



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE

Adriane Borges Cabral

**Recife
2011**

Adriane Borges Cabral

Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE

Dissertação apresentada ao colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de mestre em Medicina Tropical.

Orientadores:

Prof^a. Dr^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Dr^a. Ana Catarina de Souza Lopes

Recife

2011

Cabral, Adriane Borges

Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a antibióticos β -lactâmicos de última geração provenientes de Recife-PE / Adriane Borges Cabral. – Recife: O Autor, 2011.
151 folhas: il., fig., ; 30 cm.

Orientador: Maria Amélia Vieira Maciel.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCS. Medicina Tropical, 2011.

Inclui bibliografia.

1. *Klebsiella pneumoniae*. 2. β -lactâmicos. 3.

Tipagem molecular. I. Maciel, Maria Amélia Vieira.

II. Título.

UFPE

616.014

CDD (22.ed.)

CS2011-038



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DA MESTRANDA

ADRIANE BORGES CABRAL

No dia 02 de março de 2011, às 10h00, na Sala de Aula da Sede do Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Professores: a Prof^ª. Dra. Vera Magalhães da Silveira (Presidente da Banca - UFPE), a Prof^ª. Dra. Janete Magali de Araújo (UFPE), e a Prof^ª. Dra. Nilma Cintra Leal (CPqAM), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguíram a mestranda ADRIANE BORGES CABRAL sobre a sua Dissertação intitulada "CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Klebsiella pneumoniae* RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS β -LACTÂMICOS DE ÚLTIMA GERAÇÃO PROVENIENTES DE RECIFE-PE", a qual foi orientada pela Prof^ª. Dra. Maria Amélia Vieira Maciel (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta da mestranda, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

Prof^ª. Dr^ª. Nilma Cintra Leal

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Vera Magalhães
Prof^ª. Dr^ª. Vera Magalhães da Silveira

Janete Magali de Araújo
Prof^ª. Dr^ª. Janete Magali de Araújo

Nilma Cintra Leal
Prof^ª. Dr^ª. Nilma Cintra Leal

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA TROPICAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

REITOR

Prof. Amaro Henrique Pessoa Lins

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. José Tadeu Pinheiro

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

**VICE-COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA
TROPICAL**

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

CORPO DOCENTE

Prof^a. Ana Lúcia Coutinho Domingues

Prof^a. Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Prof. Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Prof^a. Elizabeth Malagueño de Santana

Prof. Fábio André Brayner dos Santos

Prof^a. Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel

Prof^a. Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Prof^a. Maria do Amparo Andrade

Prof^a. Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Prof^a. Marli Tenório Cordeiro

Prof. Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Prof^a. Valdênia Maria Oliveira de Souza

Prof^a. Vera Magalhães da Silveira

DEDICO,

*A Deus primeiramente, por sempre
me proteger, guiar e iluminar;*

*Aos meus pais Luís Borges (em
memória) e Heloísa Borges por todo
o amor, educação e incentivo,
alicerces da minha formação.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela bondade e proteção infinita em tudo que faço na minha vida;

A minha mãe, pelo amor, incentivo e educação. Aos meus irmãos, por todo o apoio e incentivo; aos meus sobrinhos, por todo o amor e alegria e a toda a minha família.

A Carlos Henrique, pelo amor, pelo companheirismo e por tudo o que representa para mim;

A Prof^a. Ana Catarina de Souza Lopes, pelos ensinamentos, orientação, dedicação e incentivo a minha carreira científica;

A Prof^a. Maria Amélia Vieira Maciel, pela ajuda prestada, orientação e ensinamentos transmitidos;

Aos amigos, Renata Suéllen, Myrtes Fabiana, Keyla Emanuelle, Márcio Daniel e Cecília Fernandes pela amizade, que mesmo devido à rotina do dia a dia não permitir presença física constante, ocupam um espaço enorme no meu coração;

As amigas de laboratório, Paula Jácome, Rita de Cássia, Lílian Rodrigues e Maíra Espíndola, pela amizade, compartilhamento de conhecimentos e por toda a ajuda prestada;

As amigas de faculdade, Alexsandra Mariá, Rafaela Melo, Adriana Burgo e Camilla Albertina pela amizade, carinho e incentivo;

Aos amigos Aline Mary, Rosângela Santos, Gabriella Tenório, Fernando Brederodes, Monique Fraga, Marcelo Amorim e Pamela Karinne pela amizade e por fazerem das manhãs, algo muito mais descontraído;

Aos professores e a todos que fazem o Departamento de Medicina Tropical, pelos ensinamentos e pela contribuição na minha formação; em especial a Walter Leite, por toda a prestatividade;

Aos professores e a todos que fazem a Disciplina de Microbiologia, pelos ensinamentos e amizade ao longo de todos esses anos que faço parte da Disciplina, em especial a D. Djanira, por toda paciência;

A PROPESQ-UFPE, CNPq e FACEPE, pelo suporte financeiro e a todos que direta ou indiretamente me ajudaram a realizar este trabalho.

***“Suba o primeiro degrau com fé.
Não é necessário que você veja toda
a escada. Apenas dê o primeiro
passo.”***

Martin Luther King

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Isolamento de <i>K. pneumoniae</i> em Agar MacConkey	22
Figura 2. Mecanismo de conjugação bacteriana.....	26
Figura 3. Mecanismos de Resistência bacteriana aos antimicrobianos	32
Figura 4. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo teste de sinergia do disco duplo proposta por Vercauteren <i>et al.</i> (1997).41	
Figura 5. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo E-test.....	42
Figura 6. Placa com meio Mueller-Hinton após incubação para pesquisa de KPC pelo Teste de Hodge Modificado proposto por Anderson <i>et al.</i> (2007).....	56
Artigo 1	
Figura 1. Tipagem pela técnica de ERIC-PCR. a. Gel de agarose à 1,5% representativo do produto amplificado da ERIC-PCR. b. Dendograma gerado pela ERIC-PCR, usando o programa DarWin 5.0, ilustrando a relação dos 19 perfis de ERIC-PCR.	102
Figura 2. Gel de agarose à 1,0% mostrando o produto amplificado por PCR para o gene <i>bla_{KPC}</i>	102
Artigo 2	
Figura 1. Gel de agarose à 1,0% mostrando o produto amplificado por PCR para o gene <i>bla_{VIM}</i>	113

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> provenientes do Hospital público e do Hospital Particular nos anos de 2007 e 2008, respectivamente da cidade de Recife-PE.	82
Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção dos gene de β -lactamases.....	83
Artigo 1	
Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de <i>K. pneumoniae</i> provenientes do Hospital público e do Hospital particular nos anos de 2007 e 2008, respectivamente da cidade de Recife-PE.	98
Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção dos gene de β -lactamases.....	99
Tabela 3. Caracterização dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> através da detecção fenotípica e molecular de β -lactamases, perfil plasmidial e perfil da ERIC-PCR.	100
Tabela 4. Perfil plasmidial dos isolados dos hospitais públicos e particular analisados neste estudo.....	101
Artigo 2	
Tabela 1. Origem, perfil de resistência aos β -lactâmicos, perfil de ERIC-PCR e ocorrência de genes para metalo- β -lactamases em isolados de <i>Klebsiella pneumoniae</i> provenientes de um hospital particular de Recife-PE.....	114

LISTA DE ABREVIATURAS

AFLP	Polimorfismo de Fragmento Amplificado
AIM	Australian imipemenase
AMC	Amoxicilina/Ácido Clavulânico
AMI	Amicacina
AMO	Amoxicilina
AMP	Ampicilina
APS	Ampicilina/Sulbactam
ATM	Aztreonam
CAZ	Ceftazidima
CFL	Cefalotina
CFO	Cefoxitina
CIP	Ciprofloxacina
CLO	Clofanfenicol
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	Cefepime
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Cefotaximase
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CTX-M	Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
ESBL	Extended-Spectrum β -lactamase
ERIC-PCR	PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de Enterobactérias
EST	Estreptomicina
FDA	Food and Drug Administration
FTP	Fator de Transferência
genes <i>bla</i>	Genes de β -lactamases
GIM	German Imipenemase
GEN	Gentamicina

GyrA	DNA girase A
h	Horas
IEF	Isoelectric Focusing
IMP	Impipenemase
IMP	Imipenem
int	Intermediário
Kb	Quilo-base
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase
LB	Luria-Bertani
log	Logarítimo
mA	Miliampere
MBLs	metalo- β -lactamases
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
MHT	Teste de Hodge Modificado
MIC	Concentração Mínima Inibitória
ml	mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
M	Molar
MPM	Meropenem
N	Normal
NAL	Ácido Nalidíxico
NDM	Nova-Delhi Metalo- β -lactamase
ng	Nanograma
Pb	Par de bases
PBPs	Proteínas de ligação à Penicilina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
pH	Potencial de Hidrogênio
pI	Ponto Isoelétrico
PIT	Piperacilina/Tazobactam
q.s.p	Quantidade suficiente para

RAPD	Random-Amplified Polymorphic DNA
REP	Repetitive Element-Based PCR
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA _r	RNA Ribossomal
RNAse	Ribonuclease
rpm	Rotações por minuto
SIM	Seul imipemenase
SIM	H ₂ S/indol/motilidade
SPM	São Paulo metalo- β -lactamase
sp.	espécie
spp.	espécies
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SHV	Sulfidril variable
STE	Tampão SDS-Tris-EDTA
TBE	Tris-borato, ácido bórico, EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA
TEM	Referência à Temoniera
TET	Tetraciclina
TSI	Tríplice sugar/iron
TSU	Trimetoprim/Sulfa
U	Unidade
UTI	Unidades de terapia intensiva
UV	Ultravioleta
v	Volts
VIM	Verona integron-encoded metalo- β -lactamase
Zn	Zinco
2-MPA	ácido 2-mercaptopropiônico
°C	Grau Celsius
μ g	Micrograma
μ l	Microlitro
μ M	Micromolar
μ mol	Micromol

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é uma enterobactéria associada a infecções hospitalares graves que acomete principalmente, o trato urinário e respiratório, causando também meningite e septicemia, particularmente, em pacientes imunocomprometidos. O objetivo desse trabalho foi caracterizar geneticamente isolados clínicos de *K. pneumoniae* através da investigação dos genes de resistência a β -lactâmicos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}, do perfil plasmidial e da ERIC-PCR. Foram analisados 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de hospital público e de um hospital particular nos anos de 2007 e 2008, respectivamente, da cidade de Recife-PE. O Teste de sinergia de disco duplo, o Teste de Hodge Modificado e o E-Test MBL foram aplicados para detecção fenotípica de ESBLs, KPC e MBL, respectivamente. Todos os isolados apresentaram o gene *bla*_{SHV}, 62,5% *bla*_{CTX-M}, 29% *bla*_{TEM}. Dentre os isolados do Hospital particular 71% apresentaram *bla*_{KPC} e 50% *bla*_{VIM}. Este é o primeiro relato do gene *bla*_{VIM} em *K. pneumoniae* em Recife-PE, Brasil. Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} não foram detectados. O achado de 14 isolados (58%) carreando no mínimo 3 dentre os 7 genes de β -lactamases pesquisados é preocupante, uma vez que não é frequentemente relatado. O perfil plasmidial, agrupou os isolados em 17 grupos e 3 subgrupos. A ERIC-PCR classificou os isolados em 19 perfis distintos com 6 isolados apresentando o mesmo perfil, mostrando relação clonal. Podemos concluir que os isolados estudados acumularam determinantes de resistência que, conseqüentemente, impõem uma limitação nas opções terapêuticas disponíveis, podendo explicar muitos episódios de insucesso na tentativa de controle das infecções hospitalares.

Palavras-chaves: *K. pneumoniae*, β -lactamases, Tipagem molecular

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is an enterobacteria associated with serious hospital infections that primarily affects the urinary and respiratory tracts, also causing meningitis and septicemia, especially in immunocompromised patients. The aim of this study was to genetically characterize clinical isolates of *K. pneumoniae* by the investigation of the β -lactams resistance genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM}, the plasmid profile and ERIC-PCR. We analyzed 24 isolates from public hospital and from a private hospital from 2007 and 2008, respectively, from the city of Recife-PE. Double-disk synergy testing, Modified Hodge Test and the MBL E-test were used for phenotypic detection of ESBLs, KPC and MBL, respectively. The *bla*_{SHV} gene was found in all isolates, *bla*_{CTX-M} in 62.5% and *bla*_{TEM} in 29%. The carbapenemases genes *bla*_{KPC} and *bla*_{VIM} were found with a frequency of 71% and 50%, respectively, among the isolates from the private hospital. This is the first report of the gene *bla*_{VIM} in *K. pneumoniae* in Recife-PE, Brazil. The genes *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM} were not detected. The finding that 14 isolates (58%) harboring at least three among the seven β -lactamases genes studied is of concern since it is not often reported. The plasmid profile grouped the 24 isolates in 17 groups and 3 subgroups. The ERIC-PCR classified the isolates in 19 distinct types with 6 isolates exhibiting the same profile, showing clonal relationship. We can conclude that the isolates studied here accumulated resistance determinants which consequently imposes a limitation on the treatment options available, explaining many episodes of failure in the control of many hospital infections.

Keywords: *K. pneumoniae*, β -lactamases, Molecular typing

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1. <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i>	22
2.2. PLASMÍDEOS	25
2.3. ANTIMICROBIANOS B-LACTÂMICOS	28
2.4. MECANISMOS DE RESISTÊNCIA E BETA-LACTAMASES.....	31
2.5. BETA-LACTAMASES DE ESPECTRO EXTENDIDO (ESBLs)	37
2.6. TEM E SHV	43
2.7. INIBIDORES DE B-LACTAMASES	46
2.8. CTX-M	47
2.9. CARBAPENEMASE DO TIPO KPC	50
2.10. METALO-B-LACTAMASES: VIM, IMP E SPM	59
2.11. TIPAGEM MOLECULAR DE BACTÉRIAS	69
3. OBJETIVOS	72
3.1. OBJETIVO GERAL	73
3.2. ESPECÍFICOS	73
4. MATERIAS E MÉTODOS	74
4.1. ISOLADOS BACTERIANOS	75
4.2. PERFIL DE SUSCEPTIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS	75
4.3. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE ESBLs	76
4.4. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE KPC	76
4.5. DETECÇÃO FENOTÍPICA DE MBL	76
4.6. EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL	77
4.7. CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>BLA_{SHV}</i> E <i>BLA_{TEM}</i>	78
4.8. CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>BLA_{CTX-M}</i>	78
4.9. CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES <i>BLA_{KPC}</i>	79
4.10. CONDIÇÕES DA PCR PARA IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE MBL	79
4.11. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE.....	80
4.12. EXTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL	80

4.13. ERIC-PCR	80
4.14. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	81
5. ARTIGOS.....	84
ARTIGO 1: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> PORTADORES DE MÚLTIPLOS GENES DE RESISTÊNCIA A ANTIBIÓTICOS BETA-LACTÂMICOS EM RECIFE-PE, BRASIL.85	
1.INTRODUÇÃO.....	88
2.MATERIAIS E MÉTODOS	89
2.1.Isolados bacterianos.....	89
2.2.Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção fenotípica de β -lactamases	89
2.3.Amplificação por PCR dos genes de β -lactamases	90
2.4.Extração plasmidial e ERIC-PCR.....	90
3.RESULTADOS	91
3.1.Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos	91
3.2.ERIC-PCR	91
3.3.Detecção fenotípica e genotípica de ESBLs.....	92
3.4.Detecção fenotípica e genotípica de KPC	92
3.5.Análise do perfil plasmidial.....	92
4.DISSCUSSÃO	93
5.REFERÊNCIAS	102
ARTIGO 2: PRIMEIRO RELATO DO GENE <i>BLA_{VIM}</i> EM ISOLADOS CLÍNICOS DE <i>KLEBSIELLA PNEUMONIAE</i> NO BRASIL.	
1.INTRODUÇÃO.....	111
2.MATERIAIS E MÉTODOS	111
3.RESULTADOS	112
4.DISSCUSSÃO	112
5.REFERÊNCIAS	114
6. CONCLUSÕES.....	117
7. REFERÊNCIAS	120

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno oportunista associado a infecções hospitalares graves que acomete principalmente o trato urinário e respiratório, causando também meningite e septicemia, particularmente em pacientes imunocomprometidos (KONEMAN *et al.*, 2008). Na América Latina corresponde a 12% de todos os patógenos isolados e é o terceiro patógeno mais prevalente causando pneumonia (MARRA *et al.*, 2006a). Também está relacionado a outras infecções invasivas em pacientes internados em diferentes países (CHRISTIAN; ROYE-GREEN; SMIKLE, 2010).

Infecções nosocomiais por *K. pneumoniae* são causadas por linhagens multirresistentes e principalmente produtoras de ESBLs (Extended-Spectrum β -lactamases), enzimas codificadas frequentemente por genes plasmidiais, que podem degradar as cefalosporinas de 3ª e 4ª geração e o monobactâmico, aztreonam (THERRIEN; LEVESQUE, 2000). Estas enzimas são relatadas tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade, representando grandes desafios na terapêutica e no controle das infecções (LIVERMORE *et al.*, 2007). Até o momento mais de 300 ESBLs foram descritas sendo a maioria derivada dos grupos TEM e SHV (DROPA *et al.*, 2009). No entanto, nos últimos anos, mais de 60 diferentes tipos de CTX-M estão emergindo na família *Enterobacteriaceae* e substituindo TEM e SHV em muitos países (JONES *et al.*, 2009).

No Brasil há poucos estudos que comparam a prevalência dos grupos TEM, SHV e CTX-M em isolados de *K. pneumoniae*. Em Recife, Lopes *et al.* (2010) pesquisando a presença do gene *bla*_{CTX-M} determinaram através de sequenciamento de DNA que *bla*_{CTX-M-2} foi o de maior ocorrência entre isolados clínicos de *K. pneumoniae*. Estes e outros trabalhos que constituem uma vasta literatura mundial (ACHOUR *et al.*, 2008; COQUE; BAQUERO; CANTON, 2008; DIESTRA *et al.*, 2008; HO *et al.*, 2008; KINGSLEY; VERGHESE, 2008; PEREZ *et al.*, 2008; DROPA *et al.*, 2009; GOYAL *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2009; MOHAMMAD; AL-AGAMY; SHIBL, 2009), alertam para o surgimento de inúmeras variantes de ESBLs e fornecem evidências da ampla difusão dos genes que codificam essas enzimas. Em Recife-PE não existem estudos que comparem à atual frequência de TEM, SHV e CTX-M entre isolados nosocomiais de *K. pneumoniae*.

Para o tratamento de infecções causadas por patógenos Gram-negativos multirresistentes nosocomiais, os carbapenêmicos são usados com frequência e são considerados como as drogas de escolha para as graves infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (YIGIT *et al.*, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; ANDERSON *et al.*, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008). Dentre os mecanismos de resistência aos

carbapenêmicos têm se destacado recentemente a produção de β -lactamase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC estão sendo identificados entre os patógenos nosocomiais mais frequentes (NASS *et al.*, 2008). Villegas *et al.* (2006), reportaram o primeiro relato de *K. pneumoniae* produtores de KPC na América Latina. Monteiro *et al.* (2009), foram responsáveis pelo primeiro relato da ocorrência do gene *bla*_{KPC-2} em *K. pneumoniae* no Brasil.

Na América Latina, ESBLs são comumente encontradas em membros da família *Enterobacteriaceae*, porém metalo- β -lactamases (MBL) eram encontradas exclusivamente em espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (PATERSON; BONOMO, 2005; SADER *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2005). Desde 2003 a produção de MBL por membros da família *Enterobacteriaceae* vem sendo observada nos hospitais brasileiros (LINCOPAN *et al.*, 2006). As MBLs mais frequentes em vários países são dos tipos IMP e VIM (LIVERMORE; WOODFORD, 2000; NORDMAN; POIREL, 2002). Por outro lado, no Brasil, o gene mais prevalente é o *bla*_{SPM} (PICOLI, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Lincopan *et al.* (2005), foram os responsáveis pela primeira descrição de IMP-1 em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil. Metalo- β -lactamase do tipo VIM já foi relatada em isolados de *K. pneumoniae* na América Latina (Venezuela) (MARCANO *et al.*, 2008), porém não foram encontrados relatos dessa MBL em *K. pneumoniae* em Recife-PE, Brasil. Tato *et al.* (2007), descreveram a colonização com bactérias Gram-negativas produtoras de MBL, relatando uma situação que está próxima de um estado de endemidade, com uma taxa de mortalidade de quase 50% entre os pacientes infectados com estes organismos. É muito importante que a detecção de MBL seja feita de rotina para bacilos Gram-negativos em laboratórios clínicos, porque a falha no controle de surtos envolvendo organismos produtores de carbapenemases resultará em uma situação em que todas as opções de tratamento empírico serão inúteis.

Além da análise da diversidade de genes de β -lactamases existem outros métodos moleculares utilizados com o objetivo de caracterizar isolados de *K. pneumoniae* envolvidos em infecções hospitalares, dentre estes, a análise plasmidial. Souza Lopes *et al.* (2005), mostraram que o perfil plasmidial é uma ferramenta útil para facilitar a classificação de isolados de *K. pneumoniae* em subtipos.

Um outro método de tipagem molecular bacteriana que tem se mostrado bastante promissor é baseado na amplificação por PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) (VERSALOVIC; KOEUTH; LUPSKI, 1991).

Esta técnica permite a detecção de clones dentro de um grupo fenotipicamente idêntico que pode ter um impacto direto no método de intervenção terapêutica, por ser essencial para identificar cadeias de transmissão em surtos hospitalares (PFALLER *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2006).

Nos últimos anos, tem sido relatada uma grande ocorrência de isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a β -lactâmicos de amplo espectro em vários países, inclusive no Brasil. Considerando que são raros os estudos que determinam a prevalência e o genótipo de ESBLs e carbapenemases do tipo KPC e MBL em Recife-PE, torna-se importante a caracterização genética de isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de Recife, através da pesquisa dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}, do perfil plasmidial e da ERIC-PCR.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Klebsiella pneumoniae*

Klebsiella spp. são bacilos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e constituintes da microbiota intestinal da maioria dos animais, incluindo os seres humanos. Em humanos, *K. pneumoniae* pode colonizar a pele, faringe, bexiga e trato gastrointestinal, podendo causar pneumonia associada à ventilação mecânica (PAWAR *et al.*, 2003), bacteriemia (TENÓRIO *et al.*, 2010), septicemia (YANG; LAUDERDALE; LO, 2004; SOUZA LOPES *et al.*, 2005), infecções do trato urinário (STRATTON, 2001; SOUZA LOPES *et al.*, 2005), doença pulmonar crônica (SINHA *et al.*, 2003), infecções de tecidos moles (SOUZA LOPES *et al.*, 2005) e diarreia (THI *et al.*, 2003; HARYANI *et al.*, 2007; VELASCO *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010). As infecções urinárias são as principais doenças causadas por *K. pneumoniae*, seguido por infecções pulmonares graves, septicemias, além de meningites em lactentes (KONEMAN *et al.*, 2008).

Em meios de isolamento, como ágar Eosina Azul de Metileno (EMB) e ágar MacConKey, *K. pneumoniae* exibem colônias grandes, de consistência mucóide (Figura 1). Microscopicamente, são bacilos Gram-negativos, imóveis, não esporulados e envolvidos por cápsulas polissacarídicas, nas quais estão presentes diferentes antígenos que permitem a diferenciação do gênero em 77 sorotipos (ZHAO *et al.*, 2010). Como características bioquímicas, são fermentadores de lactose, produzem a enzima urease (algumas cepas hidrolizam a uréia lentamente), não produzem indol (propriedade que a distingue da espécie *K. oxytoca* que é indol positiva) e não são capazes de produzir sulfeto de hidrogênio.

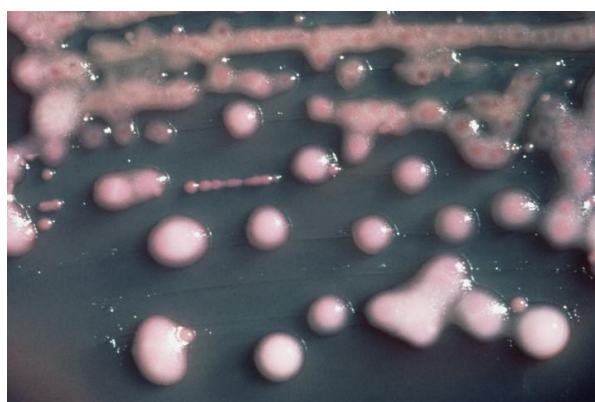


Figura 1. Isolamento de *K. pneumoniae* em Agar MacConkey
(Fonte: <http://www.infoescola.com/reino-monera/super-bacteria-kpc>)

O gênero *Klebsiella* recebeu esta designação, no final do século XIX, em homenagem a Edwin Klebs, um microbiologista alemão (KONEMAN *et al.*, 2008). O bacilo também foi descrito por Carl Friedlander e durante muitos anos era conhecido como grande causador de pneumonia grave, muitas vezes fatal. Taxonomicamente, as espécies do gênero *Klebsiella* eram classificadas em *K. oxytoca*, *K. terrigena*, *K. planticola*, *K. ornithinolytica* e *K. pneumoniae* (ØRSKOV; ØRSKOV, 1984). *K. pneumoniae* compreende as subespécies: *pneumoniae*, *ozaenae* e *rhinoscleromatis*. Usualmente refere-se à espécie *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* como *K. pneumoniae* e às outras duas subespécies como *K. ozaenae* e *K. rhinoscleromatis* (PODSCHUM; ULLMANN, 1998). *Klebsiella ozaenae* é isolada do nariz em casos de ozena (atrofia fétida das mucosas) e *K. rhinoscleromatis* é isolada de lesões granulomatosas destrutivas do rinoscleroma (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). *Klebsiella terrigena* e *K. planticola* eram inicialmente consideradas restritas a ambientes aquáticos e de solo, porém estas espécies já têm sido isoladas de infecções respiratórias humanas (PODSCHUM; ULLMANN, 1994). As espécies *K. terrigena*, *K. planticola* e *K. ornithinolytica* foram reclassificados taxonomicamente, em um novo gênero chamado *Raoultella* (DRANCOURT *et al.*, 2001). A estrutura filogenética do gênero *Klebsiella* foi recentemente analisada (BRISSE; VERHOEF, 2001; BOYE; HANSEN, 2003; ROSENBLUETH *et al.*, 2004; DRANCOURT *et al.*, 2005). Esses estudos mostram a complexidade taxonômica deste organismo. Duas novas espécies foram descritas: (1) *Klebsiella variicola* que estava sendo identificada por métodos convencionais como *K. pneumoniae*, mas foi considerada como uma nova espécie baseando-se principalmente na análise das sequências dos genes *rpoB*, *gyrA*, *mdh*, *infB*, *phoE* e *nifH*, pertencentes a várias linhagens, incluindo bactérias isoladas a partir de plantas e humanos (ROSENBLUETH *et al.*, 2004) e (2) *Klebsiella singaporensis*, baseado nas sequências dos genes de RNAr 16S e do gene *rpoB*. Tanto *K. pneumoniae*, quanto *K. oxytoca* são as principais espécies do gênero responsáveis por infecções hospitalares, sendo a *K. pneumoniae* a espécie clinicamente mais importante, devido à associação com altas taxas de mortalidade (HARYANI *et al.*, 2007).

Klebsiella pneumoniae é a bactéria Gram-negativa mais frequentemente envolvida em infecções hospitalares e surtos nosocomiais (FREITAS *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Muitos surtos causados por este organismo têm sido descritos na literatura, geralmente acomete pacientes internados em áreas de alto risco, tais como unidades de terapia intensiva ou UTI neonatal, embora as áreas de menor risco,

como áreas cirúrgicas/clínicas e asilos também podem ser afetadas (PATERSON; BONOMO, 2005; VELASCO *et al.*, 2009). *Klebsiella pneumoniae* é um importante patógeno oportunista. Em ambientes clínicos, o trato gastrointestinal dos pacientes e as mãos dos profissionais de saúde são os mais importantes reservatórios para a transmissão (SCHJORRING; STRUVE; KROGFELT, 2008). Em indivíduos saudáveis, a espécie *K. pneumoniae* é encontrada com frequência de 5 a 32% nas fezes e de 1 a 6% na orofaringe. Em pacientes hospitalizados pode haver um aumento dessa prevalência para 77% em amostra de fezes e 19% na secreção de nasofaringe (KONEMAN *et al.*, 2008).

Klebsiella pneumoniae tem sido relatada como a mais frequente espécie produtora de ESBLs (BRATU *et al.*, 2005c). Em alguns países a prevalência da produção de ESBL aproxima-se de 50% (LEAVITT *et al.*, 2009). Nos hospitais brasileiros, esta frequência é maior do que a observada em muitos hospitais europeus e americanos, Marra *et al.* (2006a), detectaram 51,8% de ESBLs positivos analisando 108 isolados de *K. pneumoniae* causadores de infecções sanguíneas, prevalência maior que outras descritas na literatura como Canadá (5%), Estados Unidos (8%), Europa (23%) e Pacífico Ocidental (25%) (SADER *et al.*, 2001; WINOKUR *et al.*, 2001; NOGUEIRA *et al.*, 2006; VILLEGAS *et al.*, 2008; DROPA *et al.*, 2009).

A resistência a outras classes de drogas entre isolados produtores de ESBL limita as opções terapêuticas úteis contra tais cepas (SCHWABER *et al.*, 2005), tornando os carbapenêmicos os agentes mais eficientes (TUMBARELLO *et al.*, 2007). A emergência da resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae*, está mais relacionada à produção de carbapenemases, como metalo-enzimas ou enzimas KPC, que a outros mecanismos de resistência, como produção de ESBL e deficiência na expressão de proteínas da membrana externa (OMPs) OMPK35 e OMPK36 (LEAVITT *et al.*, 2009; WOODFORD *et al.*, 2007).

Yegneswaran, Numswan e Alcid (2010), analisando 106 isolados de *K. pneumoniae* entre 2007 a 2009 nos Estados Unidos, encontraram 7,5% positivos para KPC. Bratu *et al.* (2005a), detectaram que 24% dos isolados de *K. pneumoniae* de New York possuíam os genes *bla*_{KPC-2} e *bla*_{KPC-3}, sendo que a maioria (88%) dos isolados KPC pertenciam a um mesmo ribotipo. Martins *et al.* (2010), analisando 40 isolados da cidade de Recife-PE, sendo 12 *K. pneumoniae*, encontraram 16 positivos para *bla*_{KPC}, sendo 10 *K. pneumoniae*, logo a taxa de produção de KPC dentre os isolados de *K. pneumoniae* foi 83,3% (10/12).

Ao longo dos últimos anos, estudos têm relatado a disseminação de MBLs tipo VIM em *Enterobacteriaceae* (WALSH *et al.*, 2005), sugerindo a disseminação desses determinantes de resistência entre diversos patógenos. Após o primeiro relato de IMP em *K. pneumoniae* no Brasil, evidenciou-se ampla disseminação desse mecanismo de resistência entre vários patógenos nos hospitais brasileiros (LINCOPAN *et al.*, 2005).

2.2. Plasmídeos

Além do cromossomo bacteriano, as bactérias podem conter pequenas moléculas circulares de DNA de dupla fita, denominadas plasmídeos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Esses elementos genéticos autoduplicam-se de forma independente da replicação cromossômica, podendo existir em número variável dentro da célula bacteriana e tendo funções diversas e seletivas. Portanto, podem ser classificados como plasmídeos de resistência (Plasmídeos R), de virulência, metabólicos e conjugativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Até o momento, 27 plasmídeos em *K. pneumoniae* variando de 3 Kb a 270 Kb têm sido seqüenciados (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/genlist.cgi?taxid=2;type=2;name=Bacteria%20Plasmids>) (GOLEBIEWSKI *et al.*, 2007; SHEN *et al.*, 2008; ZHAO *et al.*, 2010).

Os plasmídeos R ou fatores R (fatores de resistência) albergam genes de resistência e possuem importância médica significativa. Eles foram descobertos no Japão no final da década de 50 após várias epidemias de disenteria. Após o isolamento, descobriu-se que o patógeno era resistente a uma série de antibióticos diferentes e apresentava diferentes fatores R (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Muitos plasmídeos de resistência contêm dois grupos de genes. Um grupo é denominado fator de transferência (FTP) e inclui genes para replicação e conjugação. O outro, o R determinante, tem genes de resistência. Diferentes plasmídeos R quando presentes na mesma célula podem se recombinar. Os plasmídeos podem ser transferidos de uma bactéria para outra por conjugação ou transformação (Figura 2). A transferência destes plasmídeos de resistência pode ocorrer inter e intra-espécie, facilitando a disseminação da resistência (OZGUMUS, 2008).

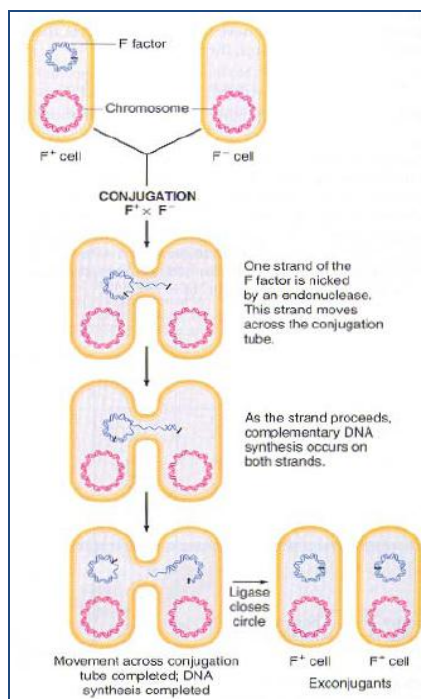


Figura 2. Mecanismo de conjugação bacteriana

(Fonte: http://www.libertaria.pro.br/d_ressurgentes_arquivo/conjugacao.gif&imgrefurl)

Bistué *et al.* (2008), mostraram a similaridade entre o plasmídeo de multirresistência pMET1 em *K. pneumoniae* com o plasmídeo pCRY em *Yersinia pestis*, sugerindo que podem compartilhar um ancestral comum, indicando um alto risco de disseminação de genes de resistência a antibióticos entre bactérias entéricas. Verma *et al.* (2001), sugerem que a persistência de estirpes multirresistentes no trato digestivo e urinário provavelmente facilita a conjugação de plasmídeos de cepas multirresistentes a outras enterobactérias. A transferência de genes de resistência entre as bactérias potencialmente patogênicas no trato gastrointestinal resulta em bactérias multirresistentes que podem causar infecções e se espalhar para organismos diferentes levando à falha de tratamento. Portanto, a flora endógena pode atuar como um reservatório de transferência de genes de resistência a bactérias patogênicas, que podem levar a infecções com possibilidades limitadas de tratamento (SCHJORRING; STRUVE; KROGFELT, 2008). Cepas resistentes de diferentes gêneros de *Enterobacteriaceae* e que contêm plasmídeos R podem estar presentes no trato gastrintestinal em um nível baixo e depois do tratamento antimicrobiano, serem selecionadas para colonizar o intestino (OZGUMUS *et al.*, 2008).

Plasmídeos não conjugativos podem ser transferidos de uma célula para outra ao se introduzirem em um plasmídeo conjugativo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Outras estruturas genéticas, como transposons e integrons podem se ligar ao plasmídeo R levando

genes de resistência adicionais. Os plasmídeos são distinguidos uns dos outros pela diferença de peso molecular, expresso em quilo base (Kb) e medido pela diferença de migração eletroforética em gel de agarose (DOMENICO *et al.*, 1992). O tamanho e o número de plasmídeos determinam distintos perfis plasmidiais (FEIZABADI *et al.*, 2008). Grandes plasmídeos são frágeis e apresentam-se em baixo número de cópias (EISEN *et al.*, 1995). Plasmídeos são geneticamente diferentes e contêm uma série de mutações, incluindo mutações benéficas e neutras, ou quase neutras, que são mutações que não podem conferir uma vantagem seletiva, mas ainda assim são comumente encontradas. A diversidade genética em plasmídeos de *K.pneumoniae* mostra claramente que as bactérias podem reforçar sua resistência a antibióticos frequentemente pela troca de plasmídeos de multirresistência e também pela elevada taxa de mutação em plasmídeos (ZHAO *et al.*, 2010). Perfis plasmidiais têm sido utilizadas em paralelo com outras técnicas de tipagem para estudar a epidemiologia das infecções por *K. pneumoniae* (FEIZABADI *et al.*, 2008). A extração de plasmídeos é relativamente rápida, barata e tecnicamente simples além de fornecer resultados facilmente interpretáveis, por outro lado, tem a desvantagem de não ter boa reprodutibilidade, pois os plasmídeos são moléculas instáveis, podendo ser eliminados da célula bacteriana.

A grande facilidade de *K. pneumoniae* em adquirir plasmídeos de multirresistência, através de conjugação bacteriana, faz com que essa espécie tenha alta taxa de resistência a diferentes antimicrobianos, principalmente aos β -lactâmicos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). A resistência a vários antimicrobianos é bem correlacionada com a presença ou ausência de plasmídeos. Organismos que expressam ESBL são frequentemente resistentes a outros agentes antimicrobianos, pois muitos desses genes de resistência adicionais são codificados nos plasmídeos associados a ESBL (WINOKUR *et al.*, 2001).

Sharma; Ray e Sharma (2010), descrevem uma tendência no aumento de resistência com o aumento do número de plasmídeos. Cepas abrigando múltiplos plasmídeos simultaneamente exibem co-resistência às diferentes classes de antibióticos, portanto há uma forte correlação entre o número de plasmídeos abrigados por um isolado e a resistência apresentada a várias drogas. A análise estatística deste trabalho revelou que os organismos com maior número de plasmídeos são resistentes a um maior número de drogas. SHAHID *et al.* (2008), compararam a perda da resistência a antibióticos à perda de conteúdo do plasmídeo, notando que todos os isolados de *K. pneumoniae* que perderam plasmídeos tornaram-se susceptíveis a determinados antibióticos.

A presença de plasmídeos de alto peso molecular (60 a 180 Kb) em isolados clínicos de *K. pneumoniae* tem sido observada em vários países e tem sido frequentemente associada com a produção de ESBLs (LI; LIM, 2000; CHANAWONG *et al.*, 2002; WEI *et al.*, 2005). Estas enzimas inativam os antimicrobianos β -lactâmicos, conseqüentemente a atividade terapêutica dessas drogas torna-se ineficaz e a bactéria não é eliminada no local da infecção (SOUZA JR.; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2003).

β -lactamases, mediadas por plasmídeos, que conferem resistência aos carbapenêmicos também têm sido reportadas em plasmídeos de *K. pneumoniae* (YAN; KO; WU, 2001; MOLAND *et al.*, 2003; POIREL *et al.*, 2004a). WENDT *et al.* (2010), encontraram plasmídeos de 80 Kb associados a *bla*_{KPC-2}, que são consideravelmente menores que outros plasmídeos descritos carreando genes *bla*_{KPC}, podendo indicar eventos de recombinação. Monteiro *et al.* (2009), relacionaram a presença do gene *bla*_{KPC-2} e *bla*_{CTX-M-2} com um único plasmídeo de 60 Kb através de experimentos de transformação.

Giakkoup *et al.* (2009), através de experimentos de hibridização indicaram a existência de plasmídeos de alto peso molecular (aproximadamente 350 Kb) codificando o gene *bla*_{VIM-1}. Ktari *et al.* (2006), mostraram a presença de dois grandes plasmídeos (maiores que 130 Kb) nos isolados de *K. pneumoniae*. Por PCR (reação em cadeia da polimerase), comprovaram que o menor codificou enzimas CMY-2 e VIM enquanto o maior codificou β -lactamases CTX-M e TEM. Queenan e Bush (2007), demonstraram que um plasmídeo de 450 Kb carregava o gene *bla*_{IMP-9}. Esses eventos reforçam o problema da resistência aos antibióticos em isolados de *K. pneumoniae*, um organismo com notória habilidade de acumular e transferir determinantes de resistência.

2.3. Antimicrobianos β -lactâmicos

Antimicrobianos são drogas que têm ação sobre microrganismos e que podem ter origem natural ou semi-sintética, produzidos totalmente ou parcialmente por microrganismos, como também podem ser sintetizados em laboratório, neste caso são chamados quimioterápicos (RANG *et al.*, 2006). Geralmente estas drogas apresentam um largo espectro de ação, ou seja, eles atuam sobre vários tipos de microrganismos. As diferentes classes de antibióticos apresentam diferentes mecanismos de ação, atuando principalmente na parede celular ou ribossomos, mas também podem atuar na membrana

citoplasmática, ácidos nucleicos e no metabolismo bacteriano. De acordo com o mecanismo de ação, algumas destas drogas não são seletivas e também atuam sobre as células humanas, causando efeitos adversos. Os principais grupos de antimicrobianos utilizados para enterobactérias, como a *K. pneumoniae* são: β -lactâmicos, aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol e quinolônicos (CLSI, 2007).

Os β -lactâmicos são os antibióticos mais prescritos mundialmente devido à boa atividade, baixa toxicidade e grande variedade dos compostos disponíveis (THERRIEN; LEVESQUE, 2000). Mais de 40 moléculas estruturalmente diferentes de β -lactâmicos estão disponíveis em 73 formulações e a maioria está prescrita para uso médico em hospitais. β -lactâmicos são bem tolerados pelo ser humano com poucos efeitos colaterais. Eles interagem muito especificamente com o seu alvo bacteriano, a D-alanil-D-alanina carboxipeptidase transpeptidase, normalmente referido como o DD-peptidase.

O grande número de antimicrobianos β -lactâmicos naturais, semi-sintéticos e sintéticos pode ser subdividido em seis diferentes subtipos estruturais: (1) penams que incluem os derivados de penicilinas (por exemplo, ampicilina e benzilpenicilina), (2) cepheids que incluem as cefalosporinas clássica, cefalosporinas de 2ª geração (cefuroxima e cefotiam, por exemplo) e também representantes das cefalosporinas de 3ª geração (por exemplo, ceftazidima, cefotaxima), (3) cefamicinas como 7-metoxi-cefalosporinas (por exemplo, cefoxitina), (4) monobactâmicos como moléculas monocíclica (por exemplo, aztreonam), (5) penems com uma ligação dupla 2,3 no anel thiazoline (Faropenem, por exemplo) e (6) carbapenêmicos (imipenem, por exemplo) diferindo da estrutura dos penems pela posse de um átomo de carbono na posição 1 (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). A estrutura básica destes antibióticos consiste de um anel β -lactâmico formado de três átomos de carbono e um de nitrogênio (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). Todos os antibióticos β -lactâmicos interferem na síntese do peptideoglicano da parede celular bacteriana. A penicilina foi o primeiro antibiótico e foi descoberto por Fleming em 1929. A penicilina pertence a antibióticos β -lactâmicos que têm um efeito letal sobre as bactérias através de uma interação com as proteínas alvo conhecidas como proteínas de ligação à penicilina (PBPs), localizada na membrana celular (ZEBA, 2005). Após a sua fixação aos sítios de ligação na bactéria, das quais pode haver sete ou mais tipos em diferentes microrganismos, os antibióticos β -lactâmicos inibem a enzima de transpeptidação que forma ligações cruzadas das cadeias peptídicas ligadas ao arcabouço do peptideoglicano. Então, PBPs são enzimas, transpeptidases, que estão envolvidas nas ligações cruzadas do

peptideoglicano da parede bacteriana. Os danos causados pelos β -lactâmicos às bactérias especialmente no estado de crescimento vêm da sua capacidade de se ligar as transpeptidases e inativá-las. Este processo de inativação interrompe a constituição fisiológica normal do peptidoglicano da parede celular e induz a lise e morte celular. O evento bactericida final consiste na inativação de um inibidor das enzimas autolíticas na parede celular levando a lise da bactéria (RANG *et al.*, 2006).

A hidrólise de antibióticos β -lactâmicos por β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência a esta classe de agentes antimicrobianos em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes (SOUZA JR.; FERREIRA; CONCEIÇÃO, 2003; BUSH; JACOBY, 2010). A emergência da resistência a antibióticos β -lactâmicos vem desde que o primeiro β -lactâmico, penicilina, foi desenvolvido (BRADFORD, 2001). A cada nova classe utilizada na terapia, novas β -lactamases emergem, causando resistência a mesma classe de drogas. Presumivelmente, o uso de novos antibióticos no tratamento de pacientes foi selecionando novas variantes de β -lactamases (BRADFORD, 2001).

Os carbapenêmicos e os monobactâmicos foram desenvolvidos para tratamento das infecções por microrganismos Gram-negativos produtores de β -lactamases resistentes às penicilinas e cefalosporinas (LIVERMORE *et al.*, 2001). Quatro carbapenêmicos atualmente aprovados pela FDA (Food and Drug administration) para uso clínico: imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem. Como essas drogas têm amplo espectro de atividade, elas são frequentemente utilizadas para terapia empírica de infecções potencialmente letais, tais como sepse. Carbapenêmicos também são utilizados para infecções com bacilos Gram-negativos multirresistente, como *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. e *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL (BRADFORD, 2001; YIGIT *et al.*, 2001; PATERSON; BONOMO, 2005; WEI *et al.*, 2007; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Isso porque estes antimicrobianos geralmente mantêm a atividade e o tratamento precoce com antibióticos inadequados pode resultar em maior mortalidade (PATERSON *et al.*, 2004; ANDERSON *et al.*, 2007; BENNETT *et al.*, 2010). De acordo com Wirth *et al.* (2009), os carbapenêmicos apresentam um bom espectro de atividade e são estáveis à hidrólise pela maioria das β -lactamases, incluindo as ESBLs.

O uso dos carbapenêmicos tem aumentado nas últimas duas décadas. Isto se deve, em parte, à facilidade de entrar na célula bacteriana (SANTOS *et al.*, 2008), à sua resistência à hidrólise por ESBLs (EDWARDS; BETTS, 2000; PATERSON, 2006) e ao seu vasto espectro de atividade antibacteriana. O ertapenem é um 1- β -metil carbapenem,

que chegou ao uso clínico em 2001 (SHAH; ISAACS, 2003). É altamente ativo contra bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL e AmpC (LIVERMORE *et al.*, 2001) e é um importante agente para o tratamento destas infecções (LEAVITT *et al.*, 2009).

A maior utilização destas drogas no ambiente hospitalar resulta em uma maior pressão seletiva sobre a microbiota, o que favorece a seleção de sub-populações de microrganismos com sensibilidade diminuída ou resistentes a esses antimicrobianos (MENDES *et al.*, 2004a). A resistência aos carbapenêmicos é incomum em organismos entéricos (BRATU *et al.*, 2005a; LOMAESTRO *et al.*, 2006; PETRELLA *et al.*, 2008), entretanto, a resistência pode surgir por conhecidos mecanismos (YIGIT *et al.*, 2001), principalmente pela produção de carbapenemases que degradam os antibióticos β -lactâmicos do grupo dos carbapenêmicos. São classificadas em: MBLs, pertencentes ao grupo 3 ou classe B (IMP, VIM, SPM, GIM); carbapenemases do grupo 2d ou classe D (OXA-23, OXA-48) e carbapenemases do grupo 2f ou classe A (KPC, SME, NMC-A, IMI) (BUSH, JACOBY; 2010).

2.4. Mecanismos de resistência e Beta-lactamases

As bactérias podem adotar várias estratégias para aumentar a resistência aos antibióticos, incluindo as seguintes: bombas de efluxo que pode expulsar níveis terapêuticos de antibióticos do interior da célula bacteriana (bomba de efluxo para tetraciclina, transportador ABC); degradação da droga ou modificação por inativação enzimática (β -lactamase, macrolídeos fosfotransferase, adeniltransferase estreptomicina, acetiltransferase aminoglicosídeos, fosfotransferase aminoglicosídeo), redução da permeabilidade da membrana; sítios de ação do antibiótico alterado ou alteração da via metabólica (MCKEEGAN; BORGES-WALMSLEY; WALMSLEY, *et al.*, 2002; ZHAO *et al.*, 2010) (Figura 3).

Mecanismos de resistência bacteriana

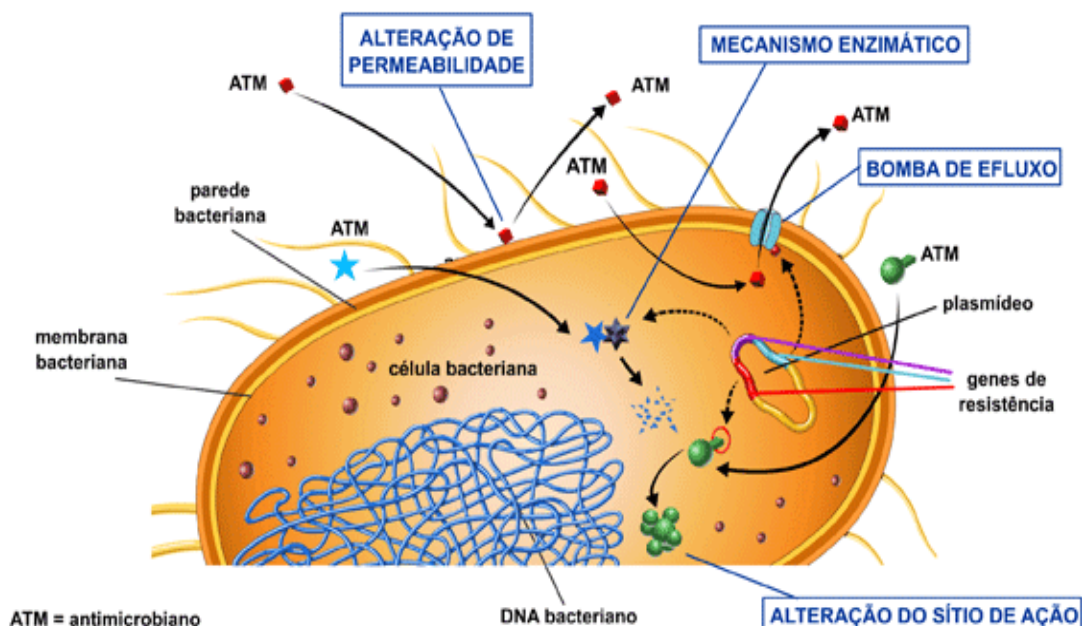


Figura 3. Mecanismos de Resistência bacteriana aos antimicrobianos
(Fonte: http://www.damedpel.com/CDD/4oAno/CGA/Antimicrobianos%20MS%20-%202008/opas_web/modulo3/mec_animacao.htm)

Em *K. pneumoniae*, as porinas OmpK35 e OmpK36 parecem regular a entrada dos carbapenêmicos e outros β -lactâmicos através da parede celular (MARTINEZ-MARTINEZ, 2002; BENNETT *et al.*, 2010). Um quinto mecanismo de resistência, caso específico para as sulfonamidas e trimetopim, se relaciona à capacidade da célula bacteriana em evitar a rota metabólica inibida por estes antibióticos (FARIAS, 2007). Em isolados de *K. pneumoniae*, mutações pontuais na DNA girase A (GyrA), proteína partição plasmídeo (PARC), ou a bomba de efluxo multidrogas (ACRA) podem ser associados à resistência às fluoroquinolonas (SCHNEIDERS; AMYES; LEVY, 2003; FU *et al.*, 2008).

Bactérias Gram-negativas possuem diferentes estratégias moleculares para o desenvolvimento de resistência a antibióticos β -lactâmicos: (1) produção de ESBL; (2) aquisição de genes que codificam ESBL de bactérias ambientais como, por exemplo, o *bla*_{CTX-M} de *Kluyvera* spp.; (3) alto nível de expressão de genes de β -lactamases codificados cromossomicamente como os genes *bla*_{OXA} ou *bla*_{AmpC}; (4) mobilização dos genes *bla* por incorporação em integrons e a transferência horizontal em outras espécies de bactérias Gram-negativas; (5) disseminação de carbapenemases mediada por plasmídeos como KPC e MBLs e (6) não-expressão de genes de porina e expressão de bomba de efluxo baseados na resistência aos antibióticos (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010).

A resistência, em geral de bactérias a antibióticos β -lactâmicos depende de três princípios básicos: (1) a presença de uma PBP alterada com baixa afinidade para β -lactâmicos (ex. PBP2a em *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes); (2) bombas de efluxo que, adicionalmente, usam β -lactâmicos como substratos (ex. o sistema mex na *P. aeruginosa*); (3) β -lactamases que clivam a ligação amida do anel β -lactâmico, inativando o antibiótico (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). A resistência a uma cefalosporina de espectro estendido também pode ser explicada pela (1) expressão de uma β -lactamase tipo ampC ou (2) expressão de TEM-1 ou SHV-1 β -lactamase em associação com alterações na permeabilidade da membrana externa ou mesmo (3) pela presença de um único inibidor de β -lactamase (WINOKUR *et al.*, 2001).

β -lactamases são enzimas capazes de degradar o anel β -lactâmico dos antibióticos transformando-os em produtos inativos (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008). São enzimas codificadas principalmente por genes plasmidiais que são encontrados com frequência entre as enterobactérias, representando uma séria ameaça a atual terapia por antibióticos β -lactâmicos (THERRIEN; LEVESQUE, 2000; HAEGGMAN *et al.*, 2004; JEONG *et al.*, 2004; WOODFORD *et al.*, 2005). No início de 1960 TEM-1 foi descrita na Europa, a primeira β -lactamase plasmídeo mediada, em uma linhagem de *Escherichia coli*. Posteriormente espalhou-se em todo o mundo para outras espécies de bactérias (*P. aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*, dentre outras) (BRADFORD, 2001). Ao mesmo tempo, outra enzima surgiu, a SHV-1. Esta β -lactamase é codificada cromossomicamente em *K. pneumoniae* mas codificada por plasmídeos em *E. coli* (ZEBA *et al.*, 2005). SHV-1 e TEM-1 são provavelmente as mais predominantes hidrolases de β -lactâmicos em espécies como *K. pneumoniae* e *E. coli*. *Klebsiella pneumoniae* é conhecida por abrigar, pelo menos, dois tipos de β -lactamases codificadas cromossomicamente sendo SHV-1 (BABINI; LIVERMORE, 2000; DROPA *et al.*, 2009) e LEN-1, as quais conferem resistência a ampicilina, amoxicilina, carbenicilina e ticarcilina, sendo também codificadas por transposons e integrons (SOUZA LOPES *et al.*, 2005). Souza Lopes *et al.* (2005), verificaram também que todos os isolados foram resistentes à ampicilina, mesmo aqueles que não apresentavam plasmídeos mostrando que a resistência a ampicilina em *K. pneumoniae* está relacionada a genes cromossômicos.

Mais de 50 anos de uso inadequado ou abusivo de β -lactâmicos para tratamento de infecções hospitalares e comunitárias criou uma enorme pressão seletiva sobre o ecossistema bacteriano. Levando à seleção de cepas resistentes produtoras de novas β -

lactamases ou variantes das β -lactamases clássicas, resultando no aumento da morbidade, mortalidade e custos nos cuidados de saúde. A evolução das β -lactamases foi acelerada pelo uso intensivo de β -lactâmicos naturais e semi-sintéticos em diversos ambientes, tais como agricultura, indústria e medicina. Surpreendentemente, cerca da metade dos antimicrobianos produzidos nos países industrializados são usados para fins agrícolas e suplementação alimentar para animais (THERRIEN; LEVESQUE, 2000). Hoje, as bactérias são geneticamente mais complexas do que há uma ou duas décadas. Não só devido aos novos mecanismos de resistência como ESBL, mas também devido a isolados que produzem múltiplas β -lactamases, representando um grave problema terapêutico em muitas partes do mundo (SHARMA; RAY; SHARMA, 2010). De fato a existência de β -lactamases juntamente com ESBLs, múltiplas ESBLs e ESBLs com MBLs se tornou comum em *K. pneumoniae* multirresistente (YAN; KO; WU, 2001; ESSACK; HALL; LIVERMORE, 2004).

A primeira β -lactamase foi descrita em 1940 por Abraham e Chain (BERTONCHELI; HORNER, 2008). Estas enzimas, provavelmente já existiam antes da descoberta dos antibióticos β -lactâmicos e podem desempenhar outros papéis nas bactérias (ZEBA *et al.*, 2005). Estudos apóiam o conceito de que a função fisiológica das β -lactamases é reestruturar o glicopeptídeo durante o crescimento da célula bacteriana, pois foi verificado que a síntese de β -lactamase pode ser induzida pela presença de precursores da parede celular no meio extracelular (TORTORA; FUNKE; CASE, 2005). Sua síntese também pode ser induzida pela presença de antibióticos β -lactâmicos. Até hoje β -lactamases têm sido encontradas exclusivamente em bactérias. A atividade de β -lactamase não foi detectada em fungos produtores de β -lactâmicos, como espécies de *Penicillium* e *Cephalosporium*. Sobre a origem dessas enzimas, a idéia aceita hoje é que β -lactamases são o resultado de conversão de PBPs por transformação genética. Isto significa que ambos os tipos de proteínas têm um ancestral em comum (ZEBA *et al.*, 2005).

Ao final de 2009, o número de seqüências únicas de proteína para β -lactamases ultrapassou 890 (<http://www.lahey.org/Studies>; BUSH; JACOBY, 2010). A Classificação de β -lactamases tem sido tradicionalmente baseada tanto nas características funcionais das enzimas quanto na sua estrutura principal (BUSH; JACOBY, 2010). As razões para a diversidade das β -lactamases são muitas, as serina- β -lactamases são enzimas antigas, estima-se que evoluíram por mais de 2 bilhões de anos (HALL; BARLOW, 2003.). Essas enzimas são encontradas em bactérias que vivem em uma grande variedade de ambientes e,

portanto, estão sujeitas a pressões seletivas diferentes. Além disso, são enzimas adaptáveis que evoluíram para evitar sua danificação por compostos que funcionam como inibidores enzimáticos (MEDEIROS, 1997).

Os genes *bla* foram beneficiados com muitos mecanismos de transferência horizontal entre as bactérias e se espalharam para novos hospedeiros, tornando-se parte de plasmídeos de multirresistência, agora comuns em isolados clínicos. Portanto, há uma previsão segura que as β -lactamases continuarão a evoluir, assim como esquemas de classificação necessários para a sua descrição.

As β -lactamases são bastante diversificadas podendo ser agrupadas em 4 classes moleculares (A, B, C e D) de acordo com as características estruturais (classificação de Ambler) ou em 3 principais grupos de acordo com características funcionais e moleculares (esquema de Bush-Jacob-Medeiros de 1995) (ROBIN *et al.*, 2005; BUSH; JACOBY, 2010).

As classes A, C e D incluem enzimas capazes de hidrolisar os substratos, formando uma enzima acil através de um sítio ativo de serina, enquanto que a classe B são metaloenzimas que utilizam pelo menos um sítio ativo de íons zinco a fim de facilitar a hidrólise de β -lactâmicos (BUSH; JACOBY, 2010).

As enzimas do grupo 1 são cefalosporinases pertencentes à classe molecular C que são codificadas cromossomicamente em *Enterobacteriaceae* e poucos outros organismos (JACOBY, 2009).

O grupo 2 compreende as serina- β -lactamases, inclui as classes A e D e representa o maior grupo de β -lactamases, devido principalmente ao aumento na identificação de ESBLs durante os últimos 20 anos (CHANAWONG *et al.*, 2002; COQUE *et al.*, 2002).

Subgrupo 2b hidrolisa facilmente penicilinas e cefalosporinas antigas, tais como cefaloridina e cefalotina e é fortemente inibido pelo ácido clavulânico e tazobactam. Inclui as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1, o mais comum grupo de β -lactamases mediadas por plasmídeos identificadas em 1970 e 1980. Desde 1995, pelo menos 9 TEM e 29 SHV do subgrupo 2b têm sido descritas (<http://www.lahey.org/Estudos>; BUSH; JACOBY, 2010).

Subgrupo 2be compreende as ESBLs. Estas enzimas de amplo espectro mantêm a atividade contra penicilinas e cefalosporinas do subgrupo 2b, além de hidrolisar um ou mais oximino- β -lactâmicos, como a ceftazidima, cefotaxima e aztreonam. O primeiro e maior subconjunto do subgrupo 2be foi obtido por substituições dos aminoácidos em TEM-1, TEM-2 e SHV-1 que ampliou seu espectro hidrolítico (QUEENAN *et al.*, 2004).

TEM e SHV ESBLs foram juntadas pela semelhança funcional, posteriormente enzimas CTX-M (BONNET, 2004). Como o nome indica, a maioria das enzimas CTX-M hidrolisam cefotaxima mais prontamente que ceftazidima. Muitas hidrolisam cefepime também. Caracteristicamente, o subgrupo 2be permanece sensível à inibição pelo ácido clavulânico, um recurso usado na detecção por laboratórios de análises clínicas (CLSI, 2009).

Enzimas do subgrupo 2br são β -lactamases que adquiriram resistência ao ácido clavulânico e inibidores relacionados. Atualmente 36 das 135 enzimas TEM, caracterizadas funcionalmente, têm essa propriedade e incluem enzimas como a TEM-30 e TEM-31 (IRT-1 e IRT-2, respectivamente), bem como 5 das correspondentes 72 SHV funcionalmente caracterizadas (por exemplo, SHV-10). Nenhuma CTX-M β -lactamase demonstrou essa característica até o momento (<http://www.lahey.org/Studies>; BUSH; JACOBY, 2010).

Subgrupo 2d compreende as OXA carbapenemases da classe D de Ambler. Essencialmente encontradas em *Acinetobacter* spp. sendo incomuns em outros gêneros de bactérias. Porém há um relato de OXA carbapenemases em *P. aeruginosa* (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2006), e dois relatos de OXA carbapenemases em *Enterobacteriaceae*, OXA-48 codificada por plasmídeo em *K. pneumoniae* isolada da Turquia (POIREL *et al.*, 2004a) e OXA-23 cromossomicamente codificadas em *Proteus mirabilis* da França (BONNET *et al.*, 2002; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009).

O subgrupo 2f compreende as serina-carbapenemases da classe molecular A, tendo os carbapenêmicos como substrato. Estas enzimas são melhor inibidas pelo tazobactam do que pelo ácido clavulânico. SME, IMI-1 e CNM-1 são os representantes cromossômicos das enzimas do subgrupo 2f (QUEENAN; BUSH, 2007). Mais preocupante, no entanto, é o subgrupo 2f mediado por plasmídeo, incluindo enzimas KPC e algumas GES (antiga IBC). A carbapenemase KPC em particular, têm sido recentemente associada com grandes surtos de infecções por bactérias Gram-negativas multirresistente em hospitais em Nova York (BRADFORD *et al.*, 2004; BRATU *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c) e em Israel (LEAVITT *et al.*, 2009), propagando-se mundialmente (VILLEGAS *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2007; MONTEIRO *et al.*, 2009; ZAVASCKI *et al.*, 2009).

O grupo 3 compreende as MBLs que hidrolizam penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos e que não são inibidas pelo ácido clavulânico. Elas diferem estruturalmente das outras β -lactamases por sua exigência de um íon de zinco no sítio

ativo. Funcionalmente, já foram distinguidas principalmente pela sua capacidade de hidrolisar carbapenêmicos, porém algumas serina- β -lactamases têm agora adquirido essa habilidade. Em contraste com as serina- β -lactamases, MBLs têm uma fraca afinidade ou capacidade hidrolítica para monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou tazobactam. Em vez disso, elas são inibidas por metais quelantes de íons tais como EDTA, ácido dipicolínico ou 1,10-o-fenantroline (MARCHIARO *et al.*, 2008). O subgrupo 3a inclui as principais famílias de MBL plasmidiais, tais como IMP e VIM que têm aparecido globalmente, principalmente em bactérias não-fermentadoras, mas também em *Enterobacteriaceae*. O subgrupo 3b contém um pequeno grupo de MBLs que preferencialmente hidrolisam carbapenêmicos em contraste às penicilinas e cefalosporinas (BUSH; JACOBY, 2010).

Existem vários mecanismos de resistência aos carbapenêmicos (JACOBY; MUNOZ-PRICE, 2005; PATERSON, 2006; QUEENAN; BUSH, 2007; BENNETT *et al.*, 2010). Desde 2003 tem sido relatado o surgimento de isolados de *K. pneumoniae* agentes de surtos de infecções hospitalares produtores de carbapenemases (KPC-2 e -3) na cidade de Nova York (MOLAND *et al.*, 2003; WOODFORD *et al.*, 2004a; BRATU *et al.*, 2005a; 2005b; 2005c) e MBLs, IMP e VIM, no Japão e na Itália, respectivamente (WATANABE *et al.*, 1991; LAURETTI *et al.*, 1999).

2.5. Beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

A maior parte das ESBLs é derivada das β -lactamases TEM-1, TEM-2 ou SHV-1 que são amplamente distribuídas dentre a família *Enterobacteriaceae* (WINOKUR *et al.*, 2001). Através de mutações pontuais, ocorre substituição de um ou mais aminoácidos na cadeia original aumentando o espectro hidrolítico da enzima consequentemente permitindo a inativação de β -lactâmicos mais recentes como as cefalosporinas de 3^o (Ceftazidima, Cefotaxima, Cefoxitina) e 4^o geração (Cefepime) e monobactâmicos, como Aztreonam (SABIHA *et al.*, 2001). Mais recentemente, uma série de enzimas ESBL que não estão relacionadas com as enzimas TEM e SHV foram descritas (BUSH; JACOBY, 2010). Enzimas do tipo CTX-M foram identificadas nos últimos anos. Estas enzimas não estão relacionadas às enzimas TEM ou SHV porque compartilham apenas 40% de identidade (MINARINI *et al.*, 2007). A localização desses genes em elementos móveis podem

aumentar a dispersão das ESBLs entre as diferentes cepas de enterobactérias (PITOUT *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2010).

Devido ao amplo uso de β -lactâmicos ao longo das últimas décadas na prática clínica, várias β -lactamases têm surgido, tornando-se um problema mundial (CHENG *et al.*, 2009; GOYAL *et al.*, 2009). Isolados de *Klebsiella* spp. são frequentemente multirresistentes e são os hospedeiros principais de ESBLs. Bactérias Gram-negativas com múltiplas β -lactamases têm sido relatadas em vários lugares (ESSACK *et al.*, 2001). O surgimento de organismos complexos leva a diversas implicações. Em primeiro lugar, a produção de várias β -lactamases aumenta a probabilidade que os inibidores de β -lactamases sejam ineficazes. Em segundo lugar, tal complexidade restringe a leitura interpretativa de antibiogramas. Em terceiro lugar, a vigilância da base molecular da resistência antimicrobiana torna-se progressivamente mais difícil, com a crescente probabilidade de que alguns mecanismos de resistência serão mascarados por outros (ESSACK; HALL; LIVERMORE, 2004). A resistência devido à produção de ESBL pode ser difícil de detectar porque *K. pneumoniae* pode hiperproduzir β -lactamases não ESBL (por exemplo, SHV-1) ou possuem modificações em proteínas da membrana externa, que também conferem um fenótipo semelhante a ESBL causando resultados falso-positivos (RICE *et al.*, 2000; WU *et al.*, 2001; SCHWABER *et al.*, 2004; MENDONÇA; FERREIRA; CANIÇA, 2006). Mendonça, Ferreira e Caniça (2006), encontraram nove classificações falso-positivas de produtores de ESBL, utilizando métodos fenotípicos. Os motivos incluem modificações em proteínas de membrana externa (RICE *et al.*, 2000), hiper-produção da enzima SHV-1 devido ao elevado número de cópias de genes (PODBIELSKI *et al.*, 1991) ou mutação em um único par de base na seqüência promotora (RICE *et al.*, 2000).

Mendonça, Ferreira e Caniça (2006), mostraram também que a detecção e confirmação de cepas produtoras de ESBL é um problema e que *K. pneumoniae* produtoras de ESBL são provavelmente esquecidas em alguns hospitais e laboratórios privados. Este fato pode constituir uma ameaça real, porque (1) há um efeito de inóculo in vivo, bem como in vitro, com o consequente aumento da resistência às cefalosporinas de espectro estendido; (2) *K. pneumoniae* é um importante patógeno nosocomial e (3) é um frequente produtor de ESBL mundial. E ainda pacientes com infecções causadas por *Enterobacteriaceae* produtores de ESBL não devem ser tratados com antibióticos β -

lactâmicos, devido ao risco de falha terapêutica e maior infectividade que poderia resultar em morte (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

As cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBLs foram inicialmente identificadas na década de 80, na Alemanha por Knoth em 1983 e logo se tornaram prevalentes na Europa disseminando-se para diferentes gêneros de enterobactérias, causando sérios problemas terapêuticos em vários países do mundo (OZGUMUS *et al.*, 2008). A introdução de cefalosporinas de terceira geração, que começou com cefotaxima há 30 anos, foi um marco na quimioterapia antimicrobiana. Sem dúvida, como consequência da pressão seletiva exercida por essas novas cefalosporinas, a resistência em espécies de enterobactérias surgiu alguns anos depois (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Naquela época, duas principais causas foram especificadas: (1) expansão do espectro do substrato de TEM e SHV β -lactamases que já estavam amplamente disseminadas, devido à localização plasmidial destes genes (JARLIER *et al.*, 1988) e (2) expressão constitutiva de alto nível do gene *ampC* intrínseco que codifica uma cefamicinase (cefoxitina como indicador de substrato fenotípico) (SANDERS; SANDERS, 1992). O surgimento e a rápida disseminação de cepas *K. pneumoniae* produtoras de ESBL é responsável por surtos de infecção em todo o mundo. Unidades de terapia intensiva são particularmente sensíveis em termos de desfechos clínicos e esses organismos têm sido implicados no aumento da morbidade e mortalidade (PATERSON; BONOMO, 2005; MENDONÇA; FERREIRA; CANIÇA, 2006).

Coque; Baquero e Canton (2008), demonstraram que a frequência de *Enterobacteriaceae* produtores de ESBLs na Espanha tinha aumentado de menos de 1% para 5% entre os pacientes ambulatoriais e de menos de 1% para 12% entre os pacientes hospitalizados entre 1991 e 2003, com uma prevalência de 4% em voluntários saudáveis durante 2004. Alguns recentes estudos brasileiros mostram a alta prevalência de enterobactérias produtoras de ESBL em centros de saúde e até mesmo na comunidade, especialmente em isolados de *K. pneumoniae* (NOGUEIRA *et al.*, 2006; MINARINI *et al.*, 2007; SILVA DIAS; BORGES-NETO; FERRAIUOLI, 2008; DROPA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010).

Há mais de 300 ESBLs descritas até o momento, a maioria delas, derivadas de grupos TEM, SHV e CTX-M com 174, 119 e 95 variantes, respectivamente (<http://www.lahey.org/Studies>; DROPA *et al.*, 2009; JONES *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2010). Genes que codificam ESBL são geralmente localizados em plasmídeos

transferíveis, que podem carrear outros determinantes de resistência, tais como os de resistência a aminoglicosídeos, tetraciclinas, cloranfenicol, trimetoprim e sulfonamidas (MINARINI *et al.*, 2007). O achado de resistência a vários antibióticos entre isolados produtores de ESBL é previsível uma vez que os genes que codificam ESBL geralmente estão localizados em plasmídeos auto-transmissíveis, que muitas vezes carregam outros determinantes de resistência a antibióticos (FEIZABADI *et al.*, 2008). Em geral, a difusão de genes de resistência a antibióticos é facilitada por três estratégias principais: (1) disseminação clonal da bactéria que adquiriu genes de resistência, (2) propagação de um plasmídeo particular e/ou transposon entre uma variedade de diferentes cepas, e (3) translocação de genes de resistência entre os diferentes elementos genéticos móveis (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). De acordo com OZGUMUS *et al.* (2008), alguns surtos de ESBL têm sido atribuídos à disseminação de plasmídeos entre as cepas da família *Enterobacteriaceae*. Para ZHAO *et al.* (2010), a transferência de genes de resistência a drogas mediada por plasmídeos entre as cepas bacterianas foi considerada um dos mecanismos mais importantes para a propagação da resistência a múltiplas drogas. Em outros casos, a propagação de ESBL em um único ambiente tem sido relatada, devido à ocorrência de um mesmo gene em plasmídeos independentes. Embora a disseminação de plasmídeos seja bem documentada (ASENSIO *et al.*, 2000; ESSACK *et al.*, 2001), a disseminação de uma cepa epidêmica continua a ser o mecanismo mais comumente reportados de disseminação de ESBL.

Os métodos de detecção fenotípica de produção de ESBLs são baseados em testes de triagem e confirmatório. Na rotina, o teste de screening é realizado através da leitura dos halos obtidos no antibiograma e comparados à tabela do CLSI. O uso de testes fenotípicos para a detecção de microrganismos produtores de ESBLs continua a ser um problema, causando uma grande discussão e controvérsia. A resistência a antibióticos β -lactâmicos em bacilos entéricos Gram-negativos pode ser difícil de detectar usando métodos padrão de difusão em disco, Kirby-Bauer, ou caldo diluição para a concentração mínima inibitória (MIC). Essa dificuldade é devido às diferenças genéticas nos determinantes de resistência, às diferenças nos níveis de expressão do gene e à variação no espectro de atividade enzimática contra o substrato β -lactâmico usado para testes de susceptibilidade (QIN *et al.*, 2004). Embora presuntivo, o teste para identificação fenotípica de ESBL baseado na difusão em disco é a estratégia mais comum usada em laboratórios de microbiologia nos hospitais brasileiros. No entanto, esse método apresenta

sérias limitações, como mecanismos de resistência adicionais, por exemplo, β -lactamases tipo AmpC que podem causar divergência nos resultados (PERILLI *et al.*, 2002). O método padrão de difusão em disco de Kirby-Bauer e concentração mínima inibitória automatizada, não detectam prontamente resistência induzida tipo ampC.

Como teste confirmatório, são utilizados discos impregnados com a droga: disco combinado (beta-lactâmico/inibidor de β -lactamase) e disco do mesmo beta-lactâmico não-combinado. A inibição pelos inibidores de β -lactamase, como ácido clavulânico ou sulbactam (propriedade comum de enzimas ESBL) é utilizada para a confirmação fenotípica da produção de ESBL de um isolado. Existem vários métodos para a confirmação da produção de ESBL (MENDONÇA; FERREIRA; CANIÇA, 2006). A avaliação destes métodos foi publicada (FLORIJN *et al.*, 2002; LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2002; MACKENZIE; MILLER; GOULD, 2002; KOMATSU *et al.*, 2003; LINSOTT; BROWN, 2005). Estes métodos baseiam-se no aumento do halo do β -lactâmico na presença do ácido clavulânico (ROSSI; ANDREAZZI, 2005). Ainda como teste confirmatório, utiliza-se o teste de aproximação dos discos (teste de sinergia de disco duplo) (VERCAUTEREN *et al.*, 1997), em que um disco contendo clavulanato ou sulbactam é colocado a 20mm dos discos de β -lactâmicos. O aumento ou distorção da zona de diâmetro ao redor do oximino- β -lactâmico (chamada zona ghost) indica a presença de uma ESBL (Figura 4).



Figura 4. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo teste de sinergia do disco duplo proposta por Vercauteren *et al.* (1997). (Fonte: o autor)

O CLSI preconiza como os testes de sensibilidade devem ser realizados e interpretados e em 2010 esses padrões de interpretação foram revisados e alterados para enterobactérias. Foram publicados novos pontos de corte para cefazolina, ceftriaxona,

cefotaxima e ceftazidima. Esses novos critérios interpretativos para cefalosporinas e aztreonam foram estabelecidos com base nas propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas e dados clínicos. Cefepime e cefuroxima também foram avaliados, mas não houve mudanças nos critérios interpretativos para as dosagens indicadas. Com a mudança para essa versão, a sensibilidade das drogas é reportada da maneira que são lidas (CLSI, 2010). Outro teste fenotípico que permite a detecção de mecanismos de resistência é o E-Teste, método em que uma fita plástica com gradientes de concentração de antimicrobianos detecta o mecanismo de resistência além do MIC dos antimicrobianos testados (Figura 5).



Figura 5. Placa com meio Ágar Mueller-Hinton após incubação para teste de detecção de ESBLs pelo E-test (Fonte: o autor)

Testes baseados na detecção de ESBL por PCR e focalização isoeletrica (IF) são mais conclusivos para a produção de ESBL (STEWART *et al.*, 2001). Em um cenário de aumento da resistência microbiana aos antibióticos, devido as limitações conhecidas dos métodos fenotípicos, há necessidade de métodos moleculares, como PCR para identificação de microrganismos produtores de ESBL (CARTER *et al.*, 2000).

Oliveira *et al.* (2010), encontraram disparidades entre resultados fenotípicos e moleculares em 15 isolados que apresentavam o gene da família SHV, mas foram negativos no teste fenotípico. Estes resultados apontam para uma provável falha de detecção do teste baseado na inibição da enzima pelo ácido clavulânico. Situações em que a ação inibitória do ácido clavulânico pode ser mascarada incluem (1) coexistência de mais de uma enzima que confere resistência, por exemplo, enzimas ESBL mais enzimas tipo AmpC, (2) mudanças nos poros das membranas celulares e (3) inibidores de β -lactamases com uma menor afinidade para β -lactamases tipos TEM e SHV (STEWART *et al.*, 2001;

SANGUINETTI *et al.*, 2003). Além disso, (4) a produção de diferentes tipos de β -lactamases (TEM, SHV, CTX-M, OXA) pelo mesmo microrganismo pode levar a conclusões errôneas fenotípica (SANGUINETTI *et al.*, 2003). Em 2007, Tofteland, *et al.* (2007), relataram que hiper-produção de HSV-1 ou HSV-11 também pode ser a causa da falha na detecção de ESBL quando o método de disco combinado é usado.

Mendonça; Ferreira; Caniça (2006), testando os métodos fenotípicos de microdiluição em ágar, microdiluição em caldo e E-test, viram que o E-test foi o único método que detectou todas as cepas produtoras de ESBLs, obtendo 100% de sensibilidade, achado semelhante a outros autores (LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2002). Alguns autores relatam uma menor sensibilidade, Florijn *et al.* (2002), 93%; Linscott e Brown (2005), 97% e MacKenzie *et al.* (2002), 77%. O E-test apresenta algumas limitações incluindo problemas de leitura e interpretação (LEVERSTEIN-VAN HALL *et al.*, 2002). O método de microdiluição em caldo apresentou sensibilidade de 93%, utilizando orientações do CLSI, comparado com os resultados de outros estudos, Komatsu *et al.* (2003), 92% e Linscott e Brown (2005), 100%. Qin *et al.* (2004), através do teste de sinergia de disco duplo identificaram 76% dos isolados como produtores de ESBLs, que seriam considerados sensíveis pelo método padrão difusão em disco Kirby-bauer.

2.6. TEM e SHV

As enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 inativam penicilinas e algumas cefalosporinas, mantendo a sensibilidade aos inibidores de β -lactamases, tais como ácido clavulânico, sendo inativas contra oximino-cefalosporinas, como ceftazidima. O nome TEM é uma referência a Temoniera, paciente do qual a bactéria foi isolada. Em contraste, SHV, é a contração de Sulphhydryl variable, descrição de propriedades bioquímicas desta β -lactamase (HERITAGE *et al.*, 1999). A partir de 1983, devido ao intenso uso de β -lactâmicos ocorreu uma evolução destas β -lactamases surgindo as ESBLs, primeiramente relatadas em isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *Serratia marcescens* na Alemanha (SHV-2) (HERITAGE *et al.*, 1999) e na França em 1984 (TEM-3). Estas enzimas diferem das β -lactamases originais por um ou poucos aminoácidos conferindo atividade hidrolítica contra oximino-cefalosporinas, tais como, ceftazidima, cefotaxima e cefoperazona (SALADIN *et al.*, 2002). Os genes contendo estas mutações estão presentes em elementos móveis, facilitando sua disseminação em patógenos nosocomiais.

SHV-2 difere em um único aminoácido da SHV-1 (glicina em SHV-1 e serina em SHV-2, na posição 238) (HERITAGE *et al.*, 1999). Em 1988, SHV-3 foi descrita em *K. pneumoniae* isolada de um paciente de UTI francesa (JARLIER *et al.*, 1988). Pouco tempo após a descrição de SHV-3, outros membros da família foram identificados. SHV-5 (com ponto isoelétrico de 8,2) foi inicialmente detectada em um isolado de *K. pneumoniae* de um hospital em Santiago, Chile (GUTMANN *et al.*, 1989) e foi subsequencialmente encontrada em outros países (MENDONÇA; FERREIRA; CANIÇA, 2006). Estudos de outras partes do mundo reportaram que SHV-5 é um comum gene em isolados de *K. pneumoniae* (PERILLI *et al.*, 2002; LAL *et al.* 2007).

Derivados de SHV-1 também têm atividade de espectro estendido, capaz de inativar cefalosporinas de terceira geração ou são resistentes aos inibidores de β -lactamases (HERITAGE *et al.*, 1999). A análise da sequência de nucleotídeos mostra que SHV-1 é intimamente relacionada a LEN-1 (88,9%) e apresenta perfil bioquímico similar a OHIO-1 compartilhando 91,8% de sequência nucleotídica. SHV-1 e TEM-1 compartilham somente 63,7% de similaridade na sequência de aminoácidos (HERITAGE *et al.*, 1999).

Dropa *et al.* (2009), detectaram os genes que codificam a família SHV em 63% dos isolados, em seis espécies diferentes, das quais 88,7% foram *K. pneumoniae*. A maioria das enzimas deste grupo são ESBL, exceto SHV-1 e SHV-11. De acordo com a literatura a maioria das cepas de *K. pneumoniae* possuem o gene cromossômico *bla*_{SHV-1} (BABINI; LIVERMORE, 2000; HOWARD *et al.* 2002, LIVERMORE, 2008). Bennett *et al.* (2010), identificaram como ESBLs mais comuns no grupo de isolados de *K. pneumoniae* membros da família SHV (13/14, 93%) e CTX-M (10/14, 71%), houve concomitância da produção de SHV-2 e CTX-M-15.

Analisando 13 isolados representativos, Damjanova *et al.* (2007), detectaram o gene *bla*_{SHV-2} e *bla*_{SHV-5} em três e em sete isolados, respectivamente. Na maioria dos isolados os genes *bla*_{SHV} foram transferidos em plasmídeos de 94 Kb. Os resultados sugerem que um plasmídeo semelhante carreando *bla*_{SHV-5} tem se difundido entre os clones epidêmicos de *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* causando surtos em regiões geograficamente distantes da Hungria. Prodinger *et al.* (1996), descreveram a difusão epidêmica de um plasmídeo carreando *bla*_{SHV-5} com um tamanho de 80 Kb causando surtos paralelamente em três setores hospitalares na Áustria. Resultados semelhantes foram publicados por Galani *et al.* (2002) a partir Grécia. De acordo com Sharma; Ray e Sharma (2010), uma

vez que não se realize qualquer experimento de transferência de resistência a drogas, é difícil supor que este é o plasmídeo de resistência aos β -lactâmicos.

A enzima TEM-3 foi inicialmente nomeada de CTX-1, por conferir resistência a cefotaxima (HERITAGE *et al.*, 1999), difere de TEM-2 por duas substituições de aminoácidos (SOUGAKOFF *et al.*, 1988). Numa retrospectiva, TEM-3 pode não ter sido a primeira ESBL tipo TEM. Em *Klebsiella oxytoca*, um plasmídeo contendo um gene de resistência à ceftazidima, foi isolado pela primeira vez em Liverpool, Inglaterra, em 1982 (DU BOIS; MARRIOTT; AMYES, 1995). A β -lactamase responsável agora é chamado de TEM-12. Curiosamente, a cepa veio de uma unidade neonatal, que tinha sido atingida por um surto de *K. oxytoca* produtoras de TEM-1. Ceftazidima foi usada para tratar pacientes infectados, mas posteriormente isolados de *K. oxytoca* da mesma unidade abrigaram ESBL do tipo TEM (DU BOIS; MARRIOTT; AMYES, 1995). Este é um bom exemplo do surgimento de ESBLs como uma resposta à pressão seletiva induzida por cefalosporinas de espectro estendido. Bem mais de 100 β -lactamases tipo TEM têm sido descritas, das quais a maioria são ESBLs. Seus pontos isoelétricos variam de 5,2 a 6,5. As alterações de aminoácido em comparação com TEM-1 e TEM-2 estão documentados no <http://www.lahey.org/estudos/temtable.htm> (PATERSON; BONOMO, 2005). TEM-13 também tem um perfil semelhante hidrolítico a TEM-1 e TEM-2. TEM-1, TEM-2 e TEM-13 não são ESBLs (JACOBY; MEDEIROS, 1991).

Em 1990 surgiram enzimas do tipo TEM resistentes aos inibidores utilizados em combinação com as penicilinas. Estas enzimas foram examinadas por Chaibi *et al.* (1999) e não são consideradas ESBLs. No entanto, curiosamente, mutantes de TEM β -lactamases que estão sendo recuperados mantêm a capacidade de hidrolisar as cefalosporinas de terceira geração, mas também demonstram resistência aos inibidores. Estes são referidos como complexo mutante de TEM (CMT-1 a -4) (NEUWIRTH *et al.*, 2001; POIREL; MAMMERI; NORDMANN, 2004; PATERSON; BONOMO, 2005). Consequentemente, surgiu o terceiro subgrupo das enzimas TEM, as quais conferem diferentes níveis de resistência ao ácido clavulânico e as oximino-cefalosporinas (BRADFORD, 2001; ROBIN *et al.*, 2005).

Damjanova *et al.* (2007), encontraram 34% de positividade pra *bla*_{TEM} dentre 126 isolados de *Klebsiella* spp.. Dropa *et al.* (2009), identificaram o grupo TEM em 17,3% dos isolados em cinco espécies diferentes (*K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *E. coli*, *Morganella morganii* e *P. mirabilis*), geralmente em associação a SHV e/ou genes CTX-M. Lal *et al.*

(2007), encontraram 170 *K. pneumoniae* positivas para ESBLs analisando 204 isolados. Selecionando randomicamente 95 dentre esses 170 isolados para PCR, encontraram 64 (67,3%) carreando ambas ESBLs, SHV e TEM, entretanto somente 19 (20%) possuíam genes TEM e 8 (8,4%) o gene SHV sozinhos. Wei *et al.* (2005), através de PCR e seqüenciamento de DNA confirmaram que o plasmídeo de 95 Kb codificou pelo menos 4 genes de β -lactamases: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-12}, *bla*_{CTX-M-3} e *bla*_{DHA-1}. Igualmente Xiong *et al.* (2004), confirmaram que a cepa de *K. pneumoniae* produziu SHV-12, CTX-M-3 e TEM-1 através de um único plasmídeo de 60 Kb, que foi responsável pela resistência do isolado à maioria dos β -lactâmicos. De acordo com Essack; Hall; Livermore (2004) e Yan, Ko e Wu (2001), o número de genes de resistência carregados nos plasmídeos de *K. pneumoniae* multirresistentes é maior que um e ocasionalmente até cinco.

As ESBLs estão difundidas em todo o mundo, mas a prevalência e as características fenotípicas dos isolados clínicos podem variar entre áreas geográficas (SHASHID *et al.*, 2008). Na América Latina, no grupo SHV, as variantes SHV-2, SHV-5 e SHV-12 são as mais comuns (PATERSON *et al.*, 2000; VILLEGAS *et al.*, 2008), embora no Brasil já tenha sido relatada a detecção de SHV-4 (MENDES *et al.*, 2004a) e a caracterização de SHV-27 (CORKILL *et al.*, 2001). TEM variantes têm sido descritas na América do Sul (PATERSON *et al.*, 2003; VIGNOLI; VARELA; MOTA, 2005; VILLEGAS *et al.*, 2008) e os mais comuns são TEM-10, TEM-12 e TEM-26 (VILLEGAS *et al.* 2008).

2.7. Inibidores de β -lactamases

A descoberta dos inibidores de β -lactamases foi pensado ser a solução para o problema da resistência. Infelizmente, as bactérias desenvolveram novos mecanismos de resistência para superar os efeitos inibitórios dos inativadores de β -lactamase. Uma nova abordagem para combater bactérias produtoras de β -lactamases é a associação de um β -lactâmico a um inibidor de β -lactamase. Estes inibidores não são, entretanto, ativos contra todas as β -lactamases, portanto novas estratégias precisam ser desenvolvidas a fim de neutralizar essa resistência. Santos *et al.* (2008), demonstraram que mesmo associando penicilina a um inibidor de β -lactamase, o isolado produtor de ESBLs permanecia resistente ao antibiótico, sugerindo que outros mecanismos de resistência podem estar envolvidos (BABIC; HUJER; BOMONO, 2006; PATERSON, 2006).

O uso de inibidores de β -lactamase também tem sido seguido pelo surgimento de isolados clínicos resistentes que super produzem β -lactamases tipo TEM (PATERSON *et al.*, 2004) ou que produzem variantes TEM resistentes aos inibidores (IRTS) (ASENCIO *et al.*, 2000). Como foi o caso das ESBLs, IRTS surgiram de TEM e SHV-1 penicilinas mediadas por plasmídeos e subsequentes a algumas substituições de aminoácidos. Estas substituições conferem resistência aos inibidores mas não a capacidade de hidrolisar oximino- β -lactâmicos. Um novo subgrupo de TEM e SHV tipo β -lactamases que carregam ambas mutações que conferem atividade de espectro estendido e resistência aos inibidores, surgiram desde o final de 1990 em diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*: *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* e *Enterobacter aerogenes*. Quatro enzimas são derivadas das enzimas tipo TEM e foram designadas complexo mutante de TEM (CMT-1 a CMT-4) (NEUWIRTH *et al.*, 2001, POIREL; MAMMERI; NORDMANN, 2004). Outro complexo mutante derivado de SHV-1 tem sido identificado: SHV-10 (ROBIN *et al.*, 2005). As substituições de resíduos de aminoácidos nas posições 69, 130, 244, 275 e 276 são capazes de conferir um perfil de TEM-resistente a inibidor (CHAIBI *et al.*, 1999; POIREL; MAMMERI; NORDMANN, 2004).

Uma das abordagens mais promissoras para o problema da resistência é o desenho racional de β -lactâmicos ou moléculas relacionadas a base da estrutura terciária da enzima e ao seu mecanismo de ação. No entanto, o aparecimento de novo mecanismo de resistência à futura geração de β -lactâmicos é inevitável e, portanto, muito cuidado deve ser tomado na forma como usamos antibióticos β -lactâmicos na medicina e na agricultura (THERRIEN; LEVESQUE, 2000).

2.8. CTX-M

A ESBL CTX-M é muito mais eficiente contra oximino- β -lactâmicos tais como a cefotaxima que contra a ceftazidima, mas mutações pontuais podem aumentar a atividade hidrolítica contra ceftazidima (TZOUVELEKIS *et al.*, 2000). Os carbapenêmicos, como o imipenem e meropenem, não são hidrolisados pelas enzimas CTX-M. O clavulanato, sulbactam e tazobactam inibem a atividade enzimática, mas muitas vezes os isolados produtores destas enzimas são resistentes aos inibidores de β -lactamases por causa da produção simultânea de penicilinase resistente a inibidores (por exemplo, OXA-1), por vezes codificada pelo mesmo plasmídeo (LIVERMORE *et al.*, 2007).

O grupo CTX-M está evoluindo rapidamente, principalmente por ser codificado por plasmídeos conjugativos (SALADIN *et al.*, 2002). As duas primeiras enzimas foram isoladas na Europa em 1989: MEN-1 (também conhecida como CTX-M-1) de um paciente italiano na França e CTX-M-1 na Alemanha. Os outros foram relatados em uma vasta área geográfica, incluindo Europa, América do Sul e Oriente Médio (SALADIN *et al.*, 2002). De acordo com a homologia na sequência de DNA a família CTX-M de ESBLs é atualmente classificada em cinco principais grupos: CTX-M-1 (incluindo CTX-M-1, CTX-M-3, CTX-M-10, CTX-M-11, CTX-M-12, CTX-M-15, CTX-M-22, CTX-M-23, CTX-M-28, CTX-M-32, CTX-M-54 e CTX-M-58), CTX-M-2 (inclui a CTX-M-2, CTX-M-4, CTX-M-5, CTX-M-6, CTX-M-7, CTX-M-35, CTX-M-42 e Toho-1), CTX-M-8 (CTX-M-8, CTX-M-40, CTX-M-63) CTX-M-9 (CTX-M-14, CTX-M-16, CTX-M-19 e CTX-M-27, Toho-2 e Toho-3) e CTX-M-25 (CTX-M-25, CTX-M-26 e CTX-M-41) (ACHOUR *et al.*, 2008; GOYAL *et al.*, 2009; MOHAMMAD; AL-AGAMY; SHIBL, 2009; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). A homologia entre os membros de cada grupo é maior que 94% e membros de diferentes grupos diferem de 10-30% de resíduos aminoácidos (BRADFORD, 2001; PAGANI *et al.*, 2003; BONNET, 2004; NORDMAN *et al.*, 2006). Diversos métodos moleculares, incluindo a PCR multiplex, têm sido bem sucedidos para a detecção de todos os membros dos cinco grupos, no entanto, sem o sequenciamento de DNA, a caracterização precisa do genótipo de CTX-M permanece um desafio. Portanto, o sequenciamento de nucleotídeos permanece como um padrão para a determinação dos genes codificantes para β -lactamases presentes em um isolado bacteriano, mas é demorado e caro (BRADFORD, 2001; XU *et al.*, 2007). Comumente genótipos moleculares de ESBL (*bla*_{TEM}, SHV, CTX-M) são detectado por PCR; clusters são identificados por análise de restrição e o genótipo é confirmado através do sequenciamento (GOYAL *et al.*, 2009).

CTX-M tem sequência similar a β -lactamase cromossomal de *Kluyvera georgiana*, *Kluyvera ascorbata* e *Kluyvera criocrescens* (POIREL; KAMPFER; NORDMANN, 2002; PAGANI *et al.*, 2003). O grupo CTX-M-1 e CTX-M-2 são derivados de *Kluyvera ascorbata*, enquanto que o CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 são derivados de *Kluyvera Georgiana* (NORDMANN *et al.*, 2006; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). Sendo móveis, os genes *bla*_{CTX-M} podem ser acolhidos por muitos elementos, mas na maioria das vezes, por grandes plasmídeos de multirresistência (LIVERMORE *et al.*, 2007).

As enzimas CTX-M estão substituindo TEM e SHV mutantes em muitos países, principalmente na Europa, América Latina e Leste Asiático, as quais têm sido o tipo de

ESBLs predominantemente produzidas por patógenos Gram-negativos, especialmente *K. pneumoniae* e *E. coli* (CAO *et al.*, 2002; CHANAWONG *et al.*, 2002; COQUE *et al.*, 2002; BONNET, 2004; MUNDAY *et al.*, 2004; LING; XIONG; YU, 2006; SOGE *et al.*, 2006; LIVERMORE *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009). A variante mais amplamente difundida é CTX-M-15 (CANTÓN; COQUE, 2006; LIVERMORE *et al.*, 2007; MEGLIC *et al.*, 2009).

No Leste da Ásia, CTX-M também se encontra em expansão predominando CTX-M-2. Apenas na América do Norte TEM e SHV mutantes ainda são dominantes, embora tenham ocorrido surtos de *E. coli* com CTX-M-15 no Canadá (LIVERMORE *et al.*, 2007). Estudos realizados na Europa (Reino Unido, França, Espanha, Portugal e Polônia), mostraram que é rara a ocorrência do grupo CTX-M-2, no entanto, com uma alta prevalência do grupo 1, predominantemente CTX-M-15. No Reino Unido e Espanha, enzimas CTX-M-9 também são dominantes (HERNANDEZ; MARTINEZ-MARTINEZ; CANTON, 2005; LIVERMORE *et al.*, 2007). Em Londres há um predomínio do grupo CTX-M-1 (WOODFORD *et al.*, 2004b). CTX-M do grupo 2 são as mais prevalentes em partes da América do Sul e em Israel (BONNET, 2004). Na Argentina também já se relata a prevalência de CTX-M-2. CTX-M são endêmicas e amplamente distribuídas em nosso continente (CELENZA *et al.*, 2006; VILLEGAS *et al.*, 2008; DROPA *et al.*, 2009). Sendo relatadas em uma grande variedade de espécies de *Enterobacteriaceae* (QUINTEROS; RADICE; GARDELLA, 2003; CELENZA *et al.*, 2006). Elas foram notificadas em 1989 na Argentina (CTX-M-2) e, desde então, diversas enzimas diferentes deste grupo foram relatadas em vários países, incluindo Brasil, onde o CTX-M-2, -8, -9 e -16 foram descritas (VILLEGAS *et al.* 2008, LOPES *et al.*, 2010).

Coelho *et al.* (2010), analisando 111 isolados de *K. pneumoniae* da região metropolitana de Barcelona encontraram 37 isolados positivos para CTX-M-15, fornecendo evidências da integração cromossomal de *bla*_{CTX-M-15} em *K. pneumoniae* e documentaram a primeira associação relatada de *bla*_{CTX-M-15} com os dois réplicons recentemente descritos Incr e IncFIik. Estes resultados refletem diferenças nos vetores genéticos envolvidos no transporte de *bla*_{CTX-M-15} em *K. pneumoniae* versus aqueles descritos em *E. coli*. Estas diferenças podem contribuir para a difusão de *bla*_{CTX-M-15} dentro de *K. pneumoniae*. Meglic *et al.* (2009), analisando 177 isolados de *K. pneumoniae* encontraram 60 (34%) carreando o gene CTX-M, com *bla*_{CTX-M-15}

detectado por sequenciamento. Através de estudos de hibridização, mostraram que *bla*_{CTX-M-15} estava localizado em plasmídeos de 150Kb.

No Brasil há poucos estudos que relatem a prevalência e o grupo de enzimas CTX-M em combinação a outras ESBLs em isolados nosocomiais de *K. pneumoniae*. Variantes CTX-M-8, M-9 e M-16 foram descritas por Dropa *et al.* (2009), analisando 96 isolados de *K. pneumoniae* de pacientes hospitalizados e ambulatoriais. CTX-M foi identificada em *E. coli*, *Enterobacter cloacae* e *K. oxytoca* (BONNET *et al.*, 2001; MINARINI *et al.*, 2007; MINARINI *et al.*, 2008). No Nordeste brasileiro, Lopes *et al.* (2010), encontraram 7 isolados positivos para os genes *bla*_{CTX-M} dentre 28 *K. pneumoniae* analisados, sendo que 6 isolados carregavam *bla*_{CTX-M-2} e um isolado foi positivo para *bla*_{CTX-M-1}. Através de sequenciamento de nucleotídeos detectou-se que seis isolados de *K. pneumoniae* abrigavam genes *bla*_{CTX-M-2} e um isolado continha *bla*_{CTX-M-28}. Nenhum dos isolados foram positivos para os grupos *bla*_{CTX-M-8}, *bla*_{CTX-M-9} ou *bla*_{CTX-M-25}.

Devido ao amplo uso de antibióticos, os hospitais continuam a ser um ambiente perfeito para a seleção de genes de resistência e é plausível que *K. pneumoniae*, uma das principais fontes para ESBLs, incluindo cada vez mais tipos de CTX-M, está atuando como um vetor de transferência para a *E. coli* e outras espécies (BARANIAK *et al.*, 2002; LIVERMORE *et al.*, 2007; MEGLIC, 2009).

2.9. Carbapenemase do tipo KPC

Inicialmente, a resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias ocorria principalmente devido a superprodução de β -lactamases AmpC (grupo 1, classe C), associada com a perda de porinas, proteínas de membrana externa. Segundo Bennett *et al.* (2010), a resistência ao ertapenem entre os isolados foi provavelmente reforçada ou tornada possível por algum grau de diminuição da permeabilidade da membrana da célula resultante da diminuição da expressão de porinas de superfície da membrana celular. Tem sido proposto que a perda de OMPs é um co-fator necessário para que isolados KPC alcancem altos níveis de resistência aos carbapenêmicos (PATERSON, 2006). Em combinação com ESBL e AmpC β -lactamases, a perda de OMPs parece significativamente afetar a susceptibilidade aos carbapenêmicos.

As carbapenemases degradam os antibióticos β -lactâmicos do grupo carbapenêmico (imipenem, meropenem, ertapenem e doripenem) (PATEL; RASHEED;

KITCHEL, 2009). Organismos produtores de carbapenemases do tipo KPC são capazes de hidrolizar todas as cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos e são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam (PEIRANO *et al.*, 2009; GOREN *et al.*, 2010). O MICs dos carbapenêmicos é reduzido na presença de ácido clavulânico, devido à inibição da enzima (QUEENAN; BUSH, 2007; FONTANA *et al.*, 2010). β -lactamases do tipo KPC (KPC 1-7) conferem uma diminuição da susceptibilidade ou resistência a todos os β -lactâmicos (ROCHE *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010). Segundo Bratu *et al.* (2005a), isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC são resistentes a piperacilina-tazobactam e a ciprofloxacina. Por outro lado, são sensíveis a tigeciclina (LEAVITT *et al.*, 2007) e polimixina B (BRATU *et al.*, 2005a). A aquisição de KPC tem contribuído para esta resistência a todos os β -lactâmicos. Estes isolados também são frequentemente resistentes a aminoglicosídeos e fluorquinolonas e ocasionalmente são resistentes a polimixina e tigeciclina. Este atributo limita as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções graves, que é basicamente restrito a tigeciclina e polimixinas (MONTEIRO *et al.*, 2009). A emergência de resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* é complexa porque esta resistência frequentemente pode estar associada com resistência a muitos antibióticos β -lactâmicos ou não. Este fato limita efetivamente as opções terapêuticas (ANDERSON *et al.*, 2007) e favorece o aumento de índices de mortalidade devido a patógenos multirresistentes como *K. pneumoniae* (BRATU *et al.*, 2005a).

As β -lactamases do grupo plasmidial (KPC e GES) são amplamente dispersas, pois seus genes estão localizados em elementos transferíveis, facilitando sua disseminação, o que também reflete na sua distribuição geográfica (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007). A β -lactamase KPC tem duas características funcionais bem distintas. Primeiro, as enzimas KPC são encontradas em plasmídeos transferíveis; segundo, seu substrato de hidrólise inclui as aminothiazole oxime-cefalosporinas, como a cefotaxima (QUEENAN; BUSH, 2007). Existem evidências que a disseminação do *bla*_{KPC} está relacionada com elementos plasmidiais transferíveis com tamanhos variando de 10 a 170Kb (NORDMANN; POIREL, 2002; NAVON-VENEZIA *et al.*, 2006; NASS *et al.*, 2008; WOLTER *et al.*, 2009) entre diferentes membros de Enterobactérias, resultando na expansão da resistência a drogas (ZHANG *et al.*, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008). Giakkoup *et al.* (2009), encontraram que o plasmídeo de aproximadamente 100Kb hibridizou fortemente com uma sonda específica para *bla*_{KPC-2}. Através de experimentos de conjugação foi possível transferir o gene de uma cepa de *K. pneumoniae* para uma cepa

receptora de *E. coli*. Estes isolados foram incapazes de transferir VIM-1 por conjugação com as condições empregadas in vitro. Os genes *bla*_{KPC} estão localizados no novo transposon tn4401 baseado no tn3 (NASS *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2010). Este transposon foi identificado em plasmídeos de diferentes tamanhos, sugerindo que o gene também pode se mover pela inserção do transposon em plasmídeos diferentes (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Tn4401 foi proposto estar na origem da mobilização de KPC (WENDT *et al.*, 2010). Este perfil de disseminação tem limitado as chances de sucesso terapêutico contra estes microrganismos pan-resistentes (resistentes a todos os antimicrobianos testados de acordo com as recomendações do CLSI) (LEAVITT *et al.*, 2007).

Dez variantes são conhecidas até agora. Os genes codificando KPC-1 e KPC-2 são idênticos (YIGIT *et al.*, 2001; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). KPC-2 e KPC-3 são as variantes mais frequentes em todo o mundo (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). KPC-2 foi descrita pela primeira vez em *K. pneumoniae* resistente a carbapenêmicos na Carolina do Norte em 2001 (YIGIT *et al.*, 2001) e KPC-3 foi detectada com frequência em isolados de *K. pneumoniae* hospitalares no Nordeste dos EUA e em Israel (SHIRI *et al.*, 2009; PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010). KPC-4 (número de acesso GenBank AY700571) foi inicialmente encontrada em *Enterobacter* spp. na Escócia em 2004 e foi recentemente relatado em isolados de *K. pneumoniae* em Porto Rico (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). KPC-2 já foi descrita em isolados de *K. pneumoniae*; *K. oxytoca*, *Salmonella enterica* e em *Enterobacter* sp. e KPC-3 em *K. pneumoniae* e *E. cloacae* (DIENSTMANN *et al.*, 2010).

KPC foi inicialmente relatada em isolados de *K. pneumoniae* na cidade de Nova York (MOLAND *et al.*, 2003; WOODFORD *et al.*, 2004a; BRATU *et al.*, 2005a). Depois expandiu-se ao longo da costa leste dos Estados Unidos e a partir de 2005, a detecção de KPC foi relatada em outros países (NASS *et al.*, 2005; WENDT *et al.*, 2010). *K. pneumoniae* positiva para KPC já tem sido observada na Europa (PFEIFER; CULLIK; WITTE, 2010), Finlândia (ÖSTERBLAD *et al.*, 2009), América do Sul (VILLEGAS *et al.*, 2006; PASTERAN *et al.*, 2008), China (WEI *et al.*, 2007; CAI *et al.*, 2008) e Alemanha (WENDT, 2008). Organismos KPC continuam a espalhar-se ao longo do tempo sendo notificados em 27 estados dos Estados Unidos e em muitos países ao redor do mundo, incluindo Colômbia, Brasil, Israel (NAVON-VENEZIA *et al.*, 2006; SAMRA *et al.*, 2007), Canadá, França, República da Irlanda, Grécia (CUZON *et al.*, 2008; TSAKRIS *et al.*,

2008; MALTEZOU *et al.*, 2009) (onde infecção causada por KPC é principalmente devido a clone hiperendêmico) e mais recentemente na Itália (CAI *et al.*, 2008; GIANI *et al.*, 2009; FONTANA *et al.*, 2010).

A primeira detecção de KPC-2 em um plasmídeo de *P. aeruginosa* foi relatada, o que representa uma evolução inquietante na disseminação dessas carbapenemases (QUEENAN; BUSH, 2007; VILLEGAS *et al.*, 2007). Embora a β -lactamase KPC seja predominantemente encontrada em isolados de *K. pneumoniae*, que é o patógeno mais comum carregando os genes *bla*_{KPC} (VILLEGAS *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2007; WOODFORD *et al.*, 2008), alguns trabalhos têm descrito esta enzima em *Enterobacter* spp. e *Salmonella* spp. (MIRIAGOU *et al.*, 2003; QUEENAN; BUSH, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2010), bem como, em outros membros de enterobactérias (*K. oxytoca*, *E. coli*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii* e *Serratia* spp.) (YIGIT *et al.*, 2003; ANDERSON *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007) e também em *P. aeruginosa* (VILLEGAS *et al.*, 2007; WOLTER *et al.*, 2009).

Na cidade do Recife há o relato de dois clones distintos do ano de 2006 produtores de carbapenemases (MONTEIRO *et al.*, 2009). Após esse relato, foram detectados seis isolados de *K. pneumoniae* recuperados de dois hospitais do Rio de Janeiro (de setembro de 2007 a maio de 2008) (PEIRANO *et al.*, 2009). Na verdade, Pavez, Mamizuka e Lincopan (2009), mostraram que estes isolados estavam presentes na região desde pelo menos 2005 (ZAVASCKI *et al.*, 2009).

Embora considerado por alguns relativamente raro esse fenótipo de resistência, relatos de sua ocorrência em locais de surto têm aumentado constantemente (QUEENAN; BUSH, 2007; GOLDFARB *et al.*, 2009; ROCHE *et al.*, 2009). A infecção com *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos está associada a um aumento da proporção de mortes em relação a *K. pneumoniae* sensível aos carbapenêmicos (SCHWABER *et al.*, 2008; GOREN *et al.*, 2010). Em um surto descrito por Woodford *et al.* (2004a), 14 dentre 24 pacientes internados na UTI foram infectados com *K. pneumoniae* produtores de KPC e oito dos pacientes infectados morreram. Isolados KPC são preocupantes para a clínica, devido ao seu potencial de disseminação epidêmica, principalmente entre patógenos humanos (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007), como tem sido observado por alguns autores (BRADFORD *et al.*, 2004; BRATU *et al.*, 2005c; WEI *et al.*, 2007).

A rápida emergência deste mecanismo de resistência nestes isolados pode ter efeito da multiplicação clonal, aumentando a frequência de isolados KPC. A disseminação clonal

de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC está sendo frequentemente observada dentro de países bem como entre países, indicando que existe uma circulação clonal internacional (SAMUELSEN *et al.*, 2009). Muitos dos isolados que carregam o gene *bla*_{KPC}, de um estudo individual, foram do mesmo ribotipo, mostrando que eles são geneticamente relacionados e que resultam de um processo de disseminação clonal (WALTHER-RASMUSSEN; HOIBY, 2007; LIVERMORE *et al.*, 2008). Nass *et al.* (2005), informaram que KPC-2 identificado na França provavelmente resultou de uma transferência intercontinental de KPC dos Estados Unidos e Woodford *et al.* (2008), demonstraram que pelo menos um dos dois isolados de *K. pneumoniae* com carbapenemase KPC-3 detectado no Reino Unido foi, provavelmente, importado de Israel. Dois isolados de *K. pneumoniae* KPC-2 foram exportados da Grécia, um para França (CUZON *et al.*, 2008) e outro para a Suécia (TEGMARK *et al.*, 2007). Não está claro se os isolados relacionados em diferentes localizações geográficas indicam a transmissão de um isolado de *K. pneumoniae* KPC ou se há uma cepa de *K. pneumoniae*, que é mais provável para adquirir o mecanismo de resistência (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). WENDT *et al.* (2010), não conseguiram estabelecer uma fonte comum para a manifestação, porém sugeriram que o mecanismo mais provável de disseminação foi a transmissão através das mãos dos profissionais de saúde. A eficácia na detecção destes isolados resistentes aos carbapenêmicos é crucial para controlar sua disseminação (BRATU *et al.*, 2005a; 2005b).

Problemas com a detecção de KPC mediando resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* foram relatados por vários pesquisadores (TENOVER *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2007). A sensibilidade de detecção varia de acordo com método. O fracasso dos sistemas de testes automatizados de susceptibilidade para detectar a resistência mediada por KPC foi observado anteriormente, especialmente se o ertapenem, que estava determinado ser mais susceptível à atividade hidrolítica de KPC, não for testado (ANDERSON *et al.*, 2007; FONTANA *et al.*, 2010).

Isolados com esse mecanismo de resistência frequentemente expressam susceptibilidade variável aos diferentes carbapenêmicos (LIVERMORE; WOODFORD, 2006; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Múltiplos fatores podem complicar o processo de detecção (VILLEGAS *et al.*, 2006; WALTHER-RASMUSSEN *et al.*, 2007). Em primeiro lugar, o transporte do alelo *bla*_{KPC} pode conferir apenas uma reduzida sensibilidade aos carbapenêmicos mas não plena resistência. Em segundo lugar, KPC tem sido associado com testes de confirmação de ESBL positivos, levando a erros de

identificação como cepas produtoras de ESBL. Em terceiro lugar, existe um efeito de inóculo nos sistemas automatizados que utilizam baixos inóculos. A detecção precisa das enzimas KPC será fundamental no controle da sua propagação, especialmente em isolados que permanecem susceptíveis *in vitro*. Estas dificuldades levam a subestimação da incidência de isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC e consequentemente, a identificação imprecisa de *K. pneumoniae* resistente aos carbapenêmicos pode ter fatais consequências. As metodologias usadas para rastreamento de KPC são diversificadas: focalização isoeletrica, disco-difusão, E-test (BRADFORD *et al.*, 2004), Teste de Hodge modificado (MHT) (LEE *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2007) e utilização de ácido borônico (TSAKRIS *et al.*, 2009). Pode-se ainda pesquisar o gene *bla*_{KPC} por PCR e sequenciamento de DNA. Já foi relatado que sistemas de automação usados para teste de susceptibilidade podem não identificar com precisão os isolados KPC positivos (DIENSTMANN *et al.*, 2010). Assim, a triagem fenotípica se dá preferencialmente por meio de antibiograma com discos de cefalosporinas de 3ª geração (cefoperazona, cefotaxima, ceftazidima, ceftizoxima, ceftriaxona) e imipenem, meropenem e ertapenem (BRATU *et al.*, 2005b), além do MHT (CLSI, 2009).

Almeida *et al.* (2010), analisando 27 isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC encontraram resistência variável aos carbapenêmicos: ertapenem (100%), meropenem (81,4%) e imipenem (77,7%). Fontana *et al.* (2010), analisando dois isolados de *K. pneumoniae* KPC positivos, encontraram que esses isolados foram resistentes a todos os β -lactâmicos e sensíveis ao imipenem e meropenem, mas resistentes ao ertapenem, portanto a sensibilidade de detecção também varia de acordo com o carbapenêmico que é testado. Ertapenem por qualquer método de teste foi considerado um indicador mais sensível que meropenem ou imipenem para as enzimas KPC (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009; WENDT *et al.*, 2010). Tem sido recomendado anteriormente que imipenem e meropenem podem ser marcadores indiretos para a susceptibilidade ao ertapenem (FRIEDLAND *et al.*, 2002), apesar de terem sido descritas dificuldades em alcançar resultados precisos nos testes de susceptibilidade para imipenem e meropenem em laboratórios de microbiologia clínica (TENOVER *et al.*, 2006), mesmo quando os sistemas automatizados, como MicroScan e Vitek são utilizados (BRATU *et al.*, 2005a; 2005b; LEAVITT *et al.*, 2009).

Diversos pesquisadores têm recomendado usar testes de susceptibilidade ao ertapenem para detectar a resistência mediada por KPC (BRATU *et al.*, 2005a;

ANDERSON *et al.*, 2007; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). Para saber se o isolado é um produtor de carbapenemase, alguns laboratórios estão implementando testes fenotípicos para a detecção de atividade de carbapenemase. Um desses testes é o MHT (LEE *et al.*, 2001; 2003; ANDERSON *et al.*, 2007), de acordo com as recomendações do CLSI-M100S20. Nesse teste, uma cepa de microrganismo sensível ao antimicrobiano a ser testado, preferencialmente, *Escherichia coli* ATCC 25922, é semeada de maneira confluyente em placa, um disco de carbapenêmico é colocado no centro da placa, um forte inóculo do microrganismo a ser testado é semeado a partir do disco de antibiótico até a periferia da placa. Os isolados produtores da enzima distorcem a zona de inibição do organismo sensível (Figura 6). As vantagens deste teste são: facilidade de execução, vários isolados podem ser testado em uma placa de ágar e pode ser usado para detectar ambas as enzimas KPC e MBLs (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). As desvantagens do teste é que é subjetivo e não pode diferenciar entre KPC e MBLs, que podem ser de interesse epidemiológico.

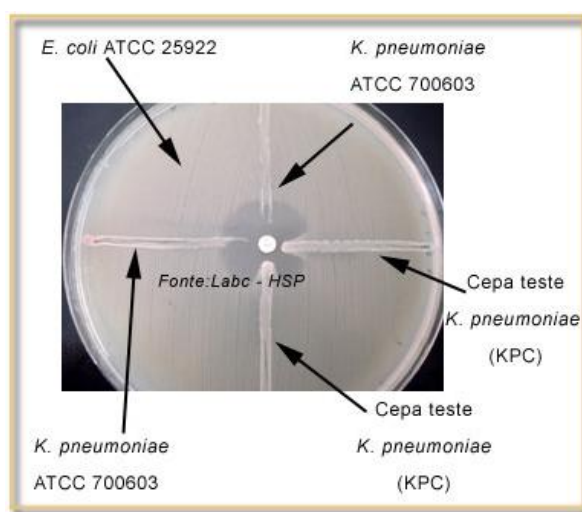


Figura 6. Placa com meio Mueller-Hinton após incubação para pesquisa de KPC pelo Teste de Hodge Modificado proposto por Anderson *et al.* (2007). (Fonte: http://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo5/image/figura21.jpg&imgrefurl)

A prevenção e o controle dessa emergente resistência é complicada pela ocorrência de isolados positivos para KPC mas que produzem baixo nível de resistência aos carbapenêmicos, usando atuais pontos de corte e comuns testes de susceptibilidade antimicrobiana. Como resultado, esses isolados não são identificados como tendo um mecanismo de resistência incomum. A detecção de tais isolados, independentemente do MIC aos carbapenêmicos, é claramente uma prioridade de controle de infecção de modo que a transmissão de isolados resistentes possa ser evitada (PATEL; RASHEED;

KITCHEL, 2009). Em janeiro de 2008 a edição do documento CLSI M100 (CLSI, 2008), foi incluído um comentário alertando os laboratórios a procurarem *Enterobacteriaceae* para o qual o MIC para carbapenêmicos é ≥ 2 ou 4 $\mu\text{g} / \text{ml}$ como possíveis produtores de carbapenemase (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009). De acordo com a nota técnica nº 1/2010 da ANVISA (2010): *Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes*, os critérios a serem utilizados como base para interpretação dos testes de sensibilidade para *Enterobacteriaceae* em laboratórios de microbiologia clínica no Brasil, deverão ser aqueles contidos no documento M100-S20 do CLSI publicado em janeiro de 2010, com as seguintes modificações: resistência ao ertapenem (MIC $\geq 2\mu\text{g/ml}$, halo de inibição: $\leq 21\text{mm}$), imipenem (MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$, halo de inibição: $\leq 19\text{mm}$) e meropenem (MIC $\geq 4\mu\text{g/ml}$, halo de inibição: $\leq 19\text{mm}$). Ao realizar o teste de sensibilidade a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de pacientes hospitalizados, o laboratório de microbiologia deverá compulsoriamente testar imipenem e meropenem. A resistência ou sensibilidade intermediária ao ertapenem não deverão mais ser utilizadas para a triagem de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases. No Brasil, um elevado número de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de cefotaximases apresentam simultaneamente, perda de porinas, e conseqüentemente, são falsamente detectadas como produtoras de carbapenemases. Os resultados dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos devem ser liberados de acordo com os critérios interpretativos descritos acima, sem alteração das categorias. Ao liberar os resultados de amostras não sensíveis a imipenem ou a meropenem, incluir no laudo a seguinte nota: *Enterobactéria possivelmente produtora de carbapenemase* (KPC, IMP, dentre outras). Os laboratórios que não possuem capacidade instalada para comprovação molecular do mecanismo de resistência ou tipagem de microrganismos deverão encaminhar as amostras suspeitas da produção de carbapenemase aos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN).

Identificação de um isolado produtor de carbapenemase, mas com testes sensíveis aos carbapenêmicos, cria um problema na comunicação dos resultados de susceptibilidade. Neste momento, não existem dados suficientes sobre os resultados terapêuticos para recomendar que esses isolados sejam relatados como resistentes aos carbapenêmicos. No entanto, devido a preocupações em falha terapêutica potencial, algumas instituições de saúde estão decidindo internamente que *Enterobacteriaceae* produtoras de carbapenemase serão relatadas resistentes a todos os carbapenêmicos

independentemente do resultado dos testes de susceptibilidade. À luz destas emergentes carbapenemases, parece prudente reavaliar os “breakpoints” dos carbapenêmicos.

O CLSI fez uma modificação no documento M100-S20-U publicada em junho de 2010, onde os halos de resistência medidos em mm para doripenem, ertapenem, imipenem e meropenem agora correspondem a ≤ 19 mm e os MICs de resistência para doripenem, imipenem e meropenem é de ≥ 4 e para o ertapenem é ≥ 1 . Estabelecem que o MHT deverá ser limitado a isolados que apresentem as seguintes características: intermediários ou resistentes a um ou mais carbapenêmicos e resistentes a um ou mais agentes da subclasse III de cefalosporinas. O MHT pode ser desenvolvido usando ertapenem ou meropenem, sendo o ertapenem o mais sensível indicador da produção de carbapenemases. Nenhuma mudança na interpretação dos resultados dos testes de sensibilidade aos carbapenêmicos é requerida para isolados MHT positivos. Este teste resulta em alto nível de sensibilidade ($> 90\%$) e especificidade ($> 90\%$) em detectar carbapenemase tipo KPC em enterobactérias. A sensibilidade e especificidade do teste para detectar produção em baixo nível de MBL são desconhecidas.

Leavitt *et al.* (2009), caracterizaram molecularmente isolados não-susceptíveis ao ertapenem e revelou a falta de carbapenemases, indicando a presença de genes de ESBL em conjunto com alterações na permeabilidade como mecanismo de resistência aos carbapenêmicos. Este mecanismo foi relatado anteriormente para amostras clínicas de *K. pneumoniae* carreando SHV-2 e CTX-M (ELLIOTT *et al.*, 2006; WOODFORD *et al.*, 2007). Vários são os mecanismos de resistência que podem impedir a ação dos carbapenêmicos, e a resistência surge, ocasionalmente, da combinação da impermeabilidade da membrana com β -lactamases cromossômicas (AmpC) ou de amplo espectro (ESBL) (DIENSTMANN *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que outros genes de ESBL (SHV e CTX-M), bem como β -lactamases, tais como OXA-2 conferem resistência ao ertapenem quando introduzidos em um plasmídeo de uma cepa curada de *K. pneumoniae* (JACOBY; MILLS; CHOW, 2004). Nas cepas resistentes ao ertapenem encontrou-se vários genes de ESBL, tais como CTX-M-2, CTX-M-10, SHV-12, e SHV-28 juntamente com a perda de OMPK36. Porém um dos isolados analisados não apresentou perda da porina OMPK36, sugerindo que outros mecanismos estão envolvidos na resistência ao ertapenem.

2.10. Metallo- β -lactamases: VIM, IMP e SPM

O surgimento de resistência aos carbapenêmicos mediada pela produção de carbapenemases tem sido cada vez mais relatado entre *Enterobacteriaceae* sendo uma questão de grande preocupação clínica (CAGNACCI *et al.*, 2007). MBLs agora são reportadas na Ásia (CHU *et al.*, 2001), Europa (TOLEMAN *et al.*, 2005), América do Norte (GIBB *et al.*, 2002) e América do Sul (TOLEMAN *et al.*, 2002). MBLs estão emergindo e limitando severamente as opções de tratamento nestes países (ZAVASCKI *et al.*, 2005).

O desenho dos antibióticos carbapenêmicos foi inspirado pelo produto natural tienamicínico, produzido pelo organismo do solo *Streptomyces cattleya*. Devido a prevalência destas moléculas no solo, é lógico esperar que as enzimas capazes de degradar estes β -lactâmicos seriam produzidas por organismos ambientais, tais como *Bacillus cereus* e *Bacillus anthracis*, bactérias com MBL bem caracterizadas que dariam uma vantagem seletiva para o crescimento destas espécies ambientais. Estas carbapenemases cromossômicas podem ter evoluído, inicialmente, como um mecanismo para as bactérias se protegerem das ameaças externas à sua parede celular, porém estas β -lactamases podem também desempenhar um papel importante na regulação da síntese da parede celular (QUEENAN; BUSH, 2007).

As MBLs foram inicialmente identificadas como enzimas cromossômicas em bactérias Gram-positivas e ocasionalmente em bacilos Gram-negativos, tais como *Bacteroides fragilis* ou *Stenotrophomonas maltophilia* (BUSH, JACOBY; 2010). São considerados organismos portadores inertes de genes MBL: *Aeromonas hydrophilia*, *Flavobacterium* spp. e *S. maltophilia* (PELEG *et al.*, 2005). Felizmente com exceção de *S. maltophilia*, estas bactérias não são frequentemente associadas a infecções nosocomiais e os genes de MBL cromossômicos não são facilmente transferidos (QUEENAN; BUSH, 2007). A primeira MBL codificada cromossomicamente foi descrita por Sabath e Abraham em 1966, numa amostra de *Bacillus cereus* (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

Enquanto eram codificadas cromossomicamente, por muitos anos seu número permaneceu relativamente constante até que as MBLs começaram a aparecer em elementos genéticos móveis e em uma variedade de hospedeiros, resultando em uma família de enzimas com diversas variantes. Tem havido um aumento dramático na detecção e difusão das famílias destas metalo-enzimas adquiridas e transferíveis. A

transmissão de genes de carbapenemase pode ocorrer facilmente quando localizado em elementos móveis, tais como plasmídeos e integrons. É provável que a circulação de genes de carbapenemase prossegue em duas direções: fontes ambientais dessas enzimas e cepas clínicas que podem dispersar esta informação, tanto em ambiente hospitalar quanto em ambientes circundantes (QUEENAN; BUSH, 2007). Até o início dos anos 90, as MBLs não possuíam muita importância clínica, pois eram produzidas cromossomicamente por alguns microrganismos de pouca relevância clínica os quais estavam, às vezes, associados com infecções oportunistas. A primeira MBL adquirida foi encontrada em *Bacteroides fragilis*, a qual foi classificada como cromossômica. No entanto, após a caracterização do gene *cfiA* (ou *CcrA*) observou-se que esta enzima era mediada por elementos genéticos móveis (BERTONCHELI; HORNER, 2008).

No início da década de 90, novos genes que codificam MBLs distintas têm sido descritos em importantes patógenos clínicos como *pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. e membros da família *Enterobacteriaceae* (WIRTH *et al.*, 2009). Várias MBLs foram relatadas, incluindo: IMP, VIM, SPM, GIM e, mais recentemente, SIM-1, codificada pelo gene *bla_{SIM-1}* em isolados de *A. baumannii* da Coréia do Sul (WIRTH *et al.*, 2009). As MBLs adquiridas, clinicamente importantes dentre bactérias Gram-negativas são: IMP, VIM, SPM e GIM (ZAVASCKI *et al.*, 2005). Seis subclasses de MBL são conhecidas até o presente momento: IMP, VIM, SPM, GIM, SIM e AIM, identificadas inicialmente no Japão (1991), Itália (1997), Brasil (2001), Alemanha (2004), Coréia (2003/2004) e Austrália (2007), respectivamente (WATANABE *et al.* 1991; LAURETTI *et al.* 1999; TOLEMAN *et al.* 2002; CASTANHEIRA *et al.* 2004; LEE *et al.* 2005; GUPTA, 2008). Surtos de MBL na América do Sul são dominados pelas famílias SPM e VIM. No Brasil, diferente de outros países, o gene mais prevalente é o *bla_{SPM}* (PICOLI, 2008; FIGUEIREDO *et al.*, 2009). Em um estudo do SENTRY, 36 em 183 isolados de *P. aeruginosa* foram positivas para metalo-enzimas. A maioria dos isolados foram positivas para SPM-1 (55,6%), seguido de VIM-2 (30,6%) e genes IMP-1 em três isolados (8,3%). Enquanto SPM-1 foi confinado ao Brasil, outros países da América do Sul que relataram metalo-enzimas: Argentina, Chile e Venezuela, bem como a Colômbia, onde tanto VIM-2 e VIM-8 foram encontrados em *P. aeruginosa* (QUEENAN; BUSH, 2007).

Na América Latina seis distintas MBLs já têm sido descritas em *P. Aeruginosa*, incluindo SPM-1, IMP-1, IMP-16, VIM-2, VIM-8 e VIM-11 (ZAVASCKI *et al.*, 2005). Na

América Latina, a maior concentração de microrganismos produtores de MBL está no Brasil e na Argentina (BERTONCHELI; HORNER, 2008). IMP e VIM tem sido reportadas esporadicamente em *Pseudomonas* e *Acinetobacter*. O gene que codifica SPM-1 parece estar especificamente relacionado à espécie *P. aeruginosa*, uma vez que, até então, não foi detectado em demais microrganismos nosocomiais (MENDES *et al.*, 2006). SPM-1 está amplamente disseminada dentre os hospitais brasileiros (GALES *et al.*, 2003; SADER *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2005).

As MBLs apresentam as seguintes características: (1) são ativas contra carbapenêmicos; (2) não hidrolizam monobactâmicos; (3) são inibidas pelos agentes quelantes de íons metálicos como o ácido Etilenodiaminotetracético (EDTA); (4) não são inibidas pelo ácido clavulânico, sulbactam ou tazobactam e (5) apresentam um ou dois íons de zinco em seu sítio ativo. A maioria das *K. pneumoniae* produtoras de VIM são sensíveis ao aztreonam (um substrato pobre para MBL VIM) e gentamicina (MARCANO *et al.*, 2008). Os genes que codificam as MBL dos tipos IMP, VIM, GIM-1 e SIM-1 foram encontrados em integrons de classe 1 (CASTANHEIRA *et al.*, 2004), no entanto, MBL do tipo IMP também foram encontradas em integrons de classe 3 (WALSH *et al.*, 2005).

Classicamente, as bactérias produtoras de MBL são sensíveis ao aztreonam, porém Laranjeira *et al.* (2010), demonstraram que nenhuma cepa de *P. aeruginosa* apresentou este comportamento. Assim, é provável que exista outro mecanismo de resistência nestas bactérias, provavelmente a produção de uma ESBL. Da mesma maneira, Zavascki *et al.* (2005), encontraram um considerável número (26,7%) de isolados intermediários ou resistentes ao aztreonam dentre isolados MBL positivos. Segundo Arakawa *et al.* (2000), o substrato mais adequado para pesquisa de metalo-enzima é a ceftazidima (30µg), pois amostras produtoras de MBLs usualmente demonstram alto nível de resistência a este antimicrobiano, além de considerável efeito inibitório do EDTA e dos compostos derivados do ácido tiolático como o ácido 2-mercaptopropiônico (2-MPA) (MENDES *et al.*, 2006).

MBL tipo VIM (de “Verona integron-encoded metalo- β -lactamase”) apresenta um amplo espectro de atividade hidrolítica contra antibióticos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos, e seus respectivos genes estão localizados na região variável de integrons classe 1. O mecanismo de hidrólise é dependente da interação do β -lactâmico com íons

zinco no sítio ativo da enzima, com inibição pelo EDTA, um quelante de Zn^{+2} e outros cátions divalentes (QUEENAN; BUSH, 2007).

O primeiro membro da família VIM, VIM-1, foi identificado em um isolado clínico de *P. aeruginosa* em Verona, Itália em 1997 (LAURETTI *et al.*, 1999). Com a identificação de VIM-2 na França em 1996, posteriormente relatada (QUEENAN; BUSH, 2007). Atualmente, são conhecidas 18 variantes identificadas em diferentes microrganismos e relatadas em vários países por todo o mundo (BERTONCHELI; HORNER, 2008), porém com ocorrência relatada principalmente em *P. aeruginosa* e relacionada a múltiplos integrons. Os primeiros relatos de VIM na América do Sul (Venezuela) ocorreram em isolados de *P. aeruginosa* em 2002 (MENDES *et al.*, 2004b) e em isolados de *K. pneumoniae* em 2008 (MARCANO *et al.*, 2008).

A família VIM tem sido relatada principalmente nos países europeus e asiáticos, porém VIM-7, foi caracterizada nos Estados Unidos (TOLEMAN *et al.*, 2004). Giakkoupi *et al.* (2003), relataram isolados *K. pneumoniae* produtores de VIM-1 na Grécia. Esporádicos isolados de *E. cloacae* e *K. pneumoniae* produtores de VIM têm sido descritos na Itália (LUZZARO *et al.*, 2004). Surtos de *K. pneumoniae* produtores de MBLs tipo VIM têm sido relatados na Grécia, França e Itália (KTARI *et al.*, 2006). Roche *et al.* (2010), relataram um isolado de *K. pneumoniae* produtor de VIM-1 na Irlanda pertencente ao grupo de enterobactérias produtoras da recentemente relatada Nova Delhi metalo- β -lactamase (NDM-1). As MBLs mais frequentes na América são do tipo VIM, com VIM-2 a variante mais difundida em todo o mundo (SÁNCHEZ *et al.*, 2008).

Queenan e Bush (2007), analisando 1234 isolados Gram-negativos não fermentadores encontraram 211 (17%) de positividade para metalo-enzimas, sendo 74% VIM e 22% de IMP. Giakkoup *et al.* (2009), fizeram o primeiro relato da emergência de *K. pneumoniae* co-produzindo VIM-1 e KPC-2. A Identificação de *K. pneumoniae* VIM-1 co-produtora de KPC-2 pode sugerir um diferencial até agora despercebido, mas significativo. São necessários estudos para avaliar a real prevalência de *K. pneumoniae* co-produzindo essas enzimas e o potencial impacto terapêutico da co-produção. Uma hipótese plausível é que *K. pneumoniae* VIM-1 co-produtora de KPC-2 evoluiu através da aquisição de um plasmídeo carregando *bla*_{KPC-2} por um estabelecida cepa de *K. pneumoniae* produtora de VIM-1.

CAGNACCI *et al.* (2007), revelaram a presença dos seguintes genes de β -lactamase em todos os isolados estudados de *K. pneumoniae* na Itália: *bla*_{TEM-1}, *bla*_{SHV-5} e *bla*_{VIM-1}, através de análise molecular. Ktari *et al.* (2006), relataram o surgimento de *K. pneumoniae* multirresistente que produziu MBL do tipo VIM-4, ESBL do tipo CTX-M-15 e β -lactamases do tipo AmpC, CMY-4 e TEM-1 em um hospital universitário da Tunísia. Também houve detecção do gene *bla*_{SHV-1}, provavelmente, codificado cromossomicamente. A simultânea produção de três β -lactamases (VIM-4, CMY-4 e CTX-M-15) por isolados clínicos de *K. Pneumoniae* merece destaque. A coexistência de duas enzimas, uma MBL e uma ESBL, na mesma estirpe foi documentada para *Enterobacteriaceae*, por exemplo, VIM-1e CTX-M (SCOULICA *et al.*, 2004), VIM-1 e SHV-5 (KASSIS-CHIKHANI *et al.*, 2006), SHV-12 e VIM-4 (LUZZARO *et al.*, 2004), VIM-2 e IBC-1 (GALANI *et al.*, 2004), IMP-1e CTX-M-2 (LIVERMORE, WOODFORD; 2000), VIM-12 e uma cefalosporinase do tipo CMY (POURNARAS *et al.*, 2005) e VIM-1 e CMY-13 (MIRIAGOU *et al.*, 2004).

Estes genes são normalmente inseridos em elementos móveis que facilitam o intercâmbio desses genes de resistência entre diversas espécies de bactérias (WIRTH *et al.*, 2009). A análise da sequência de nucleotídeos de MBL revelou que *bla*_{VIM-4} era parte de um integron de classe 1 (TÓRTOLA *et al.*, 2005; KTARI *et al.*, 2006). Cagnacci *et al.* (2007), mostraram que *bla*_{VIM-1} era parte da região variável de um integron classe 1, genes transferidos por conjugação, provavelmente através de diferentes plasmídeos conjugativos.

A primeira enzima MBL do tipo IMP (de “imipenemase”) foi descrita no Japão em 1991 (WATANABE *et al.*, 1991). Por muitos anos, a detecção de isolados produtores de IMP-1 foi restrito ao Japão (TOLEMAN *et al.*, 2002). O segundo membro da família IMP, IMP-2, encontrado na Europa foi em um isolado de *A. Baumannii* na Itália em 1997 e 1998 em um integron classe 1 (RICCIO *et al.*, 2000). Em um estudo realizado no Hospital São Paulo, de 1993 a 2001, 54,8% (40/73) das amostras de *Acinetobacter* spp., que apresentaram resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos, foram produtores de IMP-1. A emergência desse determinante de resistência foi detectada em amostras bacterianas isoladas a partir de 1998 (MENDES *et al.*, 2006). A descoberta histórica de IMP foi bem documentada na revisão de Walsh *et al.* (2005). Atualmente, são conhecidas 23 variantes pertencentes à subclasse IMP (BERTONCHELI; HORNER, 2008), as quais foram identificadas em diferentes microrganismos e em diversos países. Em 2005, identificou-se o primeiro isolado de *K. pneumoniae* produtora de MBL do tipo IMP-1 do

Brasil e da América Latina (LINCOPAN *et al.*, 2005), evidenciando ampla disseminação desse mecanismo de resistência entre vários patógenos nos hospitais brasileiros. Durante o 44 Interscience Conferência sobre Agentes Antimicrobianos e Quimioterapia, Grinbaum *et al.* (2004), relataram um surto hospitalar causado por um clone de *K. pneumoniae* produtora de IMP-1 em um hospital de ensino em São Paulo no final de 2003 e início de 2004.

A análise da resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* é importante, (1) porque IMP-1 é codificado por elementos extracromossômicos de transmissão rápida e horizontal entre as bactérias e (2) porque *K. pneumoniae* é considerada reservatório nosocomial e fonte de transmissão de plasmídeos de resistência (AKTAS *et al.*, 2006). O gene *bla*_{IMP-1} está inserido em um integron classe 1, sugerindo versatilidade na sua disseminação para outras espécies. IMP-4 foi identificado em um integron de classe 1 residente em um grande plasmídeo conjugativo (HOUANG *et al.*, 2003; PELEG *et al.*, 2005). Porém, Queenan e Bush (2007), demonstraram que o integron relacionado a IMP-13 estava localizado cromossomicamente, este gene não foi transferido por experimentos de conjugação. Esses elementos genéticos são críticos para a aquisição, manutenção e disseminação da resistência em organismos Gram-negativos (FLUIT; SCHMITZ, 2004). Peleg *et al.* (2005), ilustraram a facilidade de difusão de um gene MBL entre 5 gêneros de bactérias Gram-negativas diferentes em ambiente clínico.

Analisando 2100 bactérias Gram-negativas, dentre as quais 204 (10%) reuniam os critérios para a seleção de MBL, Peleg *et al.* (2005), encontraram 20 isolados positivos para MBL por definição fenotípica. Por métodos moleculares, um isolado não teve seu conteúdo genético amplificado para IMP ou VIM. Todos os 19 isolados apresentavam o gene *bla*_{IMP-4}, um gene de resistência previamente relatado em Hong Kong e na China (HAWKEY *et al.*, 2001) e que apresenta 95,6% de homologia na sequência de aminoácidos como gene *bla*_{IMP-1} (CHU *et al.*, 2001). Dentre os 19 isolados que apresentavam o gene *bla*_{IMP-4}, apenas 5 (26%) eram resistentes aos carbapenêmicos. Esta susceptibilidade variável foi descrita anteriormente e pode ser explicada por uma série de fatores. Em primeiro lugar, a expressão fenotípica de resistência é mais provável quando outros mecanismos de resistência estão presentes. Por exemplo, a co-presença de bombas de efluxo e/ou impermeabilidade da membrana (LIVERMORE, 2002). Outras explicações incluem a supressão do gene MBL por sistemas de regulação secundária, levando a um gene silencioso (SENDA *et al.*, 1996) e a hidrólise variada dos carbapenêmicos depende da

dosagem do gene MBL, dependente do número de cópias de plasmídeos (HIRAKATA *et al.*, 1998). Senda *et al.* (1996), avaliando hospitais japoneses, entre os anos de 1992 e 1994, encontraram o gene *bla*_{IMP-1} em 15 dos 132 isolados selecionados. Ao avaliar o MIC para o imipenem dos isolados positivos para MBL, observaram que apenas a aquisição de genes para MBL nem sempre estava associada com níveis elevados de resistência aos carbapenêmicos.

Lincopan *et al.* (2006), analisaram 7 enterobactérias resistentes ao imipenem, sendo 6 *K. pneumoniae*, provenientes de hospitais da cidade de São Paulo no ano de 2003 a 2005. Encontraram IMP-1, CTX-M, TEM concomitantemente e IMP-1 associado a CTX-M, TEM e SHV separadamente. Tal acúmulo de determinantes de resistência em uma cepa impõe uma limitação nas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por espécies Gram-negativas. De fato, a produção dessas duas enzimas, ESBLs e MBL, contribuiu para a falha do tratamento e morte dos pacientes infectados. Esta preocupação é agravada pela escassez de drogas antibacterianas sendo desenvolvidas para atingir organismos Gram-negativas (CHARLES; GRAYSON, 2004; PELEG *et al.*, 2005).

SPM-1 (de “São Paulo metalo- β -lactamase”) foi isolada pela primeira vez no ano de 2001 em uma cepa de *P. aeruginosa* no estado de São Paulo (TOLEMAN *et al.*, 2002; GALES *et al.*, 2003). Até o momento, SPM-1 foi encontrada exclusivamente em *P. aeruginosa* (SADER *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2005). A identificação da MBL SPM-1 definiu uma nova família com identidade de aminoácido de 35,5% com IMP-1 (QUEENAN; BUSH, 2007). Desde o relatório inicial, clones de *P. aeruginosa* contendo SPM-1 têm causado múltiplos surtos hospitalares com alta mortalidade no Brasil (MARRA *et al.*, 2006b; POIREL *et al.*, 2004b). Magalhães, Lins e Magalhães (2005), publicaram um estudo com 48 cepas de *P. aeruginosa*, procedentes de cinco hospitais públicos e privados de Recife, onde foi observado que 50% dos isolados eram resistentes ao imipenem, e destes, 62,5% eram produtores de SPM-1. Zavascki *et al.* (2005), são responsáveis pelo primeiro relato de SPM-1 no Rio grande do Sul, descrevendo um surto nosocomial por *P. aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos pela produção de SPM-1. 77,1% das *P. Aeruginosa* resistentes a carbapênemicos provaram ser produtores de MBLs, prevalência extremamente alta. Gaspareto *et al.* (2007), encontraram a frequência de 73% para o gene SPM-1. Gonçalves *et al.* (2009), detectaram o gene *bla*_{SPM-1} em 26 (74,3%) isolados e em nove isolados (25,7%) com fenótipo positivo para MBL, não foram detectados nenhum dos

genes pesquisados, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{IMP-1}, *bla*_{IMP-2}, *bla*_{VIM-1} e *bla*_{VIM-2}. Estudos realizados no Brasil demonstram que *P. aeruginosa* portadora do gene *bla*_{SPM-1} está disseminada pelo país e a taxa de isolados produtores de MBL é variável em diferentes regiões (CASTANHEIRA *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009). Sader *et al.* (2005), reportou em um centro médico de São Paulo os genes VIM, IMP e SPM em 36 isolados de *P. aeruginosa* positivos pra MBL recuperados entre 2000 e 2001, encontrando 20 positivos para SPM-1, onze para VIM-2 e 3 para IMP-1.

Salabi *et al.* (2010), são responsáveis pela primeira descrição de SPM-1 fora do Brasil, isolado do ano de 2007. Foi relatado que o paciente recebeu cuidados primários em um hospital da cidade de Recife antes de ser transportado para Europa. O isolado europeu foi considerado intimamente relacionado (padrão de restrição quase idêntico, diferindo por 3 ou 4 bandas somente) a 15 isolados originários do Brasil entre 1997 e 2007 baseado em Tenover *et al.* (1995). Salabi *et al.* (2010), também mostraram que a sonda de *bla*_{SPM-1} hibridizou somente ao DNA cromossômico e não a bandas de plasmídeos, indicando que o gene de MBL estava localizado cromossomicamente.

A emergência de bactérias produtoras de MBL requer mudanças na rotina dos laboratórios de Microbiologia, adequando métodos capazes de detectar a sua produção. Entretanto, representa um desafio, pois não existe um consenso sobre a padronização de metodologias para a detecção da produção dessas enzimas (PICÃO *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009). Apesar da detecção da resistência pelos laboratórios clínicos de microbiologia ser uma ferramenta valiosa para os serviços de controle de infecção hospitalar, a prática ainda constitui um grande problema, pois a maioria dos isolados resistentes apresenta mais de um mecanismo envolvido e várias recomendações têm sido descritas para melhorar sua pesquisa. Até o momento, o CLSI não determinou o melhor teste para detecção de amostras produtoras de MBL, contrariando a realidade brasileira, onde diversos estudos apontam a presença dessas enzimas em cepas de *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* sp. e *Enterobacteriaceae* isoladas em distintos hospitais (LARANJEIRA *et al.*, 2010).

Existe grande discordância na literatura quanto à melhor técnica fenotípica para detecção de MBL. Possivelmente, tais discrepâncias estão relacionadas com a espécie bacteriana em estudo e os tipos de metalo-enzimas envolvidos. Alguns trabalhos mostram que o 2-MPA oferece maior sensibilidade (ARAKAWA *et al.*, 2000; LEE *et al.*, 2003) apesar da interpretação ser difícil e subjetiva, enquanto outros, como Walsh *et al.* (2002),

apontam que o EDTA pode ser usado com sucesso, porém também orientam que a realização de testes específicos para a detecção de MBL não tem impacto significativo na conduta terapêutica, pois a maioria absoluta dos isolados produtores desta enzima já apresenta resistência aos carbapenêmicos quando testados por disco difusão.

Wirth *et al.* (2009), encontraram 30,4% positivos para MBLs no hospital de Porto Alegre e 3,1% positivos no hospital da região de Vale dos Sinos. A prevalência de *P. aeruginosa* produtoras de MBLs podem ser significativamente diferente em distintas áreas geográficas e até mesmo entre diferentes hospitais de uma mesma área. A cepa foi detectada pelo E-Teste MBL. Marcano *et al.* (2008), alertam para a transferência de resistência entre microrganismos que já está ocorrendo em alguns países com o subsequente aumento nos custos dos cuidados à saúde e também mortalidade. Através de IEF detectaram uma banda de pI 5,8 que corresponde a MBL. A PCR revelou a presença do gene *bla_{VIM}*. Para Giakkoup *et al.* (2009), o teste fenotípico para produção de MBLs baseado no ácido borônico utilizando imipenem, meropenem ou discos de ertapenem apresentou-se negativo. Os resultados falso-negativos do teste à base de ácido borônico devem ser atribuídos a um efeito de "mascaramento" da co-produção de VIM-1. A diminuição da susceptibilidade ou resistência ao cefepime, imipenem, meropenem e ertapenem determinado pela técnica de microdiluição foram consistentes com a produção de VIM-1.

WIRTH *et al.* (2009), não conseguiram detectar nenhum isolado MBL positivo através do teste de Arakawa *et al.* (2000), que utiliza o ácido 2-MPA, no entanto, todas as amostras positivas para a produção de MBL foram detectadas pela tira de E-teste. Os isolados positivos fenotipicamente, através de PCR amplificaram o gene *bla_{SPM-1}*, porém em dois isolados que foram MBL positivos, não houve detecção dos genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{IMP}* ou *bla_{VIM}* por PCR, sugerindo que outro tipo de gene MBL pode estar envolvido nestas amostras. Entre as cepas negativas para MBLs, duas foram resistentes somente ao imipenem (dentre os β -lactâmicos testados), o que pode ser explicado por um mecanismo envolvendo perda de porina. De acordo com Troillet, Samore e Carmeli (1997), esta discrepância pode ser explicada pelo fato de que os carbapenêmicos utilizam uma porina específica para entrar na célula bacteriana (porinas OprD), enquanto outros β -lactâmicos usam outros tipos de porinas. Desta forma, a perda de OprD resultaria em um aumento da MIC do imipenem apenas (WIRTH *et al.*, 2009).

Segundo Marra *et al.* (2006b) e Magalhães, Lins e Magalhães (2005), a enzima SPM-1, que é altamente prevalente no Brasil, pôde ser igualmente detectada pelo método de 2-MPA e o método baseado em EDTA. Zavascki *et al.* (2005), encontraram o gene *bla_{SPM-1}* em todas as *P. aeruginosa* produtoras de MBL, exceto uma. Esse isolado também mostrou-se negativo para os genes *bla_{IMP-1}* e *bla_{VIM-2}*, sugerindo a presença de outro gene de MBL. Gonçalves *et al.* (2009), analisando 62 isolados de *P. aeruginosa* resistentes ao imipenem e à ceftazidima, encontraram 35 (56,4%) positivos para a produção de MBL pelo método fenotípico de aproximação de disco. Este teste apresenta boa sensibilidade e especificidade. Porém, esses resultados podem variar de acordo com a espécie bacteriana testada, o substrato e o agente quelante utilizado. Segundo Arakawa *et al.* (2000), o agente quelante 2-MPA apresentou melhor atividade (100%) quando comparado ao EDTA utilizando-se a ceftazidima como substrato. Neste estudo, o teste com 2-MPA permitiu verificar a produção de MBL em 35 isolados, enquanto utilizando EDTA, a produção foi verificada em seis. Segundo Lee *et al.* (2003), o teste com 2-MPA falhou em detectar 10,5% das *P. aeruginosa* analisadas. Em contrapartida, o EDTA falhou em detectar 6% das amostras de *Acinetobacter* spp..

Laranjeira *et al.* (2010), realizaram detecção fenotípica de MBL pelos métodos de aproximação de disco com ceftazidima (CAZ) e ácido 2-MPA e pelo E-test MBL. Para confirmar a presença de genes de MBL nos não fermentadores fenotipicamente positivos, foi realizada a amplificação dos genes *bla_{IMP-1}*, *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}*. Adicionalmente, foi realizada a amplificação dos genes *bla_{OXA-23}* e *bla_{OXA-51}* nas cepas de *Acinetobacter* sp. Dentre as 13 cepas avaliadas, nove *Acinetobacter* sp. e 2 *P. aeruginosa* tiveram teste fenotípico (E-test MBL) positivo para MBL, mas todas foram negativas no teste CAZ/2-MPA. As duas cepas de *P. aeruginosa* com fenótipo de MBL foram positivas apenas para o gene *bla_{SPM-1}*. Os genes *bla_{SPM-1}*, *bla_{VIM-1}* e *bla_{IMP-1}* não foram encontrados entre as cepas de *Acinetobacter* sp.. Deve-se ter cautela ao avaliar testes fenotípicos utilizados na detecção rotineira de metalo-enzima (LARANJEIRA *et al.*, 2010). Gaspareto *et al.* (2007), em uma amostra de 60 isolados, encontraram 14 negativos para os genes de MBLs através da PCR dentre isolados positivos fenotipicamente por testes de aproximação de disco para produção de MBLs. Deve-se interpretar cautelosamente o resultado fenotípico de MBL obtido com E-test® MBL dado o elevado número de resultados falso-positivos. Por outro lado, o teste de disco aproximação CAZ/2-MPA subestimou a presença da metalo-enzima em *P. aeruginosa* (falso negativo) (LARANJEIRA *et al.*, 2010). Os métodos moleculares

são mais sensíveis e específicos para a detecção de MBLs, porém podem ser tecnicamente exigentes e não disponíveis na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica.

Devido ao relato da disseminação de cepas de enterobactérias produtoras de outras carbapenemases em diversos países, a exemplo daquelas dos tipos NDM ou VIM, recomenda-se a implementação de medidas de precauções de contato para pacientes admitidos em hospitais brasileiros, oriundos de instituições hospitalares no exterior, ou que tenham sido recentemente hospitalizados no exterior. Deve-se realizar coleta de amostra de swab retal para cultura de vigilância e manter as medidas de precaução de contato até que seja afastada a hipótese de colonização ou infecção por enterobactéria resistente a carbapenêmicos (ANVISA, 2010).

2.11. Tipagem molecular de bactérias

O processo de tipagem é importante epidemiologicamente no reconhecimento de surtos de infecções, infecções recorrentes, na detecção de transmissão cruzada de patógenos, na determinação da fonte de infecção e no monitoramento de programas de vacinação (OLIVE; BEAN, 1999). Surtos de doenças infecciosas frequentemente são resultantes da exposição a um agente etiológico de origem comum, cujos descendentes são geneticamente idênticos ou estritamente relacionados. Em termos epidemiológicos, os organismos envolvidos em surtos são relacionados clonalmente. Estes organismos são membros de uma mesma espécie e possuem fatores de virulência e características bioquímicas e genéticas semelhantes. Alguns programas de vigilância têm incorporado técnicas de tipagem molecular como um meio de proporcionar informação adicional, para detectar e avaliar o modo de disseminação de patógenos multirresistentes (PFALLER *et al.*, 2001).

A tipagem de linhagens bacterianas tem sido realizada por diferentes métodos que podem ser classificados em métodos fenotípicos e métodos genotípicos (ARBEIT, 1999). Um dos métodos fenotípicos mais usados para tipar isolados multirresistentes de *K. pneumoniae* é o perfil de susceptibilidade a antimicrobianos (SOUZA LOPES *et al.*, 2005). Todos os isolados de *K. pneumoniae* analisados por Ktari *et al.* (2006), apresentaram padrões similares de susceptibilidade aos antimicrobianos, consequentemente investigaram a relação clonal dessas cepas por PFGE. Os resultados do PFGE revelaram que todas as cepas de *K. pneumoniae* foram geneticamente idênticas. A identificação de genes de

resistência a antimicrobianos pode ser associada à utilização de métodos de genotipagem para identificação de semelhança genética entre as linhagens, permitindo assim o mapeamento da dinâmica de transmissão da infecção (SPACOV, *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2007).

Isolados bacterianos provenientes de diferentes fontes e regiões geográficas apresentam diversidade suficiente ao nível de espécie de modo que possam ser diferenciados ou classificados em subtipos ou linhagens (OLIVE; BEAN, 1999). Estas diferenças entre linhagens da mesma espécie são reflexos do acúmulo de mutações aleatórias não letais, substituição de pares de bases, deleção de genes individuais, aquisição de DNA de outras espécies bacterianas. Estudos brasileiros têm mostrado que isolados nosocomiais de *K. pneumoniae* compreende um elevado grupo de organismos geneticamente variável (SOUZA LOPES *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2007). Em Recife, isolados de *K.pneumoniae* foram agrupados em três grupos filogenéticos igualmente aos grupos encontrados por Brisse e Verhoef (2001) na Europa (SILVA, 2009).

Também têm sido utilizados diversos métodos moleculares com o objetivo de caracterizar isolados de *K. pneumoniae* envolvidos em surtos de infecções hospitalares: análise plasmidial (PRODINGER *et al.*, 1996), PFGE (SECHI *et al.*, 2001), ribotipagem clássica (PAI *et al.*, 1999), RAPD (BRISSE; VERHOEF, 2001; SOUZA LOPES *et al.*, 2005), polimorfismo de fragmento amplificado (AFLP) (JONAS *et al.*, 2004), ribotipagem por PCR e tDNA-PCR (LOPES *et al.*, 2007), PCR-RFLP do gene *gyrA* (BRISSE *et al.*, 2004; SILVA, 2009), PCR dos elementos repetitivos palindrômicos extragênicos (REP-PCR) e ERIC-PCR (VERSALOVIC *et al.*, 1991).

ERIC-PCR e REP-PCR são os principais grupos de elementos repetitivos que vêm sendo utilizados com sucesso para a tipagem de enterobactérias (OLIVE; BEAN, 1999). As técnicas baseadas em elementos repetitivos do DNA bacteriano mostram maior aplicabilidade e poder discriminatório do que perfil plasmidial (GEORGHIOU *et al.*, 1995) e ribotipagem por PCR (APPUHAMY *et al.*, 1997), adicionalmente, estudos demonstraram que apresentam boa correlação com PFGE, considerado o método “padrão ouro” para a tipagem de microrganismos (GUNAWARDANA; TOWNSEND; FROST, 2000). Ben-Hamouda *et al.* (2003), classificaram isolados de *K. pneumoniae* multirresistentes envolvidos em um surto neonatal na Tunísia em clones pertencentes a dois clusters principalmente, resultados da ERIC-PCR concordantes com PFGE. Cartelle *et al.* (2004), caracterizaram molecularmente um surto nosocomial na Espanha causado por cepas de *K.*

pneumoniae com susceptibilidade reduzida a cefalosporinas de espectro estendido. Classificando os 50 isolados em 17 grupos concordantes com o PFGE, comprovando a capacidade discriminatória e boa reprodutibilidade da ERIC-PCR.

Infecções por *K.pneumoniae* podem ser clonal ou multiclonal. A relação clonal indica a transmissão de uma cepa comum entre os pacientes e a infecção multiclonal indica uma seleção de cepas resistentes (SANTOS *et al.*, 2008). Quando isolados são geneticamente distintos, o grupo de microrganismos resistentes pode ser originado devido à pressão seletiva excessiva de antimicrobianos, o que favorece os fenótipos de resistência dentro de um grupo independente de cepas (TOSIN; SILBERT; SADER, 2003). Vários padrões distintos sugerem transferência horizontal de genes de resistência, como forma de propagação. Cassetari *et al.* (2006), sugerem que o problema de disseminação de clones resistentes e de genes no ambiente hospitalar pode ocorrer devido ao contato com os profissionais de saúde e devido à transferência de pacientes entre unidades hospitalares, uma vez que isolados apresentando padrões moleculares idênticos foram observados em diferentes enfermarias e alguns isolados apresentaram padrões idênticos à cepa isolada das mãos de profissionais de saúde. Portanto, no presente estudo será importante definir se os isolados de *K. pneumoniae* analisados apresentam heterogeneidade genética ou são clones de uma mesma cepa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Caracterizar geneticamente isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a β -lactâmicos de amplo espectro, provenientes de Recife-PE.

3.2. Específicos

- Determinar a ocorrência de genes para ESBLs *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} em isolados de *K. pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e/ou ao aztreonam.
- Investigar a ocorrência de genes do tipo *bla*_{KPC} e MBL (*bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}) em isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos.
- Determinar o polimorfismo genético dos isolados de *K. pneumoniae*, através do perfil plasmidial e da ERIC-PCR.
- Analisar a relação entre a presença de genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}, perfil plasmidial, resistência a antimicrobianos β -lactâmicos e os grupos genéticos dos isolados de *K. pneumoniae*.

4. MATERIAS E MÉTODOS

4.1. Isolados bacterianos

Foram analisados 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, sendo 10 isolados provenientes de diversos setores de um hospital público da cidade de Recife-PE e 14 provenientes da Unidade de Terapia Intensiva de um hospital particular da cidade de Recife-PE, nos anos de 2007 e 2008, respectivamente (tabela 1). Os isolados provenientes do Hospital público foram identificados bioquimicamente no hospital utilizando os seguintes meios de cultura: TSI (Ágar Tríplice-açúcar-ferro), caldo glicose, caldo lactose, caldo sacarose, caldo uréia, meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade), ágar citrato de Simmons e ágar lisina-ferro. Os isolados provenientes do hospital particular foram identificados no hospital pelo sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux). Todos os isolados foram re-identificados bioquimicamente utilizando testes convencionais de identificação no laboratório de microbiologia do Departamento de Medicina Tropical-UFPE. Os isolados foram mantidos em estoque congelado com glicerol 15% a -20°C. Para as análises foram cultivados em Caldo Brain Heart Infusion (BHI) ou Caldo Luria Bertani (LB) e plaqueados em Ágar nutriente (AN).

4.2. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Todos os isolados foram analisados quanto à resistência a antimicrobianos através do teste de difusão de disco em Ágar Müller-Hinton proposta por Kirby e Bauer (CLSI, 2006), utilizando os seguintes antimicrobianos: amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), amoxicilina/ ácido clavulânico (AMC), ampicilina/sulbactam (APS), aztreonam (ATM), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ), cefalotina (CFL), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MPM), piperacilina/ tazobactam (PIT), trimetoprim/ sulfametoxazol (TSU), amicacina (AMI), ácido nalidíxico (NAL), cloranfenicol (CLO), estreptomicina (EST) e tetraciclina (TET). Após 18 horas de incubação a 37°C, o diâmetro do halo de inibição foi medido em milímetros e interpretado como sensível, intermediário ou resistente, respeitando os critérios do CLSI. Todos os isolados de *K. pneumoniae* estudados apresentavam resistência ou susceptibilidade intermediária às cefalosporinas de terceira, quarta geração e/ou ao aztreonam, indicando que esses isolados são suspeitos de serem produtores de ESBLs.

Alguns isolados apresentavam resistência ao imipenem e/ou meropenem, indicando que esses isolados são suspeitos de serem produtores de carbapenemases do tipo KPC ou MBL.

4.3. Detecção fenotípica de ESBLs

Para detecção fenotípica da produção de ESBLs foi utilizado o teste de sinergia de disco duplo (VERCAUTEREN *et al.*, 1997). O inóculo com turbidez de 0,5 da escala de MacFarland foi semeado confluentemente em Ágar Mueller-Hinton. Em seguida, depositados em cada placa um disco de cefotaxima ou ceftazidima, um disco de aztreonam e 1 disco de Amoxicilina/ ácido clavulânico com uma distância entre eles de 20 mm. As placas foram incubadas a 37°C por 18 à 24h. A observação do aumento da zona de inibição ao redor do disco da cefalosporina de 3ª geração em direção ao disco contendo clavulanato (inibidor de β -lactamase) é indicativa da produção de ESBLs pelo microrganismo. Como controle positivo foi utilizado uma linhagem de *K. pneumoniae* ESBL positiva (K16R) (SOUZA LOPES *et al.*, 2005).

4.4. Detecção fenotípica de KPC

Os isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes do hospital particular que apresentaram resistência aos carbapenêmicos imipenem e/ou meropenem foram testados para produção de carbapenemases através do MHT (LEE *et al.*, 2001). A cepa *E. coli* ATCC 25922 foi semeada, utilizando-se um swab, em ágar Müeller-Hinton com uma suspensão padronizada a 0,5 na escala de turbidez de McFarland. Após secagem, depositou-se um disco contendo o antimicrobiano no centro da placa, o teste foi feito usando tanto discos de meropenem quanto ertapenem. Os isolados de *K. pneumoniae* foram inoculados, utilizando-se alça de platina, da margem do disco à periferia da placa de petri, e incubados por 24h à 37°C. O teste foi considerado positivo quando houve distorção no halo de inibição na interseção entre esta zona e o inóculo de *K. pneumoniae*.

4.5. Detecção fenotípica de MBL

Os isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes do hospital particular que apresentaram resistência aos carbapenêmicos imipenem e/ou meropenem foram testados

para produção de metalo- β -lactamases através do E-Test MBL com Imipenem e Imipenem/EDTA. Os isolados bacterianos foram semeados em ágar Müller-Hinton com uma suspensão padronizada do microrganismo a 0,5 na escala de turbidez de McFarland. A fita de E-Test MBL foi depositada no centro da placa. A interpretação foi: 1. Positivo para produção de MBL quando a relação entre os MICs de Imipenem e Imipenem/EDTA foi maior ou igual a 8, ou maior ou igual a 3 vezes o logaritmo da relação dos MICs de Imipenem e Imipenem/EDTA na base 2 ($3 \log_2 \text{MIC-Imipenem} : \text{MIC-Imipenem/EDTA}$); 2. Negativo para produção de MBL quando a relação entre os MICs de Imipenem e Imipenem/EDTA foi menor que 1. Aparecimento de zona “fantasma” ou deformação da elipse é indicativo da produção de MBL. Foram utilizados dois isolados de *P. aeruginosa* como controle positivo e um isolado de *K. pneumoniae* como controle negativo.

4.6. Extração de DNA total

Foi extraído o DNA genômico dos 24 isolados segundo Maniatis *et al.* (1982). Os isolados bacterianos foram crescidos em caldo LB por 18h à 37°C e 1,5 ml da cultura foi centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 μ l de TE 10:1 (10mM Tris-Cl pH 8,0; 1mM EDTA pH 8,0 e água MilliQ q.s.p), homogenizado e centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e novamente ressuspensionado em 500 μ L de TE 10:1. Em seguida foi adicionado 10 μ l de Proteinase K (5mg/ml), após homogeneização a suspensão foi incubada a 60°C por 20 minutos. A lise foi concluída adicionando-se 100 μ l de STE (2,5% SDS; 0,25M EDTA; 10mM Tris-Cl pH 8,0) e incubando por 15 minutos à 60°C. Após 5 minutos à temperatura ambiente e 5 minutos em gelo, foram acrescentados 130 μ l de acetato de potássio 5M com ácido acético 11,5% e cuidadosamente homogenizado, permanecendo a solução em gelo por 15 minutos. Após a centrifugação por 15 minutos, o sobrenadante, aproximadamente 700 μ l, foi transferido para outro tubo e o mesmo volume de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) foi adicionado, seguido de centrifugação por 10 minutos. O sobrenadante foi removido para outro tubo estéril e o DNA foi precipitado com aproximadamente 420 μ l de isopropanol incubado a -20°C por 18h ou -80°C por 20 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos à 4°C e ao precipitado seco foram adicionados 10 μ l de RNase (50 μ g/ml). O DNA foi quantificado

por comparação com quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III em gel de agarose a 1,0%.

4.7. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}

Os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} foram investigados pela técnica de PCR utilizando os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM do desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂, 1 µmol dos primers para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo, constituído de um tubo com todos os componentes da reação ao qual não foi adicionado DNA e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* K16R. As amplificações foram realizadas em termociclador (Bioclycer da Biosystems) programado para 5 minutos à 96°C para desnaturação inicial, seguido de 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 96°C para desnaturação, 1 minuto a uma temperatura de anelamento de 62° C para o gene *bla*_{SHV} e 57° C para o gene *bla*_{TEM} e 1 minuto à 72°C para extensão. Após os 35 ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72°C.

4.8. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{CTX-M}

Os genes de resistência *bla*_{CTX-M} foram investigados pela técnica de PCR inicialmente com os iniciadores consensus CTX-MA que amplifica todos os genes *bla*_{CTX-M} (Tabela 2). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo e um controle positivo, com o DNA da linhagem de *K. pneumoniae* K18P (LOPES *et al.*, 2010). As amplificações do gene *bla*_{CTX-M} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95 °C para desnaturação, 1 minuto à 61°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C. Os isolados positivos para o gene *bla*_{CTX-M} foram submetidos novamente a PCR com

primers específicos para o grupo 1 (primers CTX-M13) que amplifica os genes *bla*_{CTX-M-1} e para o grupo 2 (primers CTX-M25) que amplifica os genes *bla*_{CTX-M-2}, nas mesmas condições de reação de PCR descritas acima, porém com temperatura de anelamento específica para cada primer.

4.9. Condições da PCR para identificação dos genes *bla*_{KPC}

Os genes de resistência *bla*_{KPC} foram investigados pela técnica de PCR, com os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 5ng/µl, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 1 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações do gene *bla*_{KPC} foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à 63°C para anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72 °C.

4.10. Condições da PCR para identificação dos genes de MBL

Os genes de resistência *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} foram investigados pela técnica de PCR, com os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações dos genes de MBL foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, a etapa de anelamento dos primers constituiu de 1 minuto à 60°C para *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} e 1 minuto à 62°C para *bla*_{VIM} e a etapa de extensão constituiu de 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C.

4.11. Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,0% em tampão TBE e voltagem constante de 100 v. Foi utilizado um marcador de 100pb (Ludwig biotec) como padrão de peso molecular. Os géis foram adicionados de brometo de etídio a 10µg/mL, visualizados em transiluminador de luz ultravioleta (UV) e fotografados pelo sistema de fotodocumentação Photocap da Vilber Lourmat.

4.12. Extração de DNA plasmidial

A extração de plasmídeos foi realizada através do sistema UltraClean Endotoxin-Free Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Lab), de acordo com as instruções do fabricante.

O DNA plasmidial (10 µl) adicionado de 2 µl de tampão de amostra (azul de bromofenol, 30% de glicerol em TE) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 0,7% em tampão TBE. A eletroforese foi realizada à temperatura ambiente por cerca de 2h a 70v e 30 mA. Após a migração em gel de agarose o DNA plasmidial foi visualizado e documentado como descrito anteriormente. Foi utilizada a linhagem de *K. pneumoniae* K16R (SOUZA LOPES *et al.*, 2005) com plasmídeos de tamanho conhecido como marcador de peso molecular.

4.13. ERIC-PCR

Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 100ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. Em cada partida de amplificação foi incluso um controle negativo. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos também foi realizada uma etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em tampão TBE e voltagem constante de 100v, como citado anteriormente. A análise dos

fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.0.

4.14. Considerações Éticas

Os procedimentos descritos para a utilização experimental dos referidos isolados patogênicos de *K. pneumoniae* não necessitaram ser encaminhados à Comissão de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CEP/CCS/UFPE), uma vez que os isolados tratam de amostras secundárias de laboratórios e não dispomos de nenhum contato ou dados de pacientes.

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes do Hospital público e do Hospital Particular nos anos de 2007 e 2008, respectivamente da cidade de Recife-PE.

Isolado ^(A)	Origem	Perfil de Resistência a Antimicrobianos ^(B)
K1A	Ponta de cateter	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN, PIT, TSU, NAL, CLO(int)
K2A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN(int), PIT, TSU, NAL, EST(int), TET
K3A	Ferida operatória	AMO, AMP, AMC, CTX(int), TSU, NAL(int), TET
K4A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, CTX(int), NAL, TET
K5A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, GEN, PIT(int), TSU, CLO, TET
K6A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM (int), CIP, GEN(int), NAL, CLO, TET
K7A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN(int), PIT(int), TSU, NAL, EST(int), TET
K9A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, PIT(int), TSU, CLO
K10A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CPM, CTX, CFO(int), CAZ, CIP, PIT, TSU, AMI(int), NAL, CLO, TET
K12A	Urina	AMO, AMP, AMC, CMP, CFO, CIP, MPM, PIT, TSU, AMI
K1P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, TET
K3P	Fragmento ósseo	AMO, AMP, AMC(int), APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, PIT, TSU
K5P	Sangue	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, CLO, TET
K8P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, AMI, NAL, CLO, TET(int)
K9P	Secreção de abscesso	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, PIT, TSU, NAL, CLO, EST(int), TET
K10P	Secreção de coto	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int)
K12P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, AMI, NAL, CLO, TET(int)
K13P	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), TET(int)
K14P	Sangue	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, PIT, TSU, NAL, CLO, EST, TET
K15P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), TET(int)
K16P	Ponta de catéter	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, TET(int)
K19P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, CIP, PIT, TSU, NAL, CLO(int), EST, TET
K20P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, EST(int), TET
K22P	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), EST(int), TET(int)

^(A)Identificação dos isolados bacterianos: K, *K. pneumoniae*; A, hospital público; P, hospital particular

^(B)Perfil de Resistência a Antimicrobianos: AMP, ampicilina; AMO, amoxicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; APS, ampicilina-sulbactam; ATM, aztreonam; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CFL, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MPM, meropenem; PIT, piperacilina/tazobactam; TSU, trimetoprin/sulfa; AMI, amicacina; NAL, ácido nalidixico; CLO, cloranfenicol; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; (int), intermediário.

Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção dos gene de β -lactamases.

Primer	Sequência (5' - 3')	temp. ^(a)	Referência	Gene
SHV.FoR	GGGTTATTCTTATTTGTCGC	62°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)	<i>bla</i> _{SHV}
SHV.ReR	AGCGCGAGAAGCATCCTG			
T1F	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA	57°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)	<i>bla</i> _{TEM}
T2R	GACAGTTACCAATGCTTAATC			
CTX-MA1	SCSATGTGCAGYACCAGTAA	61°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M}
CTX-MA2	CCGCRATATGRTTGGTGGTG			
CTX-M13U	GGTTAAAAAATCACTGCGTC	60°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
CTX-M13L	TTGGTGACGATTTTAGCCGC			
CTX-M25U	ATGATGACTCAGAGCATTCG	62°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
CTX-M25L	TGGGTTACGATTTTCGCCGC			
KPC-1a	TGTCACTGTATCGCCGTC	63°C	Yigit <i>et al.</i> (2001)	<i>bla</i> _{KPC}
KPC-1b	CTCAGTGCTCTACAGAAAACC			
VIM-DIA F	CAGATTGCCGATGGTGTGTTGG	62°C	Dong <i>et al.</i> (2008)	<i>bla</i> _{VIM}
VIM-DIA R	AGGTGGGCCATTCAGCCAGA			
IMP-DIA F	GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC	60°C	Dong <i>et al.</i> (2008)	<i>bla</i> _{IMP}
IMP-DIA R	GTGATGCGTCYCCAAYTTCCT			
SPM-DIA F	CCTACAATCTAACGGCGACC	60°	Gales <i>et al.</i> (2003)	<i>bla</i> _{SPM}
SPM-DIA R	TCGCCGTGTCCAGGTATAAC			
ERIC-1	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC	36°C	Duan <i>et al.</i> , (2009)	
ERIC-2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG			

^(a) Temp, temperatura de anelamento dos primers

Artigo 1: Caracterização genética de isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* portadores de múltiplos genes de resistência a antibióticos beta-lactâmicos em Recife-PE, brasil.

(Artigo que será submetido para publicação na Revista MICROBIAL DRUG RESISTANCE)

Adriane Borges Cabral⁽¹⁾

Rita de Cássia de Andrade Melo⁽²⁾

Maria Amélia Vieira Maciel⁽³⁾

Ana Catarina de Souza Lopes⁽³⁾

Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco

⁽¹⁾Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical – UFPE

⁽²⁾Aluna de Iniciação Científica do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

⁽³⁾Professoras do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

Endereço para correspondência:

Adriane Borges Cabral

Rua São Mateus, 1160, bl. J ap. 204, Iputinga, Recife-PE. CEP: 50680-000

E-mail: adrianeborgescabral@gmail.com

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi caracterizar geneticamente isolados clínicos de *K. pneumoniae* através da investigação dos genes de resistência a β -lactâmicos *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{KPC}, do perfil plasmidial e da ERIC-PCR. Foram analisados 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae*, 10 provenientes de um hospital público da cidade de Recife-PE e 14 de um hospital particular da cidade de Recife-PE nos anos de 2007 e 2008, respectivamente. O Teste de sinergia de disco duplo e o Teste de Hodge Modificado foram aplicados para detecção fenotípica de ESBLs e KPC, respectivamente. Todos os isolados apresentaram o gene *bla*_{SHV}, 62,5% *bla*_{CTX-M}, 29% *bla*_{TEM}. Dentre os isolados do Hospital particular 71% apresentaram *bla*_{KPC}. O achado de 11 isolados (46%) carregando no mínimo 3 dentre os 4 genes de β -lactamases pesquisados é preocupante, uma vez que não é frequentemente relatado. O perfil plasmidial, agrupou os isolados em 17 grupos e 3 subgrupos. A ERIC-PCR classificou os isolados em 19 perfis distintos com 6 isolados apresentando o mesmo perfil, mostrando relação clonal. Podemos concluir que os isolados estudados acumulam determinantes de resistência que consequentemente impõem uma limitação nas opções terapêuticas disponíveis, explicando muitos episódios de insucesso na tentativa de controle das infecções hospitalares.

Palavras-chaves: *K. pneumoniae*, β -lactamases, Tipagem molecular

ABSTRACT

The aim of this study was genetically characterize clinical isolates of *K. pneumoniae* by the investigation of the β -lactams resistance genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} and *bla*_{KPC}, the plasmid profile and ERIC-PCR. We analyzed 24 isolates from Public hospital and from a private hospital from the city of Recife-PE from 2007 and 2008, respectively. Double-disk synergy testing and Modified Hodge Test were used for phenotypic detection of ESBLs and KPC, respectively. The *bla*_{SHV} gene was found in all isolates, *bla*_{CTX-M} in 62.5% and *bla*_{TEM} in 29%. The carbapenemase gene *bla*_{KPC} was found in frequency of 71% among the isolates from hospital particular. The finding that 11 isolates (46%) harboring at least three among the four genes β -lactamases studied is of concern since it is not often reported. The plasmid profile grouped the isolates from in 17 groups and 3 subgroups. The ERIC-PCR classified the isolates in 19 distinct types with 6 isolates exhibiting the same profile, showing clonal relationship. We can conclude that the strains accumulate resistance determinants which consequently imposes a limitation on the treatment options available, explaining many episodes of failure in the control of many hospital infections.

Keywords: *K. pneumoniae*, β -lactamases, Molecular typing

1.INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é uma das bactérias Gram-negativas mais envolvida em infecções e surtos hospitalares (FREITAS *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2010), podendo causar diversas síndromes clínicas, incluindo pneumonia, bacteriemia e infecção do trato urinário (ZHAO *et al.*, 2010).

Infecções nosocomiais por *K. pneumoniae* são causadas por linhagens multirresistentes e principalmente produtoras de ESBLs (Extended-Spectrum β -lactamases), enzimas codificadas frequentemente por genes plasmidiais, que podem degradar as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e o monobactâmico, aztreonam (THERRIEN; LEVESQUE, 2000). Existem mais de 300 ESBLs descritas, sendo a maioria derivada dos grupos TEM e SHV (DROPA *et al.*, 2009). No entanto, nos últimos anos, mais de 60 diferentes tipos de CTX-M estão emergindo na família *Enterobacteriaceae* e substituindo as ESBLs TEM e SHV em muitos países (JONES *et al.*, 2009). Enzimas CTX-M têm sido recentemente descritas no Brasil em *K. pneumoniae* (GARCIA *et al.*, 2008; DROPA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010).

Os carbapenêmicos são utilizados com frequência para o tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas multirresistentes e são considerados fármacos de escolha para o tratamento das infecções por *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBLs (YIGIT *et al.*, 2001; ANDERSON *et al.*, 2007; PETRELLA *et al.*, 2008). Dentre os mecanismos de resistência a esta classe de fármacos tem se destacado recentemente a produção de β -lactamase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Isolados de *K. pneumoniae* produtores de KPC estão sendo identificados entre os patógenos nosocomiais mais frequentes (NASS *et al.*, 2008). Enzimas KPC têm sido recentemente descritas no Brasil em *K. pneumoniae* (PAVEZ; MAMIZUKA; LINCOPAN, 2009; PEIRANO *et al.*, 2009). Monteiro *et al.* (2009), detectaram essa enzima em isolados provenientes de Recife-PE.

Existem outros métodos moleculares utilizados com o objetivo de caracterizar isolados de *K. pneumoniae* envolvidos em infecções hospitalares, dentre estes, a análise plasmidial (SOUZA LOPES *et al.*, 2005) e amplificação por PCR de seqüências consenso intergênicas repetitivas de enterobactérias (ERIC-PCR) (VERSALOVIC *et al.*, 1991). O perfil plasmidial é uma ferramenta útil para facilitar a classificação de isolados de *K. pneumoniae* em subtipos enquanto a ERIC-PCR permite a detecção de clones dentro de um

grupo fenotipicamente idêntico. Perfis plasmidiais têm sido utilizados em paralelo com outras técnicas de tipagem para estudar a epidemiologia das infecções por *K. pneumoniae* (FEIZABADI *et al.*, 2008).

O objetivo do presente estudo foi caracterizar geneticamente isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes de dois hospitais da cidade de Recife-PE, através dos genes *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}, do perfil plasmidial e da ERIC-PCR.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1.Isolados bacterianos

Foram analisados 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes de diferentes amostras clínicas (TABELA 1). Dez amostras provenientes de diversos setores de um hospital público e 14 provenientes da Unidade de Terapia Intensiva (UTI) de um hospital particular, nos anos de 2007 e 2008, respectivamente., da cidade de Recife-PE. Os isolados provenientes do Hospital público foram identificados bioquimicamente utilizando os seguintes meios de cultura: TSI (Ágar Tríplice-açúcar-ferro), caldo glicose, caldo lactose, caldo sacarose, caldo uréia, meio SIM (Sulfeto, Indol e Motilidade), ágar citrato de Simmons e ágar lisina-ferro. Os isolados provenientes do hospital particular foram identificados no hospital pelo sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux).

2.2.Teste de susceptibilidade a antimicrobianos e detecção fenotípica de β -lactamases

Os isolados foram analisados quanto à resistência a antimicrobianos através do teste de difusão de disco em Ágar Müller-Hinton proposto por Kirby e Bauer (CLSI, 2006), utilizando os seguintes antimicrobianos: amoxicilina (AMO), ampicilina (AMP), amoxicilina/ ácido clavulânico (AMC), ampicilina/sulbactam (APS), aztreonam (ATM), cefepime (CPM), cefotaxima (CTX), cefoxitina (CFO), ceftazidima (CAZ), cefalotina (CFL), ciprofloxacina (CIP), gentamicina (GEN), imipenem (IMP), meropenem (MPM), piperacilina/ tazobactam (PIT), trimetoprim/ sulfa (TSU), amicacina (AMI), ácido nalidíxico (NAL), cloranfenicol (CLO), estreptomicina (EST) e tetraciclina (TET). Após 18 horas de incubação a 37°C, o diâmetro do halo de inibição foi medido em milímetros e interpretado como sensível, intermediário ou resistente, respeitando os critérios do CLSI.

Para detecção fenotípica da produção de ESBLs foi utilizado o teste de sinergia de disco duplo (VERCAUTEREN *et al.*, 1997) e a pesquisa de KPC foi realizada através do Teste de Hodge Modificado (MHT) (ANDERSON *et al.*, 2007).

2.3. Amplificação por PCR dos genes de β -lactamases

O DNA genômico foi extraído segundo Maniatis *et al.* (1982) e quantificado por comparação com quantidade conhecida de DNA do fago *lambda* clivado com a enzima *Hind* III em gel de agarose a 1% em tampão TBE (Tris-Borato 0,089M e EDTA 0,002M). Os genes foram pesquisados usando os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ l por tubo, compreendendo: 1 μ l de DNA genômico a 5ng/ μ l, 2,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 μ M do desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP) (Ludwig Biotec), 1,5 mM de $MgCl_2$, 1 μ mol dos primers. As amplificações foram realizadas em termociclador (Bioclycer da Biosystems) programado para 5 minutos à 96°C para desnaturação inicial para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} e à 95° para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}. Em seguida 35 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 96°C para desnaturação, 1 minuto à temperatura específica de anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão para os genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM}. Para os genes *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}, foram executados 30 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 95°C para desnaturação, 1 minuto à temperatura específica de anelamento do primer e 1 minuto à 72°C para extensão. Após os ciclos, foi realizada uma etapa de alongamento final de 10 minutos à 72°C. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 1,0%.

2.4. Extração plasmidial e ERIC-PCR

A extração de plasmídeos foi realizada através do sistema UltraClean Endotoxin-Free Mini Plasmid Prep Kit (Mo Bio Lab), de acordo com as instruções do fabricante. Para o método da ERIC-PCR foram utilizados os primers descritos na tabela 2. As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ l por tubo, compreendendo: 1 μ l de DNA genômico a 100ng/ μ l, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 200 μ M de dNTP (Ludwig Biotec), 1,52 mM de $MgCl_2$ e 0,4 μ mol dos primers. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95 °C por 3 minutos, seguido de 40 ciclos, consistindo cada ciclo de 1 minuto à 92 °C para desnaturação, 1 minuto à 36°C para anelamento do primer e 8 minuto à 72°C para extensão. Após estes ciclos foi realizada uma

etapa de alongamento final de 16 minutos à 72 °C. Os produtos da extração plasmidial e da ERIC-PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 0,7% e 1,5%, respectivamente. A análise dos fragmentos amplificados pela ERIC-PCR e a construção do dendrograma foram feitas utilizando o software DARwin 5.0.

3.RESULTADOS

3.1.Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos

Analizando o perfil de susceptibilidade aos antimicrobianos das 10 amostras do hospital público, observamos que os carbapenêmicos foram os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade, imipenem inibiu todos os isolados e meropenem, nove isolados (90%), seguido da cefoxitina (taxa de inibição de 80%). Os aminoglicosídeos, amicacina, estreptomicina e gentamicina inibiram 80%, 80% e 50% dos isolados, respectivamente. Os demais antimicrobianos inibiram menos de 50% das amostras. Analisando os 14 isolados do hospital particular, foi constatado que os aminoglicosídeos, amicacina, estreptomicina e gentamicina, foram os antimicrobianos mais eficazes, com taxas de inibição 86% (12 isolados), 64% (9 isolados) e 64% (9 isolados), respectivamente. Os demais antimicrobianos inibiram menos de 4 amostras (31%). Considerando os dois hospitais, os antimicrobianos que apresentaram melhor atividade foram os aminoglicosídeos seguidos dos carbapenêmicos. Deve-se destacar que os isolados K2A e o K7A assim como K8P e o K12P, mostraram o mesmo perfil de resistência a antimicrobianos, porém não eram clones pela ERIC-PCR.

3.2.ERIC-PCR

O padrão de bandas gerado pela ERIC-PCR foi analisado de acordo com Tenover *et al.* (1995). Seis isolados do hospital particular (K10P, K12P, K13P, K15P, K16P e K22P) apresentaram mesmo padrão de bandas (perfil E11), apresentando 100% de similaridade (FIGURA 1), mostrando relação clonal. As demais amostras do hospital particular e do hospital público apresentaram perfis genéticos distintos (TABELA 3), com no máximo 60% de similaridade pela análise do dendrograma (FIGURA 1), sendo considerados não relacionados geneticamente por diferirem em no mínimo 7 bandas (mudanças consistentes com três ou mais eventos genéticos independentes).

3.3.Detecção fenotípica e genotípica de ESBLs

Dos 24 isolados clínicos de *K. pneumoniae* estudados quanto a produção de ESBLs, nove (37,5%) foram positivos para o teste de sinergia de disco duplo. As amostras que foram negativas fenotipicamente para a produção de ESBLs apresentaram no mínimo um dos três genes pesquisados, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} ou *bla*_{CTX-M}. Todos os isolados que foram positivos por PCR para *bla*_{CTX-M} (consensus) foram positivos para *bla*_{CTX-M-2} (grupo 2). As 24 amostras apresentaram o gene *bla*_{SHV}, quinze (62,5%) apresentaram o gene *bla*_{CTX-M} e 7 (29%) foram positivas para a presença do gene *bla*_{TEM} (TABELA 3). Foi detectado que 67% (16/24) das amostras foram produtoras de ESBL, baseando-se em 2 características, a presença do gene *bla*_{CTX-M} (15 isolados) e/ou por apresentar o teste de sinergia de disco duplo positivo. A combinação de genes mais frequentemente observada foi *bla*_{SHV} e *bla*_{CTX-M} (42%), seguido de *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} (8%), a combinação *bla*_{CTX-M} e *bla*_{TEM} não foi observada. Os três genes pesquisados foram encontrados simultaneamente em 5 isolados (21%): K1A, K5A, K10A, K1P e K14P (TABELA 3). A ERIC-PCR mostrou que nenhum desses isolados eram clones.

3.4.Detecção fenotípica e genotípica de KPC

Apenas cinco das 10 amostras de *K. pneumoniae* provenientes do hospital particular que apresentavam resistência aos carbapenêmicos foram positivas pelo MHT. A pesquisa por PCR do gene *bla*_{KPC} foi aplicada para todas as amostras dos 2 hospitais analisados. O gene *bla*_{KPC} não foi encontrado nas amostras do hospital público, por outro lado, dez isolados (71%) do hospital particular apresentaram o gene *bla*_{KPC} amplificando um fragmento de peso molecular de 1000 pb, conforme representado na figura 2. O isolado K14P não apresentava resistência aos carbapenêmicos, foi negativo para o MHT, porém albergava o gene para carbapenemase KPC (TABELA 3). Os isolados K8P, K12P, K16P e K20P apresentaram resistência aos carbapenêmicos e o gene *bla*_{KPC}, porém mostraram MHT negativo. O isolado K5P, resistente aos carbapenêmicos, foi negativo para o MHT e para o gene pesquisado.

3.5.Análise do perfil plasmidial

Todas as amostras apresentaram de 1 a 10 plasmídeos de diferentes tamanhos (TABELA 4). Os plasmídeos >150Kb, 150kb e ≤3,4kb foram encontrados em 50%, 54% e 83% dos isolados, respectivamente. Plasmídeos de 100kb, 80kb, e 12kb foram encontrados

em 57%, 78% e 50% dos isolados provenientes do hospital particular, sugerindo que pode ter havido disseminação desses plasmídeos. Deve-se destacar que os isolados K4A e o K10A assim como, K12P e K13P; K14P e K19P; K15P e K16P apresentaram o mesmo perfil plasmidial, definido pelo número e peso molecular dos plasmídeos. Deve-se ressaltar que K12P, K13P, K15P e K16P eram clones pela análise de ERIC-PCR.

4.DISCUSSÃO

A multirresistência entre isolados produtores de ESBL é previsível uma vez que os genes que codificam ESBL geralmente estão localizados em plasmídeos auto-transferíveis, transposons e integrons, que podem carregar outros determinantes de resistência a antimicrobianos (FEIZABADI *et al.*, 2008). Os isolados foram testados frente a 9 classes de antimicrobianos, porém para a maioria (18/24) as opções terapêuticas restringiram-se a no máximo 4 classes, evidenciando a problemática para tratamento de isolados multirresistentes. Foi possível estabelecer uma associação entre perfil de resistência e genes para β -lactamases, visto que, isolados com mesmo perfil de resistência apresentaram mesmo conteúdo genético (K2A e o K7A, assim como, K8P e o K12P). Os isolados do hospital público que apresentaram três ou dois genes dentre *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*, foram resistentes a todas às cefalosporinas de 3^a e 4^a geração (ceftazidima, cefotaxima e cefepime) e ao aztreonam, enquanto os isolados que apresentaram 1 gene (*bla_{SHV}*) foram resistentes a somente 1 destes antimicrobianos. Por outro lado, no hospital particular não foi observada esta associação, uma vez que todos os isolados foram resistentes a todas as cefalosporinas de 3^a e 4^a geração e ao monobactâmico testado, independente da quantidade de genes apresentada.

Considerando que os isolados K3A, K4A, K6A, K12A, K3P, K8P, K12P, K20P e 22P apresentaram resistência às cefalosporinas de última geração e não apresentaram o gene *bla_{CTX-M}*, provavelmente os genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* nestes isolados podem corresponder a uma ESBL. Entretanto, a resistência a estes antimicrobianos, pode ser conferida por outros mecanismos que não ESBLs (WINOKUR *et al.*, 2001). Um mecanismo que poderia explicar essa resistência nos isolados K8P, K12P, K20P e K22P é a presença do gene *bla_{KPC}*.

O teste de sinergia de disco duplo foi eficaz na detecção de todas as amostras produtoras de ESBL (PCR positiva para *bla_{CTX-M}*) provenientes do hospital público. Para

os isolados do hospital particular, o teste foi concordante para 6 isolados, porém falhou na detecção em 7 isolados. A falha do teste de sinergia de disco duplo para detecção de ESBLs para os isolados K1P, K10P, K13P, K14P, K15P, K16P pode ser explicada pela presença concomitante de carbapenemase KPC. Tsakris *et al.* (2009), mostraram que a detecção fenotípica de ESBLs é dificultada quando os isolados também produzem KPC, portanto, sugerem a adição de ácido borônico ao teste para inibir enzimas KPC, para que as enzimas ESBL possam ser detectadas. O isolado K3P foi positivo fenotipicamente para o teste de sinergia de disco duplo mesmo na ausência de *bla*_{CTX-M}, cujo gene *bla*_{SHV} pode corresponder a uma ESBL. Entretanto, é importante ressaltar que de acordo com a literatura, a maioria das cepas de *K. pneumoniae* possuem o gene cromossômico *bla*_{SHV-1} (BABINI; LIVERMORE, 2000; HOWARD *et al.* 2002; LIVERMORE, 2008; DROPA *et al.*, 2009).

A falha na detecção de ESBLs através do teste de sinergia de disco duplo para o isolado K5P, que foi positivo para *bla*_{CTX-M} e negativo para *bla*_{KPC}, pode ser explicada pelo fato que: (1) não é um teste confirmatório para detecção de ESBLs (NCCLS, 2003), pois se baseia no fenótipo bacteriano, que pode ser alterado pelas condições de cultivo *in vitro*, (2) adicionalmente detecta somente ESBLs que são inibidas pelo ácido clavulânico (atualmente 36 das 135 enzimas TEM, e 5 das 72 enzimas SHV, demonstraram a característica de resistência ao ácido clavulânico e inibidores relacionados, porém nenhuma CTX-M demonstrou essa característica até o momento) (BUSH; JACOBY, 2010) e (3) uma outra explicação é que métodos moleculares apresentam maior sensibilidade para a detecção de ESBLs que métodos fenotípicos (STEWART *et al.*, 2001). Essa disparidade entre resultados fenotípicos e moleculares tem sido citada na literatura.

Em alguns países a prevalência da produção de ESBL por *K. pneumoniae* aproxima-se de 50% (LEAVITT, 2009), principalmente na Europa Oriental e América Latina (PATERSON *et al.*, 2004), porém inferior a detectada no nosso estudo (67%). Alguns estudos brasileiros mostram diferentes taxas de enterobactérias produtoras de ESBL em centros de saúde e até mesmo na comunidade, especialmente em isolados de *K. pneumoniae* (NOGUEIRA *et al.*, 2006; MINARINI *et al.*, 2007; SILVA DIAS; BORGES-NETO; FERRAIUOLI, 2008; DROPA *et al.*, 2009; LOPES *et al.*, 2010). A combinação dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM} e *bla*_{CTX-M} em *Enterobacteriaceae*, já foi relatada por outros autores como Lal *et al.* (2007) e Droga *et al.* (2009).

O MHT falhou na detecção de carbapenemases em cinco isolados resistentes aos carbapenêmicos e que apresentavam o gene *bla_{KPC}*. No Brasil é mais comum ocorrer resultado falso positivo para produção de carbapenemase, por exemplo em amostras de *K. pneumoniae* produtoras de cefotaximases e que apresentam simultaneamente perda de porinas (ANVISA, 2010). Problemas com a detecção de KPC mediando resistência aos carbapenêmicos em *Enterobacteriaceae* foram relatados por outros pesquisadores (TENOVER *et al.*, 2006; ANDERSON *et al.*, 2007), por isso tem sido indicada a detecção fenotípica de KPC utilizando o ácido borônico (TSAKRIS *et al.*, 2009).

Analizando as amostras do hospital particular, um fato que merece destaque é o encontro do gene *bla_{KPC}* na frequência de 71%, igual a frequência de ESBL neste hospital. Este fato limita efetivamente as opções terapêuticas e favorece o aumento de índices de mortalidade (BRATU *et al.*, 2005a). O gene *bla_{KPC}* não foi encontrado nas amostras do hospital público, porém o isolado K12A apresentava resistência ao meropenem. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores, como Elliott *et al.* (2006), Woodford *et al.* (2007), Leavitt *et al.* (2009) e Dienstmann *et al.* (2010), que justificaram a resistência aos carbapenêmicos através da combinação da impermeabilidade da membrana com β -lactamases cromossômicas (AmpC) ou de amplo espectro. Outro achado relevante é a não expressão de resistência aos carbapenêmicos pelo isolado K14P, positivo para *bla_{KPC}*. A falsa sensibilidade *in vitro* aos carbapenêmicos poderia explicar muitos episódios de insucesso terapêutico na tentativa de controle de muitas infecções hospitalares (BRATU *et al.*, 2005b; WALLACE *et al.*, 2010). Resultados semelhantes foram encontrados por Peleg *et al.* (2005), onde apenas 5 em 19 isolados que carregavam genes de carbapenemase expressavam resistência aos carbapenêmicos. A aquisição de genes que codificam carbapenemases nem sempre está associada com níveis elevados de resistência aos carbapenêmicos (BERTONCHELI; HORNER, 2008). Esta susceptibilidade variável pode ser explicada por uma série de fatores, como: (1) co-presença de outros mecanismos de resistência (LIVERMORE, 2002), (2) supressão genética que leva a um gene silencioso ou (3) dosagem do gene dependente do número de cópias de plasmídeos (PELEG *et al.*, 2005).

Analizando o perfil plasmidial dos isolados, podemos supor que os plasmídeos de mesmo peso molecular podem ter se disseminado entre as amostras do hospital particular, uma vez que *K. pneumoniae* é considerada reservatório nosocomial e fonte de transmissão de plasmídeos de resistência (AKTAS *et al.*, 2006). De acordo com

Sharma; Ray e Sharma (2010), há uma forte correlação entre o número de plasmídeos abrigados por um isolado e a resistência apresentada a várias fármacos, portanto cepas abrigando múltiplos plasmídeos simultaneamente exibem co-resistência a diferentes classes de antimicrobianos. Esta associação não foi observada no presente estudo, uma vez que, isolados resistentes ao maior número de fármacos (K8P e K12P) não são os que apresentaram maior quantidade de plasmídeos (K15P e K16P), assim como, os resistentes ao menor número de fármacos (K3A e K4A) não são os que apresentaram menor quantidade de plasmídeos (K12A e K5P). Adicionalmente, isolados que apresentaram o mesmo perfil de resistência, não apresentaram mesmo perfil plasmidial, e outros, compartilharam o mesmo perfil plasmidial, mas diferentes resistências.

Analisando quantitativamente os plasmídeos e os genes *bla_{SVH}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*, não foi observada uma correlação, uma vez que, os isolados positivos para os três genes apresentaram no máximo 4 plasmídeos e os isolados positivos para somente um gene, apresentaram de 1 a 9 plasmídeos. Os demais isolados apresentaram dois genes com quantidades variáveis de plasmídeos. K1P foi positivo para os quatro genes de β -lactamases pesquisados (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX-M}* e *bla_{KPC}*) e apresentou somente 2 plasmídeos (100kb e 8kb), enquanto isolados que apresentaram até dois genes carregavam até 9 plasmídeos. De acordo com Yan, Ko e Wu (2001) e Essack; Hall; Livermore (2004), o número de genes de resistência carregados nos plasmídeos de *K. pneumoniae* multirresistentes pode chegar até cinco. A presença de plasmídeos de alto peso molecular (60 a 180 Kb) em isolados clínicos de *K. pneumoniae* é bastante comum e tem sido frequentemente associada com a produção de ESBLs (LI ; LIM, 2000; CHANAWONG *et al.*, 2002; SOUZA LOPES *et al.*, 2005; WEI *et al.*, 2005), porém os isolados K1A, K5P e K9P não apresentavam estes plasmídeos e foram positivos para ESBL. O gene *bla_{KPC}* está frequentemente associado ao transposon tn4401 (NAAS *et al.*, 2008; FONTANA *et al.*, 2010), que já foi identificado em plasmídeos de diferentes tamanhos (PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009).

Analisando o padrão de bandas gerado pela ERIC-PCR, vimos que seis isolados do hospital particular mostraram relação clonal mesmo apresentando diferentes fenótipo de resistência, conteúdo de genes de resistência e perfil plasmidial. Na literatura existem dados de tipagem molecular que corroboram estes resultados. Ben-Hamouda *et al.* (2003), encontraram idênticos padrões de PFGE ou ERIC-PCR, a exemplo P6c, com diferentes perfis de susceptibilidade a fármacos (A7 e A12). Bennet *et al.* (2010), não encontraram

correlação entre padrões PFGE e genes de resistência. Souza Lopes *et al.* (2005), encontraram subtipos RAPD com diferentes perfis plasmidiais. Semelhante aos nossos resultados com os isolados do hospital público, Ben-Hamouda *et al.* (2003), encontraram diferentes PFGE com idêntico perfil de resistência, Bennet *et al.* (2010), encontraram diferentes PFGE com mesmos genes de resistência e Haryani *et al.* (2007), encontraram diferentes RAPD com mesmo perfil plasmidial. Estas disparidades das técnicas de tipagem devem-se ao fato de que as provas para clonalidade são melhor consideradas relativas que absolutas, devido ao potencial de mudanças genéticas detectáveis apenas pelo seqüenciamento de DNA ou outras análises específicas (TENOVER *et al.*, 1995).

O achado de 11/24 isolados (46%) carreando no mínimo 3 dentre os 4 genes de β -lactamases pesquisados é preocupante. Deve-se ressaltar que os isolados K1P e K14P apresentaram os genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} e *bla*_{KPC}. De acordo com Ktari *et al.* (2006), a simultânea produção de três β -lactamases por *K. pneumoniae* merece destaque, enquanto a coexistência de duas enzimas ocorre mais frequentemente em *Enterobacteriaceae* (KASSIS-CHIKHANI *et al.*, 2006; CAGNACCI *et al.*, 2007). Tal acúmulo de determinantes de resistência em uma cepa, como observado nesse estudo, impõe uma limitação nas opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de infecções causadas por *K. pneumoniae*. Outro achado que merece destaque é a presença de clones intra-hospitalar. Esses resultados devem alertar as autoridades médicas para instituir rigorosos métodos de detecção e conseqüentemente controle da disseminação de genes de resistência em ambiente hospitalar. Medidas a fim de controlar o uso excessivo de antimicrobianos também devem ser tomadas.

Tabela 1. Origem e perfil de resistência a antimicrobianos dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* provenientes do Hospital público e do Hospital particular nos anos de 2007 e 2008, respectivamente da cidade de Recife-PE.

Isolado ^(A)	Origem	Perfil de Resistência a Antimicrobianos ^(B)
K1A	Ponta de cateter	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN, PIT, TSU, NAL, CLO(int)
K2A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN(int), PIT, TSU, NAL, EST(int), TET
K3A	Ferida operatória	AMO, AMP, AMC, CTX(int), TSU, NAL(int), TET
K4A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, CTX(int), NAL, TET
K5A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, GEN, PIT(int), TSU, CLO, TET
K6A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM (int), CIP, GEN(int), NAL, CLO, TET
K7A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, CIP, GEN(int), PIT(int), TSU NAL, EST (int), TET
K9A	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, ATM, CMP, CTX, CAZ, PIT(int), TSU, CLO
K10A	Urina	AMO, AMP, AMC, ATM, CPM, CTX, CFO(int), CAZ, CIP, PIT, TSU, AMI(int), NAL, CLO, TET
K12A	Urina	AMO, AMP, AMC, CMP, CFO, CIP, MPM, PIT, TSU, AMI
K1P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, TET
K3P	Fragmento ósseo	AMO, AMP, AMC(int), APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, PIT, TSU
K5P	Sangue	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, CLO, TET
K8P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, AMI, NAL, CLO(int), TET(int)
K9P	Secreção de abscesso	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, PIT, TSU, NAL, CLO, EST(int), TET
K10P	Secreção de coto	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int)
K12P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, AMI, NAL, CLO, TET(int)
K13P	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), TET(int)
K14P	Sangue	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, PIT, TSU, NAL, CLO, EST, TET
K15P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), TET(int)
K16P	Ponta de catéter	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, TET(int)
K19P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, CIP, PIT, TSU, NAL, CLO(int), EST, TET
K20P	Urina	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, CIP, GEN, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO, EST(int), TET
K22P	Secreção traqueal	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, CIP, IMP, MPM, PIT, TSU, NAL, CLO(int), EST(int), TET(int)

^(A)Identificação dos isolados bacterianos: K, *K. pneumoniae*; A, hospital público; P, hospital particular

^(B)Perfil de Resistência a Antimicrobianos: AMP, ampicilina; AMO, amoxicilina; AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; APS, ampicilina-sulbactam; ATM, aztreonam; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, cefoxitina; CAZ, ceftazidima; CFL, cefalotina; CIP, ciprofloxacina; GEN, gentamicina; IMP, imipenem; MPM, meropenem; PIP, piperacilina/tazobactam; TSU, trimetoprin/sulfa; AMI, amicacina; NAL, ácido nalidixico; CLO, cloranfenicol; EST, estreptomicina; TET, tetraciclina; (int), intermediário.

Tabela 2. Primers utilizados na PCR para detecção dos gene de β -lactamases.

Primer	Sequência (5' - 3')	temp. ^(a)	Referência	Gene
SHV.FoR SHV.ReR	GGGTTATTCTTATTTGTGCG AGCGCGAGAAGCATCCTG	62°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)	<i>bla</i> _{SHV}
T1F T2R	ATAAAATTCTTGAAGACGAAA GACAGTTACCAATGCTTAATC	57°C	Rasheed <i>et al.</i> (2000)	<i>bla</i> _{TEM}
CTX-MA1 CTX-MA2	SCSATGTGCAGYACCAGTAA CCGCRATATGRTTGGTGGTG	61°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M}
CTX-M13U CTX-M13L	GGTTAAAAAATCACTGCGTC TTGGTGACGATTTTAGCCGC	60°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M-1}
CTX-M25U CTX-M25L	ATGATGACTCAGAGCATTCG TGGGTTACGATTTTCGCCGC	62°C	Saladin <i>et al.</i> (2002)	<i>bla</i> _{CTX-M-2}
KPC-1a KPC-1b	TGTCACTGTATCGCCGTC CTCAGTGCTCTACAGAAAACC	63°C	Yigit <i>et al.</i> (2001)	<i>bla</i> _{KPC}
ERIC-1 ERIC-2	ATGTAAGCTCCTGGGGATTAAC AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	36°C	Duan <i>et al.</i> , (2009)	

^(a)Temp, temperatura de anelamento dos primers

Tabela 3. Caracterização dos isolados de *K. pneumoniae* através da detecção fenotípica e molecular de β -lactamases, perfil plasmidial e perfil da ERIC-PCR.

Isolado Bacteriano ^(A)	Teste de sinergia ^(B)	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{CTX-M}	MHT ^(C)	<i>bla</i> _{KPC}	Perfil Plasmidial	Perfil da ERIC-PCR
K1A	+	+	+	+	NT	-	P6	E3
K2A	+	+	-	+	NT	-	P7	E1
K3A	-	+	-	-	NT	-	P2	E7
K4A	-	+	-	-	NT	-	P1	E4
K5A	+	+	+	+	NT	-	P3	E5
K6A	-	+	-	-	NT	-	P4	E6
K7A	+	+	-	+	NT	-	P1a	E10
K9A	+	+	-	+	NT	-	P8	E2
K10A	+	+	+	+	NT	-	P1	E9
K12A	-	+	-	-	NT	-	P5	E8
K1P	-	+	+	+	+	+	P15	E14
K3P	+	+	-	-	NT	-	P12	E15
K5P	-	+	-	+	-	-	P13	E12
K8P	-	+	+	-	-	+	P14	E13
K9P	+	+	-	+	NT	-	P16	E17
K10P	-	+	-	+	+	+	P10a	E11
K12P	-	+	+	-	-	+	P9	E11
K13P	-	+	-	+	+	+	P9	E11
K14P	-	+	+	+	-	+	P11	E19
K15P	-	+	-	+	+	+	P10	E11
K16P	-	+	-	+	-	+	P10	E11
K19P	+	+	-	+	NT	-	P11	E16
K20P	-	+	-	-	-	+	P17	E18
K22P	-	+	-	-	+	+	P9a	E11

^(A)Identificação dos isolados bacterianos: K, *K. pneumoniae*; A, hospital público; P, hospital particular^(B)Deteção da produção fenotípica de ESBL através do teste de Sinergia de disco duplo^(C)Deteção da produção fenotípica de KPC através do Teste de Hodge Modificado

NT, não testado

Tabela 4. Perfil plasmidial dos isolados dos hospitais públicos e particular analisados neste estudo.

ISOLADO BACTERIANO ^(A)	NÚMERO DE PLASMÍDEOS	TAMANHO DOS PLASMÍDEOS	PERFIL PLASMIDIAL
K1A	2	4kb; <3,4kb	P6
K2A	6	>150kb; 150kb; 90kb; 4kb; dois <3,4kb	P7
K3A	5	>150kb; 150kb; 3,4kb; dois <3,4kb	P2
K4A	3	>150kb; 150kb; <3,4kb	P1
K5A	3	>150kb; 150kb; 3,4kb	P3
K6A	3	>150kb; 10kb; <3,4kb	P4
K7A	4	>150kb; 150kb; 3,4kb; <3,4kb	P1a
K9A	8	>150kb; 150kb; 100kb; 80kb; 10kb; três <3,4kb	P8
K10A	3	>150kb; 150kb; <3,4kb	P1
K12A	1	<3,4kb	P5
K1P	2	100kb; 8kb	P15
K3P	2	80kb; 12kb	P12
K5P	1	<3,4kb	P13
K8P	5	100kb; 80kb; 3,4kb; dois <3,4kb	P14
K9P	2	8kb; <3,4kb	P16
K10P	9	Dois >150kb; 150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb	P10a
K12P	8	150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb; <3,4kb	P9
K13P	8	150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb; <3,4kb	P9
K14P	4	80kb; 8kb; dois <3,4kb	P11
K15P	10	Dois >150kb; 150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb; <3,4kb	P10
K16P	10	Dois >150kb; 150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb; <3,4kb	P10
K19P	4	80kb; 8kb; dois <3,4kb	P11
K20P	5	80kb; 75kb; 3,4kb; dois <3,4kb	P17
K22P	9	>150kb; 150kb; 100kb; 80kb; 65kb; 15kb; 12kb; 9kb; <3,4kb	P9a

^(A) Identificação dos isolados bacterianos: K, *K. pneumoniae*; A, hospital público; P, hospital particular

Kb, Kilo-base

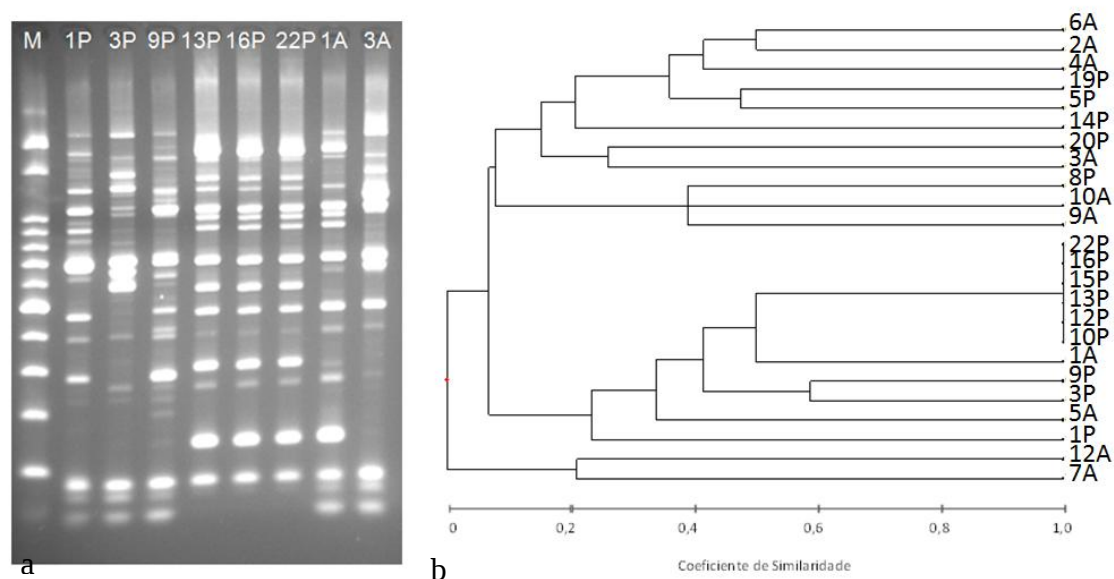


Figura 1. Tipagem pela técnica de ERIC-PCR. a. Gel de agarose à 1,5% representativo do produto amplificado da ERIC-PCR. Linha 1, Marcador de peso molecular de 100pb; linhas 2 a 9, isolados do Hospitais público e particular. b. Dendograma gerado pela ERIC-PCR, usando o programa DarWin 5.0, ilustrando a relação dos 19 perfis de ERIC-PCR.

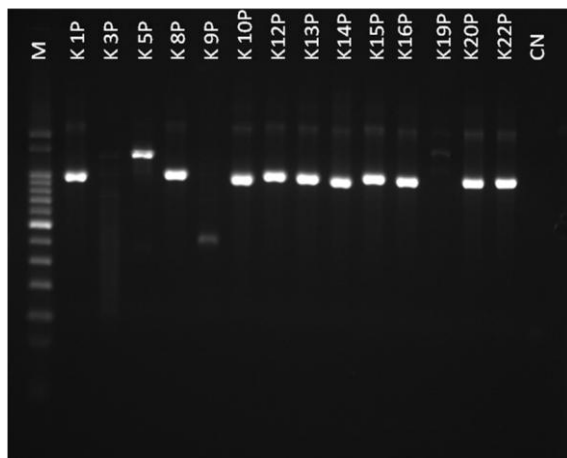


Figura 2. Gel de agarose à 1,0% mostrando o produto amplificado por PCR para o gene *bla_{KPC}*. Linha 1, Marcador de peso molecular de 100pb; linhas 2 a 14, isolados do Hospital particular; linha 16, Controle negativo.

5.REFERÊNCIAS

ANVISA- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nota técnica nº 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes em 25 de outubro de 2010.

Aktas, Z.; Bal, C.; Midilli, K.; Poirel L.; Nordmann, P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p. 695–699, 2006.

Anderson, K.F.; Lonsway, D.R.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.; Jensen, B.; McDougal, L.K.; Carey, R.B.; Thompson, A.; Stocker, S.; Limbago, B.; Patel, J.B. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Klebsiella* in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.2723-2725, 2007.

Babini, G.S.; Livermore, D.M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella* spp. Collect from intensive care units in southern and western Europe in 1997-1998. **Journal of antimicrobial and chemotherapy**, v.45, p.183-189, 2000.

Ben-Hamouda, T.; Foulon, T.; Ben-Cheikh-Masmoudi, A.; Fendri, C.; Belhadj, O.; Ben-Mahrez, K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.427–433, 2003.

Bennett, J.W.; Robertson, J.L.; Hospenthal, D.R.; Wolf, S.E.; Chung, K.K.; Mende, K.; Murray, C.K. Impact of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections in severely burned patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v.211, p.391-399, 2010.

Bertoncheli, C.M.; Hörner, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, 2008.

Bratu, S.; Mooty, M.; Nichani, S.; Landman, D.; Gullans, C.; Pettinato, B.; Karumudi, U.; Tolaney, P.; Quale, J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p.3018–3020, 2005a.

Bratu, S.; Landman, D.; Alan, M.; Tolentino, E.; Quale, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.776–778, 2005b.

Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.969–976, 2010.

Cagnacci, S.; Gualco, L.; Roveta, S.; Mannelli, S.; Borgianni, L.; Docquier, J-D.; Dodi, F.; Centanaro, M.; Debbia, E.; Marchese, A.; Rossolini, G.M. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- β -lactamase: first Italian outbreak. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.296–300, 2008.

Chanawong, A.; M'Zali, F.H.; Heritage, G.; Xiong, J.H.; Hawkey, P.M. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p. 630-637, 2002.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, CLSI M100-S17, Wayne, 2006.

Dienstmann, R.; Picoli, S.U.; Meyer, G.; Schenkel, T.; Steyer, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, no.1, 2010.

Dropa, M.; Balsalobre, L.C.; Lincopan, N.; Mamizuka, E.M.; Murakami, T.; Cassettari, V.C.; Franco, F.; Guida, S.M.; Balabakis, A.J.; Passadore, L.F.; Santos, S.R.; Matté, G.R.; Matté, M.H. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.51, p.203-209, 2009.

Duan, H.; Chai, T.; Liu, J.; Zhang, X.; Qi, C.; Gao, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Miao, Z.; Yao, M.; Schlenker, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.

Elliott, E.; Brink, A.J.; Greune, J.V.; Els, Z.; Woodford, N.; Turton, J.; Warner, M.; Livermore, D.M. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.95-98, 2006.

Essack, S.Y.; Hall, L.M.C.; Livermore, D.M. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC beta-lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.398–400, 2004.

Feizabadi, M.M.; Farahani, A.S.; Rahmati, M.; Asadi, S. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients. *R. Ci. méd. biol., Salvador*, v.7, p.273-279, 2008.

Fontana, C.; Favaro, M.; Sarmati, L.; Natoli, S.; Altieri, A.; Bossa, M.C.; Minelli, S.; Leonardi, F.; Favalli, C. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **BMC Research Notes**, v.3, p.40, 2010.

Freitas, A.L.P.; Machado, D.P.; Soares, F.S.C.; Barth, A.L. β -lactamases de espectro ampliado em *Klebsiella* spp e em *Escherichia coli* obtidas em um hospital escola brasileiro: detecção, prevalência e tipagem molecular. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.344-348, 2003.

Garcia, D.O.; Doi, Y.; Szabo, D.; Adams-Haduch, J.M.; Vaz, T.M.; Leite, D.; Padoveze, M.C.; Freire, M.P.; Silveira, F.P.; Paterson, D.L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-12 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1790-1793, 2008.

Haryani, Y.; Noorzaleha, A.S.; Fatimah, A.B.; Noorjahan, B.A.; Patrick, G.B.; Shamsinar, A.T.; Laila, R.A.S.; Son, R. Incidence of *Klebsiella pneumoniae* in street foods sold in

Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD-PCR analysis. **Food Control**, v.18, p.847–853, 2007.

Howard, C.; Daal, A.; Kelly, G.; Schooneveldt, J.; Nimmo, G.; Giffard, P.M. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.659-664, 2002.

Jones, C. H.; Tuckman, M.; Keeney, D.; Ruzin, A.; Bradford, P.A. Characterization and Sequence Analysis of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Encoding Genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.465–475, 2009.

Kassis-Chikhani, N.; Decre, D.; Gautier, V.; Burghoffer, B.; Saliba, F.; Mathieu, D.; Samuel, D.; Castaing, D.; Petit, J.C.; Dussaix, E.; Arlet, G. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.142-145, 2006.

Ktari, S.; Arlet, G.; Mnif, B.; Gautier, V.; Mahjoubi, F.; Jmeaa, M.B.; Bouaziz, M.; Hammami, A. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.4198–4201, 2006.

Lal, P; Kapil, A.; Das, B.K.; Sood, S. 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.

Leavitt, A.; Chmelnitsky, I.; Colodner, R.; Itzhak Ofek, I.; Carmeli, Y.; Navon-Venezia, S. Ertapenem Resistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.969–974, 2009.

Li, L.; Lim, C.K. A novel large plasmid carrying multiple beta-lactam resistance genes isolated from a *Klebsiella pneumoniae* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.1038-1048, 2000.

Livermore, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.634–640, 2002.

Livermore, D.M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.3-10, 2008.

Lopes, A.C.S.; Veras, D.L.; Lima, A.M.S.; Melo, R.C.A.; Ayala, J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.163-167, 2010.

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, 368-369p.

Minarini, L.A.R.; Gales, A.C.; Palazzo, I.C.V.; Darini, A.L.C. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, v.54, p.335-341, 2007.

Monteiro, J.; Santos, A.F.; Asensi, M.D.; Peirano, G.; Gales, A.C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p. 333–334, 2009.

Naas, T.; Cuzon, G.; Villegas, M.V.; Lartigue, M.F.; Quinn, J.P.; Nordmann, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p.1257–1263, 2008.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: eleventh informational supplement M100-S13. NCCLS, Wayne, Pa, 2003.

Nogueira, K.S.; Higuti, I.H.; Nascimento, A.J.; Terasawa, L.B.; Oliveira, S.; Matos, A. P.; Souza, H.A.P.H.M.; Cogo, L.L.; Costa, L.M.D. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.390-395, 2006.

Oliveira, C.F.; Salla, A.; Lara, V.M; Rieger, A.; Horta, J.A.; Alves, S.H. Prevalence of Extended-spectrum beta-lactamases producing microorganisms in nosocomial patients and molecular characterization of the SHV type isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.278-282, 2010.

Patel, J.B.; Rasheed, J.K.; Kitchel, B. Carbapenemases in *Enterobacteriaceae*: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.1, n.8, 2009.

Paterson, D.L.; Ko, W.C.; Von Gottberg, A.; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K.P.; Bonomo, R.A.; Rice, L.B.; Wagener, M.M.; McCormack, J.G.; Yu, V.L. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.31-37, 2004.

Pavez, M.; Mamizuka, E.M.; Lincopan, N. Early dissemination of KPC-2-producing *K. pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2702, 2009.

Peirano, G.; Seki, L.M.; Val Passos, V.L.; Pinto, M.C.; Guerra, L.R.; Asensi, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.265–268, 2009.

Peleg, A.Y.; Franklin, C.; Bell, J.M.; Spelman, D.W. Dissemination of the metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-negative pathogens in a clinical setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1549–1556, 2005.

Pereira, A.S.; Carmo Filho, J.R.; Tognim, M.C.B.; Sader, H.S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-

lactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, p.301-308, 2003.

Petrella, S.; Ziental-Gelus, N.; Mayer, C.; Renard, M.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of *Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–36, 2008.

Rasheed, J.K.; Anderson, G.J.; Yigit, H.; Quennan, A.M.; Doménech-Sánchez, A.; Swenson, J.M.; Biddle, J.W.; Ferraro, M.J.; Jacoby, G.A.; TENOVER, F.C. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**. v.44, p.2382-2388, 2000.

Saladin, M.; Bao Cao, V.T.; Lambert, T.; Donay, J.; Herrmann, J.; Ould-Hocine, Z.; Verdet, C.; Delisle, F.; Philippon, A.; Arlet, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.161-68, 2002.

Sharma, J.; Ray, P.; Sharma, M. Plasmid profile of ESBLs producing-Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β -lactam drugs. **Indian journal of pathology and microbiology**, v.53, no.1, 2010.

Silva Dias, R.C.; Borges-Neto, A.A.; Ferraiuoli, G.I.D. Prevalence of AmpC and other β -lactamases in Enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.60, p.79-87, 2008.

Souza 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, p.37-46, 2005.

Steward, C.D.; Rasheed, J.K.; Hubert, S.K.; Biddle, J.W.; Raney, P.M.; Anderson G.J.; Williams, P.P.; Brittain, K.L.; Oliver, A.; McGowan Jr, J.E.; Tenover, F.C. Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 laboratories using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -Lactamases Detection Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2864-2872, 2001.

Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Michelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233–2239, 1995.

Tenover, F.C.; Kalsi, R.K.; Williams, P.P.; Carey, R.B.; Stocker, S.; Lonsway, D.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.W.; McGowan Jr., J.E.; Hanna, B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.1209–1213, 2006.

Therrien, C.; Levesque, R.C. Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.251-262, 2000.

Tsakris, A.; Kristo, I.; Poulou, A.; Themeli-Digalaki, K.; Ikonomidis, A.; Petropoulou, D.; Pournaras, S.; Sofianou, D. Evaluation of boronic acid disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.362-367, 2009.

Vercauteren, E.; Descheemaeker, P.; Ieven, M.; Sanders, C.C.; Goossens, H. Comparison of screening methods and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Belgian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2191-2197, 1997.

Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6823-6831, 1991.

Wallace, K.M.P.; Bethel, C.R.; Destler, A.M.; Kasuboski, C.; Taracila, M.; Bonomo, R. Inhibitor resistance in the KPC-2 β -lactamases, a preeminent property of this class A β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.890-897, 2010.

Wei, Z.; Chen, Y.; Yu, Y.; Lu, W.; Li, L. Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple β -lactamases. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.885-888, 2005.

Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.94-103, 2001.

Woodford, N.; Dallow, J.W.; Hill, R.L.; Palepou, M.F.; Pike, R.; Ward, M.E.; Warner, M.; Livermore, D.M. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. **The International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.456-459, 2007.

Yan, J.J.; Ko, W.C.; Wu, J.J. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2368-2371, 2001.

Yigit, H.; Queenan, A.M.; Anderson, G.J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.W.; Steward, C.D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151-1161, 2001.

Zhao, F.; Bai, J.; Wu, J.; Liu, J.; Zhou, M.; Xia, S.; Wang, S.; Yao, X.; Yi, H.; Lin, M.; Gao, S.; Zhou, T.; Xu, Z.; Niu, Y.; Bao, Q. Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v.5, ed.4, 2010.

Artigo 2: Primeiro relato do gene *bla*_{VIM} em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* no Brasil.

(Artigo que será submetido para publicação na Revista MICROBIAL DRUG RESISTANCE)

Adriane Borges Cabral⁽¹⁾

Rita de Cássia de Andrade Melo⁽²⁾

Paula Regina Luna de Araújo Jácome⁽¹⁾

Maria Amélia Vieira Maciel⁽³⁾

Ana Catarina de Souza Lopes⁽³⁾

Departamento de Medicina Tropical – Universidade Federal de Pernambuco

⁽¹⁾Mestranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical – UFPE

⁽²⁾Aluna de Iniciação Científica do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

⁽³⁾Professora do Departamento de Medicina Tropical – UFPE

Endereço para correspondência:

Adriane Borges Cabral

Rua São Mateus, 1160, bl. J ap. 204, Iputinga, Recife-PE. CEP: 50680-000

E-mail: adrianeborgescabral@gmail.com

RESUMO

Foram analisados 14 isolados clínicos multirresistentes de *K. pneumoniae* provenientes de pacientes internados na Unidade de Terapia Intensiva de um hospital particular da cidade de Recife, Brasil, com o objetivo de determinar a ocorrência de genes para metalo- β -lactamases *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}. O E-Test MBL foi aplicado para a detecção fenotípica de MBL. O gene *bla*_{VIM} foi encontrado em 7 isolados e os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} não foram detectados. Este é o primeiro relato do gene *bla*_{VIM} em isolados de *K. pneumoniae* no Brasil.

Palavras-chaves: *K. pneumoniae*, metalo- β -lactamase, *bla*_{VIM}

ABSTRACT

Were analyzed 14 multi-drug resistant clinical isolates of *K. pneumoniae* from an UTI of a private hospital in the city of Recife, Brazil, with the aim of determine the occurrence of the metallo- β -lactamase (MBL) genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM}. The E-test MBL was applied for the phenotypic detection of MBL. The *bla*_{VIM} gene was found in 7 isolates and the genes *bla*_{IMP} and *bla*_{SPM} were not detected. This is the first report of *bla*_{VIM} in *K. pneumoniae* isolates from Brazil.

Keywords: *K. pneumoniae*, metallo- β -lactamase, *bla*_{VIM}.

1.INTRODUÇÃO

O uso dos carbapenêmicos tem aumentado nas últimas duas décadas sendo frequentemente utilizados para terapia empírica de infecções por bacilos Gram-negativos. Entretanto, a emergência da resistência bacteriana a esses fármacos é uma das maiores ameaças para o tratamento antimicrobiano dessas infecções (WEI *et al.*, 2007; PATEL; RASHEED; KITCHEL, 2009; TSAKRIS *et al.*, 2009).

Um importante mecanismo de resistência aos carbapenêmicos que vem se destacando em membros da família *Enterobacteriaceae* é a produção de Metallo- β -lactamase (MBL), antes exclusiva de espécies de *Pseudomonas* e *Acinetobacter* (PATERSON, BONOMO; 2005). A produção de MBL por enterobactérias é observada nos hospitais brasileiros desde 2003 (LINCOPAN *et al.*, 2006). No Brasil, não há relatos de MBL do tipo SPM em enterobactérias (SADER *et al.*, 2005; WALSH *et al.*, 2005), IMP já foi descrita em isolados de *K. pneumoniae* (LINCOPAN *et al.*, 2005), porém VIM ainda não foi relatada em *K. pneumoniae*. O primeiro relato de VIM nesta espécie bacteriana, no continente americano, ocorreu na Venezuela no ano de 2008 (MARCANO *et al.*, 2008). Este é o primeiro relato de isolados de *K. pneumoniae* carreando o gene *bla*_{VIM} no Brasil.

2.MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados 14 isolados de *K. pneumoniae* provenientes da Unidade de Terapia Intensiva de um hospital particular da cidade de Recife-PE no ano de 2008. Os isolados foram identificados pelo sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux) e analisados quanto à resistência a antimicrobianos através do teste de difusão de disco em Ágar Mueller-Hinton proposto por Kirby e Bauer (CLSI, 2006). O E-Test MBL com Imipenem e Imipenem/EDTA foi aplicado para os 10 isolados que apresentavam resistência aos carbapenêmicos. A pesquisa dos genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} através da técnica de PCR foi aplicada para todos os 14 isolados, utilizando os primers VIM-DIA F5'-CAGATTGCCGATGGTGTGTTTGG-3' e VIM-DIA R5'-AGGTGGGCCATTTCAGCCAGA-3' (DONG *et al.*, 2008), IMP-DIA F5'-GGAATAGAGTGGCTTAATTCTC-3' e IMP-DIA R5'-GTGATGCGTCYCCAAYTTCACT-3' (DONG *et al.*, 2008) e SPM-DIA F5'-CCTACAATCTAACGGCGACC-3' e SPM-DIA R5'-TCGCCGTGTCCAGGT

ATAAC-3' (GALES *et al.*, 2003). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 µl por tubo, compreendendo: 1µl de DNA genômico a 20ng/µl, 1,0U da enzima *Taq* DNA polimerase (Promega), 100 µM de dNTP (Ludwig Biotec), 1,5 mM de MgCl₂ e 0,4 µmol dos primers. As amplificações foram realizadas com ciclos de desnaturação inicial à 95°C por 5 minutos, seguido de 30 ciclos: 1 minuto à 95°C, 1 minuto à 60°C para *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} e 1 minuto à 62°C para *bla*_{VIM} e 1 minuto à 68°C. Após estes ciclos foi realizada uma etapa de alongamento final de 5 minutos à 68°C. A tipagem molecular foi realizada através da técnica de ERIC-PCR de acordo com Duan *et al.* (2009).

3.RESULTADOS

Através do E-test MBL foram obtidos 7 resultados negativos e 3 indeterminados. Os genes *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} não foram detectados. Sete isolados (50%) apresentaram o gene *bla*_{VIM}, amplificando um fragmento de peso molecular de 500 pb, conforme representado na figura 1, sendo que dois destes isolados apresentaram o mesmo padrão de bandas pela ERIC-PCR, mostrando relação clonal (TABELA 1). O isolado K19P foi positivo para o gene *bla*_{VIM}, porém não expressava resistência aos carbapenêmicos, por outro lado, os isolados K10P, K12P, K13P e K22P foram resistentes aos carbapenêmicos, porém negativos para os genes pesquisados.

4.DISSCUSSÃO

No presente estudo, o E-Test MBL não foi eficaz em detectar os isolados produtores de MBL, uma vez que mostrou-se negativo para isolados que albergavam genes de MBL, além de resultados indeterminados para isolados positivos e negativos através de PCR. Esses resultados são contraditórios aos encontrados por Wirth *et al.* (2009), que conseguiram detectar todas as amostras positivas para a produção de MBL através do E-Test. Os achados corroboram que métodos moleculares são mais sensíveis e específicos para a detecção de MBLs, porém por serem técnicas mais trabalhosas e com maior custo não estão disponíveis na maioria dos laboratórios de microbiologia clínica no Brasil.

Merece destaque a detecção de *bla*_{VIM} em 6 isolados distintos geneticamente, que pode ser explicada pela inserção do gene em elementos móveis o que facilita o intercâmbio desses genes de resistência (WIRTH *et al.*, 2009). Monteiro *et al.* (2009), não detectaram os genes *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP} e *bla*_{SPM} em isolados de *K. pneumoniae* provenientes de Recife-PE no ano de 2006, da mesma forma Peirano *et al.* (2009), não detectaram genes de metalo- β -lactamases em isolados de *K. pneumoniae* do Rio de Janeiro em 2007 e 2008. Esse é o primeiro relato de VIM em *K. pneumoniae* no Brasil. VIM foi descrita em isolados de *K. pneumoniae* na Itália (LUZZARO *et al.*, 2004; CAGNACCI *et al.*, 2008), Grécia (GIAKKOUP *et al.*, 2003; 2009), Irlanda (ROCHE *et al.*, 2010) e Tunísia (KTARI *et al.*, 2006). No presente estudo os aminoglicosídeos foram a única classe de antibióticos que mostrou atividade “in vitro” para os isolados positivos para *bla*_{VIM}. MBLs estão emergindo e limitando as opções de tratamento em diversos países (ZAVASCKI *et al.*, 2005).

A emergência de bactérias produtoras de MBL requer mudanças na rotina dos laboratórios de Microbiologia, adequando métodos capazes de detectar a sua produção, uma vez que a detecção é a etapa crítica para controlar a disseminação dessas bactérias evitando uma situação em que todas as opções de tratamento empírico serão inúteis.

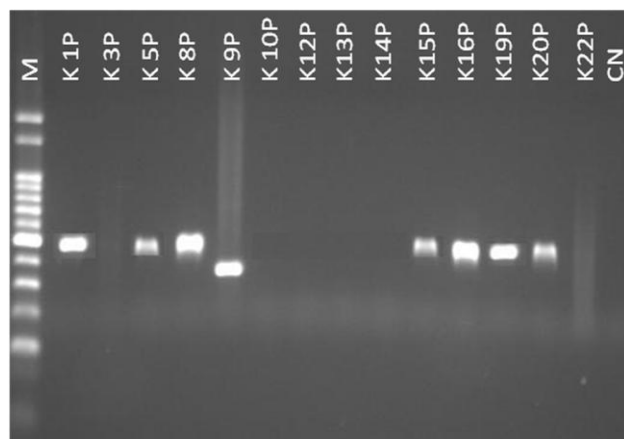


Figura 1. Gel de agarose à 1,0% mostrando o produto amplificado por PCR para o gene *bla*_{VIM}. Linha 1, M, marcador de peso molecular de 100pb; linhas 2 a 14, isolados do Hospital particular; linha 16, CN, controle negativo.

Tabela 1. Origem, perfil de resistência aos β -lactâmicos, perfil de ERIC-PCR e ocorrência de genes para metalo- β -lactamases em isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de um hospital particular de Recife-PE.

Isolado bacteriano ^(A)	Fonte de isolamento	<i>bla</i> _{VIM}	Perfil de ERIC-PCR	Resistência aos β -lactâmicos ^(B)
K1P	Urina	+	E14	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K3P	Fragmento ósseo	-	E15	AMO, AMP, AMC(int), APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, PIT
K5P	Sangue	+	E12	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K8P	Urina	+	E13	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K9P	Secreção de abscesso	-	E17	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, PIT
K10P	Secreção de coto	-	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT,
K12P	Urina	-	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K13P	Secreção traqueal	-	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K14P	Sangue	-	E19	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, PIT
K15P	Urina	+	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT,
K16P	Ponta de catéter	+	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT,
K19P	Urina	+	E16	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO(int), CAZ, CFL, PIT
K20P	Urina	+	E18	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CFO, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT
K22P	Secreção traqueal	-	E11	AMO, AMP, AMC, APS, ATM, CMP, CTX, CAZ, CFL, IMP, MPM, PIT,

^(A)Identificação dos isolados bacterianos: K, *K. pneumoniae*; P, hospital particular.

^(B)AMP, ampicilina; AMO, amoxicilina, AMC, amoxicilina-ácido clavulânico; APS, ampicilina-sulbactam; ATM, aztreonam; CPM, cefepime; CTX, cefotaxima; CFO, ceftazidima; CAZ, ceftazidima; CFL, cefalotina; IMP, imipenem; MPM, meropenem; PIP, piperacilina/tazobactam; (int), intermediário.

5.REFERÊNCIAS

Cagnacci, S.; Gualco, L.; Roveta, S.; Mannelli, S.; Borgianni, L.; Docquier, J.D.; Dodi, F.; Centanaro, M.; Debbia, E.; Marchese, A.; Rossolini, G.M. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- β -lactamase: first Italian outbreak. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.296–300, 2008.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, CLSI M100-S17, Wayne, 2006.

Dong, F.; Xu, Xi-wei.; Song, Wen-qi.; Lü, Ping.; Yu, Sang-jie.; Yang, Yong-hong.; Shen, Xu-zhuang. Characterization of multidrug-resistant and metallo-beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.

Duan, H.; Chai, T.; Liu, J.; Zhang, X.; Qi, C.; Gao, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Miao, Z.; Yao, M.; Schlenker, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511–517, 2009.

Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenêmicos-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003.

Giakkoupi, P.; Xanthaki, A.; Kanelopoulou, M.; Vlahaki, A.; Miriagou, V.; Kontou, S.; Papafraggas, E.; Malamou-Lada, H.; Tzouvelekis, L.S.; Legakis, N.J.; Vatopoulos, A.C. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3893–3896, 2003.

Giakkoupi, P.; Pappa, O.; Polemis, M.; Vatopoulos, A.C.; Miriagou, V.; Zioga, A.; Papagiannitsis, C.C.; Tzouvelekis, L.S. Emerging *Klebsiella pneumoniae* Isolates Coproducing KPC-2 and VIM-1 Carbapenemases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.4048–4050, 2009.

Ktari, S.; Arlet, G.; Mnif, B.; Gautier, V.; Mahjoubi, F.; Jmeaa, M.B.; Bouaziz, M.; Hammami, A. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.4198–4201, 2006.

Lincopan, N.; McCulloch J.A.; Reinert, C.; Cassettari, V.C.; Gales, A.C.; Mamizuka, E.M. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.516-519, 2005.

Lincopan, N.; Leis, R.; Vianello, M.A.; Araújo, M.R.E.; Ruiz, A.S.; Mamizuka, E.M. Enterobacteria producing extended-spectrum b-lactamases and IMP-1 metallo-b-lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1611-1613, 2006.

Luzzaro, F.; Docquier, J.D.; Colillon, C.; Endimiani, A.; Lombardi, G.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M.; Toniolo, A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo-b-lactamase encoded by a conjugative plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.648–650, 2004.

Marcano, D.; Pasterán, F.; Rapoport, M.; Faccone, D.; Ugarte, C.; Salgado, N.; Payares, D.; Spadola, E.; López, Y.; Maggi, G.; Galas, M.; Sánchez, D. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.2, p.241-244, 2008.

Monteiro, J.; Santos, A.F.; Asensi, M.D.; Peirano, G.; Gales, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.333–334, 2009.

Patel, J.B.; Rasheed, J.K.; Kitchel, B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: activity, epidemiology, and laboratory detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.1, n.8, 2009.

Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657–686, 2005.

Peirano, G.; Seki, L.M.; Val Passos, V.L.; Pinto, M.C.; Guerra, L.R.; Asensi, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.265–268, 2009.

Roche, C.; Lynch, M.; Kelly, S.; O'Rourke, K.; Crowley, B. First identified case of VIM-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland associated with fatal outcome. **Eurosurveillance**, v.15, ed.50, 2010.

Sader, H.S.; Castanheira, M.; Mendes, R.E.; Toleman, M.; Walsh, T.R.; Jones, R.N. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.57–61, 2005.

Tsakris, A.; Kristo, I.; Poulou, A.; Themeli-Digalaki, K.; Ikonomidis, A.; Petropoulou, D.; Pournaras, S.; Sofianou, D. Evaluation of boronic acid Disk tests for differentiating KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the clinical laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.362–367, 2009.

Walsh, T.R.; Toleman, M.A.; Poirel, L.; Nordmann, P. Metallo-beta-lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.306–325, 2005.

Wei, Z.Q.; Du, X.X.; Yu, Y.S.; Shen, P.; Chen, Y.G.; Li, L.J. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.763–765, 2007.

Wirth, F.W.; Picoli, S.U.; Cantarelli, V.V.; Gonçalves, A.L.S.; Brust, F.R.; Santos, L.M.O.; Barreto, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.170–172, 2009.

Zavascki, A.P.; Gaspareto, P.B.; Martins, A.F.; Gonçalves, A.L.; Barth, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.1148–1151, 2005.

6. CONCLUSÕES

- O teste de sinergia de disco duplo foi eficaz para a detecção fenotípica de todas as amostras ESBL provenientes do hospital público, mas não para os isolados do hospital particular.
- O teste de Hodge modificado não foi eficaz na detecção de todas as amostras que possuíam o gene *bla_{KPC}* e o E-Test MBL não foi eficaz na detecção dos isolados que albergavam o gene *bla_{VIM}*.
- A ocorrência do gene *bla_{SHV}* foi maior que a dos genes *bla_{CTX-M}* e *bla_{TEM}*. A co-produção dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{CTX-M}* foi maior que a de *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}*, e a combinação *bla_{CTX-M}* e *bla_{TEM}* não foi observada. Cinco isolados apresentaram concomitantemente os genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}* e *bla_{CTX-M}*.
- Considerando os dois hospitais analisados a taxa de ESBL foi superior a taxa de carbapenemases, porém os genes para carbapenemases foram mais frequentes que genes para ESBL nos isolados do hospital particular.
- Dentre os genes de carbapenemases, *bla_{KPC}* foi mais frequente que *bla_{VIM}*, doze isolados do hospital particular apresentaram no mínimo um dos dois genes de carbapenemases pesquisados e a co-produção dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}* foi vista em cinco isolados.
- O achado de 14 isolados positivos para no mínimo 3 dos 7 genes de β -lactamases pesquisados é preocupante uma vez que não é frequentemente relatado.
- A presença dos genes *bla_{KPC}* e *bla_{VIM}* explicou a resistência aos carbapenêmicos dos isolados do hospital particular. Esse é o primeiro relato do gene *bla_{VIM}* em *K. pneumoniae* no Brasil.
- Houve associação quantitativa entre perfil de resistência às cefalosporinas de última geração e ao aztreonam e perfil de genes de β -lactamases nos isolados do hospital público, mas não nos isolados do hospital particular.
- Pode ter havido disseminação dos plamídeos de mesmo peso molecular entre as amostras do hospital particular, o que facilita a disseminação dos mecanismos de resistência, explicando o alto percentual dos genes encontrados.
- Não foi observada associação entre perfil plasmidial e perfil de resistência a drogas, uma vez que isolados com maior número de plasmídeos não são os que apresentaram resistência ao maior número de antimicrobianos.

- Não foi observada associação entre perfil plasmidial e conteúdo genético, uma vez que isolados com maior número de plasmídeos não são os que apresentam maior número de genes.
- Alguns isolados considerados clones pela ERIC-PCR apresentaram fenótipo de resistência, conteúdo de genes de resistência e subgrupo do perfil plasmidial diferentes, por outro lado, houve detecção de isolados com diferentes perfis de ERIC-PCR apresentando fenótipo de resistência, conteúdo de genes de resistência e subgrupo do perfil plasmidial idênticos.

7. REFERÊNCIAS

- Achour, N.B.; Mercuri, P.S.; Power, P.; Belhadj, C.; Moussa, M. B.; Galleni, M.; Belhadj, O. First detection of CTX-M-28 in a Tunisian hospital from a cefotaxime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain. **Pathologie Biologie**, 2008.
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária, nota técnica nº 1/2010: Medidas para identificação, prevenção e controle de infecções relacionadas à assistência à saúde por microrganismos multirresistentes em 25 de outubro de 2010.
- Aktas, Z.; Bal, C.; Midilli, K.; Poirel L.; Nordmann, P. First IMP-1-producing *Klebsiella pneumoniae* isolate in Turkey. **Clinical Microbiology and Infection**, v.12, p. 695–699, 2006.
- Almeida, J.; Cury, A.P.; Maffucci, M.; Caiaffa, H.; Duarte, J.A.; Rossi, F. KPC Antibigram in a large teaching Brazilian Hospital. **International Journal of Infectious Diseases**, v.14, 23.024, 2010.
- Alves, M.S.; Dias, R.C.S.; Castro, A.C.D.; Riley, L.W.; Moreira, B.M.; Identification of clinical isolates of indole-positive and indole-negative *Klebsiella spp.* **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p. 3640-3646, 2006.
- Anderson, K.F.; Lonsway, D.R.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.; Jensen, B.; McDougal, L.K.; Carey, R.B.; Thompson, A.; Stocker, S.; Limbago, B.; Patel, J.B. Evaluation of methods to identify the *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in *Enterobacteriaceae*. **Journal of Clinical Microbiolgy**, v.45, p.2723-2725, 2007.
- Appuhamy, S.; Parton, R.; Coote, J.G.; Gibb, H.A. Genomic fingerprinting of *Haemophilus sommus* by a combination of PCR methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.288-291, 1997.
- Arakawa, Y.; Schibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H.; Goto, M. Convenient Test for Screening Metallo-β-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacteria by Using Thiol Compounds. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.40-3, 2000.
- Arbeit, R.D. Laboratory procedures for the epidemiologic analysis of microorganisms. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Tenover, F.C.; Yolken, R.H. **Manual of Clinical Microbiology**, 7. ed., p.116-137, 1999.
- Asensio, A.; Oliver, A.; Gonzáles-Diego, P.; Baquero, F.; Pérez-Díaz, J.C.; Ros, P.; Cobo, J.; Palacios, M.; Lasheras, D.; Cantón, R. Outbreak of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain in an intensive care unit: antibiotic use as risk factor for colonization and infection. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.55-60, 2000.
- Babini, G.S.; Livermore, D.M. Antimicrobial resistance amongst *Klebsiella spp.* Collect from intensive care units in southern and western Europe in 1997-1998. **Journal of antimicrobial and chemotherapy**, v.45, p.183-189, 2000.
- Babic, M.; Hujer, A.M.; Bomono, R.A.What's new in antibiotic resistance? Focus on β-lactamases. **Elsevier**, v.10, p.1016-1032, 2006.

- Baraniak, A.; Fiett, J.; Sulikowska, A.; Hryniewicz, W.; Gniadkowski, M. Country wide 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.
- Ben-Hamouda, T.; Foulon, T.; Ben-Cheikh-Masmoudi, A.; Fendri, C.; Belhadj, O.; Ben-Mahrez, K. Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. **Journal of Medical Microbiology**, v.52, p.427–433, 2003.
- Bennett, P. Integrins and gene cassettes: a genetic construction kit for bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.1-4, 1999.
- Bennett, J.W.; Robertson, J.L.; Hospenthal, D.R.; Wolf, S.E.; Chung, K.K.; Mende, K.; Murray, C.K. Impact of Extended Spectrum Beta-Lactamase Producing *Klebsiella pneumoniae* Infections in Severely Burned Patients. **Journal of the American College of Surgeons**, v.211, p.391-399, 2010.
- Bertoncheli, C.M.; Hörner, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, 2008.
- Bistué, A.J.S.; Birshan, D.; Tomaras, A.P.; Dandekar, M.; Tran, T.; Newmark, J.; Bui, D.; Gupta, N.; Hernandez, K.; Sarno, R.; Zorreguieta, A.; Actis, L.A.; Tolmasky, M.E. *Klebsiella pneumoniae* multiresistance plasmid pMET1: similarity with the *Yersinia pestis* plasmid pCRY and integrative conjugative elements. **PLoS ONE**, v.3, e.1800, 2008.
- Bonnet, R.; Dutor, C.; Sampaio, J.L.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; De Champs, C.; Sirot, J. Novel cefotaximase (CTX-M-16) with increased catalytic efficiency due to substitution Asp-240→Gly. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2269-2275, 2001.
- Bonnet, R.; Marchandin, H.; Chanal, C.; Sirot, D.; Labia, R.; De Champs, C.; Jumas-Bilak, E.; Sirot, J. Chromosome encoded class D β -lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.2004-2006, 2002.
- Bonnet, R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1-14, 2004.
- Boye, K.; Hansen, D.S. Sequencing of 16S rDNA of *Klebsiella*: taxonomic relations within the genus and to other *Enterobacteriaceae*. **International Journal of Medical Microbiology**, v.292, p.495-503, 2003.
- Bradford, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clinical Microbiology Reviews**, v.14, p.933–951, 2001.

- Bradford, P.A.; Bratu, S.; Urban, C.; Visalli, M.; Mariano, N.; Landman, D.; Rahal, J.J.; Brooks, S.; Cebular, S.; Quale, J. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 β -lactamases in New York City. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.55–60, 2004.
- Bratu, S.; Mooty, M.; Nichani, S.; Landman, D.; Gullans, C.; Pettinato, B.; Karumudi, U.; Tolaney, P.; Quale, J. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p.3018–3020, 2005a.
- Bratu, S.; Landman, D.; Alam, M.; Tolentino, E.; Quale, J. Detection of KPC carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. from Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.776–778, 2005b.
- Bratu, S.; Landman, D.; Haag, R.; Recco, R.; Eramo, A.; Alam, M.; Quale, J. Rapid spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in New York City: a new threat to our antibiotic armamentarium. **Archive International of Medicine**, v.165, p.1430–1435, 2005c.
- Brisse, S.; Van Himbergen, T.; Kusters, K.; Verhoef, J. Development of a rapid identification method for *Klebsiella pneumoniae* phylogenetic groups and analysis of 420 clinical isolates. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.942–945, 2004.
- Brisse, S.; Verhoef, J. Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.915–924, 2001.
- Bush, K.; Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. A functional classification scheme for β -lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.39, p.1211–1223, 1995.
- Bush, K.; Jacoby, G.A. Updated Functional Classification of β -Lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.969–976, 2010.
- Cagnacci, S.; Gualco, L.; Roveta, S.; Mannelli, S.; Borgianni, L.; Docquier, J.D.; Dodi, F.; Centanaro, M.; Debbia, E.; Marchese, A.; Rossolini, G.M. Bloodstream infections caused by multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing the carbapenem-hydrolysing VIM-1 metallo- β -lactamase: first Italian outbreak. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.61, p.296–300, 2008.
- Cai, J.C.; Zhou, H.W.; Zhang, R.; Chen, G.X. Emergence of *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Escherichia coli* isolates possessing the plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2 in intensive care units of a Chinese hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.2014–2018, 2008.

- Cantón, R.; Coque, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. **Current Opinion in Microbiology**, v.9, p.466-475, 2006.
- Cao, V.; Lambert, T.; Nhu, D.Q.; Loan, H.K.; Hoang, N.K.; Arlet, G.; Courvalin, P. Distribution of Extended-Spectrum β -lactamases in Clinical Isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3739-3743, 2002.
- Cartelle, M.; Tomas, M.M.; Pertega, S.; Beceiro, A.; Dominguez, M.A.; Velasco, D.; Molina, F.; Villanueva, R.; Bou, G. Risk Factors for Colonization and Infection in a Hospital Outbreak Caused by a Strain of *Klebsiella pneumoniae* with Reduced Susceptibility to Expanded-Spectrum Cephalosporins. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.4242-4249, 2004.
- Carter, M.W.; Oakton, K.J.; Warner, M.; Livermore, D.M. Detection of extended-spectrum β -lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination Disk method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, p.4228-4232, 2000.
- Cassettari, V.C.; Silveira, I.R.; Balsamo, A.C.; Franco, F. Outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit linked to onychomycosis in a healthcare worker. **Jornal de Pediatria**, v.82, p.313-316, 2006.
- Castanheira, M.; Toleman, M.; Jones, R.N.; Schmidt, F.J.; Walsh, T.R. Molecular characterization of a β -lactamase gene, *bla*_{GIM-1}, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4654-4661, 2004.
- Castanheira, M.; Fritsche, T.R.; Sader, H.S.; Jones, R.N.; Doi, Y.; Garcia, D.O.; Paterson, D.L. RmtD 16S RNA methylase in Epidemiologically Unrelated SPM-1-Producing *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1587-1588, 2008.
- Celenza, G.; Pellegrini, C.; Caccamo, M. Segatore, B.; Amicosante, G.; Perilli, M. Spread of *bla*_{CTX-M}-type and *bla*_{PER-2} β -lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.975-978, 2006.
- Chaibi, E.B.; Sirot, D.; Paul, G.; Labia, R. Inhibitor-resistant TEM beta-lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristics. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.43, p.447-458, 1999.
- Chanawong, A.; M'Zali, F.H.; Heritage, G.; Xiong, J.H.; Hawkey, P.M. Three cefotaximases, CTX-M-9, CTX-M-13, and CTX-M-14, among *Enterobacteriaceae* in the people's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.630-637, 2002.
- Charles, P.G.; Grayson, M.L. The dearth of new antibiotic development: why we should be worried and what we can do about it. **The Medical Journal of Australia**, v.181, p.549-553, 2004.

- Cheng, J.; Wang, Q.; Chen, Y.; Ye, Y.; Li, H.; Li, X.; Li, J.B. Phenotypic and molecular characterization of a novel β -lactamase carried by *Klebsiella pneumoniae*, CTX-M-72, derived from CTX-M-3. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v.55, p.207-216, 2009.
- Christian, N.A.; Roye-Green, K.; Smikle, M. Molecular epidemiology of multidrug resistant extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* at a Jamaican hospital, 2000 – 2004. **BMC Microbiology**, v.10, p.27, 2010.
- Chu, Y.W.; Afzal-Shah, M.; Houang, E.T.; Palepou, M.I.; Lyon, D.J.; Woodford, N.; Livermore, D.M. IMP-4, a novel metallo- β -lactamase from nosocomial *Acinetobacter* spp. collected in Hong Kong between 1994 and 1998. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.710–714, 2001.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, CLSI M100-S17, Wayne, 2006.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. CLSI/NCCLS M100-S17. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2007.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. CLSI document M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2008.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 19th informational supplement. CLSI M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2009.
- Clinical Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twentieth Informational Supplement, M100-S20. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA., 2010.
- Coelho, A.; González-López, J.J.; Miró, E.; Alonso-Tarrés, C.; Mirelis, B.; Larrosa, M.N.; Bartolomé, R.M.; Andreu, A.; Navarro, F.; Johnson, J.R.; Prats, G. Characterisation of the CTX-M-15-encoding gene in *Klebsiella pneumoniae* strains from the Barcelona metropolitan area: plasmid diversity and chromosomal integration. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.73–78, 2010.
- Coque, T.M.; Oliver, A.; Pérez-Díaz, J.C.; Baquero, F.; Cantón, R. Genes encoding TEM-4, SHV-2, and CTX-M-10 extended-spectrum beta-lactamases are carried by multiple *Klebsiella pneumoniae* clones in a single hospital (Madrid, 1989 to 2000). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.500-510, 2002.
- Coque, T.M.; Baquero, F.; Canton, R. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Eurosurveillance**, v.13, 2008.

- Corkill, J.E.; Cuevas, L.E.; Gurgel, R.Q.; Greensill, J.; HART, C.A. SHV-27, a novel cefotaxime hydrolyzing β -lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.47, p.463-465, 2001.
- Cuzon, G.; Naas, T.; Demachy, M.C.; Nordmann, P. Plasmid mediated carbapenem-hydrolyzing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolate from Greece. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.796-797, 2008.
- Damjanova, I.; Tóth, A.; Pászti, J.; Jakab, M.; Milch, H.; Bauernfeind, A.; Fuzi, M. Epidemiology of SHV-type β -lactamase-producing *Klebsiella* spp. from outbreaks in five geographically distant Hungarian neonatal intensive care units: widespread dissemination of epidemic R-plasmids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.665-671, 2007.
- Dienstmann, R.; Picoli, S.U.; Meyer, G.; Schenkel, T.; Steyer, J. Avaliação fenotípica da enzima *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) em *Enterobacteriaceae* de ambiente hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.46, no.1, 2010.
- Diestra, K.; Coque, T. M.; Miró, E.; Oteo, J.; Nicolau, C. J.; Campos, J.; Moyá, B.; Curia, T.; Pérez-Vázquez, M.; Cantón, R.; Oliver, A.; Navarro, F.; Red Española de Investigación en Patología Infecciosa (REIPI) Caracterización y epidemiología molecular de betalactamasas de espectro extendido en *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* en once hospitales españoles (2004). **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v.26, p.404-10, 2008.
- Domenico, P.; Marx, J.L.; Schoch, P.E.; Cunha, B.A. Rapid plasmid DNA isolation from mucoid Gram-negative bacteria. **Journal of Clinical Microbiology**, v.30, p.2859-2863, 1992.
- Dong, F.; Xu, Xi-wei.; Song, Wen-qi.; Lü, Ping.; Yu, Sang-jie.; Yang, Yong-hong.; Shen, Xu-zhuang. Characterization of multidrug-resistant and metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a paediatric clinic in China. **Chinese Medical Journal**, v.121, p.1611-1616, 2008.
- Drancourt, M.; Bollet, C.; Carta, A.; Rousselier, P. Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov., *Raoultella planticola* comb. nov. **International Journal of Systemic and Evolutionary Microbiology**, v.51, p.925-932, 2001.
- Duan, H.; Chai, T.; Liu, J.; Zhang, X.; Qi, C.; Gao, J.; Wang, Y.; Cai, Y.; Miao, Z.; Yao, M.; Schlenker, G. Source identification of airborne *Escherichia coli* of swine house surroundings using ERIC-PCR and REP-PCR. **Environmental Research**, v.109, p.511-517, 2009.
- Dropa, M.; Balsalobre, L.C.; Lincopan, N.; Mamizuka, E.M.; Murakami, T.; Cassettari, V.C.; Franco, F.; Guida, S.M.; Balabakis, A.J. ; Passadore, L.F.; Santos, S.R.;

- Matté, G.R.; Matté, M.H. Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina tropical de São Paulo**, v.51, p.203-209, 2009.
- Du Bois, S.K.; Marriott, M.S.; Amyes, S.G. TEM- and SHV-derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.35, p.7–22, 1995.
- Edwards, J.J.; Betts, M.J. Carbapenems: the pinnacle of the β -lactam antibiotics or room for improvement. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.45, p.1-4, 2000.
- Eisen, D.; Russell, E.G.; Tymms, M.; Roper, E.J.; Grayson, M.L.; Turnidge, J. Random Amplified Polymorphic DNA and Plasmid Analyses Used in Investigation of an Outbreak of Multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 33, p.713–717, 1995.
- Elliott, E.; Brink, A.J.; Greune, J.V.; Els, Z.; Woodford, N.; Turton, J.; Warner, M.; Livermore, D.M. In vivo development of ertapenem resistance in a patient with pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, p.95-98, 2006.
- Essack, S.Y.; Hall, L.M.; Pillay, D.G.; McFadyen, M.L.; Livermore, D.M. Complexity and diversity of *Klebsiella pneumoniae* strains with extended-spectrum β -lactamases isolated in 1994 and 1996 at a teaching hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.88-95, 2001.
- Essack, S.Y.; Hall, L.M.C.; Livermore, D.M. *Klebsiella pneumoniae* isolate from South Africa with multiple TEM, SHV and AmpC beta-lactamases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.398–400, 2004.
- Farias, T.S. Utilização de antimicrobianos em pacientes hospitalizados. Dissertação de mestrado do Departamento de Saúde Coletiva UEPB, 2007.
- Feizabadi, M.M.; Farahani, A.S.; Rahmati, M.; Asadi, S. Phenotypic characterization and plasmid analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains from Iranian patients R. Ci. méd. biol., Salvador, v.7, p.273-279, 2008.
- Figueiredo, D.Q.; Castro, L.F.S.; Santos, K.R.N.; Teixeira, L.M.; Mondino, S.S.B. Detecção de metalo-beta-lactamases em amostras hospitalares de *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.45, p.177-184, 2009.
- Florijn, A.; Nijssen, S.; Schmitz, F.J.; Verhoef, J.; Fluit, A.C. Comparison of E-Test and double disk diffusion test for detection of extended spectrum β -lactamases. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.21, p.241-243, 2002.
- Fluit, A.C.; Schmitz, F.J. Resistance integrons and super-integrons. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.272–288, 2004.

- Fontana, C.; Favaro, M.; Sarmati, L.; Natoli, S.; Altieri, A.; Bossa, M.C.; Minelli, S.; Leonardi, F.; Favalli, C. Emergence of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in Italy. **BMC Research Notes**, v.3, p.40, 2010.
- Freitas, A.L.P.; Machado, D.P.; Soares, F.S.C.; Barth, A.L. β -lactamases de espectro ampliado em *Klebsiella* spp e em *Escherichia coli* obtidas em um hospital escola brasileiro: detecção, prevalência e tipagem molecular. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.34, p.344-348, 2003.
- Friedland, I.R.; Isaacs, R.; Mixson, L.A.; Motyl, M.; Woods, G.L. Use of surrogate antimicrobial agents to predict susceptibility to ertapenem. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.43, p.61-64, 2002.
- Fu, Y.; Guo, L.; Xu, Y.; Zhang, W.; Gu, J.; Xu, J.; Chen, X.; Zhao, Y.; Ma, J.; Liu, X.; Zhang, F. Alteration of GyrA amino acid required for ciprofloxacin resistance in *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.2980-2983, 2008.
- Galani, I.; Xirouchaki, E.; Kanellakopoulou, K.; Petrikos, G.; Giamarellou, H. Transferable plasmid mediating resistance to multiple antimicrobial agents in *Klebsiella pneumoniae* isolates in Greece. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.579-588, 2002.
- Galani, I.; Souli, M.; Chrysosouli, Z.; Katsala, D.; Giamarellou, H. First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing both metallo- β -lactamase VIM-2 and extended-spectrum β -lactamase IBC-1. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.757-760, 2004.
- Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Silbert, S.; Sader, H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo- β -lactamase. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.699-702, 2003.
- Garcia, D.O.; Doi, Y.; Szabo, D.; Adams-Haduch, J.M.; Vaz, T.M.; Leite, D.; Padoveze, M.C.; Freire, M.P.; Silveira, F.P.; Paterson, D.L. Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamase CTX-M-12 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1790-1793, 2008.
- Gaspareto, P.B.; Martins, A.F.; Zavascki, A.P.; Barth, A.L. Occurrence of *bla*_{SPM-1} and *bla*_{IMP-1} genes of metallo- β -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* from three university hospitals in the city of Porto Alegre, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.108-109, 2007.
- Georghiou, P.R.; Hammil, R.J.; Wright, C.E.; Versalovic, J.; Koeuth, T.; Watson, D.A.; Lupski, J.R. Molecular epidemiology of infections due to *Enterobacter aerogenes*: identification of hospital-associated strains by molecular techniques. **Clinical Infectious Diseases**, v.20, p.84-94, 1995.

- Giani, T.; D'Andrea, M.M.; Pecile, P.; Borgianni, L.; Nicoletti, P.; Tonelli, F.; Bartoloni, A.; Rossolini, G.M. Emergence in Italy of *Klebsiella pneumoniae* sequence type 258 producing KPC-3 Carbapenemase. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.3793-3794, 2009.
- Giakkoupi, P.; Xanthaki, A.; Kanelopoulou, M.; Vlahaki, A.; Miriagou, V.; Kontou, S.; Papafragas, E.; Malamou-Lada, H.; Tzouvelekis, L.S.; Legakis, N.J.; Vatopoulos, A.C. VIM-1 metallo- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Greek hospitals. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.3893-3896, 2003.
- Giakkoupi, P.; Pappa, O.; Polemis, M.; Vatopoulos, A.C.; Miriagou, V.; Zioga, A.; Papagiannitsis, C.C.; Tzouvelekis, L.S. Emerging *Klebsiella pneumoniae* Isolates Coproducing KPC-2 and VIM-1 Carbapenemases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.4048-4050, 2009.
- Gibb, A.P.; Tribuddharat, C.; Moore, R.A.; Louie, T.J.; Krulicki, W.; Livermore, D.M.; Paleou, M.F.; Woodford, N. Nosocomial outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*_{IMP} allele, *bla*_{IMP-7}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.255-258, 2002.
- Goldfarb, D.; Harvey, S.B.; Jessamine, K.; Jessamine, P.; Toye, B.; Desjardins, M. Detection of plasmid mediated KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canadá: Evidence of Intra-Hospital Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.1920-1922, 2009.
- Golebiewski, M.; Kern-Zdanowicz, I.; Zienkiewicz, M.; Adamczyk, M.; Zylinska, J.; Baraniak, A.; Gniadkowski, M.; Bardowski, J.; Cegowski, P. Complete nucleotide sequence of the pCTX-M3 plasmid and its involvement in spread of the extended-spectrum beta-lactamase gene *bla*_{CTX-M-3}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.3789-3795, 2007.
- Gonçalves, D.C.P.S.; Lima, A.B.M.; Leão, L.S.N.O.; Carmo Filho, J.R.; Pimenta, F.C.; Vieira, J.D.G. Detecção de metalo-beta-lactamase em *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de pacientes hospitalizados em Goiânia, Estado de Goiás. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, p.411-414, 2009.
- Goren, M.G.; Carmeli, Y.; Schwaber, M.J.; Chmelnitsky, I.; Schechner, V.; Navon-Venezia, S. Transfer of Carbapenem-Resistant Plasmid from *Klebsiella pneumoniae* ST258 to *Escherichia coli* in Patient. **Emerging Infectious Diseases** v.16, n.6, 2010.
- Goyal, A.; Prasad, K.N.; Prasad, A.; Gupta, S.; Ghoshal, U.; Ayyagari, A. Extended spectrum β -lactamases in *Escherichia coli* & *Klebsiella pneumoniae* & associated risk factors. **Indian Journal of Medical Research**, v.129, p. 695-700, 2009.
- Grinbaum, R.S.; Adriano Neto, A.; Guimarães, T.; Carballo, L.; Gales, A.C. IMP-1 producing *Klebsiella pneumoniae* outbreak in a brazilian teaching hospital. 44th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, n. C2-1355, p.112, 2004.

- Gunawardana, G.A.; Townsend, K.M.; Frost, A.J. Molecular characterisation of avian *Pasteurella multocida* isolates from Australia and Vietnam by REP-PCR and PFGE. **Veterinary Microbiology**, v.72, p.97-109, 2000.
- Gupta V. Metallo beta lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v.17, p.131-143, 2008.
- Gutmann, L.; Ferré, B.; Goldstein, F.W.; Risk, N.; Pinto-Schuster, E.; Acar, J.F.; Collatz, E. SHV-5, a novel SHV-type β -lactamase that hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins and monobactams. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, p.951-956, 1989.
- Haeggman, S.; Lofdahl, S.; Paauw, A.; Verhoef J.; Brisse S. Diversity and Evolution of the Classe A Chromosomal Beta-lactamase gene in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.2400-2408, 2004.
- Hall, B.G.; Barlow, M. Structure-based phylogenies of the serine β -lactamases. **Journal of Molecular Evolution**, v.57, p.255–260, 2003.
- Haryani, Y.; Noorzaleha, A.S.; Fatimah, A.B.; Noorjahan, B.A.; Patrick, G.B.; Shamsinar, A.T.; Laila, R.A.S.; Son, R. Incidence of *Klebsiella pneumonia* in street foods sold in Malaysia and their characterization by antibiotic resistance, plasmid profiling, and RAPD–PCR analysis. **Food Control**, v.18, p.847–853, 2007.
- Hawkey, P.M.; Xiong, J.; Ye, H.; Li, H.; M’Zali, F.H. Occurrence of a new metallo-beta-lactamase IMP-4 carried on a conjugative plasmid in *Citrobacter youngae* from the People’s Republic of China. **FEMS Microbiology Letters**, v.194, p.53–57, 2001.
- Heritage, J.; M’Zali, F.H.; Gascoyne-Binzi, D.; Hawkey, P.M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum β -lactamases in Gram negative bacteria. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.44, p.309-318, 1999.
- Hernandez, J.; Martinez-Martinez, L.; Canton, R. Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum β -lactamases in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.2122–2125, 2005.
- Hirakata, Y.; Izumikawa, K.; Yamaguchi, T.; Takemura, H.; Tanaka, H.; Yoshida, R.; Matsuda, J.; Nakano, M.; Tomono, K.; Maesaki, S.; Kaku, M.; Yamada, Y.; Kamihira, S.; Kohno, S. Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging multiple-drug-resistant Gram-negative rods carrying the metallo- β -lactamase gene *bla*_{IMP}. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.42, p.2006–2011, 1998.
- Ho, P.K.; Wong, R.C.W.; Chow, K.H.; Yip, K.; Wong, S.S.Y.; Que, T.L. CTX-M type beta-lactamases among fecal *Eschechiria coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates in non-hospitalized children and adults. **The Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v.41, p.428-432, 2008.
- Houang, E.T.; Chu, Y.W.; Lo, W.S.; Chu, K.Y.; Cheng, A.F. Epidemiology of

- Rifampin ADP-ribosyltransferase (*arr-2*) and metallo- β -lactamase (*bla*_{IMP-4}) gene cassettes in class 1 integrons in *Acinetobacter* strains isolated from blood cultures in 1997 to 2000. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1382–1390, 2003.
- Howard, C.; Daal, A.; Kelly, G.; Schooneveldt, J.; Nimmo, G.; Giffard, P.M. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV β -lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.659-664, 2002.
- Jacoby, G.A.; Medeiros, A.A. More extended-spectrum beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.1697-1704, 1991.
- Jacoby, G.A.; Mills, D.M.; Chow, N. Role of β -lactamases and porins in resistance to ertapenem and other β -lactams in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.3203-3206, 2004.
- Jacoby, G.A.; Munoz-Price, L.S. The new β -lactamases. **The New England Journal of Medicine**, v.352, p.380–391, 2005.
- Jacoby, G.A. AmpC β -lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.22, p.161–182, 2009.
- Jarlier, V.; Nicolas, M.H.; Fournier, G.; Philippon, A. Extended broad-spectrum β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Reviews of Infectious Diseases**, v.10, p. 867-878, 1998.
- Jeong, S.H.; Bae, I.K.; Lee, J.H.; Sohn, S.G.; Kang, G.H.; Jeon, G.J.; Kim, Y.H. Molecular characterization of extended-spectrum beta-lactamases produced by clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* from a Korean Nationwide survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.2902-2906, 2004.
- Jonas, D.; Spitzmüller, B.; Daschner, F.D.; Verhoef, J.; Brisse, S. Discrimination of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* phylogenetic groups and other *Klebsiella* species by use of AFLP. **Microbiology Research**, v.155, p.17–23, 2004.
- Jones, C. H.; Tuckman, M.; Keeney, D.; Ruzin, A.; Bradford, P.A. Characterization and sequence analysis of extended-spectrum- β -lactamase-encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.465–475, 2009.
- Kassis-Chikhani, N.; Decre, D.; Gautier, V.; Burghoffer, B.; Saliba, F.; Mathieu, D.; Samuel, D.; Castaing, D.; Petit, J.C.; Dussaix, E.; Arlet, G. First outbreak of multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* carrying *bla*_{VIM-1} and *bla*_{SHV-5} in a French university hospital. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.142-145, 2006.

- Kingsley, J.; Vergheze, S. Sequence analysis of *bla*_{CTX-M-28} an ESBL responsible for third generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae*, for the first time in India. **India Journal of Pathology and Microbiology**, v.51, 2008.
- Ktari, S.; Arlet, G.; Mnif, B.; Gautier, V.; Mahjoubi, F.; Jmeaa, M.B.; Bouaziz, M.; Hammami, A. Emergence of Multidrug-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Isolates Producing VIM-4 Metallo- β -Lactamase, CTX-M-15 Extended-Spectrum β -Lactamase, and CMY-4 AmpC β -Lactamase in a Tunisian University Hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.4198–4201, 2006.
- Komatsu, M.; Aihara, M.; Shimakawa, K.; Iwasaki, M.; Nagasaka, Y.; Fukuda, S.; Matsuo, S.; Iwatani, Y. Evaluation of MicroScan ESBL confirmation panel for *Enterobacteriaceae*-producing, extended-spectrum β -lactamases isolated in Japan. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.46, p.125-130, 2003.
- Koneman, E.W.; Allen, S.D.; Janda, W.M.; Schreckenberger, P.C.; Winn, W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2008, 1760p.
- Lal, P.; Kapil, A.; Das, B.K.; Sood, S. 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.
- Laranjeira, V.S.; Marchetti, D.P.; Steyer, J.R.; Corção, G.; Picoli, S.U. Pesquisa de *Acinetobacter* sp e *Pseudomonas aeruginosa* produtores de metalo- β -lactamase em hospital de emergência de Porto Alegre, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, p.462-464, 2010.
- Lauretti, L.; Riccio, M.L.; Mazzariol, A.; Cornaglia, G.; Amicosante, G.; Fontana, R.; Rossolini, G.M. Cloning and characterization of *bla*_{VIM}, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.43, p.1584–1590, 1999.
- Leavitt, A.; Navon-Venezia, S.; Chmelnitsky, I.; Schwaber, M. J.; Carmeli, Y. Emergence of KPC-2 and KPC-3 in carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains in an Israeli hospital. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.3026–3029, 2007.
- Leavitt, A.; Chmelnitsky, I.; Colodner, R.; Itzhak Ofek, I.; Carmeli, Y.; Navon-Venezia, S. Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.969–974, 2009.
- Lee, K.; Chong, Y.; Shin, H.B.; Kim, Y.A.; Yong, D.; Yum, J.H. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo- β -lactamase-producing strains of *Pseudomonas* and *Acinetobacter* species. **Clinical Microbiology and Infection** v.7, p.88-91, 2001.

- Lee, K.; Lim, Y.S.; Yong, D.; Yum, J.H.; Chong, Y. Evaluation of the Hodge Test and the Imipenem-EDTA Double-Disk Synergy Test for Differentiating Metallo- β -Lactamase-Producing Isolates of *Pseudomonas* spp and *Acinetobacter* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.4623-4629, 2003.
- Lee, K.; Yum, J.H.; Yong, D.; Lee, H.M.; Kim, H.D.; Docquier, J.D.; Rossolini, G.M.; Chong, Y. Novel acquired metallo- β -lactamase gene, *bla*_{SIM-1}, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4485-4491, 2005.
- Leverstein-Van Hall, M.A.; Fluit, A.C.; Paauw, A.; Box, A.T.A.; Brisse, S.; Verhoef, J. Evaluation of the Etest ESBL and BD Phoenix, VITEK 1, and VITEK 2 automated instruments for detection of extended-spectrum β -lactamases in multiresistant *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.3703-3711, 2002.
- Li, L.; Lim, C.K. A novel large plasmid carrying multiple beta-lactam resistance genes isolated from a *Klebsiella pneumoniae* strain. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.1038-1048, 2000.
- Lincopan, N.; McCulloch J.A.; Reinert, C.; Cassettari, V.C.; Gales, A.C.; Mamizuka, E.M. First isolation of metallo- β -lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.516-519, 2005.
- Lincopan, N.; Leis, R.; Vianello, M.A.; Araújo, M.R.E.; Ruiz, A.S.; Mamizuka, E.M. Enterobacteria producing extended-spectrum β -lactamases and IMP-1 metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. **Journal of Medical Microbiology**, v.55, p.1611-1613, 2006.
- Ling, T.K.; Xiong, J.; Yu, Y. Multicenter antimicrobial susceptibility survey of Gram-negative isolated from patients with community-acquired infections in the People's Republic of China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.374-378, 2006.
- Linscott, A.J.; Brown, W.J. Evaluation of four commercially available extended-spectrum β -lactamase phenotypic confirmation tests. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.1081-1085, 2005.
- Livermore, D.M.; Woodford, N. Carbapenemases: a problem in waiting? **Current Opinion in Microbiology**. v.3, p.489-495, 2000.
- Livermore, D.M.; Oakton, K.J.; Carter, M.W.; Warner, M. Activity of ertapenem (MK-0826) versus *Enterobacteriaceae* with potent beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2831-2837, 2001.
- Livermore, D.M. Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? **Clinical Infectious Diseases**, v.34, p.634-640, 2002.

- Livermore, D.M.; Woodford, N. The β -lactamase threat in *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. **Trends in Microbiology**, v.14, p.413-420, 2006.
- Livermore, D.M.; Canton, R.; Gniadkowski, M.; Nordmann, P.; Rossolini, G.M.; Arlet, G.; Ayala, J.; Coque, T.M.; Kern-Zdanowicz, I.; Luzzaro, F.; Poirel, L.; Woodford, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.165–174, 2007.
- Livermore, D.M. Defining an extended-spectrum β -lactamase. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.3-10, 2008.
- Lomaestro, B.M.; Tobin, E.H.; Shang, W.; Gootz, T. The spread of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* to upstate New York. **Clinical Infectious Diseases**, v.43, p.26–28, 2006.
- Lopes, A.C.S.; Rodrigues, J.F.; Clementino, M.B.M.; Miranda, C.A.C.; Nascimento, A.P.A.; Morais Júnior, M.A. Application of PCR ribotyping and tDNA-PCR for *Klebsiella pneumoniae* identification. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, p.827-832, 2007.
- Lopes, A.C.S.; Veras, D.L.; Lima, A.M.S.; Melo, R.C.A.; Ayala, J. *bla*_{CTX-M-2} and *bla*_{CTX-M-28} extended-spectrum β -lactamase genes and class 1 integrons in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.105, p.163-167, 2010.
- Luzzaro, F.; Docquier, J.D.; Colinon, C.; Endimiani, A.; Lombardi, G.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M.; Toniolo, A. Emergence in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates of the VIM-4 metallo- β -lactamase encoded by a conjugative plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.648–650, 2004.
- McKeegan, K.S.; Borges-Walmsley, M.I.; Walmsley, A.R. Microbial and viral drug resistance mechanisms. **Trends in Microbiology**, v.10, p.8–14, 2002.
- MacKenzie, F.M.; Miller, C.A.; Gould, I.M. Comparison of screening methods for TEM- and SHV-derived extended-spectrum β -lactamase detection. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.715-724, 2002.
- Magalhães, V.; Lins, A.K.; Magalhães, M. Metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated in hospitals in Recife, PE, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.36, p.123-125, 2005.
- Maltezou, H.C.; Giakkoupi, P.; Maragos, A.; Bolikas, M.; Raftopoulos, V.; Papahatzaki, H.; Vrouhos, G.; Liakou, V.; Vatopoulos, A.C. Outbreak of infections due to KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* in a hospital in Crete (Greece). **Journal of Infection**, v.58, p.213–219, 2009.

- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**, 2ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982, 368-369p.
- Marcano, D.; Pasterán, F.; Rapoport, M.; Faccone, D.; Ugarte, C.; Salgado, N.; Payares, D.; Spadola, E.; López, Y.; Maggi, G.; Galas, M.; Sánchez, D. First isolation of a VIM-producing *Klebsiella pneumoniae* from a seven-year-old child in Venezuela. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v.2, p.241-244, 2008.
- Marchiaro, P.; Ballerini, V.; Spalding, T.; Cera, G.; Mussi, M.A.; Moran-Barrio, J.; Vila, A.J.; Viale, A.M. Limansky, A.S. A convenient microbiological assay employing cell-free extracts for the rapid characterization of Gram-negative carbapenemase producers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.336-344, 2008.
- Martins, A.F.; Zavascki, A.P.; Gaspareto, P.B.; Barth, A.L. Dissemination of *Pseudomonas aeruginosa* Producing SPM-1-like and IMP-1-like Metallo- β -lactamases in Hospitals from Southern Brazil. **Infection**, v.35, ed.6, 2007.
- Martins, W.M.B.S.; Almeida, A.C.S.; Silva, B.O.; Vilela, M.A.; Morais, M.M.C. Prevalência do gene *bla_{KPC}* em isolados clínicos de Enterobacteriaceas e não fermentadores encontrados em amostras clínicas em um hospital universitário do Recife, X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão, 2010.
- Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Hernández-Allés, S.; Alvarez-Díaz, D.; Suárez, A.I.; Tran, J.; Benedí, V.J.; Jacoby, G.A. Roles of β -lactamases and porins in activities of carbapenems and cephalosporins against *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.43, p.1669–1673, 1999.
- Martínez-Martínez, L.; Pascual, A.; Conejo, M.C.; García, I.; Joyanes, P.; Doménech-Sánchez, A.; Benedí, V.J. Energy-Dependent Accumulation of Norfloxacin and Porin Expression in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* and Relationship to Extended-Spectrum β -Lactamase Production, **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3926-3932, 2002.
- Marra, A.R.; Wey, S.B.; Castelo, A.; Gales, A.C.; Cal, R.G.; Filho, J.R.; Edmond, M.B.; Pereira, C.A. Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamases (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. **BMC Infectious Diseases**, v.6, p.24, 2006a.
- Marra, A.R.; Pereira, C.A.P.; Gales, A.C.; Menezes, L.C.; Cal, R.G.R.; Souza, J.M.A.; Edmond, M.B.; Faro, C.; Wey, S.B. Bloodstream infections with metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa*: epidemiology, microbiology, and clinical outcomes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.388–390, 2006b.
- Medeiros, A.A. Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics. **Reviews of infectious diseases**, v.24, p.19-45, 1997.

- Meglic, K.M.; Koren, S.; Palepou, M.F.I.; Karisik, E.; Livermore, D.M.; Pike, R.; Andlovic, A.; Jeverica, S.; An-Hergouth, V.K.; Muller-Premru, M.; Seme, K. The Slovenian ESBL Study Group; Woodford, N. Nationwide Survey of CTX-M-Type Extended-Spectrum β -Lactamases among *Klebsiella pneumoniae* Isolates in Slovenian Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.287-291, 2009.
- Mendes, C.; Kiffer, C.; Segura, A.; Ribeiro, J.; Turner, P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **The Brazilian Journal of infectious Diseases**, v.8, p.109-111, 2004a.
- Mendes, R.; Castanheira, M.; Garcia, P.; Guzman, B.; Toleran, T.; Walsh, R.; Jones, N.; SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. First isolation of *bla*_{VIM-2} in Latin America: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.1433-1434, 2004b.
- Mendes, R.E.; Castanheira, M.; Pignatari, A.C.C.; Gales, A.C. Metallo- β -lactamases. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.42, p.103-113, 2006.
- Mendonça, N.; Ferreira, E.; Caniça, M. Occurrence of a novel SHV-type enzyme (SHV-55) among isolates of *Klebsiella pneumoniae* from Portuguese origin in a comparison study for extended-spectrum β -lactamase-producing evaluation. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.56, p.415-420, 2006.
- Minarini, L.A.R.; Gales, A.C.; Palazzo, I.C.V.; Darini, A.L.C. Prevalence of Community-Occurring Extended Spectrum β -Lactamase-Producing *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Current Microbiology**, v.54, p.335-341, 2007.
- Minarini, L.A.; Clímaco, E.C.; Guimarães, D.B.; Ferreira, J.C.; Palazzo, I.C.; Martinez, R.; Darini, A.L. Clonal Transmission of ESBL-Producing *Klebsiella* spp. at a University Hospital in Brazil. **Current Microbiology**, v.56, p.587-591, 2008.
- Miriagou, V.; Tzouvelekis, L.S.; Rossiter, S.; Tzelepi, E.; Angulo, F.J.; Whichard, J.M. Imipenem Resistance in a *Salmonella* Clinical Strain Due to Plasmid-Mediated Class A Carbapenemase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.1297-1300, 2003.
- Miriagou, V.; Tzouvelekis, L.S.; Villa, L.; Lebessi, E.; Vatopoulos, A.C.; Carattoli, A.; Tzelepi, E. CMY-13, a novel inducible cephalosporinase encoded by an *Escherichia coli* plasmid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.3172-3174, 2004.
- Mohammad, H.M.; AL-Agamy, A.M.; Shibl, A.F.T. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. **Annals of Saudi Medicine**, v.29, p.253-257, 2009.
- Moland, E.S.; Hanson, N.D.; Herrera, V.L.; Black, J.A.; Lockhart, T.; Hossain, J.A.; Johnson, J.A.; Goering, R.V.; Thomson, K.S. Plasmid-mediated, carbapenem-

- hydrolysing β -lactamase, KPC-2, in *Klebsiella pneumoniae* isolates. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.51, p.711–714, 2003.
- Monteiro, J.; Santos, A.F.; Asensi, M.D.; Peirano, G.; Gales, A.C. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.333–334, 2009.
- Munday, C.J.; Whitehead, G.M.; Todd, N.J.; Campbell, M.; Hawkey, P.M. Predominance and genetic diversity of community- and hospital acquired CTX-M extended-spectrum β -lactamases in York, UK. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v. 54, p.628–633, 2004.
- Naas, T.; Nordman, P.; Vedel, G.; Poyart, C. Plasmid-mediated carbapenem hydrolyzing beta-lactamase KPC in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4423–4424, 2005.
- Naas, T.; Cuzon, G.; Villegas, M.V.; Lartigue, M.F.; Quinn, J.P.; Nordmann, P. Genetic structures at the origin of acquisition of the beta-lactamase *bla*_{KPC} gene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p.1257–1263, 2008.
- Navon-Venezia, S.; Chmelnitsky, I.; Leavitt, A.; Schwaber, M.J.; Schwartz, D.; Carmeli, Y. Plasmid-mediated imipenem hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem resistant *Escherichia coli* clones in Israel. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.3098–3101, 2006.
- NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: eleventh informational supplement M100-S13. NCCLS, Wayne, Pa, 2003.
- Neuwirth, C., Madec, S.; Siebor, E.; Pechinot, A.; Duez, J.M.; Pruneaux, M.; Fouchereau-Peron, M.; Kazmierczak, A.; Labia, R. TEM-89 beta-lactamase produced by a *Proteus mirabilis* clinical isolate: new complex mutant (CMT 3) with mutations in both TEM-59 (IRT-17) and TEM-3. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.3591–3594, 2001.
- Nogueira, K.S.; Higuti, I.H.; Nascimento, A.J.; Terasawa, L.B.; Oliveira, S.; Matos, A. P.; Souza, H.A.P.H.M.; Cogo, L.L.; Costa, L.M.D. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* Isolated from Hospitalized Patients in Curitiba, southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.10, p.390–395, 2006.
- Nordmann, P.; Poirel, L. Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. **Clinical Microbiology and Infection**, v.8, p.321–331, 2002.
- Nordmann, P.; Lartigue, M. F.; Poirel, L.; Aubert, D. In Vitro Analysis of ISEcp1B-Mediated Mobilization of Naturally Occurring β -Lactamase Gene *bla*_{CTX-M} of *Kluyvera ascorbata*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.1282–1286, 2006.

- Olive, D.M.; Bean, P. Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1661-1669, 1999.
- Oliveira, C.F.; Salla, A.; Lara, V.M; Rieger, A.; Horta, J.A.; Alves, S.H. Prevalence of Extended-spectrum beta-lactamases producing microorganisms in nosocomial patients and molecular characterization of the SHV type isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.278-282, 2010.
- Ørskov, I.; Ørskov, F. Serotyping of *Klebsiella pneumoniae*. **Methods in Microbiology**, v.14, p.143-164, 1984.
- Österblad, M.; Kirveskari, J.; Koskela, S.; Tissari, P.; Vuorenoja, K.; Hakanen, A.J.; Vaara, M.; Jalava, J. First isolations of KPC-2-carrying ST258 *Klebsiella pneumoniae* strains in Finland, June and August 2009. **EuroSurveillance**, v.14, pii.19349, 2009.
- Ozgumus, O.B.; Tosun, I.; Aydin, F.; Kilic, A.O. Horizontol dissemination of TEM- and SHV-type beta-lactamase genes carrying resistance plasmids amongst clinical isolates of *Enterobacteriaceae*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.39, p.636-643, 2008.
- Pagani, L.; Dell'Amico, E.; Migliavacca, R.; D'Andrea, M.M.; Giacobone, E.; Amicosante, G.; Romero, E.; Rossolini, G.M. Multiple CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases in nosocomial isolates of *Enterobacteriaceae* from a hospital in northern Italy. **Journal Clinical Microbiology**. v.41, p.4264-4269, 2003.
- Pai, H.; Lyu, S.; Hyang Lee, J.; Kim, J.; Kwon, Y.; Kim, J.W.; Choe, K.W. Survey of extend-spectrum beta-lactamases in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: prevalence of TEM-52 in Korea. **Journal of Clinical Microbiology**, v.37, p.1758-1763, 1999.
- Pasteran, F.G.; Otaegui, L.; Guerriero, L.; Radice, G.; Maggiora, R.; Rapoport, M.; Faccione, D.; Di Martino, A.; Galas, M. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-2, Buenos Aires, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1178–1180, 2008.
- Patel, J.B.; Rasheed, J.K.; Kitchel, B. Carbapenemases in Enterobacteriaceae: Activity, Epidemiology, and Laboratory Detection. **Clinical Microbiology Newsletter**, v.1, n.8, 2009.
- Paterson, D.L.; Mulazimoglu, L.; Casellas, J.M. Epidemiology of ciprofloxacin resistance and its relationship to extended-spectrum β -lactamase production in *Klebsiella pneumoniae* isolates causing bacteremia. **Clinical Infectious Diseases**, v.30, p.473-478, 2000.
- Paterson, D.L.; Hujer, K.M.; Hujer, A.M.; Yeiser, B.; Bonomo, M.D.; Rice, L.B.; Bonomo, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* bloodstream isolates from seven countries: dominance and widespread prevalence of SHV- and

- CTX-M-type beta-lactamases. **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v.47, p.3554-3560, 2003.
- Paterson, D.L.; Ko, W.C.; Von Gottberg, A.; Mohapatra, S.; Casellas, J.M.; Goossens, H.; Mulazimoglu, L.; Trenholme, G.; Klugman, K.P.; Bonomo, R.A.; Rice, L.B.; Wagener, M.M.; McCormack, J.G.; Yu, V.L. Antibiotic therapy for *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: implications of production of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious Diseases**, v.39, p.31-37, 2004.
- Paterson, D.L.; Bonomo, R.A. Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.657-686, 2005.
- Paterson, D.L. Resistance in Gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **American Journal of Infection Control**, v.34, p.20-28, 2006.
- Pavez, M.; Mamizuka, E.M.; Lincopan, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.2702, 2009.
- Pawar, M.; Mehta, Y.; khurana, P.; Chaudhary, A.; Kulkarni, V.; Trehan, N. Ventilator-associated pneumonia: incidence, risk factors, outcome, and microbiology. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v.17, p.22–28, 2003.
- Peirano, G.; Seki, L.M.; Val Passos, V.L.; Pinto, M.C.; Guerra, L.R.; Asensi, M.D. Carbapenem-hydrolysing β -lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.265–268, 2009.
- Peleg, A.Y.; Franklin, C.; Bell, J.M.; Spelman, D.W. Dissemination of the Metallo- β -Lactamase Gene *bla*_{IMP-4} among Gram-Negative Pathogens in a Clinical Setting in Australia. **Clinical Infectious Diseases**, v.41, p.1549–1556, 2005.
- Pereira, A.S.; Carmo Filho, J.R.; Tognim, M.C.B.; Sader, H.S. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para detecção de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, p.301-308, 2003.
- Perez, F.; Endimiani, A.; Hujer, K.M.; Bonomo, R.A. The continuing challenge of ESBLs. **National Institute of Health**, 2008.
- Perilli, M.; Dell'Amico, E.; Segatore, B.; De Massis, M.R.; Bianchi, C.; Luzzaro, F.; Rossolini, G.M.; Toniolo, A.; Nicoletti, G.; Amicosante, G. Molecular Characterization of Extended-spectrum β -lactamases Produced by Nosocomial Isolates of *Enterobacteriaceae* from an Italian Nationwide Survey. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.611-614, 2002.
- Petrella, S.; Ziental-Gelus, N.; Mayer, C.; Renard, M.; Jarlier, V.; Sougakoff, W. Genetic and structural insights into the dissemination potential of the extremely-broad-spectrum class A beta-lactamase (ESBL) KPC-2 identified in two strains of

- Escherichia coli* and *Enterobacter cloacae* isolated from the same patient in France. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.3725–3736, 2008.
- Pfalleer, M.A.; Acar, J.; Jones, R.N.; Verhoef, J.; Turnidge, J.; Sader, H.S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clinical Infectious Disease**, v.32, p.156-167, 2001.
- Pfeifer, Y.; Cullik, A.; Witte, W. Resistance to cephalosporins and carbapenems in Gram-negative bacterial pathogens. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, p.371–379, 2010.
- Picão, R.C.; Andrade, S.; Nicoletti, A.G.; Campana, E.H.; Moraes, G.C.; Mendes, R.E.; Gales, A.C. Metallo- β -lactamase detection: comparative evaluation of double-disk synergy versus combined disk tests for IMP, GIM, SIM or VIM-producing isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, p.2028-2047, 2008.
- Picoli, S.U. Metallo- β -lactamase *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista brasileira de análises clínicas**, v. 40, p.273-277, 2008.
- Pitout, J.D.D.; Nordmann, P.; Laupland, K.B.; Poirel, L. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.52-59, 2005.
- Podbielski, A.; Schonling, J.; Melzer, B.; Warnatz, K.; Leusch, H.G. Molecular characterization of new plasmid-encoded SHV-type β -lactamase (SHV-2 variant) conferring high-level cefotaxime resistance upon *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of General Microbiology**, v.137, p.569-578, 1991.
- Podschum, R.; Ullmann, U. Incidence of *Klebsiella planticola* among clinical *Klebsiella* isolates. **Medical Microbiology Letters**, v.3, p.90-95, 1994.
- Podschum, R.; Ullmann, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**, v.11, p.589-603, 1998.
- Poirel, L.; Kampfer, P.; Nordmann, P. Chromosome-encoded Ambler class A β -lactamase of *Kluyvera Georgiana*, a probable progenitor of a subgroup of CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.4038-4040, 2002.
- Poirel, L.; Mammeri, H.; Nordmann, P. TEM-121, a novel complex mutant of TEM-type β -lactamase from *Enterobacter aerogenes*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p.4528–4531, 2004.
- Poirel, L.; Héritier, C.; Tolun, V.; Nordmann, P. Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.15–22, 2004a.

- Poirel, L., Magalhaes, M.; Lopes, M.; Nordmann, P. Molecular analysis of metallo- β -lactamase gene *bla*SPM-1-surrounding sequences from disseminated *Pseudomonas aeruginosa* isolates in Recife, Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 48:1406–1409, 2004b.
- Pournaras, S.; Ikonomidis, A.; Tzouveleakis, L.S.; Tokatlidou, D.; Spanakis, N.; Maniatis, A.N.; Legakis, N.J.; Tsakris, A. VIM-12, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Klebsiella pneumoniae* that resembles a VIM-1/VIM-2 hybrid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.5153–5156, 2005.
- Prodinger, W.M.; Fille, M.; Bauernfeind, A.; Stemplinger, I.; Amann, S.; Pfausler, B.; Lass-Flörl, C.; Dierich, M.P. Molecular epidemiology of *Klebsiella pneumoniae* producing SHV-5 beta-lactamase: parallel outbreaks due to multiple plasmid transfer. **Journal of clinical microbiology**, v.34, p.564-568, 1996.
- Queenan, A.M.; Foleno, B.; Gownley, C.; Wira, E.; Bush, K. Effects of inoculum and β -lactamase activity in AmpC- and extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates tested by using NCCLS ESBL methodology. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, p.269-275, 2004.
- Queenan, A.M.; Bush, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.20, p.440-458, 2007.
- Qin, X.; Weissman, S.J.; Chesnut, M.F.; Zhang, B.; Shen, L. Kirby-Bauer disc approximation to detect inducible third-generation cephalosporin resistance in *Enterobacteriaceae*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v.3, p.13, 2004.
- Quinteros, M.; Radice, M.; Gardella, N. Extended-spectrum β -lactamases in *Enterobacteriaceae* in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.2864-2867, 2003.
- Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Flower, R. J. **Farmacologia** 6^{ed.}, Elsevier, 2006, 920p.
- Rasheed, J.K.; Anderson, G.J.; Yigit, H.; Quennan, A.M.; Doménech-Sánchez, A.; Swenson, J.M.; Biddle, J.W.; Ferraro, M.J.; Jacoby, G.A.; TENOVER, F.C. Characterization of the Extended-Spectrum β -lactamase Reference strain, *Klebsiella pneumoniae* K6 (ATCC 700603), which Produces the novel enzyme SHV-18. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, v.44, p.2382-2388, 2000.
- Rice, L.B.; Carias, L.L.; Hujer, A.M.; Bonafede, M.; Hutton, R.; Høyen, C.; Bonomo, R.A. High-level expression of chromosomally encoded SHV-1 β -lactamase and an outer membrane protein change confer resistance to ceftazidime and piperacillin-tazobactam in clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.362-367, 2000.

- Riccio, M.L.; Franceschini, N.; Boschi, L.; Caravelli, B.; Cornaglia, G.; Fontana, R.; Amicosante, G.; Rossolini, G.M. Characterization of the metallo- β -lactamase determinant of *Acinetobacter baumannii* AC-54/97 reveals the existence of *bla*_{IMP} allelic variants carried by gene cassettes of different phylogeny. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.44, p.1229–1235, 2000.
- Robin, F.; Delmas, J.; Chanal, C.; Sirot, D.; Sirot, J.; Bonnet, R. TEM-109 (CMT-5), a Natural Complex Mutant of TEM-1 β -lactamase Combining the Amino Acid Substitutions of TEM-6 and TEM-33 (IRT-5). **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.4443–4447, 2005.
- Roche, C.; Cotter, M.; O Connell, N.; Crowley, B. First identification of class A carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland. **EuroSurveillance**, v.14, pii.19163, 2009.
- Roche, C.; Lynch, M.; Kelly, S.; O'Rourke, K.; Crowley, B. First identified case of VIM-producing carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in the Republic of Ireland associated with fatal outcome. **Eurosurveillance**, v.15, ed.50, 2010.
- Rosenblueth, M.; Martínez, L.; Silva, J.; Martínez-Romero, E. *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant associated isolates. **Systematic and Applied Microbiology**, v.27, p.27-35, 2004.
- Rossi, F.; Andreazzi, D.B. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma** 1^oed, São Paulo, Atheneu, 2005, 118p.
- Sabiha, Y.E.; Lucinda, M.C.H.; Devadas, G.P.; Margaret, L.M.; David, M.L. Complexity and Diversity of *K. pneumoniae* Strains with Extended Spectrum β -lactamase isolated in 1994 and 1996 at a teaching Hospital in Durban, South Africa. **Antimicrobial agents and Chemotherapy**, p.88-95, 2001.
- Sader, H.S.; Gales, A.C.; Pfaller, M.A.; Mendes, R.E.; Zoccoli, C.; Barth, A.; Jones, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY antimicrobial surveillance program. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.5, p.200-214, 2001.
- Sader, H.S.; Castanheira, M.; Mendes, R.E.; Toleman, M.; Walsh, T.R.; Jones, R.N. Dissemination and diversity of metallo- β -lactamases in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.25, p.57-61, 2005.
- Salabi, A.E.; Toleman, M.A.; Weeks, J.; Bruderer, T.; Frei, R.; Walsh, T.R. First Report of the Metallo- β -Lactamase SPM-1 in Europe. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.54, p.582, 2010.
- Saladin, M.; Bao Cao, V.T.; Lambert, T.; Donay, J.; Herrmann, J.; Ould-Hocine, Z.; Verdet, C.; Delisle, F.; Philippon, A.; Arlet, G. Diversity of CTX-M β -lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiology Letters**, v.209, p.161-168, 2002.

- Samra, Z.; Ofir, O.; Lishtzinsky, Y.; Madar-Shapiro, L.; Bishara, J. Outbreak of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing KPC-3 in a tertiary medical centre in Israel. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p.525-529, 2007.
- Samuelsen, O.; Naseer, U.; Tofteland, S.; Skutlaberg, D.H.; Onken, A.; Hjetland, R.; Sundsfjord, A.; Giske, C.G. Emergence of clonally related *Klebsiella pneumoniae* isolates of sequence type 258 producing plasmid-mediated KPC carbapenemase in Norway and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.654-658, 2009.
- Sánchez, D.; Marcano, D.; Spadola, E.; León, L.; Payares, D.; Ugarte, C.; Salgado, N.; Maggi, G.; Guevara, A.; Torres, S.; Rodríguez, J.; Flores, A.; Tarazona, B. Metaloenzimas tipo VIM Detectadas en Aislamientos Clínicos en *Pseudomonas aeruginosa* en Cuatro Hospitales en Venezuela. **Revista Científica del Instituto Nacional de Higiene Rafael Range**, v.39, p.17-22, 2008.
- Sanders, C.C.; Sanders Jr., W.E. β -Lactam resistance in Gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, p.824-839, 1992.
- Sanguinetti, M.; Posteraro, B.; Spanu, T.; Ciccaglione, D.; Romano, L.; Fiori, B.; Nicoletti, G.; Zanetti, S.; Fadda, G. Characterization of clinical isolates of *Enterobacteriaceae* from Italy by the BD Phoenix Extended-spectrum beta-lactamases detection method. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.1463-1468, 2003.
- Santos, D.F.; Pimenta, F.C.; Alves, R.; Montalvão, E.R.; Santos, D.B.; Carmo Filho, J.R. Extended-spectrum β -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. **Brazilian journal of microbiology**, v.39, p.608-612, 2008.
- Schjørring, S.; Struve, C.; Krogfelt, K.A. Transfer of antimicrobial resistance plasmids from *Klebsiella pneumoniae* to *Escherichia coli* in the mouse intestine. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1086-1093, 2008.
- Schneiders, T.; Amyes, S.G.; Levy, S.B. Role of AcrR and ramA in fluoroquinolone resistance in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Singapore. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.2831-2837, 2003.
- Schwaber, M.J.; Raney, P.M.; Rasheed, K.; Biddle, J.W.; Williams, P.; McGowan, J.E. Jr.; Tenover, F.C. 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, p.294-298, 2004.
- Schwaber, M.J.; Navon-Venezia, S.; Schwartz, D. Carmeli, Y. High levels of antimicrobial coresistance among extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.2137-2139, 2005.

- Schwaber, M.J.; Klarfeld-Lidji, S.; Navon-Venezia, S.; Schwartz, D.; Leavitt, A.; Carmeli, Y. Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.1028–1033, 2008.
- Scoulica, E.V.; Neonakis, I.K.; Gikas, A.I.; Tselentis, Y.J. Spread of *bla*_{VIM-1} producing *E. coli* in a university hospital in Greece. Genetic analysis of the integron carrying the *bla*_{VIM-1} metallo-beta-lactamase gene. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.48, p.167–172, 2004.
- Sechi, L.A.; Spanu, T.; Sanguinete, M.; Dupre, I.; Masucci, L.; Siddu, A.; Tortorolo, G.; Vento, G.; Maggio, L.; Cambiere, A.; Zanetti, S.; Fadda, G. Molecular analysis of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in pediatric wards by ribotyping, Pulsed-field gel electrophoresis and antimicrobial susceptibilities. **New Microbiology**, v.24, p.35-45, 2001.
- Senda, K.; Arakawa, Y.; Ichiyama, S.; Nakashima, K.; Ito, H.; Ohsuka, S.; Shimokata, K.; Kato, N.; Ohta, M. PCR detection of metallo-β-lactamase gene (*bla*_{IMP}) in Gram-negative rods resistant to broad-spectrum β-lactams. **Journal of Clinical Microbiology**, v.34, p.2909–2913, 1996.
- Shah, P. M.; Isaacs, R. D. Ertapenem, the first of a new group of carbapenems. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.52, p.538–542, 2003.
- Shahid, M.; Malik, A.; Akram, M.; Agrawal, L.M.; Khan, A.U.; Agrawal, M. Prevalent phenotypes and antibiotic resistance in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* at an Indian tertiary care hospital: plasmid-mediated cefoxitin resistance. **International Journal of Infectious Diseases**, v.12, p.256-264, 2008.
- Sharma, J.; Ray, P.; Sharma, M. Plasmid profile of ESBLs producing Gram-negative bacteria and correlation with susceptibility to β-lactam drugs. **Indian journal of pathology and microbiology**, v.53, no.1, 2010.
- Shen, P.; Jiang, Y.; Zhou, Z.; Zhang, J.; Yu, Y.; Li, L. Complete nucleotide sequence of pKP96, a 67 850 bp multiresistance plasmid encoding qnrA1, aac(69)-Ib-cr and *bla*_{CTX-M-24} from *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1252–1256, 2008.
- Shiri, N.V.; Leavitt, A.; Schwaber, M.J.; Rasheed, J.K.; Srinivasan, A.; Patel, J.B.; Carmeli, Y. First report on a hyperepidemic clone of KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* in Israel genetically related to a strain causing outbreaks in the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.818–820, 2009.
- Silva Dias, R.C.; Borges-neto, A.A.; Ferraiuoli, G.I.D. Prevalence of AmpC and other β-lactamases in Enterobacteria at a large urban university hospital in Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases**, v.60, p.79-87, 2008.
- Silva, M.E. Investigação de grupos filogenéticos entre isolados hospitalares e comunitários de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de Recife-PE: relação com

resistência a antimicrobianos e origem de isolamento. Dissertação de mestrado do Departamento de Medicina Tropical UFPE, 2009.

Sinha, R.; Panjabi, C.; Varma, M.; Vijayan, V.K.; Shah, A. Chronic *Klebsiella pneumoniae* in an immunocompetent host. **Journal of Association of Physicians of India**, v.51, p.306–308, 2003.

Soge, O.O.; Queenan, A.M.; Ojo, K.K.; Afeniyi, B.A.; Roberts, M.C. CTX-M-15 extended-spectrum β -lactamases from Nigerian *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.57, p.24-30, 2006.

Sougakoff, W., Goussard, S.; Gerbaud, G.; Courvalin, P. Plasmid mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. **Reviews of infectious diseases**, v.10, p.879–884, 1988.

Souza Jr., M.A.; Ferreira, E.S.; Conceição, G.C. Importância da detecção de Beta-lactamases de espectro ampliado (ESBL) em laboratórios de Microbiologia Clínica. **XXX Congresso Brasileiro de Análises Clínicas** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Análises Clínicas, 2003.

Souza 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, p.37-46, 2005.

Spacov, I.C.G.; Silva, S.A.M.; Morais Júnior, M.A.; Morais, M.M.C. 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, p.722-729, 2006.

Steward, C.D.; Wallace, D.; Hubert, S.K.; Lawton, R.; Fridkin, S.K.; Gaynes, R.P.; McGowan Jr., J.E.; Tenover, F.C. Ability of laboratories to detect emerging antimicrobial resistance in nosocomial pathogens: a survey of Project ICARE laboratories. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.38, p.59-67, 2000.

Steward, C.D.; Rasheed, J.K.; Hubert, S.K.; Biddle, J.W.; Raney, P.M.; Anderson G.J.; Williams, P.P.; Brittain, K.L.; Oliver, A.; McGowan Jr, J.E.; Tenover, F.C. Characterization of Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* from 19 Laboratories Using the National Committee for Clinical Laboratory Standards Extended-Spectrum β -Lactamases Detection Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2864-2872, 2001.

Steward, C.D.; Mohammed, J.M.; Swenson, J.M.; Stocker, S.A.; Williams, P.P.; Gaynes, R.P.; McGowan Jr., J.E.; Tenover, F.C. Antimicrobial susceptibility testing of carbapenems: multicenter validity testing and accuracy levels of five antimicrobial test methods for detecting resistance in *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v.41, p.351-358, 2003.

- Stratton, C. A dangerous new type of resistance in *Klebsiella*. A disclosure of the hyperlink “[http://www.medscape.com/viewprogram/ 507](http://www.medscape.com/viewprogram/507)” **41st interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy**, Chicago, Illinois, 2001.
- Tato, M.; Coque, T.M.; Ruiz-Garbajosa, P.; Pintado, V.; Cobo, J.; Sader, H.S.; Jones, R.N.; Baquero, F.; Ón, R. Complex clonal and plasmid epidemiology in the first outbreak of Enterobacteriaceae infection involving VIM-1 metallo- β -lactamase in Spain: toward endemicity? **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.1179-81, 2007.
- Tegmark, W.K.; Haeggman, S.; Gezelius, L.; Thompson, O.; Gustafsson, I.; Ripa, T.; Olsson-Liljequist, B. Identification of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase in Sweden. **EuroSurveillance**, v.12, ed.51, 2007.
- Tenório, M.T.F.; Porfírio, Z.; Lopes, A.C.; Cendon, S. Clinical and microbiological characteristics of bloodstream infections in a tertiary hospital in Maceió, Alagoas, Brazil, **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.14, p.175-179, 2010.
- Tenover, F.C.; Arbeit, R.D.; Goering, R.V.; Michelsen, P.A.; Murray, B.E.; Persing, D.H.; Swaminathan, B. Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.33, p.2233–2239, 1995.
- Tenover, F.C.; Kalsi, R.K.; Williams, P.P.; Carey, R.B.; Stocker, S.; Lonsway, D.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.W.; McGowan Jr., J.E.; Hanna, B. Carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* not detected by automated susceptibility testing. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, p.1209–1213, 2006.
- Therrien, C.; Levesque, R.C. Molecular basis of antibiotic resistance and β -lactamase inhibition by mechanism-based inactivators: perspectives and future directions. **FEMS Microbiology Reviews**, v.24, p.251-262, 2000.
- Thi, P.L.N.; Yassibanda, S.; Aidara, A.; Bouguenec, C.L.; Germani, Y. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. **CDC Emerging Infectious Diseases Letter**, v.9, 2003.
- Tofteland, S.; Haldorsen, B.; Dahl, K.H.; Simonsen, G.S.; Steinbakk, M.; Walsh, T.R.; Sundsfjord, A.; Norwegian ESBL Study Group. Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.199-205, 2007.
- Toleman, M.A.; Simm, A.M.; Murphy, T.A.; Gales, A.C.; Biedenbach, D.J.; Jones, R.N.; Walsh, T.R. Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo- β -lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.50, p.673–679, 2002.

- Toleman, M.A.; Rolston, K.; Jones, R.N.; Walsh, T.R. *bla*_{VIM-7}, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.329–332, 2004.
- Toleman, M.A.; Biedenbach, D.; Bennett, D.M.; Jones, R.N.; Walsh, T.R. Italian metallo- β -lactamases: a national problem? Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Programme. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, p.61–70, 2005.
- Tórtola, M.T.; Lavilla, S.; Miró, E.; González, J.J.; Larrosa, N.; Sabaté, M.; Navarro, F.; Prats, G. First detection of a carbapenem-hydrolyzing metalloenzyme in two *Enterobacteriaceae* isolates in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, p.3492–3494, 2005.
- Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia**. 8.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 894 p.
- Tosin, I.; Silbert, S.; Sader, H.S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.7, p.360-369, 2003.
- Trabulsi, L.B.; Alterthum, F. **Microbiologia** 5ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 780 p.
- Troillet, N.; Samore, M.H.; Carmeli, Y. Imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: risk factors and antibiotic susceptibility patterns. **Clinical Infectious Diseases**, v.25, p.1094-1098, 1997.
- Tsakris, A.; Kristo, I.; Poulou, A.; Markou, F.; Ikonmidis, A.; Pournaras, S. First occurrence of KPC-2-possessing *Klebsiella pneumoniae* in a Greek hospital and recommendation for detection with boronic acid disc tests. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1257–1260, 2008.
- Tsakris, A.; Kristo, I.; Poulou, A.; Themeli-Digalaki, K.; Ikonmidis, A.; Petropoulou, D.; Pournaras, S.; Sofianou, D. Evaluation of Boronic Acid Disk Tests for Differentiating KPC-Possessing *Klebsiella pneumoniae* isolates in the Clinical Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**, v.47, p.362-367, 2009.
- Tumbarello, M.; Sanguinetti, M.; Montuori, E.; Trecarichi, E.M.; Posteraro, B.; Fiori, B.; Citton, R.; D’Inzeo, T.; Fadda, G.; Cauda, R.; Spanu, T. Predictors of mortality in bloodstream infections caused by extended-spectrum- β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1987–1994, 2007.
- Tzouvelekis, L.S.; Tzelepi, E.; Tassios, P.T.; Legakis, N.J. CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.14, p.137-142, 2000.
- Velasco, C; Rodríguez-Banõ, J; García, L; Díaz P; Lupión C; Durán L; Pascual, A. Eradication of an extensive outbreak in a neonatal unit caused by two sequential

- Klebsiella pneumoniae* clones harbouring related plasmids encoding an extended-spectrum β -lactamase. **Journal of Hospital Infection**, v.73, p.157-163, 2009.
- Vercauteren, E.; Descheemaeker, P.; Ieven, M.; Sanders, C.C.; Goossens, H. Comparison of screening methods and their prevalence among blood isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in a Belgian teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v.35, p.2191-2197, 1997.
- Verma, A.; Desai, N.; Shannon, K.; Philpott-Howard, J.; Hill, R.L.R. Intra- and inter-generic plasmid-mediated spread of cephalosporin and aminoglycoside resistance amongst *Klebsiella aerogenes* K41 and other enterobacteria. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.17, p.123-129, 2001.
- Versalovic, J.; Koeuth, T.; Lupski, J.R. Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. **Nucleic Acids Research**, v.19, p.6823-6831, 1991.
- Vignoli, R.; Varela, G.; Mota, M.I. Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum β -lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, p.2940-2943, 2005.
- Villegas, M.V.; Lolans, K.; Correa, A.; Suarez, C.J.; Lopez, J.A.; Vallejo, M.; Quinn, J.P. Colombian Nosocomial Resistance Study Group. First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, p.2880-2882, 2006.
- Villegas, M.V.; Lolans, K.; Correa, A.; Kattan, J.N.; Lopez, J.A.; Quinn, J.P. First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing β -lactamase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1553-1555, 2007.
- Villegas, M.V.; Kattan, J.N.; Quinteros, M.G.; Casellas, J.M. Prevalence of extended-spectrum β -lactamases in South America. **Clinical Microbiology and Infection**, v.14, p.154-158, 2008.
- Walsh, T.R.; Bolmstrom, A.; Qvarnstrom, A.; Gales, A.C. Evaluation of a new E test for detecting metallo- β -lactamase in routine clinical testing. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, p.2755-2759, 2002.
- Walsh, T.R.; Toleman, M.A.; Poirel, L.; Nordmann, P. Metallo- β -lactamases: the quiet before the storm? **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, p.306-325, 2005.
- Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. Class A carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.470-482, 2007.
- Walther-Rasmussen, J.; Høiby, N. OXA-type carbapenemases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.57, p.373-383, 2006.

- Watanabe, M.; Iyobe, S.; Inoue, M.; Mitsuhashi, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.35, p.147–151, 1991.
- Wei, Z.; Chen, Y.; Yu, Y.; Lu, W.; Li, L. Nosocomial spread of multi-resistant *Klebsiella pneumoniae* containing a plasmid encoding multiple β -lactamases. **Journal of Medical Microbiology**, v.54, p.885–888, 2005.
- Wei, Z.Q.; Du, X.X.; Yu, Y.S.; Shen, P.; Chen, Y.G.; Li, L.J. Plasmid-mediated KPC-2 in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.763–765, 2007.
- Wendt, C.; Schütt, S.; Dalpke, A.H.; Konrad, M.; Mieth, M.; Trierweiler-Hauke, B.; Weigand, M.A.; Zimmermann, S.; Biehler, K.; Jonas, D. First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *K. pneumoniae* in Germany. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.29, p.563–570, 2010.
- Wendt, C. *Klebsiella-pneumoniae*-Carbapenemase in Deutschland diese Woche 22/2008 nachgewiesen. **Epidemiol Bull.** v.22, p.173–174, 2008.
- Winokur, P.L.; Canton, R.; Casellas, J.M.; Legakis, N. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum β -lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas and the Western Pacific Region. **Clinical Infectious Diseases**, v.32, p.94-103, 2001.
- Wirth, F.W.; Picoli, S.U.; Cantarelli, V.V.; Gonçalves, A.L.S.; Brust, F.R.; Santos, L.M.O.; Barreto, M.F. Metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in two hospitals from Southern Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.13, p.170-172, 2009.
- Wolter, D.J.; Khalaf, N.; Robledo, I.E.; Vazquez, G.J.; Sante, M.I.; Aquino, E.E.; Goering, R.V.; Hanson, N.D. Surveillance of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* from Puerto Rico medical center hospitals: dissemination of KPC and IMP-18 beta-lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.53, p.1660–1664, 2009.
- Woodford, N.; Dallow, J.W.; Hill, R.L.; Palepou, M.F.; Pike, R.; Ward, M.E.; Warner, M.; Livermore, D.M. Ertapenem resistance among *Klebsiella* and *Enterobacter* submitted in the UK to a reference laboratory. **The International Journal of Antimicrobial Agents**, v.29, p.456–459, 2007.
- Woodford, N.; Fagan, E.J.; Ellington, M.J. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.57, p.154-5, 2005.
- Woodford, N.; Tierno, P.M.Jr.; Young, K.; Tysall, L.; Palepou, M.F.; Ward, E.; Painter, R.E.; Suber, D.F.; Shungu, D.; Silver, L.L.; Inglis, K.; Kornblum, J.; Livermore, D.M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-

- hydrolyzing class A beta-lactamase, KPC-3, in a New York Medical Center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, p.4793-4799, 2004a.
- Woodford, N.; Ward, M.E.; Kaufmann, M.E.; Turton, J.; Fagan, E.J.; James, D.; Johnson, A.P.; Pike, R.; Warner, M.; Cheasty, T.; Pearson, A.; Harry, S.; Leach, J.B.; Loughrey, A.; Lowes, J.A.; Warren, R.E.; Livermore, D.M. Community and hospital spread of *Escherichia coli* producing CTX-M extended-spectrum beta-lactamases in the UK. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.54, p.735-743, 2004b.
- Woodford, N.; Zhang, J.; Warner, M.; Kaufmann, M.E.; Matos, J.; Macdonald, A.; Brudney, D.; Sompolinsky, D.; Navon-Venezia, S.; Livermore, D.M. Arrival of *Klebsiella pneumoniae* producing KPC carbapenemase in the United Kingdom. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.62, p.1261-1264, 2008.
- Wu, T.L.; Siu, L.K.; Su, L.H.; Lauderdale, T.L.; Lin, F.M.; Leu, H.S.; Lin, T.Y.; Ho, M. Outer membrane protein change combined with co-existing TEM-1 and SHV-1 beta-lactamases lead to false identification of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.47, p.755-761, 2001.
- Xiong, Z.; Zhu, D.; Wang, F.; Zhang, Y.; Okamoto, R.; Inoue, M.A. *Klebsiella pneumoniae* producing three kinds of class A β -lactamases encoded by one single plasmid isolated from a patient in Huashan Hospital, Shanghai, China. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.23, p.262-267, 2004.
- Xu, L.; Evans, J.; Ling, T.; Nye, K.; Hawkey, P. Rapid Genotyping of CTX-M Extended-Spectrum β -Lactamases by Denaturing High-Performance Liquid Chromatography. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, p.1446-1454, 2007.
- Yan, J.J.; Ko, W.C.; Wu, J.J. Identification of a plasmid encoding SHV-12, TEM-1, and a variant of IMP-2 metallo- β -lactamase, IMP-8, from a clinical isolate of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2368-2371, 2001.
- Yang, Y.L.; Lauderdale, T.L.; Lo, H.J. Molecular mechanisms of fluoroquinolone resistance in *Klebsiella*. **Current Drug Targets: Infectious Disorders**, v.4, p.295-302, 2004.
- Yegneswaran, B.; Numsuwan, W.; Alcid, D. Incidence of Carbapenemase Resistance Gene (KPC) among *Klebsiella pneumoniae* isolates and its Clinical Implications. **The International Journal of Infectious Disease**, 14S1: 23.008, 2010.
- Yigit, H.; Queenan, A.M.; Anderson, G.J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.W.; Steward, C.D.; Alberti, S.; Bush, K.; Tenover, F.C. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.1151-1161, 2001.
- Yigit, H.; Queenan, A.M.; Rasheed, J.K.; Biddle, J.W.; Domenech-Sanchez, A.; Alberti,

- S.; Bush, K.; Tenover, F.C. Carbapenem-resistant strain of *Klebsiella oxytoca* harboring carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase KPC-2. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, p.3881-3889, 2003.
- Zavascki, A.P.; Gaspareto, P.B.; Martins, A.F.; Gonçalves, A.L.; Barth, A.L. Outbreak of carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM-1 metallo- β -lactamase in a teaching hospital in southern Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.56, p.1148–1151, 2005.
- Zavascki, A.P.; Machado, A.B.; de Oliveira, K.R.; Superti, S.V.; Pilger, D.A.; Cantarelli, V.V.; Pereira, P.R.; Lieberkmecht, A.C.; Barth, A.L. KPC-2-producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.34, p.286–288, 2009.
- Zeba, B. Overview of β -lactamase incidence on bacterial drug resistance. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p.1559-1562, 2005.
- Zhang, R.; Zhou, H.W.; Cai, J.C.; Chen, G.X. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in carbapenem resistant *Serratia marcescens* isolates from Hangzhou, China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.59, p.574–576, 2007.
- Zhao, F.; Bai, J.; Wu, J.; Liu, J.; Zhou, M.; Xia, S.; Wang, S.; Yao, X.; Yi, H.; Lin, M.; Gao, S.; Zhou, T.; Xu, Z.; Niu, Y.; Bao, Q. Sequencing and Genetic Variation of Multidrug Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. **PLoS ONE**, v.5, ed.4, 2010.