulfanamidas).

Entre as duas regiões conservadas fica a região variável 5'-3'CS, onde podem ser inseridos vários tipos de genes (cassetes gênicos) de resistência. A combinação de iniciadores para as regiões conservadas 5'-CS e 3'-CS é geralmente utilizada para a amplificação da região variável em integrons de classe 1. Além dessa estrutura, alguns integrons podem apresentar uma duplicação do segmento conservado 3'-CS cada uma contendo os genes *qacEΔ1* e *sul1*. As duas

regiões 3'-CS circundam uma região comum (CR), que contém a orf513, que pode atuar como recombinase no recrutamento de novos genes de resistência.

Os genes *qacEΔ1* e *sul1* foram detectados em todos os isolados que amplificaram o gene *Int11* (50 de 55 isolados). Na amplificação por PCR para o gene *sul1* foi gerado um único amplicon de aproximadamente 800 pb e para o gene *qacEΔ1* foi gerado um amplicon de aproximadamente 200 pb (Figuras 25 e 26).

Na figura 26 observa-se o fragmento amplificado de aproximadamente 500 pb do gene *Int11*, a região variável (5'-3'CS) com 1448 pb, o gene que confere resistência a amônio quaternário *qacEΔ1* de 200 pb, o gene *sul1* de 800 pb e o produto amplificado que corresponde a região contendo os genes *sul1* e orf513 com 1894 pb presentes no integron de classe 1 do isolado 4M. Nove isolados foram investigados através de PCR, para determinar o tamanho aproximado dos cassetes gênicos inseridos entre os segmentos conservados do integron de classe 1. Nesses isolados, foram obtidos amplicons de 700, 1448 e 1633 pb, sendo utilizado o isolado 4M para os experimentos de mapeamento físico do integron (Figura 27).

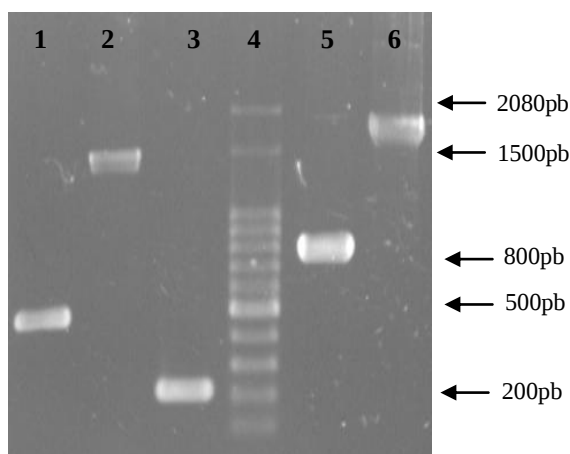


Figura 26. Gel representativo da amplificação de vários genes do integron de classe 1. Gene *Int11* (linha 1), da região variável 5'CS-3'CS (linha 2), do gene *qacEΔ* (linha 3), do marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen) (linha 4) do gene *sul1* (linha 5) e da região que compreende os genes *sul1* e ORF513 (linha 6), para mapeamento físico do integron de classe 1 do isolado 4M.

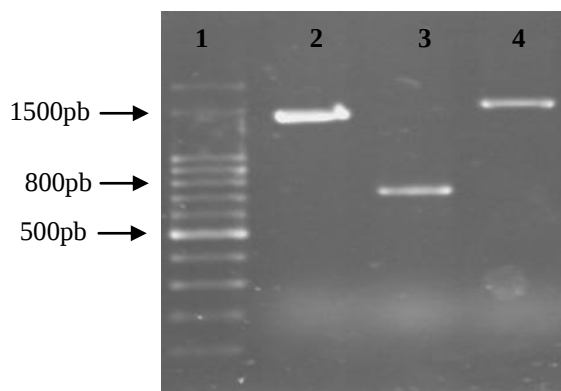


Figura 27. Gel representativo da região variável 5'-3'CS de integrons de classe 1. Eletroforese em gel de agarose a 1,2% apresentando os produtos de PCR gerados com os iniciadores 5'CS-3'CS de três isolados de *K. pneumoniae*, Linha : 1 Marcador 100 bp DNA Ladder (Invitrogen); linha 2: isolado 4M (2002); linha 3: isolado K119 (2004); linha 4: isolado OKp6 (2005);

Utilizando os iniciadores 5'-CS na direção “forward” e 3'-CS na direção “reverse” (Tabela 6), que são correspondentes aos terminais dos segmentos conservados 5'-CS e 3'-CS, respectivamente, foi obtido um fragmento de aproximadamente 1448 pb, correspondente a região variável desse isolado (Figuras 26 e 27). Usando PCR e seqüenciamento, foi determinado o conteúdo do fragmento variável do integron no isolado clínico selecionado. Esse fragmento foi seqüenciado e revelou a presença dos genes *dfrA* de 591 pb e *aadA* de 800pb, os quais codificam as enzimas dihidrofolato redutase (resistência a trimetoprim) e adeniltransferases (resistência a estreptomicina), respectivamente. A combinação dos iniciadores *qacEΔI*F e *sul1*R (Tabela 6), que anelam no início e no final da região conservada 3'-CS, respectivamente, gerou um fragmento de aproximadamente 1100 pb, cujo tamanho corresponde a soma dos fragmentos obtidos pela amplificação dos genes isolados *qacEΔI* e *sul1* (Figura 28).

A combinação dos iniciadores F₁₂D na direção “forward” e F₁₂R, na direção “reverse” que anelam no meio do gene *qacEΔI* e no final da orf513, respectivamente, gerou um fragmento de aproximadamente 1894 pb, confirmando a existência, nesse integron da região CR e utilizando-se a combinação dos iniciadores CTX-F e 3'-CS, obteve-se um fragmento de 1319 pb, indicando a presença do gene *bla*_{CTX} fora da região variável, e a presença de uma segunda região 3'-CS (Figura 28).

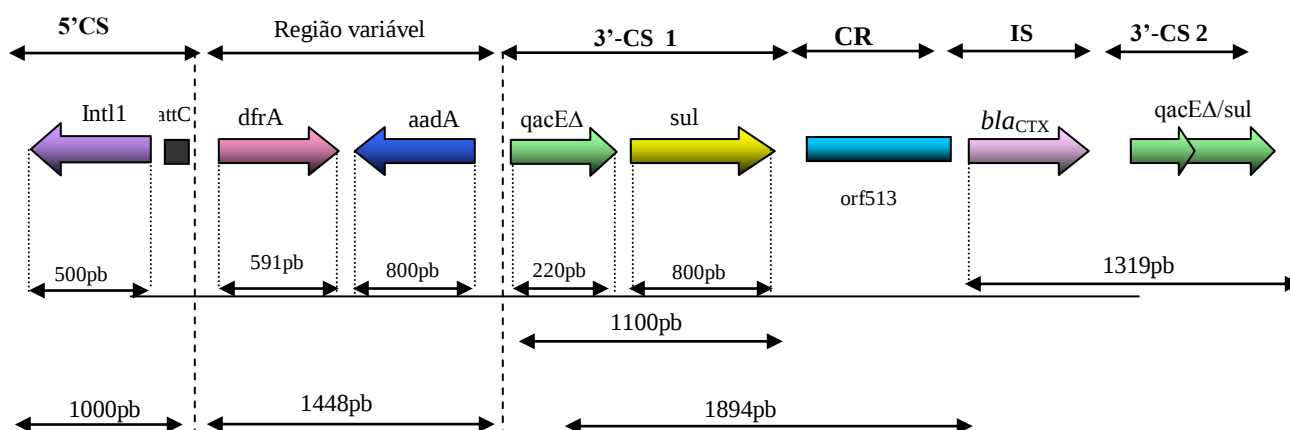


Figura 28. Esquema representativo da estrutura do integron de classe 1 (sem escala) no isolado 4M de *K. pneumoniae*. Os genes são representados por setas indicando a direção de transcrição, os tamanhos dos fragmentos foram estimados.

3.9.7. Análise genética e fenotípica geral dos isolados de *K. pneumoniae*

A resistência a sulfametoxazol/trimetoprim, droga que é fortemente ligada a presença de integrons de classe 1 no genoma bacteriano, permaneceu alta no período estudado 92,9% em 2002 a 100% em 2003. No entanto, foi possível observar que dois dos três isolados que não amplificaram com iniciadores específicos para o integron de classe I apresentaram resistência a sulfametoxazol.

Foi observado a relação entre a ausência do integron de classe 1 e a ausência do gene *bla*_{CTX-M}, embora todos esses isolados integron-negativos tenham apresentado resistência a cefotaxima. Os quatro isolados que não amplificaram para gene do integron de classe 1 não foi encontrado o gene *bla*_{CTX-M}, apenas possuíam o gene *bla*_{SHV} como gene único ou associado a *bla*_{TEM}.

A resistência a cefotaxima está geralmente associada ao gene *bla*_{CTX-M}. No entanto, alguns isolados que não apresentaram amplificação do gene *bla*_{CTX-M} foram resistentes a cefotaxima e eram portadores do integron de classe 1 (Tabela 11).

Quando os isolados foram analisados em relação a associação de resistência aos antimicrobianos e presença dos genes de β -lactamases, observou-se que nos isolados contendo os três genes, houve aumento na frequência de resistência aos antimicrobianos testados.

Durante o período do estudo todos os isolados apresentaram sensibilidade ao imipenem, que a droga mais ativa contra isolados produtores de ESBL.

Ao comparar os resultados de ribotipagem com as demais características apresentadas na Tabela 11, não foi encontrada associação entre os ribotipos e o perfil de resistência, bem como entre os ribotipos e os genes para ESBL.

Tabela 11. Perfil fenotípico e genético de isolados de *K. pneumoniae* 2002/2005.

Isolados	Resistência por disco-difusão	ESBL (perfis)	rDNA (perfis)	Tipos de genes para ESBL (<i>bla</i>)	Integron de Classe 1
2002					
4M	SUL, GEN, CTX, CAZ CPM, ATM, PIP/TZ	1	R-1	TEM, CTX, SHV	+
48M	SUL, GEN, CTX, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-2	TEM, CTX, SHV	+
114M	SUL, GEN, CTX	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+
153M	SUL, CTX, CAZ, ATM	3	R-2	SHV	+
193M	SUL, CTX, CAZ, ATM,	3	R-1	TEM, SHV	+
271M	SUL CTX, CAZ, ATM	3	R-3	SHV	+
284M	SUL CTX, CAZ, CPM, ATM,	3	R-1	SHV	+
290M	SUL, CTX	3	R-4	CTX	+
313M	SUL CTX, CAZ, ATM	3	R-3	SHV	+
355M	SUL, CIP, CTX	3	R-5	SHV	+
359M	SUL, GEN, CTX, CPM, PIP/TZ	1	R-1	TEM, CTX	+
380M	SUL, GEN, CIP, CTX, CPM, PIP/TZ	1	R-4	TEM, SHV	+
383M	SUL, CTX, CAZ, ATM	3	R-2	SHV	-
458M	CIP, CTX	3	R-1	TEM, SHV	-
2003					
478M	SUL, GEN, CTX,	3	R-1	TEM	-
487M	SUL, GEN, CTX, CPM, ATM	1	R-1	TEM, CTX, SHV	+
550M	SUL CTX, CAZ, CPM, ATM	3	R-6	CTX, SHV	+

587M	SUL, CIP, CTX, CAZ, CPM, ATM	3	R-1	CTX, SHV	+
599M	SUL, CIP, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	SHV	+
605M	SUL, CIP, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-6	CTX, SHV	+
606M	SUL, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	1	R-1	TEM, CTX, SHV	+
624M	SUL, CTX	1	R-7	CTX	+
667M	SUL, CTX, CAZ, ATM, PIP/TZ	3	R-2	SHV	+
673M	SUL, CTX	1	R-1	CTX, SHV	+
693M	SUL, CTX, CAZ, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, SHV	+
879M	SUL, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM	1	R-7	TEM, CTX, SHV	+
2004					
Kl-7	SUL CTX, CAZ CPM, ATM	3	R-1	TEM, CTX	+
Kl-17	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	1	R-1	TEM, CTX, SHV	+
Kl-19	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+
Kl-20	SUL, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-7	TEM, SHV	+
Kl-23	SUL, GEN, CTX	1	R-1	CTX, SHV	+
Kl-48	SUL, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM	1	R-1	TEM, SHV	+
Kl-70	SUL, GEN, CTX, CPM, ATM	1	R-8	TEM	+
Kl-75	SUL, CTX, CPM, ATM	1	R-1	TEM, CTX, SHV	+
Kl-80	SUL, CIP, CTX, CPM, ATM	3	R-1	SHV	+
Kl-81	SUL, CIP, CTX, CAZ, CPM, ATM	3	R-7	CTX, SHV	+
Kl-91	SUL, CTX, CPM, ATM	3	R-1	TEM, CTX	+
Kl-92	SUL, CIP, GEN, CTX	3	R-7	TEM, CTX, SHV	+
Kl-106	SUL, CIP, CTX, CAZ , ATM	3	R-2	TEM, SHV	-
Kl-109	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-5	TEM, CTX, SHV	+
Kl-111	SUL, GEN, CTX, CPM, ATM	3	R-2	TEM, SHV	+
2005					
OKp-2	SUL CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	CTX, SHV	+
OKp-4	SUL CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+
OKp-5	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	CTX, SHV	+
OKp-6	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-7	TEM, CTX, SHV	+
OKp-7	CTX	1	R-2	TEM, SHV	-
OKp-8	SUL, CIP, CTX	3	R-2	TEM, CTX, SHV	+
OKp-14	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+
OKp-16	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	1	R-7	TEM, CTX, SHV	+
OKp-19	SUL, CIP, GEN, CTX, CAZ, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+
OKp-20	SUL, CTX, CPM, ATM	3	R-1	TEM, CTX	+
OKp-22	SUL, CTX, CPM, ATM, PIP/TZ	3	R-1	TEM, CTX, SHV	+

OKp-23	SUL, CIP, GEN, CTX, CPM, ATM	3	R-2	TEM, CTX	+
OKp-24	SUL, CTX, COM	3	R-7	TEM, CTX	+
OKp-25	SUL, CTX, CPM, ATM	1	R-2	CTX	+

Antimicrobianos: SUL: sulfametoxazol/trimetoprim, CIP: ciprofloxacina, GEN: gentamicina, CTX: cefotaxima, CAZ: ceftazidima, CPM: cefepime, ATM: aztreonam, PIP/TZ: piperacilina/tazobactam.

4. Discussão

K. pneumoniae tem se tornado um dos mais comuns patógenos que carregam genes codificadores de ESBL. A erradicação desse organismo é difícil devido a sua capacidade de sobreviver bastante tempo nas superfícies e pelos níveis variáveis de resistência aos antimicrobianos (PATERSON e BONOMO, 2005).

A prevalência de ESBL é muito variável e depende de cada região. Foram encontradas taxas de prevalência de ESBL na Grécia, de 27,4%, em Portugal, 15,5% (BONNET, 2004), na Itália de 3,7 a 12,7%, (LUZZARO et al., 2006). Em um estudo realizado em 25 hospitais Europeus foi encontrado a taxa de 21% dos isolados com reduzida sensibilidade a ceftazidima (indicativo de ESBL) (PETERSON e BONOMO, 2005). A detecção de isolados com perfis de ESBL é muito frequente na América Latina, onde foi referida a prevalência de 30 a 50% (JONES, 2001; LUZZARO, et al., 2006). No Brasil, foi encontrada a prevalência de 33 a 40% (FREITAS et al., 2003). Em 2004, foi encontrada a prevalência de 30% em Recife-Pernambuco (LOPES et al., 2004).

4.1. Ribotipagem por PCR

O método de ribotipagem por PCR utiliza seqüências iniciadoras, complementares às seqüências conservadas dos genes que codificam as subunidades 16S e 23S do rRNA, para diferenciar cepas bacterianas com base no polimorfismo da região espaçadora intergênica 16S-23S do operon do RNA ribossômico (KOSTMAN et al., 1992). Todas as bactérias possuem múltiplas cópias dos genes que codificam o RNA ribossômico. Assim, cada operon de rRNA contém uma região espaçadora com um tamanho potencialmente diferente e a amplificação destas regiões pode originar um perfil característico. A variação no número, tamanho e composição destas regiões espaçadoras que permite a maior ou menor discriminação entre isolados (LOPES et al., 2007). Os resultados demonstraram que os isolados apresentaram um perfil discriminatório entre si, apresentando oito perfis distintos, diferente do descrito por LOPES e colaboradores (2007), que não observaram discriminação entre os isolados, e sim entre espécies relacionadas, contudo a discriminação intra-específica foi observada em *P. aeruginosa* (SPACOV et al., 2006). O perfil de rDNA tipo 1 foi o mais freqüente, com 28 de 55 (51,0%),

indicando a dispersão clonal de *K. pneumoniae* na população estudada. Os resultados não identificaram relação direta entre os diferentes ribotipos e os perfis de sensibilidade aos antimicrobianos apresentados pelos isolados, também não foi encontrada associação entre os genes *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e os ribotipos, o que poderia ser explicado pelo fato de que os genes são bastante móveis, por serem caracteristicamente plasmidiais e, muitas vezes, encontrados em integrons associados a transposons ou plasmídios (ARPIN et al., 2003; MACHADO et al., 2005; SCHLESINGER et al., 2005).

4.2. Hidrólise de cefotaxima e ceftazidima

No nosso estudo cefotaxima se apresentou como melhor indicador da produção de ESBL do que a ceftazidima (Tabela 9). É provável que esse achado esteja relacionado à produção da β -lactamase CTX-M, que é mais ativa contra cefotaxima do que contra ceftazidima, ao contrário das enzimas do tipo TEM e SHV (CAO et al., 2002; EDELSTEIN et al., 2003). Contudo, o fenótipo clássico de resistência conferida por CTX-M não é universal entre os produtores de ESBL, uma vez que muitos fatores, incluindo a produção de outras β -lactamases (BARANIAK et al., 2002) e mutações que alteram o substrato específico da enzima podem estar presentes (KARIM et al., 2001). Um exemplo desta variabilidade fenotípica foi apresentado por Paterson et al., (2003) que observaram um alto nível de resistência a cefotaxima, ceftazidima e cefepime geralmente associado à produção de CTX-M. No presente estudo foram encontradas também cepas que mostraram uma forte atividade hidrolítica para ambos os substratos (cefotaxima e ceftazidima), podendo, assim, se tratar de produção de várias enzimas diferentes por um isolado portador de diferentes genes para ESBL.

4.3. Resistência “in vitro” a drogas relevantes

A terapia utilizada para tratar infecções causadas por enterobacteriaceas produtoras de ESBL é usualmente dificultada, pela resistência dessas bactérias a penicilinas, cefalosporinas e ao monobactam aztreonam, como também pela resistência associada a outras classes de antimicrobianos. A resistência a aztreonam encontrada nesse estudo foi de 71,0% maior que o encontrado em Taiwan 48% (CHANG et al., 2001). A frequência de resistência a aztreonam está

ligada a produção do gene *bla*_{CTX-M} (CAO et al., 2002), contudo devido a presença de vários isolados apresentando mais de um gene não podemos afirmar que foi devido a ação desta enzima.

Cefepime, uma cefalosporina de quarta geração, tem apresentado estabilidade *in vitro* na presença de muitas ESBL, com exceção de CTX-M que a hidrolisa com alta eficiência. A concentração inibitória mínima (CIM) elevada para cefepime em isolados ESBL positivos usualmente prediz a produção do gene *bla*_{CTX} (YU et al., 2002; PATERSON et al., 2003). Os isolados deste estudo apresentaram 60,0% de resistência a cefepime. Esses resultados são semelhantes aos encontrados em isolados ESBL positivos por outros autores (YU et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006). No entanto, além da hidrólise por CTX-M, tem sido reportado que a presença de hiper produção da ESBL do tipo SHV-5, em conjunto com uma redução da permeabilidade da membrana, estão também relacionados a alto nível de resistência ao cefepime (TZOUVELEKIS et al., 1998; SZABO et al., 1999). Assim, a elevada frequência de resistência a cefepime observada pode ser resultado da ação de diferentes enzimas de ESBL, o que levou à investigação da presença dos seus respectivos genes nos isolados deste estudo.

A resistência associada a ciprofloxacina e gentamicina é frequentemente observada entre isolados produtores de ESBL (CHANG et al., 2001; EDELSTEIN et al., 2003; NOGUEIRA et al., 2006, LUZZARO et al., 2006). No presente estudo, observamos que, ao longo do período estudado, houve um aumento de resistência a ciprofloxacina de treze vezes (de 14,3% em 2002 para 57,1% em 2005), um fenômeno também observado por Bertrand e colaboradores (2006). Embora a ciprofloxacina tenha se apresentado como um dos mais potentes agentes antimicrobianos para tratamento clínico de isolados produtores de ESBL, no nosso estudo, o aumento de resistência observado demonstra a possibilidade de, num curto espaço de tempo, a ciprofloxacina deixar de ser eficaz contra os isolados ESBL positivos.

A resistência a gentamicina, sulfametoxazol/trimetoprim e imipenem se manteve com poucas variações no período estudado. No entanto a resistência a ciprofloxacina, cefepime, aztreonam e piperacilina/tazobactam foi aumentando ao longo do estudo.

Os inibidores de β -lactamases foram desenvolvidos primariamente para atuar sobre isolados que produziam TEM e SHV (BRADFORD, 2001). Contudo, a resistência aos inibidores foi logo desenvolvida, grande parte devido à intensa produção de β -lactamases pelos isolados bacterianos. Existem três inibidores de β -lactamases utilizados em uso clínico: ácido clavulânico,

sulbactam e tazobactam. Esses inativadores das enzimas β -lactamases são também referidos como “inibidores suicidas”, já que eles são capturados pelas β -lactamases (SHAH et al., 2004; BRADFORD, 2001). O percentual de resistência a piperacilina/tazobactam detectado por esse estudo foi de 36,4%, embora o tazobactam seja considerado um inibidor eficiente de enzimas tipo CTX-M (EDELSTEIN et al., 2003). Entretanto, dados recentes mostram que a bactéria que carrega *bla*_{SHV} sozinho ou acompanhado de *bla*_{TEM} apresenta alta taxa de resistência a piperacilina/tazobactam (LUZZARO et al., 2006). Como os isolados utilizados neste trabalho apresentaram várias combinações de genes em um só isolado, o percentual de resistência pode refletir a associação de TEM e SHV ou intensa produção de enzima pela bactéria. Outros estudos referem valores mais baixos para a resistência a piperacilina/tazobactam, em torno de 15,6% (LUZZARO et al., 2006) ou 21% (YU et al., 2006).

4.4. β -lactamases de espectro estendido

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais importante contra antimicrobianos β -lactâmicos em Gram negativos. Entre essas enzimas, estão as β -lactamases de espectro estendido (ESBL), presentes principalmente em *K. pneumoniae*, limitando as opções de tratamento para infecções hospitalares graves (RAMPHAL e AMBROSE, 2006).

As β -lactamases de espectro estendido mais encontradas são derivativas de TEM e SHV, contudo, outras classes de enzimas têm rapidamente se expandido como CTX-M (CAO et al., 2002; BRADFORD, et al., 2001). A prevalência de ESBL em membros da família enterobacteriaceas pode variar significativamente entre áreas geográficas. Em geral, as ESBLs tipo TEM são predominantes nos Estados Unidos; a tipo SHV é mais freqüente na Europa Ocidental, já a CTX-M tem sido detectada principalmente na América do Sul, Europa Oriental, Japão e, mais recentemente, na Espanha e no Quênia (COQUE et al., 2002).

No presente trabalho, isolados contendo somente o gene *bla*_{SHV} apresentaram a freqüência de 16,4% e foram, portanto, mais prevalentes do que os contendo somente o gene *bla*_{CTX-M} (5,5%) ou *bla*_{TEM} (3,6%), perfil diferente do encontrado por Coque e colaboradores (2002). Em 32,7% dos isolados foi detectada a presença dos três genes pesquisados.

4.4.1. Gene *bla*_{TEM}

As ESBL do tipo TEM são derivativas de TEM-1 e TEM-2. TEM-1 foi primeiro reportada em 1965 (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965). TEM-1, TEM-2, e TEM-13 não são ESBL, pois não apresentam amplo espectro de atividade (PATERSON e BONOMO, 2005). A primeira TEM com perfil de ESBL foi descrita na Inglaterra em 1982 (DUBOIS et al., 1995). Contudo, embora existam mais variedades de TEM do que de outras ESBL, estas enzimas são isoladas com baixa frequência (SCHLESINGER et al., 2005; PATERSON et al., 2003).

O gene *bla*_{TEM} como único gene dando o fenótipo de ESBL foi encontrado em dois isolados (3,6%) (Tabelas 11), em contraste com resultados observados em cepas da Austrália (BELL et al., 2007) e da Irlanda (MORRIS et al., 2003), que apresentaram prevalência de 21% e 58%, respectivamente. Interessante observar que a detecção do gene *bla*_{TEM} aumentou cerca de 17 vezes quando associado aos genes *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} (63,6%), em relação à detecção como gene único (3,6%). Esse resultado é semelhante ao encontrado em Nova Deli, Índia, em 2007, no qual o *bla*_{TEM} como gene único esteve presente em 20% dos isolados e, quando associado, esse percentual subiu para 64% (LAL et al., 2007). Curiosamente, a ESBL tipo TEM tem sido raramente reportada na América do Sul (PATERSON e BONOMO, 2005), fato confirmado pelos resultados observados no presente trabalho (Tabela 11 e Figura 22). Assim, nossos resultados demonstram que o *bla*_{TEM}, quando associados a outros genes de ESBL é mais frequente do que quando encontrado sozinho.

4.4.2. Gene *bla*_{CTX}

A ESBL CTX-M foi relatada na segunda metade da década de 1980 (BAUERNFEIND et al., 1990; MATSUMOTO et al., 1988). Desde então se tem observado a emergência e disseminação dessa β -lactamase, surgindo em muitos relatos da Ásia, América do Sul (QUINTEROS et al., 2003; MUNDAY et al., 2004) e outros continentes (PATERSON e BONOMO, 2005; PEREZ et al., 2007),

Os genes do grupo CTX foram detectados em 35 isolados (63,6%) (Tabela 11 e Figura 22). Essa é uma das mais frequentes enzimas do grupo de ESBL, sendo muito frequente na América do Sul (QUINTEROS et al., 2003). Em hospitais Russos, foi encontrado percentual de 34,9% de isolados apresentando esta enzima (EDELSTEIN et al., 2003). O gene *bla*_{CTX-M} como

gene único foi detectado em três isolados (5,5%), no entanto, suas associações foram encontradas em 32 isolados (58,2%). A presença do CTX-M em associações nesse estudo, foi cerca de dez vezes mais freqüente do que como gene único, mostrando claramente a tendência a associação de diferentes genes para ESBL por isolado, isso sugere ser mais vantagoso para a bactéria possuir genes associados, isso deve estar acontecendo devido à pressão seletiva do uso de antimicrobianos e disseminação horizontal e conseqüentemente aumentando a concentração inibitória mínima para cada cefalosporina envolvida.

4.4.3. Gene *bla_{SHV}*

A maioria das enzimas deste grupo é classificada como ESBL, exceto SHV-1 e SHV-11. Segundo relatos, a grande maioria das cepas de *K. pneumoniae* possui o gene *bla_{SHV-1}* cromossômico (BABINI e LIVERMORE, 2000; HOWARD et al., 2002). No presente trabalho o gene *bla_{SHV}* foi detectado como único gene em 16,4% dos isolados, e em 63,6% quando associado a outros genes de ESBL. Observamos que o gene *bla_{SHV}* em semelhança aos *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}* é cerca de quatro vezes mais freqüente quando em associações, no entanto, o *bla_{SHV}* foi o gene que mais ocorreu sem estar associado.

Os genes do grupo SHV foram identificados em 80% das cepas, sendo o tipo de ESBL prevalente (Tabela 11 e Figura 22). Resultados semelhantes foram encontrados em Israel (SCHLESINGER et al., 2005) e em 12 hospitais dos EUA, Taiwan, Austrália, África do Sul, Turquia, Bélgica, Argentina (PATERSON et al., 2003) e Canadá (MULVEY et al., 2004). Estudos têm sugerido que os genes do grupo *bla_{SHV}* estão sempre presentes em isolados de *K. pneumoniae* e tem sido observado que o *bla_{SHV}* pode ser mais freqüente que outros tipos de ESBL achados em isolados clínicos (CHANG et al., 2001; PATERSON e BONOMO, 2005). Esses dados sugerem que é mais vantajoso para a bactéria possuir mais de um gene, ocasionando o aumento da concentração inibitória mínima.

4.4.4. Associações dos genes de ESBL por isolado

Organismos produtores de ESBL podem produzir múltiplas β -lactamases em um só isolado (BRADFORD et al 1994). Vários relatos têm surgido identificando a presença de vários genes de ESBL em um só isolado. A associação entre o gene *bla_{TEM}* e *bla_{SHV}* tem sido a

associação mais freqüentemente encontrada em vários locais: na Irlanda (MORRIS, et al., 2003), na Índia (LAL et al., 2007), na Itália (LUZZARO et al., 2006), em Israel (SCHLESINGER et al., 2005), no Canadá (MULVEY et al., 2004), na França (ARPIN et al., 2003) e África do Sul (ESSACK et al., 2001), diferente do encontrado nos relatos acima, no presente estudo essa associação entre o gene *bla*_{TEM} e *bla*_{SHV} apresentou prevalência de 16,4% não sendo a mais freqüente, outras associações têm sido descritas, entre os genes: *bla*_{CTX} e *bla*_{TEM} ou *bla*_{CTX} e *bla*_{SHV} (MUNDAY et al., 2004).

Raros relatos referem a identificação dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, e *bla*_{CTX-M} em uma única cepa, Schlesinger e colaboradores (2005) trabalhando com isolados de *Enterobacter sp* identificou um isolado portando os três genes. Trabalhando com isolados de nove países da Ásia entre 1998 e 2003 foram encontrados três isolados de *K. pneumoniae* portando os três genes para ESBL (BELL et al., 2007), na China foi detectado um plasmídio de 95 kb com quatro genes de ESBL: *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{DHA} (WEI et al., 2005). No presente estudo é interessante observar a variedade de combinações de genes para ESBL e a alta freqüência de isolados de *K. pneumoniae* com presença simultânea de dois e de três genes. Salienta-se que a associação dos três genes ocorreu em 32,7% das amostras (Tabela 7, Figura 22), uma freqüência muito mais elevada do que as descritas na literatura.

Os isolados bacterianos hospitalares tem a tendência de manterem em seus genomas os genes de resistência a antimicrobianos devido a constante pressão seletiva do ambiente (COQUE et al., 2002). A quantidade de genes por isolado ao longo do período estudado foi crescente (Tabela 11), mais de 70% dos isolados possuíam dois ou três genes (Figura 22), sugerindo que a captação de genes por esses isolados, esta sendo mais eficaz a cada ano.

Essa tendência do aumento do número de genes de ESBL tem sido relatada (JACOBY e MEDEIROS 1991; HANSON et al., 1999), e deve está relacionada a pressão seletiva do uso de antimicrobianos e presença desses genes em elementos móveis, levando ao aumento da concentração inobitória mínima.

4.4.5. Codificação plasmidial de ESBL

Genes que codificam as β -lactamases de espectro ampliado em *Enterobacteriaceae* são usualmente localizados em plasmídios (COQUE et al., 2002; LUZZARO et al., 2006), inclusive

os que codificam as enzimas TEM, SHV e CTX-M (BERTRAND et al., 2006). Na última década, a produção de ESBL mediada por plasmídios tem sido reconhecida como um importante e adicional mecanismo de emergência de resistência entre os membros da família das enterobacteriaceas (SCHLESINGER et al., 2005).

O gene *bla*_{TEM} foi o mais frequente, em 83,3% das preparações plasmidiais, seguida do *bla*_{CTX} (75%) e *bla*_{SHV} (61%). Em alguns isolados, foram detectados os três genes de ESBL no DNA plasmidial, comprovando a ocorrência simultânea destes genes. A presença desses genes em plasmídios facilita a disseminação da resistência, aumentando a prevalência de isolados produtores de ESBL, o que poderia explicar a alta ocorrência de genes ESBL encontrada nos isolados. Alguns autores têm descrito a presença de genes de ESBL em plasmídios de alto peso molecular (WINOKUR 2001; YU et al., 2006), com tamanhos médios de 50 a 300kb. No entanto, no presente trabalho também foram detectados plasmídios pequenos em isolados ESBL positivos. Embora menos freqüente, a presença de genes de ESBL em plasmídios de baixo peso molecular também já foi descrita por outros autores, com tamanhos de 6 a 20kb (LAKSAI et al., 2000; SZABO et al., 2005; SCHLESINGER et al., 2005).

Outros elementos genéticos, como integrons, transposons ou sequencias de inserção, têm sido envolvidos na transmissão horizontal dos genes que codificam ESBL (ARDUINO et al., 2002; ARDUINO et al., 2003; POIREL et al., 2003; MACHADO et al., 2005; POWER et al., 2005; NOVAIS et al., 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2006; BAE et al., 2007) e, em alguns casos, estes elementos estão associados a plasmídios (VILLA et al., 2000; ARPIN et al., 2003; SCHLESINGER et al., 2005; WU et al., 2006).

4.5. Detecção de integrons de classe 1

O gene da integrase (*intI1*) foi detectado em 91% dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de ESBL. A prevalência de integrons é considerada alta entre isolados Gram-negativos de pacientes da Europa, Portugal, por exemplo, apresenta prevalência de 67% (MACHADO et al., 2005) e na Espanha, com 29% (VINUE et al., 2008). De forma semelhante, nos EUA foi observada prevalência de 57% dos isolados (RAO et al., 2006). No entanto, nos países asiáticos, tem sido relatado resultados de prevalência de integrons de classe 1 superiores a

Europa apresentando integrons em 99% dos isolados (PONGPECH et al., 2008), semelhante ao encontrado no nosso trabalho.

A alta prevalência de integron de classe 1 em nossos isolados deve estar relacionada com a origem nosocomial desses isolados, por serem portadores de genes para ESBL. Genes que codificam ESBL são usualmente localizados em plasmídios conjugativos (como *bla*_{TEM} ou *bla*_{SHV}) (HEDGES e JACOB, 1974), contudo, muitos relatos recentes descrevem que os genes de ESBL são freqüentemente localizados em estruturas semelhantes a integrons (como *bla*_{CTX-M}, *bla*_{GES}, ou *bla*_{VEB-1}) (VILLA et al., 2000; PARTRIDGE et al., 2001; CANTÓN et al., 2003; BONNET, 2004).

Mais de 80 diferentes cassetes de resistência aos antibióticos tem sido identificados em integrons de classe 1, codificando resistência de amplo espectro aos aminoglicosídeos, β -lactâmicos, cloranfenicol, trimetoprim, eritromicina, streptomina, rifampicina, anti-sépticos e desinfetantes (HALL e COLLIS, 1995, 1998; MAZEL et al., 1998; MAZEL e DAVIES, 1999; ROWE-MAGNUS et al., 1999; FLUIT e SCHMITZ, 2004; MAZEL, 2006). Integrons de classe 1 são frequentemente achados em enterobacteriaceas resistentes a várias drogas (NIJSSEN et al., 2005). A presença de integrons de classe 1 é associada com a resistência a sulfonamida e trimetoprim, pois a resistência a essas drogas usualmente é determinada em integrons (FLUITZ e SCHMITZ, 1999; ROWE-MAGNUS e MAZEL, 2002). No presente estudo, a presença de integron de classe 1 foi fortemente associada com a resistência a sulfonamida, pois somente três isolados (5,4%) apresentaram resistência a sulfonamida e não possuíam integron de classe 1 (Tabela 11). Nos demais isolados, foi detectado o gene *sulI*, característico de integrons de classe 1 e responsável pela resistência a este antimicrobiano. Nos isolados resistentes a sulfonamida que não possuíam integron de classe 1, existe a possibilidade da resistência ter sido codificada pelo gene *sulIII*, que é predominantemente achado em plasmídios (RADSTROM et al., 1991; ENNE et al., 2001).

A confirmação da presença de integrons de classe 1 também foi obtida pela observação da presença do gene *qacE Δ 1* em todos os isolados que continham o gene *int1*.

Em estudos recentes, a resistência a ciprofloxacina (relacionada com a presença do gene *qnr*) foi mais comum entre cepas contendo integron de classe 1 (HALL et al., 2003; WANG et al., 2004; ESSEN-ZANDBERGEN et al., 2007). Esta associação poderia ser explicada em parte

pela suposta presença do gene *qnr* no integron de classe 1 (WANG et al., 2003). Em concordância com esses autores, no presente estudo foi observado que, de 21 isolados que apresentaram a resistência a ciprofloxacina, 19 possuíam integron de classe 1, correspondendo a 90,4%, dois não possuíam integron, mas apresentavam resistência a ciprofloxacina, sugerindo a presença de outros elementos genéticos contendo o gene *qnr* (TRAN e JACOBY, 2002).

4.5.1. Mapeamento do integron

Por meio de PCR, usando os primers 5'CS e 3'CS foi amplificado a região variável dos integrons, com fragmentos de 700 pb, 1448pb e 1633 pb (Figura 27), alguns foram clonados. A seguir, os genes de resistência inseridos entre os segmentos conservados foram determinados por seqüenciamento do fragmento amplificado. O seqüenciamento revelou a presença do cassette gênico constituído pelos genes *dfrA* e *aadA*. O gene *dfrA* codifica a enzima dihidrofolato-redutase que confere resistência ao trimetoprim e o gene *aadA* que codificador da enzima adeniltransferase responsável pela resistência a estreptomicina, são freqüentemente achados em isolados portadores de integrons de classe 1 (CHIEW et al., 1998; MARTINEZ-FREIJO et al., 1999; VINUÉ et al., 2008).

O mapeamento obtido do integron do isolado 4M de *K. pneumoniae* mostrou que esse integron era constituído dos seguintes genes em ordem: na região 5'CS com a presença de *intl1* seguido da região variável contendo os cassetes gênicos *dfrA* e *aadA*. Em seguida, foi identificada a região 3'CS contendo os cassetes gênicos *qacEΔ1* e *sul1*. Depois desse segmento conservado foi identificada a região CR contendo a *orf513*, seguida do gene *bla_{CTX}*. Por fim foi identificada uma segunda região 3'CS com os genes *qacEΔ1/sul1*. Essa estrutura é semelhante à encontrada por Power e colaboradores (2005), que descreveu um isolado de *Morganella morganii* da Argentina, em que o *bla_{CTX}* não se encontrava na região variável e sim após a *orf513*, havendo supostamente a duplicação da região 3'CS. Vários trabalhos tem relatado a presença do *bla_{CTX}* fora da região variável, justificando pela presença de uma recombinase logo após a *orf513*. Os integrons de classe 1 que possuem *orf513* são associados com genes de resistência, em muitos casos o gene *bla_{CTX}* (ARDUINO et al., 2003)

Além disso, um grande número de relatos de integrons contendo uma duplicação da região 3'CS e localização do gene *bla_{CTX-M}* fora da região variável tem sido observado em

diferentes países e espécies (LEVESQUE et al., 1995; ARDUINO et al., 2002; SABATE et al., 2002; ARDUINO et al., 2003; POIREL et al., 2003; POWER et al., 2005; NOVAIS et al., 2006; RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2006; VALVERDE et al., 2006; BAE et al., 2007)

Em resumo os integrons são expressão natural de vetores que permitem a inserção de genes de resistência pelo mecanismo de recombinação sítio específica.

Várias das combinações de mecanismos de resistência observados nesse trabalho não eram prevalentes há pouco tempo, portanto, muitos isolados clínicos recentes podem ser explicados pela integração de genes de resistência a antimicrobianos em integrons. Isso mostra a intensa mobilização dos fatores de resistência bacteriana a antimicrobianos no hospital de estudo, o que serve de alerta para os órgãos de vigilância e de controle de infecções para o fato do crescente aumento da resistência das bactérias envolvidas em infecções hospitalares, apresentando-se de suma importância a redução da pressão seletiva exercida pelo uso, principalmente de cefalosporinas de terceira geração, a instituição de medidas rígidas de controle de infecção e atualização de todos os profissionais sobre padrões de resistência e drogas de escolha para tratamento desses patógenos bastante hábeis em sobreviver no ambiente hospitalar.

5. Conclusões

Os isolados de *K. pneumoniae* estudados apresentaram perfil de resistência a ciprofloxacina de evolução rápida; possuindo alto percentual de resistência ao inibidor de β -lactamase, piperacilina/tazobactam que é encontrado quando existe uma super produção de β -lactamases, elevada prevalência de isolados resistentes a sulfametoxazol/trimetoprim. A grande variabilidade genotípica encontrada entre os isolados sugere grande pressão seletiva do uso de antimicrobianos. Isolados portando os três genes de ESBL *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{SHV} foram os mais prevalentes nesse estudo. A presença desses genes em plasmídios e a alta prevalência de integrons de classe 1 indicam uma facilidade de disseminação desses genes de resistência. O gene *bla*_{CTX-M}, além da localização plasmidial, também demonstrou estar presente em integron de classe 1.

6. Referencias bibliográficas – *K. pneumoniae*

- ABRAHAM, E.P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy Penicillin. **Nature** 1940; 146: 837.
- ALBA, J.; ISHII, Y.; THOMSON, K.; et al. Kinetics study of KPC-3, a plasmid-encoded class A carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 49, p. 4760–4762, 2005.
- AMABILÉ-CUEVAS C.F. e CHICUREL, M.E. Bacterial plasmids and gene flux. **Cell. Review.** v. 70, n. 2, p. 189-99, 1992.
- AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases, **Philos, Trans, R Soc. London B**, v. 289, p321-331, 1980.
- ARAKAWA, Y.; MURAKAMI, M.; SUZUKI, K. et al. A novel integron-like element carrying the metallo β -lactamase gene *bla_{IMP}*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 39, p. 1612–1615, 1995.
- ARDUINO, S.M.; CATALANO, M.; ORMAN, B.E. et al. Molecular Epidemiology of orf513-Bearing Class 1 Integrons in Multiresistant Clinical Isolates from Argentinean Hospitals **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3945–3949, 2003.
- ARDUINO, S.M.; ROY, P.H.; JACOBY, G.A. et al. *bla_{CTX-M-2}* Is Located in an Unusual Class 1 Integron (In35) Which Includes Orf513. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 7, p. 2303–2306, 2002.
- ARLET, G.; ROUVEAU, M.; CASIN, I. et al. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* strains that produce SHV-4 β -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. **Journal of Clinical Microbiology** v. 32, p. 2553–2558, 1994.
- ARPIN, C.; DUBOIS, V.; COULANGE, L. et al. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in community and private health care centers. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p. 3506–14, 2003.
- AUGUSTI, G.R.; SUPERTI, S.; ZAVASCKI, A.P. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* bacteremia **Scientia Medica**, v. 17, n. 4, p. 192-196, 2007.

- BABIC, M.; HUJER, A.; BONOMO, R. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases **Drug Resistance Updates** . v. 9, p.142–156, 2006.
- BABINI, G.S.; LIVERMORE, D.M. Are SHV beta-lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p. 2230, 2000.
- BAE, K.I.; LEE, Y.N.; LEE, W.G. et al. Novel Complex Class 1 Integron Bearing an ISCR1 Element in an *Escherichia coli* Isolate Carrying the *bla*CTX-M-14 Gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 51, n. 8, p. 3017–3019, 2007.
- BAQUERO, F. From pieces to patterns: evolutionary engineering in bacterial pathogens. **Nature Reviews Microbiology** v. 2, p.510–518, 2004.
- BARANIAK, A.; FIETT, J.; SULIKOWSKA, A. et al. Countrywide spread of CTX-M-3 extended-spectrum β -lactamase-producing microorganisms of the family *Enterobacteriaceae* in Poland. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, p. 151–159, 2002.
- BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection** v. 18, p. 294–298, 1990.
- BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R. et al . Characterization of β -lactamase gene *bla*_{PER-2}, which encodes an extended spectrum class A β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.40, p. 616–620, 1996.
- BELL, J.M.; CHITSAZ, M.; TURNIDGE, J.D. et al. Prevalence and Significance of a Negative Extended-Spectrum β -Lactamase (ESBL) Confirmation Test Result after a Positive ESBL Screening Test Result for Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: Results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 1478–1482, 2007.
- BENNETT P M. Integrons and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, n. 1, p. 1-4, 1999.
- BERTRAND, S.; WEILL, F.X.; CLOECKAERT, A. et al. Clonal Emergence of Extended-Spectrum β -Lactamase (CTX-M-2)-Producing *Salmonella enterica* Serovar Virchow Isolates with Reduced Susceptibilities to Ciprofloxacin among Poultry and

- Humans in Belgium and France (2000 to 2003). **Journal of Clinical Microbiology**. v. 44, n. 8, p. 2897–2903, 2006.
- BINGEN, E. H.; DESJARDINS, P.; ARLET, G. et al. Molecular epidemiology of plasmid spread among extended broad-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in a pediatric hospital. **Journal of Clinical Microbiology** v. 31, p.179–184, 1993.
 - BIRSKI, L. e MAZEL, D. Erythromycin esterase gene *ere* (A) is located in a functional gene cassette in an unusual class 2 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, p.3326–3331, 2003.
 - BLAZQUEZ, J.; MOROSINI, M.I.; NEGRI, M.C. et al. Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM β -lactamase variants by fluctuating β -lactam pressure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p.2182– 2184, 2000.
 - BLONDEAU, J.M. Extended-spectrum beta-lactamases. **Seminars in respiratory infections** v.16, p. 169-176, 2001.
 - BONNET, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, p.1–14, 2004.
 - BONNET, R.; CHAMPS, C.D.; SIROT, D. et al. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, p. 2671–2677, 1999.
 - BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; CHANAL, C. et al. A novel class A extended-spectrum beta-lactamase (BES-1) in *Serratia marcescens* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 44, p. 3061–3068, 2000a.
 - BONNET, R.; SAMPAIO, J. L.; LABIA, R. et al. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p. 1936–1942, 2000b.
 - BRADFORD P.; Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.
 - BRADFORD, P. A.; CHERUBIN, C. E.; IDEMYOR, V. Multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from two Chicago hospitals: identification of the extended spectrum

- TEM-12 and TEM-10 ceftazidime-hydrolyzing beta-lactamases in a single isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 38, p. 761–766, 1994.
- BRANGER, C.; BRUNEAU, B.; LESIMPLE, A.L. et al. Epidemiological typing of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates responsible for five outbreaks in a university hospital. **Journal of Hospital Infection** v. 36, n. 1, p. 23-36, 1997.
 - BROWN, H.J.; STOKES, H.W.; HALL, R.M. The integrons In0, In2, and In5 are defective transposon derivatives. **Journal of Bacteriology** v. 178, p. 4429-37, 1996.
 - BRUN-BUISSON, C.; LEGRAND, P. ; PHILIPPON, A. et al. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Lancet**, v.ii, p. 302–306, 1987.
 - BUSH, K. New b-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clinical Infectious Diseases** v. 32, p.1085–9, 2001.
 - BUSH, K.; e SINGER, S. B. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. **Infection**, v. 17, p. 429–433, 1989.
 - BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for b-lactamases and its correlation with molecular structure minireview **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 39, n. 6, p. 1211–1233, 1995a.
 - BUSH, L.M.; CALMON, J.; JOHNSON, C.C. Newer penicillins and beta-lactamase inhibitors. **Infectious Disease Clinics of North America** v. 9, n. 3, p. 653-86, 1995b.
 - CANTON, R.; COQUE, T. M.; BAQUERO, F. Multi-resistant Gram-negative bacilli: from epidemics to endemics. **Current Opinion in Infectious Diseases** v. 16, p.315–325, 2003.
 - CAO, V.; LAMBERT, T.; QUYNH NHU, D. et al., Distribution of Extended-Spectrum β -Lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3739–3743, 2002.
 - CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. **Clinical Microbiology Reviews**10, 781–791, 1997.

- CHAMPS, C.; BONNET, R.; SIROT, D.; et al. Clinical relevance of *Proteus mirabilis* in hospital patients: a two year survey. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, p. 537-539, 2000.
- CHANG, F.Y.; SIU, L.K; FUNG, C.P. et al. Diversity of SHV and TEM b-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae*: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel b-Lactamases, SHV-25 and SHV-26. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 9, p. 2407–2413, 2001.
- CHIEW, Y. F.; YEO. S.F.; HALL, L.M. et al. Can susceptibility to an antimicrobial be restored by halting its use? The case of streptomycin versus *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 41, p. 247– 251, 1998.
- CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 15th Informational Supplement M100-S15, Wayne, PA. 2005.
- COLLIS, C. M.; HALL, R. M. Site-specific deletion and rearrangement of integron insert genes catalyzed by the integron DNA integrase. **Journal of Bacteriology** v. 174, p. 1574-1585, 1992.
- COQUE, T.M.; OLIVER, A.; PEREZ-DIAZ, J.C. et al. Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum β -Lactamases Are Carried by Multiple *Klebsiella pneumoniae* Clones in a Single Hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 2, p. 500-510, 2002.
- COQUE, T.M.; OLIVER, A.; PEREZ-DIAZ, J.C. et al. Genes Encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 Extended-Spectrum β -Lactamases Are Carried by Multiple *Klebsiella pneumoniae* Clones in a Single Hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 2, p. 500-510, 2002.
- CORKILL, J.E.; CUEVAS, L.E.; GURGEL, R.Q. SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, n. 4, p. 463-5, 2001
- DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature** v. 208, p. 239–244, 1965.

- DAVIES J.E. Origins, acquisition and dissemination of antibiotic resistance determinants. **J. Ciba Foundation Symposium**. Review. v. 207, p.15-27, 1997.
- DE CHAMPS, C.; SAUVANT, M.P.; CHANAL, C. et al. Prospective survey of colonization and infections caused by expanded-spectrum β -lactamase-producing members of the family Enterobacteriaceae in an intensive care unit, **Journal of Clinical Microbiology** v. 12, p. 2887–2890, 1989.
- DECRE, D.; GACHOT, B.; LUCET, J.C. et al., Clinical and Bacteriologic Epidemiology of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Strains of *Klebsiella pneumoniae* in a Medical Intensive Care Unit **Clinical Infectious Diseases**. v. 27, p. 834-844, 1998.
- DIANCOURT, L.; PASSET, V.; VERHOEF, J. et al. Multilocus sequence typing of *Klebsiella pneumoniae* nosocomial isolates. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 8, p. 4178–4182, 2005.
- DUBOIS, S.K.; MARRIOTT, M.S.; AMYES, S. G. TEM- and SHV- derived extended spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, p. 7–22, 1995.
- EDELSTEIN, M.; PIMKIN, M.; PALAGIN, I. et al. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 12, p. 3724–3732, 2003.
- ENNE, V.I.; LIVERMORE, D.M.; STEPHENS, P. et al. Persistence of sulphonamide resistance in *Escherichia coli* in the UK despite national prescribing restriction. **Lancet** v. 357, p.1325–1328, 2001.
- ESSACK, S.Y.; HALL, L.M.C.; PILLAY, D.G. et al., Complexity and Diversity of *Klebsiella pneumoniae* Strains with Extended-Spectrum β -Lactamases Isolated in 1994 and 1996 at a Teaching Hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 1, p. 88-95, 2001
- ESSEN-ZANDBERGEN, A.V.; SMITH, H.; VELDMAN, K. et al. Occurrence and characteristics of class 1, 2 and 3 integrons in *Escherichia coli*, *Salmonella* and

- Campylobacter* spp. in the Netherlands. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 59, n. 4, p. 746-750, 2007.
- FIETT, J.; PALUCHA, A.; MIACZYNSKA, B. et al. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM 68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing klebsiellae. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p.1499–1505, 2000.
 - FLUIT, A.C.; SCHMITZ, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clin Microbiol Infect** v. 10, p. 272-288, 2004.
 - FLUIT, A.D.; VISSER, C.; SCHMITZ FRANZ-JOSEF, M.R. Molecular Detection of Antimicrobial Resistance **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n.4, p. 836 871, 2001.
 - FLUITZ, A.C.; SCHMITZ, F.J. Class 1 integrons, gene cassettes, mobility and epidemiology. **Journal of Clinical Microbiology Infectious Diseases**. v. 18, p. 761–770, 1999.
 - FREITAS, A.L.P.; MACHADO, D.P.; SOARES, F.S. et al. Extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella* spp and *Escherichia coli* obtained in a Brazilian teaching hospital: detection, prevalence and molecular typing **Brazilian Journal of Microbiology** v.34, n.4, p. 344-348, 2003.
 - GARNER, J. S.; JARVIS, W. R.; EMORI, T. G. CDC definitions for nosocomial infections, 1988. **American Journal of Infection Control** v. 16, p.128–140. 1998.
 - GHUYSEN, J. M. Serine β -lactamases and penicillin-binding proteins. **Annual Review of Microbiology** v. 45, p.37–67, 1991.
 - GNIADKOWSKI, M.; SCHNEIDER, I.; PALUCHA, A. et al. Cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolates from a hospital in Warsaw, Poland: identification of a new CTX-M-3 cefotaxime-hydrolyzing beta-lactamase that is closely related to the CTX-M-1/MEN-1 enzyme. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, p. 827–832, 1998.
 - GOLDSTEIN, C.; LEE, M. S. ; SANCHEZ, S. et al. Incidence of class 1 and 2 integrases in clinical and commensal bacteria from livestock, companion animals, and exotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, p. 723–726, 2001.

- GOOTZ, T.D. Global dissemination of beta-lactamases mediating resistance to cephalosporins and carbapenems. **Expert Review of Anti-Infective Therapy** v. 2, p. 317–327, 2004.
- GUZMAN-BLANCO M.; CASELLAS J.M.; SADER, H.S. Bacterial resistance to antimicrobial agents in Latin América. **Infectious Disease Clinics of North America** n.14, p.67-81, 2000.
- HALL, B.G.; BARLOW, M. Revised Ambler classification of {beta}-lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.55, n. 6, p.1050-1, 2005
- HALL, M.A.; BLOK, H.E.T.; DONDEERS, A.R.T. et al. Multidrug resistance among *Enterobacteriaceae* is strongly associated with the presence of integrons and is independent of species or isolate origin. **Journal of Infectious Diseases** v. 187, p. 251–259, 2003.
- HALL, R. M., e VOCKLER, C. The region of the IncN plasmid R46 coding for resistance to beta-lactam antibiotics, streptomycin/spectinomycin and sulphonamides is closely related to antibiotic resistance segments found in IncW plasmids and in Tn21-like transposons. **Nucleic Acids Research** v. 15, p. 7491-501, 1987.
- HALL, R.M.; COLLIS, C.M. Mobile gene cassettes and integrons: capture and spread of genes by site-specific recombination. **Molecular Microbiology** v. 15, p. 593-600, 1995.
- HALLER, JR. J.S. e MASON, B. Penicillin: Medicine's Wartime Wonder Drug and Its Production at Peoria, Illinois **Illinois History Teacher**, v. 8, n.1, p. 29-47, 2001.
- HANSEN, D.S.; AUCKEN, H.M.; ABIOLA, T. et al. Recommended Test Panel for Differentiation of *Klebsiella* Species on the Basis of a Trilateral Interlaboratory Evaluation of 18 Biochemical Tests. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 8, p. 3665-3669, 2004.
- HANSON, N.D.; THOMSON, K.S.; MOLAND, E.S. et al. Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated Amp-C. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 44, p. 377–380, 1999.
- HEDGES, R.W.; JACOB, A.E. Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. **Molecular Genetics and Genomics** v. 132, p. 31- 40, 1974.

- HERITAGE, J.; HAWKEY, P.M.; TODD, N. et al. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum betalactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 36: 1981-6. 1992.
- HOCHHUT, B.; LOFTI, Y.; MAZEL, D. et al. Molecular analysis of antibiotic resistance gene clusters in *Vibrio cholerae* O139 and O1 SXT constins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, p. 2991–3000, 2001.
- HOWARD, C.; DAAL, A.V.; KELLY, G.; et al. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 46, n. 3, p. 659-664, 2002.
- HSIUNG, A.; MENDES, C.; OPLUSTIL, C. et al. Detecção e prevalência de β -lactamases de espectro ampliado (ESBL) em amostras bacterianas isoladas em hospitais brasileiros. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial** v. 36, n. 4, p. 241-6, 2000.
- JACOBY, G.A. β -Lactamase Nomenclature **Minireview Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123–1129, 2006.
- JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, p.1697–704, 1991.
- JACOBY, G.A.; MILLS, D.M.; CHOW, N., Role of beta-lactamases and porins in resistance to ertapenem and other beta-lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p. 3203–3206, 2004.
- JACOBY, G.A.; SUTTON, L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, p.164–169, 1991.
- JEONG, S.H.; HONG, S.G. SONG, J.S. et al. First Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* Clinical Isolates Producing GES-5 and SHV-12 Extended-Spectrum β -Lactamases in Korea **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 11, p. 4809–4810, 2005.

- KARIM, A.; POIREL, L. NAGARAJAN, S. et al. Plasmid-mediated extended-spectrum β -lactamase (CTX-M-3 like) from India and gene association with insertion sequence ISEcp1. **FEMS Microbiology Letters** v. 201, p. 237– 241, 2001.
- KLIEBE, C.; NIES, B.A.; MEYER, J.F. Et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 28, p.302–307, 1985.
- KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, V. et al. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Journal of Infection**. v. 11, p.315–317, 1983.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; DOWEL Jr, V.R. et al. Diagnóstico microbiológico: texto e Atlas colorido. *Enterobacteriaceae*. 6° ed. Rio de Janeiro; ed Guanabara Koogan p. 1565, 2006.
- KOSTMAN, J.R.; EDLIND, T.D. LIPUMA, J.J. et al. Molecular epidemiology of *Pseudomonas cepacia* determined by polymerase chain reaction ribotyping. **Journal of Clinical Microbiology** v. 30, n. 8, p. 2084–2087, 1992.
- KOTRA, L.P.; SAMAMA, J.; MOBASHERY, S. Beta-lactamases and resistance to beta-lactam antibiotics. In: Lewis K, Salyers AA, Taber HW, Wax RG, eds. **Bacterial resistance to antimicrobials**. p. 123-60, 2002.
- LAKSAI, Y.; SEVERINO, M.; PERILLI, M. et al. First identification of an SHV-12 extended-spectrum β -lactamase in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Italy. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 45, p. 349-351, 2000.
- LAL, P.; KAPIL, A.; BIMAL, K.; et al. Occurrence of *TEM* & *SHV* gene in extended spectrum β -lactamases (ESBLs) producing *Klebsiella* sp. Isolated from a tertiary care hospital **Indian Journal of Medical Research** v.125, p 173-178, 2007.
- LÉVESQUE, C.; PICHÉ, L.; LAROSE, C. e ROY, P. PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 1, n. 39, p. 185-191, 1995.

- LIU, C.; WENG, L.; TSENG, H.; et al., Cefotaxime-resistant *Citrobacter freundii* in isolates from blood in a tertiary teaching hospital in Northern Taiwan. **Journal of Infection**. v. 55, n. 4, p. 363 – 368, 2007.
- LIU, P. Y. F.; GUR, D.; HALL, L. M. C. et al. Survey of the prevalence of b-lactamases amongst 1000 Gram-negative bacilli, isolated consecutively at the Royal London Hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** n. 30, p. 429-447, 1992.
- LIVERMORE, D. M. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. **Clinical Microbiology Reviews** v. 8, p. 557–584, 1995.
- LIVERMORE, D.M., Of *Pseudomonas*, porins, pumps and carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 47, 247–250, 2001.
- LIVERMORE, D.M.; BROWN, D.F. Detection of beta-lactamase-mediated resistance **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 48, p. 59-64, 2001.
- LOPES, A.C.; RODRIGUES, J.F.; CLEMENTINO, M.BM. et al., Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 102, n. 7, p. 827-832, 2007.
- LOPES, A.C.; RODRIGUES, J.F.; MORAIS JÚNIOR, M.A. Molecular typing of *Klebsiella pneumoniae* isolates from public hospitals in Recife, Brazil **Microbiological Research**. v. 160, n. 1, p. 37-46, 2004.
- LUZZARO, F.; MEZZATESTA, M.; MUGNAIOLI, C.; et al. Trends in Production of Extended-Spectrum β -Lactamases among Enterobacteria of Medical Interest: Report of the Second Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 1659-1664, 2006
- MACHADO, E.; CANTON, R.; BAQUERO, F. et al. Integron Content of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains over 12 Years in a Single Hospital in Madrid, Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 5, p. 1823–1829, 2005.
- MARÍN, M.; GUDIOL, F.; Antibióticos betalactámicos. **Journal Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v.21, n. 1, p. 42-55, 2003.

- MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; et al. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **International Microbiology** v. 7, p. 261-8, 2004.
- MARTINEZ-FREIJO, P.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F. J., et al. Many class I integrons comprise distinct stable structures occurring in different species of Enterobacteriaceae isolated from widespread geographic regions in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** n. 43, 686–689, 1999.
- MARTINEZ-FREIJO, P.; FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F.J. et al. Class I integrons in Gram-negative isolates from different European hospitals and association with decreased susceptibility to multiple antibiotic compounds **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 42, p. 689–696, 1998.
- MASSOVA, I. e MOBASHERY, S. Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 42, p. 1–17, 1998.
- MATAGNE, A. GHUYSEN, M.F.; FRÈRE, J.M. Interactions between active-site-serine beta-lactamases and mechanism-based inactivators: a kinetic study and an overview. **Biochemical Journal** v.1, n. 295, p. 705-11, 1993.
- MATSUMOTO, Y.; e INOUE, M. Characterization of SFO-1, a plasmidmediated inducible class A β -lactamase from *Enterobacter cloacae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 43, p. 307–313. 1999.
- MATSUMOTO, Y.; IKEDA F.; KAMIMURA, T. et al. Novel plasmid-mediated beta lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 32:1243– 1246, 1988.
- MAZEL, D. DAVIES, J. Antibiotic resistance in microbes. **Cellular and Molecular Life Sciences** v. 56, p. 742-54. Review, 1999.
- MAZEL, D. Integrons: agents of bacterial evolution. **Nature Reviews Microbiology Microbiol** v. 4, p. 608-20. Review. 2006.

- MAZEL, D.; DYCHINCO, B.; WEBB, V. et al. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** June, v. 44, n. 6, p. 1568–1574, 2000.
- MAZEL, D.; DYCHINCO, B.; WEBB, V.A.; DAVIES, J. A distinctive class of integron in the *Vibrio cholerae* genome. **Science** v. 280, p. 605-608, 1998.
- MEDEIROS, A.A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics, **Clinical Infectious Diseases** v. 24, S19–S45, 1997.
- MEYER, K.S.; URBAN, C.; EAGAN, J.A. et al., Nosocomial outbreak of *Klebsiella pneumoniae* infection resistant to late-generation cephalosporins. **Annals of Internal Medicine**. v.119, n. 5, p. 353-8, 1993.
- MIRANDA, G.; CASTRO, N.; LEAÑOS, B. et al. Clonal and Horizontal Dissemination of *Klebsiella pneumoniae* Expressing SHV-5 Extended-Spectrum β -Lactamase in a Mexican Pediatric Hospital. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 1, p. 30-35, 2004.
- MONNET, D.L.; BIDDLE, J.W.; EDWARDS, J.R. et al., Evidence of interhospital transmission of extended-spectrum beta-lactam-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the United States, 1986 to 1993. The National Nosocomial Infections Surveillance. **Infection control and hospital epidemiology** v. 18, p. 492–498, 1997.
- MONTEROS, E.; ELENA, VICTOR, C. et al. Comparative analysis plasmids from nosocomial *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from two hospitals. *Archives of Medical Research* v. 25, n. 3, p. 321-4, 1994.
- MORRIS, D.; O'HARE, C.; GLENNON, M. et al. Extended-Spectrum β -Lactamases in Ireland, Including a Novel Enzyme, TEM-102. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 8, p. 2572–2578, 2003.
- MUGNIER, P.; DUBROUS, P.; CASIN, I. et al. A TEM-derived extended-spectrum β -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 40, p. 2488–2493, 1996.

- MULVEY, M.R.; BRYCE, E.; BOYD, D. et al. Ambler class A extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in Canadian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p. 1204–14, 2004.
- MUNDAY, C.J.; WHITEHEAD, G.M.; TODD, N.J. et al. Predominance and genetic diversity of community- and hospital-acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 54, p. 628–633, 2004.
- NAAS, T.; POIREL, L. KARIM, A. et al. Molecular characterization of In50, a class1 integron encoding the gene for the extended spectrum β -lactamase VEB-1 in *Pseudomonas aeruginosa*. **FEMS Microbiology Letters** v. 176, p.411–419, 1999.
- NATHISUWAN, S.; BURGESS, D.S.; LEWIS, J.S. Extended-spectrum β -lactamases: Epidemiology, detection, and treatment, **Pharmacotherapy** v.21, p. 920–928, 2001.
- NAVON-VENEZIA, S.; HAMMER-MUNZ, O.; SCHWARTZ, D. et al. Occurrence and Phenotypic Characteristics of Extended-Spectrum β -Lactamases among Members of the Family *Enterobacteriaceae* at the Tel-Aviv Medical Center (Israel) and Evaluation of Diagnostic Tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 1, p. 155-158, 2003.
- NEUWIRTH, C.; SIEBOR, E.; PECHINOT, A. et al. Evidence of in vivo transfer of a plasmid encoding the extended-spectrum beta-lactamase TEM-24 and other resistance factors among different members of the family Enterobacteriaceae. **Journal of Clinical Microbiology** v. 39, n. 5, p. 1985-8, 2001.
- NIJSSEN, S.; FLORIJS, A.; TOP, J. et al., Unnoticed spread of integron-carrying Enterobacteriaceae in intensive care units. **Clinical Infectious Diseases** v. 41, n. 1, p. 1-9, 2005.
- NOGUEIRA, K.S.; HIGUTI, I.H.; NASCIMENTO, A.J. et al. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 10, n. 6, p. 390-395, 2006.
- NORDMANN, P.; POIREL, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology Infection Review**. v. 8, n. 6, p. 321–331, 2002.

- NORRBY, S.R. Integrons: adding another threat to the use of antibiotic therapy. **Clinical Infectious Diseases** v. 41, p. 10-11, 2005.
- NOVAIS, A.; CANTON, R.; VALVERDE, A. et al., Dissemination and Persistence of *bla*CTX-M-9 Are Linked to Class 1 Integrons Containing CR1 Associated with Defective Transposon Derivatives from Tn402 Located in Early Antibiotic Resistance Plasmids of IncHI2, IncP1- α , and IncFI Groups **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 8, n. 50, p. 2741-2750, 2006.
- PAGANI, L.; LUZZARO, L.; RONZA, P.; et al., Outbreak of extended-spectrum β -lactamase producing *Serratia marcescens* in an intensive care unit. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**. v. 10, p. 39-46, 1994.
- PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; PALLECCHI, L.; et al., Emerging Extended-Spectrum β Lactamases in *Proteus mirabilis*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 40, n. 4, p. 1549-1552, 2002.
- PARTRIDGE, S. R., BROWN, H.J.; STOKES, H.W. et al. Transposons Tn1696 and Tn21 and their integrons In4 and In2 have independent origins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 45, p. 1263-70, 2001.
- PARTRIDGE, S. R.; RECCHIA, G. D.; SCARAMUZZI, C. et al. Definition of the attI1 site of class 1 integrons. **Microbiology**. v. 146, n.11, p. 2855-2864, 2000.
- PATERSON, D. L.; HUJER, K. M.; HUJER, A. M. et al. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: Dominance and widespread prevalence of SHV- and CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, n. 3554-3560, 2003.
- PATERSON, D.L. e BONOMO, R.A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 657-686, 2005.
- PATERSON, D.L.; HUJER, K.M.; HUJER, A. M. et al. Extended-spectrum β lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV and CTX-M-type β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, p. 3554-3560, 2003.

- PEREZ, F.; ENDIMIANI, A.; HUJER, K. et al. The continuing challenge of ESBLs **Current Opinion in Pharmacology**, v. 7, p.459–469, 2007.
- PERILLI, M.; FELICI, A.; FRANCESCHINI, N. et al. Characterization of a new TEM derived β -lactamase produced in a *Serratia marcescens* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, p. 2374–2382, 1997.
- PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. Extended-spectrum betalactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 33, p.1131–1136, 1989.
- PITOUT, J.D.; REISBIG, M.D.; VENTER, E.C. et al. Modification of the double-disk test for detection of enterobacteriaceae producing extended-spectrum and AmpC β -lactamases. **Journal of Clinical Microbiology** v. 41, p. 3933–35, 2003.
- PODSCHUN, R; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. **Clinical Microbiology Reviews** v. 11, n. 4, p. 589–603. 1998.
- POIREL, L.; DECOUSSER, J.W.; NORDMANN, P. Insertion Sequence *ISEcp1B* Is Involved in Expression and Mobilization of a *bla*CTX-M β -Lactamase Gene **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 47, n. 9, p. 2938–2945, 2003.
- POIREL, L.; LEBESSI, E.; CASTRO, M. et al. Nosocomial outbreak of extended-spectrum beta-lactamase SHV-5-producing isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in Athens, Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p. 2277–2279, 2004.
- POIREL, L.; NAAS, T.; GUIBERT, M. et al. Molecular and biochemical characterization of VEB-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase encoded by an *Escherichia coli* integron gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 43, p. 573–581, 1999.
- POIREL, L.; THOMAS, I. L.; NAAS, T. et al. Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum β -lactamase, and the class 1 integron IN52 from *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** p. 44, p. 622–632, 2000.
- POIREL, L.A.; NAAS, T.A; NICOLAS, D. et al. Characterization of VIM-2, a carbapenem-hydrolyzing metallo-beta-lactamase and its plasmid- and integron-borne gene

from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 44, p. 891-7, 2000.

- PONGPECH, P.; NAENNA, P.; TAIPOBSAKUL, Y. et al. Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase and class 1 integron integrase gene *int1* in *Escherichia coli* from thai patients and Healthy adults. Southeast Asian **The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health** v. 39, n. 3, 2008.
- POWER, P.; GALLEN, M.; DI CONZA, J. Description of In116, the first blaCTX-M-2 containing complex class 1 integron found in *Morganella morganii* isolates from Buenos Aires, Argentina. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 55, p. 461–465, 2005
- PRESTON, K. E.; GRAFFUNDER, E. M.; EVANS, A. M. et al. Survey of plasmid-associated genetic markers in *Enterobacteriaceae* with reduced susceptibilities to cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, p.2179–2185, 2003.
- PRESTON, K.E.; VENEZIA, R.A.; STELLRECHT, K.A. The SHV-5 extended-spectrum beta-lactamase gene of pACM1 is located on the remnant of a compound transposon. **Plasmid**, v. 51, p 48- 53, 2004.
- QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the Versatile β -Lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 3, p. 440–458, 2007.
- QUINTEROS, M., RADICE, M., GARDELLA, N. et al. Extendedspectrum b-lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 47, p. 2864–7, 2003.
- RADSTROM, P.; SWEDBERG, G.; SKOLD, O. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in Gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 35, p. 1840–1848, 1991.
- RAMPHAL, R. e AMBROSE, P.G. Extended-spectrum beta-lactamases and clinical outcomes: current data. **Clinical Infectious Diseases** v. 42, n. S-4, p. 164-72, 2006.
- RAO, A.N.; BARLOW, M.; CLARK, L.A. et al., Class 1 Integrons in Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp., US Hospitals. **Emerging Infectious Diseases** v. 12, n. 6, p. 1011-1014, 2006.

- RECCHIA, G. D.; HALL, R.M. Origins of the mobile gene cassettes found in integrons. **Trends in Microbiology** v. 5, p. 389-394, 1997.
- RECCHIA, G.D. e HALL, R.M. Gene cassettes: a new class of mobile element. **Microbiology** v. 141, p. 3015-27, 1995.
- RODRIGUEZ-MARTINEZ, J.M.; POIREL, L.; CANTON, R. et al. Common Region CR1 for Expression of Antibiotic Resistance Genes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 7, p. 2544–2546, 2006.
- ROWE-MAGNUS, D.A.; GUEROUT, A.M.; MAZEL, D. Super-integrons. **Research in Microbiology** v. 150, p. 641-651, 1999.
- ROWE-MAGNUS, D.A.; MAZEL, D. The role of integrons in antibiotic resistance gene capture. **Int. Journal of Medical Microbiology** v. 292, p. 115–125, 2002.
- RUPP, M.E.; FEY P.D., Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) - producing enterobacteriaceae: Considerations for diagnosis, prevention and drug treatment, **Drugs** v. 63, p.353–365, 2003.
- RYOO, N.H.; KIM, E.C.; HONG, S.G. et al. Dissemination of SHV-12 and CTX-M-type extended-spectrum β -lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* and emergence of GES-3 in Korea. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 698–702, 2005.
- SABATE, M.; NAVARRO, F.; MIRO, E. et al., Novel Complex *sul1*-Type Integron in *Escherichia coli* Carrying *bla*CTX-M-9 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2656–2661, 2002.
- SAHLY, H.; SCHUBERT, S.; HARDER, J. Activity of human β -defensins 2 and 3 against ESBL-producing *Klebsiella* strains. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 57, p. 562–565, 2006.
- SALYERS, A.A.; AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Why are antibiotic resistance genes so resistant to elimination? **Antimicrobial Agents and Chemotherapy Review**. v. 41, n. 11, p. 2321-5, 1997
- SAMAHA-KFOURY, J.N. e ARAJ, G. F. Recent developments in β lactamases and extended spectrum β lactamases. **Clinical Review. Bmj**. v. 22, n. 327, p.1209-13, 2003.

- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2. ed., 3. vol., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 253p, 1989,
- SANDERS, C. C.; e SANDERS, W. E. β -Lactam resistance in gramnegative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases** v. 15, p. 824–839, 1992.
- SCHLESINGER, J.; NAVON-VENEZIA, S.; CHMELNITSKY, I. et al. Extended-Spectrum Beta-Lactamases among *Enterobacter* Isolates Obtained in Tel Aviv, Israel **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 3, p. 1150–1156, 2005.
- SCHWABER, M.J.; RANEY, P.M.; RASHEED, J.K. et al., Utility of NCCLS Guidelines for Identifying Extended-Spectrum β -Lactamases in Non-*Escherichia coli* and Non-*Klebsiella* spp. of *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 42, n. 1, p. 294-298, 2004.
- SHAH A.A.; HASAN, F.; AHMED, S. et al. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. **Research in Microbiology Review** v. 155, n. 6, p. 409-21, 2004
- SHANNON, K. e PHILLIPS, I. The effects on beta-lactam susceptibility of phenotypic induction and genotypic derepression of beta-lactamase synthesis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v.18, p.15-22, 1986.
- SILVEIRA, G.P.; NOME, F.; GESSER, J.C. et al., Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 844-855, 2006.
- SIROT, D.; SIROT, J. R. LABIA, A. et al. Transferable resistance to thirdgeneration cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 20, p.323–334. 1987.
- SPACOV, I.C.G.; SILVA, S.A.M.; MORAIS JÚNIOR, M.A. et al. Polymorphism of the rDNA and tDNA loci in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*: A perspective for molecular epidemiology surveillance **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 4, p. 722-729, 2006.
- STOKES, H.W. e HALL, R.M. A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. **Molecular Microbiology** v. 3, p.1669-83, 1989.

- STRACHAN, T. e READ, A.P. PCR, DNA sequencing and *in vitro* mutagenesis. **Human Molecular Genetics** 2, 3rd edition, BIOS Scientific Publishers Ltd, ISBN: 0815341849. 1999.
- STRATTON, C.W. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. **Lebanese medical journal** v. 48, p. 186-98, 2000
- STURENBURG, E.; e MACK, D. Extended-spectrum Beta-lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. **Journal of Infectious Diseases** v. 47, p. 273–295. 2003.
- SZABO, D.; FILETOTH, Z.; SZENTANDRASSY, J. et al. Molecular epidemiology of a cluster of cases due to *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 extended-spectrum β -lactamase in the premature intensive care unit of a Hungarian Hospital. **Journal of Clinical Microbiology** v. 37, p. 4167-9, 1999.
- TRAN, J.H. e JACOBY, A. Mechanism of plasmide-mediated quinolone resistance. **Proceedings of the National Academy of Sciences** v. 99, n. 8, p. 5638-5642, 2002.
- TZOUVELEKIS, L.S. e BONOMO, R.A. SHV-type beta-lactamases. **Current Pharmaceutical Design** v. 5, n. 11, p. 847-64, 1999.
- TZOUVELEKIS, L.S.; TZELEPI, E.; PRINARAKIS, E. et al. Sporadic emergence of *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to cefepime and cefpirome in Greek hospitals. **Journal of Clinical Microbiology** v. 36, p. 266-8, 1998.
- VALVERDE, A.; CANTON, R.; GALAN, J.C. et al. In117, an Unusual In0-Like Class 1 Integron Containing CR1 and *bla*_{CTX-M-2} and Associated with a Tn21-Like Element **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 799–802, 2006.
- VILA, J.; NAVIA, M.; RUIZ, J.; CASALS, C. Cloning and nucleotide sequence analysis of a gene encoding an OXA-derived β -lactamase in *Acinetobacter baumannii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 41, p.2757–2759, 1997.
- VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F. et al., Multiple-antibiotic resistance mediated by structurally related IncL/M plasmids carrying an extended-spectrum beta-lactamase gene and a class 1 integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. n. 44, p. 2911–2914, 2000.

- VILLA, L.; PEZZELLA, C.; TOSINI, F. et al., Multiple-Antibiotic Resistance Mediated by Structurally Related IncL/M Plasmids Carrying an Extended-Spectrum b-Lactamase Gene and a Class 1 Integron. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 44, n. 10, p. 2911–2914, 2000.
- VINUE, L.; SAENZ, Y.; SOMALO, S. et al. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 62, p. 934–937, 2008.
- VINUÉ, L.; SÁENZ, Y.; SOMALO, S. et al. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in faecal *Escherichia coli* isolates of healthy humans in Spain **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 2008.
- WANG, M.; SAHM, D.F.; JACOBY, G.A. et al. Emerging plasmid-mediated quinolone resistance associated with the *qnr* gene in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p. 1295–1299, 2004.
- WANG, M.; TRAN, J. H.; JACOBY, G. A. et al . Plasmid-mediated quinolone resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* from Shanghai, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 47, p.2242–2248, 2003.
- WEI, Z.Q.; CHEN, Y.G.; YU, Y.S. et al. Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple β -lactamases **Journal of Medical Microbiology**. v. 54, p. 885–888, 2005.
- WELDHAGEN, G.F. Rapid Detection and Sequence-Specific Differentiation of Extended-Spectrum β -Lactamase GES-2 from *Pseudomonas aeruginosa* by Use of a Real-Time PCR Assay. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, n. 10, p. 4059–4062, 2004.
- WINOKUR, P.L.; CANTON, R.; CASELLAS, J. M. et al. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clinical Infectious Diseases** v. 32, p. 94S.–103S., 2001.
- WOODFORD, N.; TIerno JR, P.M.; YOUNG, K.; et al. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamase, KPC-3, in a

New York medical center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v. 48, p. 4793–4799, 2004.

- WU, T.L.; CHIA, J.H.; SU, L.H. et al., Dissemination of Extended-Spectrum β -Lactamase Producing Enterobacteriaceae in Intensive Care Units of a Medical Center in Taiwan **Microbial Drug Resistance**. v. 12, n. 3, 2006.
- YAN, J. J.; KO, W. C.; TSAI, S. H. et al. Dissemination of CTX-M-3 and CMY-2 beta-lactamases among clinical isolates of *Escherichia coli* in southern Taiwan. **Journal of Clinical Microbiology** v. 38, p. 4320– 4325, 2000.
- YU, W.L.; CHUANG, Y.C.; RASMUSSEN, J.W. Extended-spectrum beta-lactamases in Taiwan: epidemiology, detection, treatment and infection control **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**. v. 39, p. 264-277, 2006.

7. Anexos

7.1. Memorial

Memorial de Marinalda Anselmo Vilela apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

Nome: Marinalda Anselmo Vilela

e-mail: marinaldav@uol.com.br

Graduação: Ciências Biomédicas, UFPE, 18.12.1979.

Especialização: Especialização em Patologia Clínica, UPE, 30.06.2000.

Mestrado: Mestrado em Saúde Pública, CPqAM, 30.04.2004.

Publicações:

Revista: Memórias do Instituto Oswaldo Cruz

Dados: 2006 Nov; 101(7):715-9.

Artigo: Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil

Autores: **Marinalda A. Vilela**; Márcia Maria Camargo de Moraes, Sandra L. de Souza, Isabel Cristina Vanzato Palazzo, Joseane Cristina Ferreira, Marcos Antonio de Moraes Junior, Ana Lúcia da Costa Darini, Márcia M.C. de Moraes.

Revista: REVISTA Brasileira de Epidemiologia (1415-790X)

Dados: 2006; 9(4): 436-446.

Artigo: “Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil”.

Autores: Silvana Maria de Moraes Cavalcanti, Emmanuel Rodrigues de França, **Marinalda Anselmo Vilela**, Francisco Montenegro, Carlos Cabral, Ângela Cristina Rapela Medeiros.

Revista: Brazilian Journal of Infectious Diseases (Braz J Infect Dis).

Dados: Feb;9(1):56-63. Epub 2005 Jun 6. 2005

Artigo: “Prevalence of *Staphylococcus aureus* introduced into intensive care units of a University Hospital”

Autores: Silvana M.M. Cavalcanti; Emmanuel R. de França; Carlos Cabral; **Marinalda, A. Vilela**; Francisco Montenegro; Daniela Menezes; Ângela C.R. Medeiros

Revista: Anais da Faculdade de Medicina do Centro de Ciências da Saúde da UFPE.

Dados: VOL. 50, P. 51-54. 2005

Artigo: “Prevalência de microrganismos em infecções urinárias nosocomiais e de comunidade durante um período de cinco anos”

Autores: Cícero Tadeu Jesus de Souza, Marcia Maria Camargo de Moraes, **Marinalda A. Vilela**.

7.2. Resumos gerados a partir desse estudo publicados em anais de congressos:

7.2.1. In: 1o Congresso Norte-Nordeste de multirresistência bacteriana, 2004, Olinda. Anais do 1o Congresso Norte-Nordeste de multirresistência bacteriana, 2004. “Evolução da resistência a antimicrobianos por *E. faecalis* no Hospital Universitário Oswaldo Cruz (HUOC): primeiros casos de resistência a Vancomicina”.

7.2.2. In: XXIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2005, Santos, 2005. “Perfis de produção de ESBL por isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* em Hospital Universitário de Recife, Pernambuco”.

7.2.3. In: I Congresso Regional de Microbiologia Clínica, 2005, Paraíba, 2005. “Isolamento de *E. faecalis* contendo o gene *vanA* em Hospital Universitário de Recife, Pernambuco”.

7.2.4. In: II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, Olinda 2006. “Caracterização de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivos”.

7.2.5. In: II Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, Olinda, 2006. “Detecção de beta lactamases de espectro estendido em isolados clínicos”.

7.2.6. In: II Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, Recife 2007. “Identificação dos genes de beta-lactamase *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em *Klebsiella pneumoniae*”.

7.2.7. In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, 2008. “Caracterização Genética de Isolados Clínicos de *K. pneumoniae* Multirresistentes”.

7.2.8. In: III Congresso Norte-Nordeste de Multirresistência Bacteriana, Olinda-PE, 2008. “Perfil Plasmidial de Isolados Nosocomiais de *Klebsiella pneumoniae* Produtores de ESBL”

7.2.9. In: I Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica, Gramado, 2008. “Molecular Characterization of *Klebsiella pneumoniae* with class 1 integrons harbouring ESBL genes”.

7.2.10. In. 25º Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto de Galinhas-PE, 2009. "Class 1 Integron Harboring *bla*_{CTX} Gene in *Klebsiella pneumoniae*."

7.3. Artigos:

7.3.1. Artigo submetido:

“Increased emergence of *Klebsiella pneumoniae* isolates carrying simultaneously *bla*_{CTX}, *bla*_{SHV} and *bla*_{TEM} genes: impact on the associated resistance”

Nº de registro: 1495924162282224

Data: 09.06.2009

Periódico: BMC Microbiology

7.3.2. Artigo a ser submetido a International Journal of Infectious Diseases:

“Occurrence of class 1 integron in ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates from Recife, Brazil: physical structure of one unusual class 1 integron”.

7.3.3. Publicado:

“Identification and molecular characterization of Van A-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* in northeast of Brazil”

Data: November, 2006

Periódico: Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 101(7): 716-719.