



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

RITO SANTO PEREIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS EM *Klebsiella pneumoniae* E *Enterobacter aerogenes*,
COM IMPLICAÇÃO NA VIRULÊNCIA BACTERIANA.**

Juiz de Fora

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Rito Santo Pereira

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS EM *Klebsiella pneumoniae* E *Enterobacter aerogenes*,
COM IMPLICAÇÃO NA VIRULÊNCIA BACTERIANA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como Requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

PEREIRA, RITO SANTO .
ASPECTOS FISILÓGICOS E MOLECULARES DE RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS EM *Klebsiella pneumoniae* E *Enterobacter*
aerogenes, COM IMPLICAÇÃO NA VIRULÊNCIA BACTERIANA / RITO
SANTO PEREIRA. -- 2014.
114 f. : il.

Orientador: CLÁUDIO GALUPPO DINIZ
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Juiz de Fora, Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação
em Saúde Brasileira, 2014.

1. RESISTÊNCIA. CARBAPENÊMICOS. *Klebsiella pneumoniae*.
Enterobacter aerogenes. KPC. TEM. SHV. CTX-M. I. DINIZ,
CLÁUDIO GALUPPO, orient. II. Título.

RITO SANTO PEREIRA

**ASPECTOS FISIOLÓGICOS E MOLECULARES DA RESISTÊNCIA AOS
CARBAPENÊMICOS EM *Klebsiella pneumoniae* E *Enterobacter aerogenes*,
COM IMPLICAÇÃO NA VIRULÊNCIA BACTERIANA.**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde – Área de concentração Saúde Brasileira, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como Requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Aprovada em: 28/11/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Vânia Lúcia da Silva
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profa. Dra. Kelly Moreira Grillo Ribeiro Branco
Fundação Universidade de Itaúna

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Cláudio Galuppo Diniz pela oportunidade, confiança, apoio e amizade.

Às pessoas que gentilmente doaram sua expertise no assunto, especialmente Profa Dra. Vânia Lúcia, a Carol, Michele, Juliana e Vanessa, pelo fundamental apoio na padronização das técnicas fenotípicas e, em especial a Dra. Alessandra Machado, pelo apoio e realização das técnicas moleculares.

Á todos os funcionários e estudantes de Iniciação Científica do Instituto de Ciências Biológicas (ICB - UFJF), em especial do laboratório de microbiologia que deram força e tiveram muita compreensão para que este trabalho pudesse ser realizado.

Ao meu pai Santos Luís Pente pelos exemplos de moral e de valores humanos vivenciados desde meus primeiros anos de vida e pelos exemplos de determinação, pelo estímulo e apoio para que pudesse fazer mais esta conquista.

Aos meus irmãos, Abílio, Artur, Vasco, Nelson, Nilza, Luís e a minha *guia* Maria Josefa, pelo amor, incentivo e apoio moral.

E por fim, ao Ministério de Ciência e Tecnologia de Moçambique pelo apoio financeiro e a Universidade Zambeze por permitir a realização deste sonho.

A todos, MUITO OBRIGADO.

RESUMO

A resistência aos agentes antimicrobianos é um problema crescente, restringindo as opções de tratamento e resultando em falhas clínicas mais frequente. Carbapenemases são enzimas produzidas por bactérias Gram-negativas que conferem resistência aos β -lactâmicos. *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* destacam-se pelo oportunismo e capacidade de produção destas enzimas e seu envolvimento nas infecções hospitalares. Nosso trabalho teve como objetivo avaliar os aspectos fisiológicos e moleculares relacionados à virulência e resistência aos carbapenêmicos em *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*, isolados em um serviço de microbiologia clínica em um hospital terciário durante o ano de 2012. De maneira geral, 3437 espécimes clínicos coletados foram processados para isolamento microbiano. Amostras identificadas foram avaliadas quanto à susceptibilidade aos antimicrobianos e 42 enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos foram consideradas. Foram realizados testes para avaliação da produção de carbapenemases, atividade hemolítica, estresse oxidativo, tolerância a biocidas e formação de biofilmes. Os microrganismos foram recuperados de urina, cateter, sangue e trato respiratório. Entre os pacientes, 61,9% eram de UTI. Os isolados apresentaram altos níveis de sensibilidade à amicacina e tigeciclina (>90%). Considerando-se a frequência dos marcadores genéticos, KPC foi a mais frequente (97,6%), seguido por TEM (95,2%), SHV (69,0%) e CTX-M (38,1%). Em todos os isolados avaliados, 2,4% apresentaram 1 marcador genético associado a resistência aos carbapenêmicos, 23,8% apresentaram 2 marcadores, 45,2% apresentaram 3 e 28,6% apresentaram 4. As espécies resistentes aos carbapenêmicos apresentaram características peculiares em relação às características fisiológicas avaliadas, sugerindo que essas bactérias possam apresentar comportamentos diferentes de microrganismos de mesma espécie sensíveis às drogas, com implicações não apenas para antibioticoterapia, mas também para sua virulência e persistência no ambiente nosocomial. Estes resultados confirmam a dificuldade de manejo terapêutico de pacientes com infecções associadas a microrganismos multi-resistentes e oportunistas com impactos diretos na mortalidade e no controle epidemiológico destes microrganismos nos centros de saúde.

Palavras-chave: Resistência. Carbapenêmicos. *Klebsiella pneumoniae*. *Enterobacter aerogenes*. KPC. TEM. SHV. CTX-M.

ABSTRACT

The antimicrobial resistance is a growing problem, restricting treatment options and resulting in more frequent clinical failures. Carbapenemases are enzymes produced by Gram-negative bacteria which confer resistance to β -lactams. *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* stand out by opportunism and production capacity of these enzymes and their involvement in nosocomial infections. Our study aimed to evaluate the virulence and related carbapenem resistance in *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* physiological and molecular aspects, isolated from the Clinical Laboratory, in a tertiary hospital in the city of Juiz de Fora - Minas Gerais, during 2012. During the study period, 3437 clinical specimens were processed for microbial isolation. Identified samples were evaluated for antimicrobial susceptibility and 42 resistant *Enterobacteriaceae* to carbapenems were considered. Underwent tests for evaluation of carbapenemase production, hemolytic activity, biofilm formation, oxidative stress and biocides tolerance. The results showed that *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* were recovered in urine, catheter, blood and respiratory tract. Among the patients, 61.9% were ICU. The isolates showed high levels of sensitivity to amikacin and tigecycline (>90%). Considering the frequency of genetic markers, KPC was the most common (97.6%), followed by TEM (95.2%), SHV (69.0%) and CTX-M (38.1%). In all isolates, 2.4% had one genetic marker associated with resistance to carbapenems, 23.8% had two markers, 45.2% had three and 28.6% had four. Carbapenemase producers showed particular characteristics regarding the assessed physiological characteristics, suggesting that these bacteria may exhibit different behaviors of microorganisms of the same species susceptible to carbapenem with implications not only for antibiotic therapy, but also for their virulence and persistence in the nosocomial environment. These results confirm the difficulty of therapeutic management of patients with infections associated with multi-resistant and opportunistic microorganisms with direct impacts on mortality and epidemiological control of these microorganisms in health centers.

Key-words: Resistance. Carbapenems. *Klebsiella pneumoniae*. *Enterobacter aerogenes*. KPC. TEM. SHV. CTX-M.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Principais estruturas dos antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases.....	17
Figura 2:	Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos na família <i>Enterobacteriaceae</i>	21
Figura 3:	Teste de Hodge modificado empregando discos de ertapenem.....	45
Gráfico 1:	Frequências de distribuição dos pacientes por setor hospitalar.....	53
Gráfico 2:	Frequências de distribuição dos espécimes clínicos.....	54
Gráfico 3:	Distribuição por grupos etários dos pacientes infectados por <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. aerogenes</i> resistente aos carbapenêmicos durante o ano de 2012.....	55
Gráfico 4:	Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. aerogenes</i> resistentes aos carbapenêmicos durante o ano de 2012.....	56
Figura 4:	Atividade hemolítica negativa em placa com ágar sangue de carneiro.....	58
Figura 5:	Teste de resposta ao estresse oxidativo.....	59
Figura 6:	Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{KPC} (892pb) em enterobactérias.....	62
Figura 7:	Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{TEM} (986pb) em enterobactérias.....	62
Figura 8:	Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{SHV} (982pb) em enterobactérias.....	62
Figura 9:	Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido <i>bla</i> _{CTX-M} (562pb) em enterobactérias.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Classificação das β -lactamases.....	24
Tabela 2:	Oligoiniciadores utilizados e tamanhos dos fragmentos.....	50
Tabela 3:	Distribuição dos fenótipos de resistência a diversos antimicrobianos em <i>K. pneumoniae</i> (n=21) e <i>E. aerogenes</i> (n=21)	57
Tabela 4:	Perfil de avaliação da tolerância ao estresse oxidativo de <i>K. pneumoniae</i> resistente e sensível aos carbapenêmicos.....	59
Tabela 5:	Perfil de habilidade de formação de biofilme de <i>K. pneumoniae</i> resistente e sensível aos carbapenêmicos.....	60
Tabela 6:	Avaliação da susceptibilidade aos biocidas entre isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistente e sensível aos carbapenêmicos.....	61
Tabela 7:	Frequência de detecção dos genes codificadores β -lactamase pesquisadas nas espécies bacterianas isoladas em 2012.....	63
Tabela 8:	Perfil genotípico das bactérias resistentes aos carbapenêmicos, isoladas em 2012.....	64
Tabela 9:	<i>Odds ratio</i> para associação de linhagens de <i>Klebsiella</i> com marcadores genéticos de resistência e fenótipos para fatores de virulência (formação de biofilme, estresse oxidativo e tolerância a biocida)....	65

LISTA DE SIGLAS

μl Microlitro

μL Micrograma

AmpC Beta-lactamases cromossômicas

ATCC *American Type Culture Collection*

CTX-M Beta-lactamase tipo Cefotaximase

DNA Ácido desoxiribonucleico

EDTA *Ethylene diamine tetra-acetic acid*

NDM *New Delhi Metallo-β-lactamase*

OXA Beta-lactamase tipo oxacilinase

PCR Reação em cadeia da polimerase

SHV *Sulphydryl Variable*

TBE *Tris / Borato / EDTA*

TEM de Temoniera

TSB Caldo tripcaseína de soja

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1	Infecção hospitalar	15
2.2	Antimicrobianos β -lactâmicos.....	16
2.3	Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos na família <i>Enterobacteriaceae</i>	19
2.4	β -lactamases.....	22
2.4.1	β -lactamases de espectro estendido (ESBL).....	26
2.4.1.1	ESBL do tipo TEM	27
2.4.1.2	ESBL do tipo SHV.....	28
2.4.1.3	ESBL do tipo CTX-M	29
2.4.2	Enzimas β -lactamases do tipo Carbapenemase	30
2.4.2.1	Metalo β -lactamase	30
2.4.2.2	<i>Klebsiella pneumoniae</i> carbapenemase.....	34
2.5	Características gerais e epidemiologia de <i>Klebsiella pneumoniae</i> e <i>Enterobacter aerogenes</i>	35
3	OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo geral	39
3.2	Objetivos específicos	39
4	MATERIAIS E MÉTODOS	41

4.1	Fluxograma de atividades	41
4.2	Isolamento das amostras bacterianas.....	42
4.3	Identificação bacteriana	43
4.4	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos	43
4.5	Detecção fenotípica da produção de carbapenemases	44
4.6	Revisão dos prontuários dos pacientes.....	45
4.7	Avaliação fisiológica de habilidades bacterianas associadas à agressão	45
4.7.1	Avaliação da atividade hemolítica.....	45
4.7.2	Avaliação da tolerância ao estresse oxidativo	46
4.7.3	Teste de formação de biofilme em poliestireno	47
4.7.4	Avaliação da susceptibilidade aos biocidas.....	48
4.8	Extração de DNA bacteriano	49
4.9	Identificação dos marcadores de β -lactamases por PCR	49
4.10	Análise estatística	51
5	RESULTADOS	53
5.1	Isolamento das amostras bacterianas.....	53
5.2	Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas.....	55
5.3	Testes fisiológicos de agressão bacteriana.....	58
5.3.1	Avaliação da atividade hemolítica.....	58
5.3.2	Estresse oxidativo.....	58
5.3.3	Avaliação da habilidade de formação de biofilme.....	60
5.3.4	Perfil de susceptibilidade aos biocidas	60

5.4	Caracterização dos genes de resistência.....	61
5.5	Análise da correlação entre resistência múltipla aos antimicrobianos, detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência entre os microrganismos resistentes aos carbapenêmicos.....	64
6	DISCUSSÃO	66
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
8	CONCLUSÕES	75
9	REFERÊNCIAS	77
10	ANEXOS	101

1 INTRODUÇÃO

A partir do final da década de 1980, os antimicrobianos β -lactâmicos da classe dos carbapenêmicos, como impenem (1987), meropenem (1996), ertapenem (2001) e recentemente doripenem, foram instituídos como alternativas terapêuticas de última escolha para tratamento de infecções graves provocadas, principalmente, por bactérias Gram-negativas multi-resistentes produtoras de enzimas β -lactamases de espectro estendido (ESBL), como também por bactérias hiperprodutoras de β -lactamases do tipo AmpC.

Consideradas estáveis por essas enzimas, os carbapenêmicos apresentavam, na sua introdução terapêutica, o mais potente e excepcional espectro de atividade antibacteriana. Estas drogas se mostraram com grande potencial, agindo contra a maioria das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas aeróbias e anaeróbias. Assim, a dependência da utilização médica dos carbapenêmicos tem se tornado crescente. Muitas bactérias Gram-negativas produtoras de ESBL e/ou hiperprodutoras de AmpC são resistentes a antimicrobianos não β -lactâmicos, como aminoglicosídeos, sulfametaxazol-tripetoprima, tetraciclina, quinolonas e fluoroquinolonas, restringindo as opções de tratamento.

Com o uso abusivo de carbapenêmicos, a seleção e disseminação das bactérias resistentes a esses antimicrobianos se tornou inevitável. A resistência aos carbapenêmicos pode envolver muitos mecanismos que podem atuar de forma isolada ou em conjunto, tais como: modificação na permeabilidade da membrana ou presença de bombas de efluxo associado com hiperprodução de β -lactamases ESBL e AmpC e produção específica de carbapenemases.

As carbapenemases constituem um grupo mais versátil de β -lactamases, com espectro de atividade mais amplo que as ESBL. Embora conhecidas como carbapenemases, esse grupo de enzimas hidrolisa praticamente todos antibióticos β -lactâmicos, com destaque para a classe dos carbapenêmicos. Podem ser codificadas tanto por genes cromossômicos quanto por genes extra-cromossômicos, especialmente em plasmídeos, possuindo importante papel na disseminação dos marcadores de resistência aos carbapenêmicos.

KPC é uma enzima produzida por bactérias Gram-negativas, que conferem resistência aos carbapenêmicos, além de inativar outros β -lactâmicos e outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluoroquinolonas. O gene que codifica KPC tem sido frequentemente encontrado em enterobactérias, especialmente *Klebsiella pneumoniae*, mas pode também ser identificada em outras bactérias como *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Salmonella* spp., *E. coli* e *Pseudomonas* spp. A resistência aos carbapenêmicos confere alto potencial de disseminação para os microrganismos, o que dificulta o controle e preocupa os profissionais de saúde, pois o tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de carbapenemases é extremamente difícil, elevando as taxas de mortalidade.

Atualmente, KPC constitui importante mecanismo de resistência no contexto hospitalar mundial, e estudos demonstraram que a sua taxa de mortalidade aproxima-se de 50%, representando, portanto, um grande desafio para a terapia clínica atual. Desta forma, sua pesquisa é relevante a fim de limitar sua disseminação, contribuindo para a redução dos índices de morbidade e mortalidade ligados a diferentes doenças infecciosas, em que é imprescindível a vigilância

microbiológica, juntamente com ação da Comissão de Controle de Infecção Hospitalar.

Dando sequência à linha de pesquisa “*Epidemiologia da resistência e resposta bacteriana aos antimicrobianos*”, em desenvolvimento no Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana da Universidade Federal de Juiz de Fora, com este trabalho pretende-se avaliar aspectos fisiológicos e moleculares da resistência aos carbapenêmicos em bactérias Gram-negativas da família *Enterobacteriaceae*, isoladas no serviço de microbiologia clínica em um hospital terciário na cidade de Juiz de Fora, MG.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infecção hospitalar

Infecção Hospitalar (IH) é um problema de saúde pública com grande impacto sobre a morbimortalidade dos pacientes internados. Conforme a Portaria n.º 2.616 de 12 de maio de 1998, válida até o momento, é definida, no Brasil, como toda aquela adquirida após a admissão do paciente em um hospital, podendo se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que relacionado à permanência do paciente na instituição ou a procedimentos hospitalares (BRASIL, 1998). Também, segundo a mesma Portaria, são consideradas infecções hospitalares as que se manifestam antes de 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e ou terapêuticos realizados durante este período.

Nos pacientes hospitalizados, as infecções hospitalares relacionadas ao trato respiratório são as mais comuns, contudo, as infecções respiratórias e de corrente sanguínea representam maior gravidade (PELEG e HOOPER, 2010). Os grupos de maior risco compõem pacientes recém-nascidos e idosos internados em unidade de tratamento intensivo, bem como os transplantados, por apresentarem sistema imunológico comprometido (APPOLINÁRIO, 2008).

As unidades de transplante são consideradas de alto risco para o desenvolvimento de infecção, determinada pela relação de exposições epidemiológicas e individuais de pacientes transplantados (FISHMAN, 2007). Surtos por bactérias multi-resistentes nas unidades de transplantes requerem maiores cuidados com prevenção e detecção laboratorial mais rápida (ZÁRATE et al., 2008).

Apesar do grande avanço no desenvolvimento de antimicrobianos, o cenário atual demonstra um aumento no número de isolamento de bactérias anteriormente sensíveis aos antimicrobianos de uso hospitalar mais potentes como carbapenêmicos e a emergência de microrganismos intrinsecamente resistentes. Dentro do grupo das bactérias da família *Enterobacteriaceae*, o mecanismo de resistência que se destaca é a produção de β -lactamases, enzimas que conferem resistência aos antibióticos β -lactâmicos. Entre as β -lactamases, as mais descritas são as ESBLs, AmpC e KPC (BLACK et al., 2005; NOGUEIRA, 2005).

Além da alta prevalência em ambientes hospitalares, a aquisição de mecanismos de resistência aos antimicrobianos tem levado as enterobactérias, principalmente a *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. a alcançar notoriedade entre os patógenos causadores de surtos hospitalares (ZAMPARETTE, 2014).

2.2 Antimicrobianos β -lactâmicos

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

O anel β -lactâmico é a estrutura comum a todos os antimicrobianos dessa classe e é esta estrutura que se ligará ao sítio ativo na célula bacteriana. O anel β -lactâmico está ligado a outro radical, geralmente outro anel, formando estruturas

complexas de acordo com as quais, os β -lactâmicos são classificados em penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos, monobactâmicos e inibidores de β -lactamases (Figura 1). Pequenas alterações nas estruturas de cada grupo é o que dará as características individuais dos antimicrobianos (KONG et al., 2010; NOGUEIRA, 2011; ZAMPARETTE, 2014).

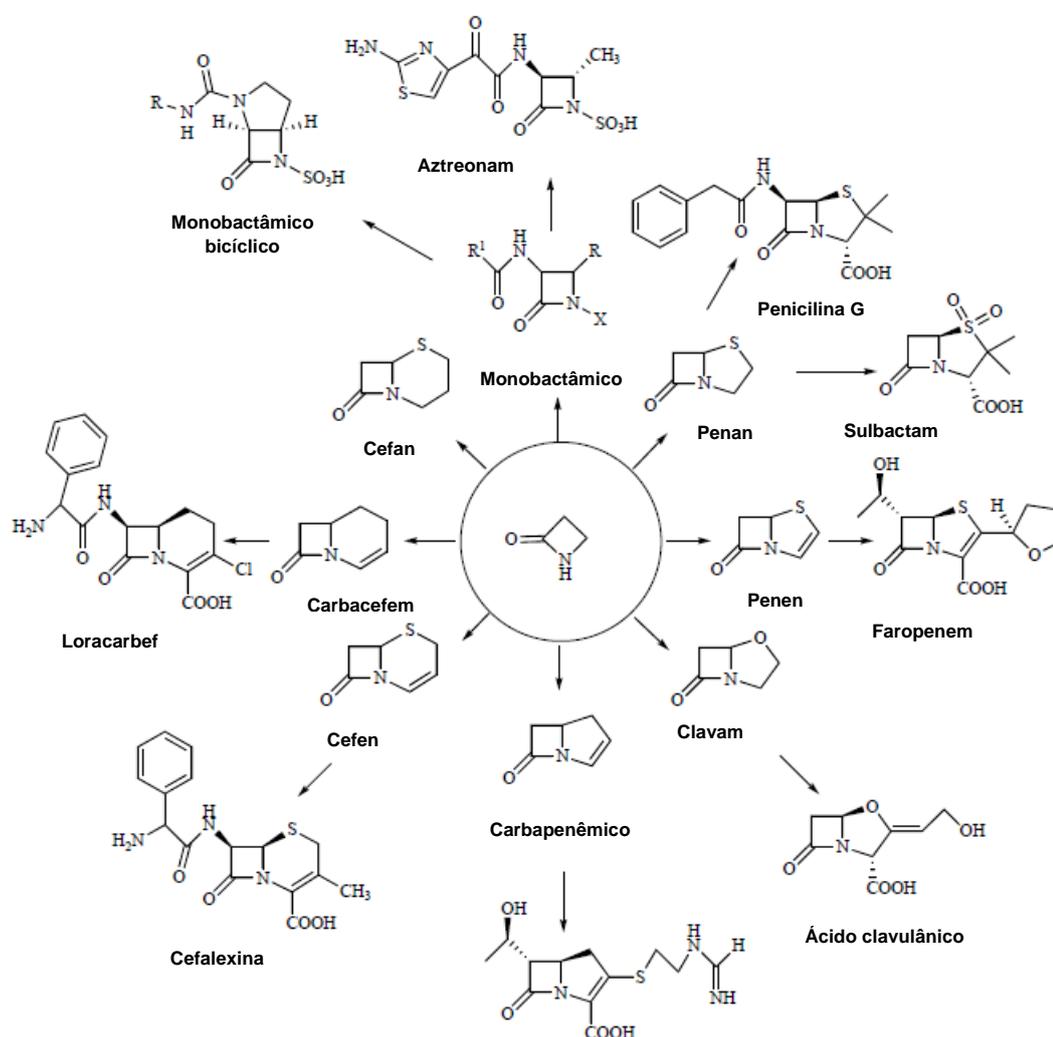


Figura 1. Principais estruturas dos antibióticos β -lactâmicos e inibidores de β -lactamases. Fonte: BIONDI et al., 2011.

Os β -lactâmicos inibem o crescimento do microrganismo interferindo na reação de transpeptidação da síntese da parede celular bacteriana (BUSH e JACOBY, 2010). A parede celular bacteriana é uma camada externa rígida que envolve por completo a membrana citoplasmática, tem como função manter a forma e a integridade celular, assim como impedir a sua lise em consequência da pressão osmótica. É constituída de um complexo polímero polissacarídeo e peptídeoglicano. O peptídeoglicano contém aminoaçúcares alternados, N-acetilglicosamina e ácido N-acetilmurâmico, ligados por pontes cruzadas de tetra ou pentapeptídeos, dependendo da espécie bacteriana (PETRI, 2005). Além disso, proteínas constitutivas importantes na biossíntese da parede celular podem ocorrer em várias espécies bacterianas e são chamadas de proteínas ligadoras de penicilinas (PBPs). Essas proteínas envolvidas nos estágios finais da síntese do peptídeoglicano atuam na alanina terminal no processo de formação de uma ligação cruzada com o peptídeo adjacente, conferindo à parede celular a sua rigidez estrutural (MASSOVA e MOBASHERY, 1998). Os antibióticos β -lactâmicos, análogos estruturais do substrato D-Ala-D-Ala, ligam-se covalentemente ao local ativo da PBP, inibindo a reação de transpeptidação, interrompendo a síntese de peptídeoglicano, promovendo a lise celular (CHAMBERS, 2010; PETRI, 2005; ZAMPARETTE, 2014).

A resistência aos β -lactâmicos acontece principalmente por quatro mecanismos: inativação do antibiótico por β -lactamases, modificação das PBP-alvo, alterações na permeabilidade da célula e por bombas de efluxo (BABIC et al., 2006; CHAMBERS, 2010; PETRI, 2005). A produção de β -lactamases é o mecanismo mais importante considerando-se as enterobactérias (KONG et al., 2010; NOGUEIRA, 2011).

2.3 Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos na família

Enterobacteriaceae

Existem três tipos principais de resistência aos antibióticos, resistência intrínseca, adquirida e adaptativa. A resistência intrínseca compreende todas as propriedades inerentes que limitam a ação dos antibióticos em um determinado microrganismo (FERNANDEZ e HANCOCK, 2012). Neste caso, todas as estirpes daquela espécie bacteriana serão igualmente resistentes (TENOVER, 2006).

Na resistência adquirida, microrganismos primariamente susceptíveis tornam-se resistentes pela incorporação de materiais genéticos por meio de plasmídeos (moléculas circulares de DNA dupla fita capazes de se reproduzir independentemente do DNA cromossômico), transposons (sequências de DNA capazes de se movimentar de uma região para outra no genoma de uma célula) e integrons (elementos genéticos que podem capturar e expressar genes de outras fontes) ou através das mutações (BAQUERO, 2001; FERNANDEZ e HANCOCK, 2012; FERNANDEZ et al., 2011).

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

A resistência adquirida é a mais preocupante, pois populações de bactérias inicialmente susceptíveis tornam-se resistentes a um agente antimicrobiano, proliferam-se e difundem-se sob a pressão seletiva promovida pela utilização desse

agente. Através deste mecanismo, muitas bactérias tornam-se resistentes a mais de uma classe de antibiótico, então chamadas de multidroga-resistentes (TENOVER, 2006). Este fato é especialmente alarmante em hospitais e outras instituições da saúde, onde pacientes podem sucumbir a um microrganismo multi-resistente, além de afetar o curso de outras doenças infecciosas coexistentes e aumentar o risco associado à imunossupressão e procedimentos médicos-hospitalar (LEVY e MARSHALL, 2004; MARTINEZ et al., 2009).

Quando a resistência adquirida se desenvolve em decorrência da seleção e mutação cromossômica é chamada de evolução vertical e a resistência que se desenvolve por recombinação de material genético a partir de outros organismos resistentes é denominada evolução horizontal (ANDERSSON e HUGHES, 2010; MARTINEZ et al., 2009). A recombinação desempenha um papel importante na transferência horizontal de genes (THOMAS e NIELSEN, 2005) e pode ocorrer através de vários mecanismos: transformação, conjugação e transdução (TENOVER, 2006). A primeira ocorre quando estirpes bacterianas susceptíveis adquirem e incorporam segmentos de DNA que carregam genes de resistência pertencentes a bactérias resistentes que sofreram lise celular. A segunda ocorre por meio da transferência de plasmídeos, transposons ou integrons, além de segmentos cromossômicos contendo genes de resistência entre microrganismos adjacentes. E a terceira acontece quando genes de resistência são transferidos de uma bactéria para outra através dos bacteriófagos (ANDERSSON e HUGHES, 2010; TENOVER, 2006).

Entre os principais mecanismos de resistência, estão a alteração de permeabilidade da membrana celular bacteriana, a alteração do sítio de ação, as bombas de efluxo e os mecanismos enzimáticos (Figura 2).

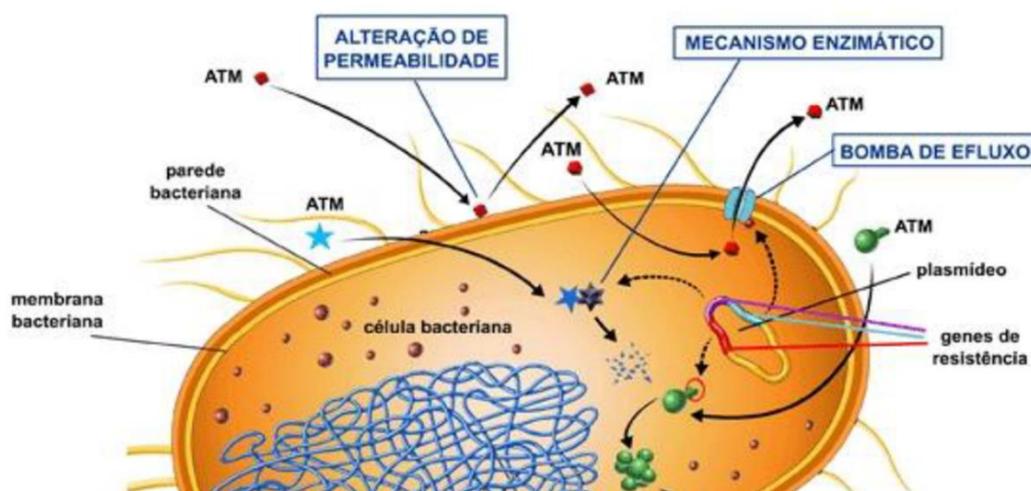


Figura 2. Mecanismos de resistência aos β -lactâmicos na família *Enterobacteriaceae*. Fonte: ANVISA, 2013a.

A alteração da permeabilidade da membrana celular externa das bactérias Gram-negativas, que é composta por polissacarídeos, ocorre pela presença de proteínas especiais denominadas porinas, que formam canais específicos pelos quais as substâncias podem passar para o espaço periplasmático e, em seguida, para o interior da célula. A permeabilidade reduzida é responsável pela resistência intrínseca dos bacilos Gram-negativos à penicilina, eritromicina, clindamicina e vancomicina (ANVISA, 2013a).

A alteração do sítio de ação no qual determinado antimicrobiano deveria atuar, impedindo a ocorrência de qualquer efeito inibitório ou bactericida, constitui um dos mais importantes mecanismos de resistência. As bactérias podem adquirir um gene que codifica um novo produto, resistente ao antibiótico, substituindo o alvo original. Assim, um gene transportado por plasmídeo ou por transposon codifica uma enzima que inativa os alvos ou altera a ligação dos antimicrobianos, como ocorre com eritromicina e clindamicina (ANVISA, 2013a).

Bombas de efluxo constituem um mecanismo de resistência por meio do bombeamento ativo de antimicrobianos do meio intracelular para o extracelular (ANVISA, 2013a), e demonstram potente habilidade de retirar os antibióticos β -lactâmicos, quinolonas e aminoglicosídeos do citoplasma plasmático, com consequente diminuição de sua concentração. O mecanismo de resistência bacteriano mais importante e frequente é a degradação do antimicrobiano por enzimas (ANVISA, 2013a), e a evolução ocorrida entre estas enzimas é resultado do uso excessivo de antimicrobianos e de sua pressão sobre o ambiente (PATERSON, 2006).

2.4 β -lactamases

A hidrólise dos antibióticos β -lactâmicos pela ação de β -lactamases é o mecanismo mais comum de resistência em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes. Isso porque essa classe de antibióticos é, geralmente, o tratamento de escolha para doenças infecciosas causadas por esses microrganismos e a expressão dessas enzimas é um impediante crítico na seleção da terapia medicamentosa (BUSH e JACOBY, 2010; ZAMPARETTE, 2014).

As β -lactamases possuem um parentesco estrutural com a PBPs que lhes permite ligar-se aos antibióticos, acilar e hidrolisar o anel β -lactâmico, inativando o fármaco (MASSOVA e MOBASHERY, 1998). O mecanismo de ação dessas enzimas se dá primeiramente com a ligação não covalente com o antibiótico. Então, o anel β -lactâmico se liga à enzima pela hidroxila livre na cadeia lateral de um resíduo de serina, formando uma ligação covalente acil-éster. A hidrólise do éster formado libera a enzima ativa e o fármaco é hidrolisado e inativado. A maioria das β -

lactamases utiliza a porção terminal do éster de serina para hidrolisar os β -lactâmicos, mas algumas β -lactamases utilizam íons de zinco (LIVERMORE, 1995).

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

Estas enzimas podem ser classificadas de acordo com as propriedades funcionais e moleculares. As taxas relativas de hidrólise dos substratos de β -lactâmicos de amplo espectro e perfis inibidores permitiram a classificação de novas β -lactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995).

A primeira classificação foi proposta por Jack e Richmond, em 1970 e foi expandida por Richmond e Sykes (LIVERMORE, 1995). Essa classificação era baseada no perfil do substrato de cada enzima, dividindo-as em cinco grupos principais (BUSH et al., 1995). Em 1980, Ambler propôs a primeira classificação molecular, quando apenas eram conhecidas sequências de quatro aminoácidos das β -lactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995). Nesta classificação, as β -lactamases são divididas em quatro grandes grupos, onde nos grupos A, C e D estão as serinas β -lactamases e no grupo B as enzimas que possuem íons de zinco na sua porção terminal, as metalo- β -lactamases (AMBLER, 1980; BUSH et al., 1995; LIVERMORE, 1995).

Em 1989, devido às deficiências das classificações existentes, Bush reorganizou a classificação das β -lactamases, correlacionando substrato e propriedades inibidoras com a estrutura molecular (BUSH, 1989). Essa classificação, de 1995 (BUSH et al., 1995), é a mais utilizada até hoje, e a última atualização foi feita em 2009 (Tabela 1) (BUSH e JACOBY, 2010).

Tabela 1. Classificação das β -lactamases.

Grupo Bush, Jacoby (2009)	Grupo Bush, Jacoby e Medeiros (1995)	Classe Molecular Ambler (sub-classes)	Substrato(s)	Inibição pelo		Definindo característica(s)	Enzima(s) Representativa(s)
				CAZ ou TCB ¹	EDTA		
1	1	C	Cefalosporinas	Não	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas do que benzilpenicilina; hidrólise de cefamicinas.	<i>E. coli</i> AmpC, P99, ACT-1, CMY-2, FOX- 1, MIR-1
1e	NI ²	C	Cefalosporinas	Não	Não	Hidrólise aumentada de ceftazidima e geralmente outros oximino- β -lactâmicos.	GC-1, CMY-3
2a	2 ^a	A	Penicilinas	Sim	Não	Maior hidrólise de benzilpenicilina do que cefalosporinas.	PC-1
2b	2b	A	Penicilinas, primeiras cefalosporinas	Sim	Não	Hidrólise similar de benzilpenicilina e cefalosporinas.	TEM-1, TEM-2, SHV-1
2be	2be	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactams	Sim	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β - lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepime, aztreonam).	TEM-3, SHV-2, CTX-M15, PER-1, VEB-1
2br	2br	A	Penicilinas	Não	Não	Resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.	TEM-30, SHV-10
2ber	NI	A	Cefalosporinas de espectro ampliado, monobactams	Não	Não	Hidrólise aumentada de oximino- β - lactâmicos combinado com resistência para ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam.	TEM-50
2c	2c	A	Carbenicilina	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina.	PSE-1, CARB-3
2ce	NI	A	Carbenicilina, cefepime	Sim	Não	Hidrólise aumentada de carbenicilina, cefepime e cefpiroma.	RTG-4
2d	2d	D	Cloxacilina	Variável	Não	Hidrólise aumentada de cloxacilina ou oxacilina.	OXA-1, OXA-10
2de	NI	D	Cefalosporinas de espectro ampliado	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e oximino- β -lactâmicos.	OXA-11, OXA-15
2df	NI	D	Carbapenens	Variável	Não	Hidrólise de cloxacilina ou oxacilina e carbapenens.	OXA-23, OXA-48
2e	2e	A	Cefalosporinas de espectro ampliado	Sim	Não	Hidrólise de cefalosporinas. Inibida pelo ácido clavulânico mas não aztreonam.	CepA
2f	2f	A	Carbapenens	Variável	Não	Hidrólise aumentada de carbapenens, oximino- β -lactâmicos, cefamicinas.	KPC-2, IMI-1, SME-1
3a	3	B (B1) B (B3)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise de espectro ampliado incluindo carbapenens mas não monobactams.	IMP-1, VIM-1, CcrA, IND-1 L1, CAU-1, GOB-1, FEZ-1
3b	3	B (2)	Carbapenens	Não	Sim	Hidrólise preferencial de carbapenens.	CphA, Sfh-1
NI	4	Desconhecido	Carbapenens	-	-	-	-

¹CAZ: Ácido clavulânico, TCB: Tazobactam, ²NI: não incluído. Fonte: BRADFORD, 2001.

No grupo 1 da classificação de Bush e Jacoby (2010) estão as cefalosporinases codificadas no cromossomo de muitas espécies de enterobactérias, as chamadas AmpC, pertencentes à classe C da classificação de Ambler. São mais ativas contra cefalosporinas e geralmente não são inibidas pelo ácido clavulânico (BUSH e JACOBY, 2010). No grupo 2 estão as serinas β -lactamases, incluindo as classes A e D de Ambler. Este é o maior grupo devido ao aumento de ESBLs. Este grupo está subdividido em 12 subgrupos. O subgrupo 2a representa um pequeno número de β -lactamases que apresentam atividade hidrolítica reduzida, chamadas penicilinas, comumente encontradas em cocos Gram-positivos. O subgrupo 2b compreende β -lactamases que hidrolisam penicilinas e cefalosporinas, são fortemente inibidas pelo ácido clavulânico e incluem as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1. O primeiro e grande subgrupo 2be corresponde às ESBLs, que mantém atividade contra penicilinas, oximino-cefalosporinas (ceftazidima, cefotaxima e aztreonam). Nesse grupo estão as ESBLs do tipo TEM, SHV, CTX-M. Estas enzimas geralmente são sensíveis ao ácido clavulânico, um recurso válido para detecção fenotípica em laboratórios clínicos (BUSH e JACOBY, 2010). Enzimas do subgrupo 2br (β -lactamases de espectro restrito) e do subgrupo 2ber (ESBL) são enzimas que não são inibidas pelo ácido clavulânico (BABIC et al., 2006).

As enzimas do subgrupo 2c hidrolisam carbenicilina ou ticarcilina tão rápido quanto benzilpenicilina, enquanto a cloxacilina ou oxacilina são hidrolisadas mais lentamente. Geralmente são inibidas pelo ácido clavulânico e tazobactam. O subgrupo 2ce foi descrito recentemente e possui atividade expandida contra cefepime e cefpiroma (BUSH e JACOBY, 2010). As β -lactamases do subgrupo 2d hidrolisam cloxacilina ou oxacilina melhor que a benzilpenicilina e, portanto, são

conhecidas como enzimas OXA. No subgrupo 2de estão as oxicilinases de espectro estendido, que inclui oximino-cefalosporinas, mas não carbapenêmicos. O novo subgrupo 2df são oxacilinases que hidrolisam carbapenêmicos e que foram divididas em nove grupos de acordo com a homologia de aminoácidos (BUSH e JACOBY, 2010). O subgrupo 2e compreende cefalosporinases com capacidade de hidrolisar cefalosporinas de amplo espectro e são inibidas por ácido clavulânico e tazobactam. Elas podem ser confundidas com o grupo das AmpCs ou ESBLs, porque podem ser encontradas nos mesmos microrganismos e apresentam perfis de resistência comparáveis. As serino carbapenemases da classe molecular A pertencem ao subgrupo 2f e os carbapenêmicos são os substratos distintos. São melhor inibidas pelo tazobactam (BUSH e JACOBY, 2010). O grupo 3 é representado pelas metallo- β -lactamases. Diferem-se estruturalmente das outras β -lactamases pela presença de um íon de zinco no sítio ativo. São distinguidas principalmente por hidrolisarem carbapenêmicos. Possuem pouca atividade hidrolítica contra os monobactâmicos e não são inibidas pelo ácido clavulânico ou pelo tazobactam, porém são inibidas pelo EDTA, ácido dipicolínico ou o-fenantrolina. São subdivididas estruturalmente em B1, B2 e B3 e funcionalmente em 3a e 3b (BUSH e JACOBY, 2010).

2.4.1 β -lactamases de espectro estendido (ESBL)

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

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

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

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

2.4.1.1 ESBL do tipo TEM

A primeira β -lactamase descrita foi a do tipo TEM, em 1965, em um isolado clínico de *E. coli*, em Atenas. Esta enzima foi denominada TEM-1 (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965), capaz de hidrolisar ampicilina em uma taxa maior que a carbenicilina, oxacilina ou cefalotina, e apresenta baixa atividade contra

cefalosporinas de amplo espectro. A enzima TEM-2 possui o mesmo perfil da primeira e todas as ESBL do tipo TEM são derivadas dela (LIVERMORE, 1995; PATERSON e BONOMO, 2005).

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

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

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

2.4.1.2 ESBL do tipo SHV

Em 1983, foi encontrada a primeira ESBL tipo SHV, a SHV-2. Foi descoberta em um isolado de *Klebsiella ozaenae*, na Alemanha. Possuía atividade contra cefotaxima e, em menor grau, contra ceftazidima (KNOTHE et al., 1983). O sequenciamento revelou que uma substituição de glicina por serina na posição 238 deu a esta enzima propriedades de espectro estendido, diferenciando-a da sua

progenitora SHV-1 (PATERSON e BONOMO, 2005). A SHV-1 é a enzima mais comumente encontrada em *K. pneumoniae* e está ligada a resistência intrínseca dessa bactéria à ampicilina (BRADFORD, 2001; LIVERMORE, 1995).

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

2.4.1.3 ESBL do tipo CTX-M

No mesmo período em que surgiram as ESBLs TEM e SHV, foram descritas enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido, porém apresentavam maior atividade contra a cefotaxima do que contra a ceftazidima, então, foram denominadas CTX-M (MATSUMOTO et al., 1988).

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

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

2.4.2 Enzimas β -lactamases do tipo Carbapenemase

As β -lactamases conhecidas como carbapenemases são codificadas por genes de origem cromossômica ou plasmidial. As carbapenemases de origem cromossômica são derivadas de genes SME, NMC e IMI e descritas nas espécies *Serratia marcescens* e *Enterobacter cloacae*. Já as carbapenemases de origem plasmidial são derivadas dos genes KPC e GES e descritas na espécie *K. pneumoniae*, mas também são encontradas em outras espécies da família *Enterobacteriaceae* (QUEENAN e BUSH, 2007).

As carbapenemases conferem resistência a todos os antibióticos β -lactâmicos: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos. Os carbapenêmicos são as drogas de escolha no tratamento de infecções graves por bactérias Gram-negativas multi-resistentes, tais como infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL (WOODFORD et al., 2004). Entre as carbapenemases, destacam-se as metalo- β -lactamases e as *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases.

2.4.2.1 Metallo- β -lactamase

As metalo- β -lactamases (MBL) pertencem ao grupo 3 de Bush e à classe molecular B de Ambler. Em 1991, elas foram descritas na espécie *P. aeruginosa*, pela primeira vez, e posteriormente em espécies da família *Enterobacteriaceae*, tais como *K. pneumoniae*, *S. marcescens*, *E. coli*, *E. cloacae* e *C. freundii* (QUEENAN e BUSH, 2007). Para esses mesmos autores, essas enzimas são resistentes às penicilinas, cefalosporinas e carbapenêmicos, não hidrolisam aztreonam, não são

inibidas por inibidores de β -lactamases, além disso, requerem íons Zn^{+2} ou outros cátions divalentes como cofator no sítio ativo e por isso, são inibidas por agentes quelantes, como o ácido etilenodiamino tetracético (EDTA).

Atualmente são conhecidas 5 subclasses: IMP (imipenemase) (WATANABE et al., 1991; OSANO et al., 1994), VIM (Verona imipenemase) (LAURETTI et al., 1999), SPM (São Paulo metalo- β -lactamase) (TOLEMAN et al., 2002), GIM (German imipenemase) (CASTANHEIRA et al., 2004) e SIM (Seoul imipenemase) (LEE et al., 2005).

Primeiro relato de MBL adquirida ocorreu em 1994 (OSANO et al., 1994), quando foi descrita uma nova subclasse denominada IMP-1. Essa enzima foi detectada em uma cepa clínica de *Serratia marcescens* isolada no Japão, a qual apresentava fenótipo de resistência a imipenem e cefalosporinas de espectro ampliado, e tem sido detectada em diferentes microrganismos, como *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* isolados de diferentes regiões geográficas (CHU et al., 2001; DA SILVA et al., 2002; DOCQUIER et al., 2003; IYOBE et al., 2002). O primeiro relato de uma MBL no continente americano ocorreu em 2002 por Gibb et al. (2002). Os autores descreveram a detecção de uma cepa de *P. aeruginosa* num hospital canadense que apresentava alto grau de resistência a ceftazidima e carbapenens.

Em 1999, a segunda subclasse de MBL adquirida descrita foi denominada VIM-1. A presença dessa enzima foi observada numa amostra de *P. aeruginosa* isolada em Verona, Itália (LAURETTI et al., 1999). As enzimas pertencentes a essa subclasse apresentam menor número de variantes atualmente descritas, bem como distribuição concentrada em determinadas regiões geográficas, quando comparadas às pertencentes à subclasse IMP (MENDES et al., 2006).

As variantes de VIM foram encontradas tanto em microrganismos fermentadores de glicose quanto naqueles não-fermentadores. Essas enzimas são mais prevalentes na Europa, região onde foi originariamente encontrada em 1999 (LAURETTI et al., 1999). Posteriormente houve diversos relatos dessas enzimas em microrganismos isolados em países da Comunidade Europeia (POIREL et al., 2004; WALSH et al., 2003). No entanto, variantes de VIM também foram relatadas na Ásia (YAN et al., 2001) e, mais recentemente, nos EUA (TOLEMAN et al., 2004), no Chile e na Venezuela (MENDES et al., 2004a).

A SPM-1, terceira subclasse de MBL adquirida, foi identificada em amostra de *P. aeruginosa* 48 -1997 recuperada do trato urinário de um paciente hospitalizado no complexo Hospital São Paulo, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Essa amostra bacteriana foi enviada ao programa SENTRY, que, em parceria com o laboratório *Bristol Centre for Antimicrobial Research and Evaluation* (BCARE), da Universidade de Bristol, Inglaterra, caracterizou esse novo determinante de resistência (TOLEMAN et al., 2004). 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 (GALES et al., 2003). Posteriormente, a mesma parceria avaliou cinco cepas de *P. aeruginosa* provenientes de Dusseldorf, Alemanha, encontrando uma nova e quarta subclasse de MBL adquirida, denominada GIM-1 (CASTANHEIRA et al., 2004).

Em estudo realizado em amostras bacterianas isoladas de pacientes internados no Hospital São Paulo durante os anos de 2002 e 2003, foi detectado o gene *bla*_{IMP-1} em sete *Acinetobacter* spp. e uma *P. aeruginosa* (CASTANHEIRA et al., 2003). Posteriormente, uma *P. aeruginosa* apresentando fenótipo de resistência a todos os β -lactâmicos, inclusive imipenem e meropenem, foi isolada de um

paciente internado no Hospital de Base de Brasília, em 2002. Estudos posteriores revelaram tratar-se da presença de uma nova variante de IMP, designada IMP-16 (MENDES et al., 2004a).

Uma amostra bacteriana de *Klebsiella pneumoniae*, isolada no Hospital Universitário da Universidade de São Paulo (HU/USP), foi caracterizada como produtora de IMP-1 (LINCOPAN et al., 2005). Este foi o primeiro relato de MBL adquirida em membros da família *Enterobacteriaceae* na América Latina. Entre 2003 e 2004 também foi evidenciada a primeira ocorrência de um surto hospitalar numa UTI causado por um clone de *K. pneumoniae* resistente a carbapenem e, mais tarde, testes moleculares confirmaram a presença do gene *bla*_{IMP-1} nessas amostras (MENDES et al., 2006). Além disso, uma amostra bacteriana de *P. aeruginosa* produtora de IMP-16 isolada de paciente internado no Hospital São Paulo e amostras bacterianas de *A. baumannii* produtoras de IMP-1 isoladas do Hospital do Servidor Público Estadual de São Paulo (HSPE) têm sido detectadas nos últimos anos (MENDES et al., 2006).

Em 2002, cinco isolados de *P. aeruginosa* multirresistentes foram obtidos de diferentes pacientes em Dusseldorf, Alemanha. Estes isolados foram provenientes do trato respiratório e apresentaram resistência a todos os antimicrobianos β -lactâmicos, aminoglicosídeos e quinolonas, sendo sensíveis apenas a polimixina B. (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008). Os testes fenotípicos indicaram a produção de MBL e a análise genotípica revelou um novo gene de MBL denominado *bla*_{GIM-1}, representando a quarta subclasse de MBL adquirida a ser identificada. GIM-1 possui amplo perfil de hidrólise, mas não possui substrato específico, e também não hidrolisa aztreonam e os inibidores de β -lactamases (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008).

Assim como a maioria dos genes que codificam as MBL, *bla*_{GIM-1} é encontrado em integron de classe 1, o qual contém, além desse gene, genes que codificam resistência aos aminoglicosídeos e um gene para a oxacilinase *bla*_{OXA-2} (CASTANHEIRA, 2004).

2.4.2.2 *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase

As *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases (KPC) pertencem ao grupo 2 de Bush e à classe molecular A de Ambler. Em 1996, a primeira KPC foi identificada na Carolina do Norte, EUA (YIGIT et al., 2001). No Brasil, o primeiro relato feito por Monteiro et al. (2009) faz a descrição de quatro casos de KPC no Recife.

Essas enzimas são resistentes às penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos e são fracamente inibidas por inibidores de β -lactamases (NORDMANN et al., 2009; YIGIT et al., 2001). Diante do aumento do número de casos de KPC em todo o mundo nos últimos anos, o *Control Laboratory Standard Institute* (CLSI) revisou os critérios de interpretação de susceptibilidade aos carbapenêmicos. Além disso, foi padronizado um método fenotípico confirmatório para detecção de carbapenemase em *Enterobacteriaceae*, com alta sensibilidade e especificidade (>90%) para carbapenemase do tipo KPC. A investigação de carbapenemases é recomendada para fins epidemiológicos ou para auxiliar o controle de infecções (CLSI, 2011).

2.5 Características gerais e epidemiologia de *Klebsiella pneumoniae* e

Enterobacter aerogenes

Klebsiella pneumoniae é um bastonete gram-negativo aeróbio facultativo, mas com melhor crescimento em condições aeróbias, imóvel, não esporulado, com 0,3 a 1µ de diâmetro e 0,6 a 6µ de comprimento, fermentador de glicose, não produtora de ácido sulfídrico (H₂S), capaz de crescer em meio contendo cianeto de potássio, utiliza o citrato como fonte única de carbono, produz colônias grandes e gomosas quando cultivado em placas com nutrientes, hidrolisa a ureia e apresenta-se como bactéria encapsulada (FARMER, 1999; MARTÍNEZ et al, 2004). É um importante causador de pneumonia adquirida na comunidade (KEYNAN e RUBINSTEIN, 2007; PODSCHUN e ULLMANN, 1998). No entanto, é um patógeno oportunista em ambientes hospitalares, responsáveis por infecções graves, principalmente em pacientes imunocomprometidos ou com doenças graves adjacentes como alcoolismo, diabetes mellitus e doença pulmonar obstrutiva crônica (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; SAHLY et al., 2008; SAHLY et al., 2004). Sua virulência está associada à presença de cápsula polissacarídica, sistema de captação de ferro, fenótipo mucóide e lipopolissacarídeo tóxico (SCARPATE e COSSATIS, 2009).

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

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

Estima-se que a prevalência de *K. pneumoniae* produtora de ESBL seja de 12% nos Estados Unidos, 33% na Europa, 28% na Ásia e 52% na América Latina. A maior preocupação, porém, está nas estirpes de *K. pneumoniae* produtoras de carbapenemases. A primeira *K. pneumoniae* produtora de carbapenemase (tipo KPC) foi isolada em 1996, nos EUA, mas hoje se encontra disseminada em vários países não só em *Klebsiella*, mas em várias espécies de enterobactérias e bacilos Gram-negativos não fermentadores (MUNOZ-PRICE et al., 2013). Mais recentemente foi descoberta uma nova carbapenemase, isolada primeiramente em *K. pneumoniae*, de um paciente que esteve em Nova Deli, Índia, chamada de NDM-1 (YONG et al., 2009) que rapidamente se espalhou para outros países (FUURSTED et al., 2012). No Brasil, a primeira NDM-1 foi isolada no Rio de Janeiro, em 2013, em *Providencia rettgeri* (CARVALHO-ASSEF et al., 2013).

O gênero *Enterobacter* spp. apresenta as características semelhantes à *Klebsiella* sobretudo em função das suas semelhanças filogenéticas e de virulência, apesar de suas espécies serem diferenciadas da maioria das espécies de *Klebsiella* por características como a imotilidade e positividade para o teste da ornitina (JASKULSKI, 2013; SRINIVASAN e PATEL, 2008). O gênero inclui 14 espécies que

são classificadas de acordo com as características bioquímicas e similaridades genômicas (BERTONA et al., 2005). *E. cloacae* e *E. aerogenes* são os patógenos mais comumente isolados, principalmente no ambiente hospitalar, afetando principalmente pacientes das Unidades de Terapia Intensiva (NOGUEIRA et al., 2006; PEREZ et al., 2012; SANDERS e SANDERS, 1997; ZAMPARETTE, 2014).

Fazem parte da microbiota entérica e são responsáveis por inúmeras infecções oportunistas que afetam as vias urinárias, a corrente sanguínea, o trato respiratório, as feridas cutâneas e, ocasionalmente, causam sepse e meningite (JASKULSKI, 2013; SRINIVASAN e PATEL, 2008; PEREZ et al., 2012).

Na América latina, o gênero *Enterobacter* ocupa o quinto lugar dentre os patógenos mais isolados em pacientes pediátricos (FLEDER et al., 2006). Por outro lado no Brasil, este gênero é responsável por 6 – 8,5% das infecções hospitalares em pacientes pertencentes à unidade de cuidados intensivos, sendo a terceira enterobactéria mais prevalente em infecções do trato urinário, tecidos moles e septicemias (SADER et al., 2001). A frequência de bacteremia causada por *Enterobacter* spp. pode chegar a 1 em cada mil admissões em hospitais universitários ou hospitais de nível terciário. Geralmente, a taxa de mortalidade em bacteremia associada a essa espécie é alta, podendo chegar de 20 a 35% dos casos (NOGUEIRA et al., 2009; SANDERS e SANDERS, 1997).

Embora estejam relacionados com infecções hospitalares, são muito menos isolados que outras enterobactérias (MCGOWAN, 1985). No entanto, surtos hospitalares com estirpes multi-resistentes de *Enterobacter* spp. estão se tornando cada vez mais frequentes (PEREZ et al., 2012).

Espécies de *Enterobacter* spp. principalmente de ambientes hospitalares, são altamente resistentes a várias classes de antibióticos (DAVIN-REGLI et al., 2008). O

principal mecanismo de resistência é a expressão de uma cefalosporinase, AmpC cromossomal, levando à falha terapêutica quando cefalosporinas de 3ª geração são administradas. Do mesmo modo que a frequência elevada na produção e expressão de ESBL tornou-se importante causa de resistência às cefalosporinas de amplo espectro (ZAMPARETTE, 2014). O mecanismo de barreira via mudança na permeabilidade da membrana através dos canais de porinas e a expressão de bombas de efluxo também contribuem para o aumento da resistência aos β -lactâmicos, incluindo os carbapenêmicos e outras classes de antibióticos como fluoroquinolonas e cloranfenicol (LAVIGNE et al., 2012; NIKAIDO, 2003; PAGES et al., 2008).

Do exposto, considerando-se a importância clínica das infecções oportunistas associadas à *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, sobretudo considerando-se isolados resistentes aos antimicrobianos e produtores de ESBL e carbapenemases, esse trabalho foi proposto. Pouco se sabe sobre as características fisiológicas e moleculares destas bactérias considerando-se linhagens resistentes a drogas com potencial no seu reflexo agressor.

Assim, as informações geradas poderão contribuir para a construção de bancos de dados para vigilância epidemiológica acerca da resistência bacteriana a drogas. O conhecimento da epidemiologia, dinâmica de disseminação e circulação de marcadores genéticos de resistência a drogas constitui um dado clínico relevante, pois possibilita a instauração de uma terapia antimicrobiana mais adequada, bem como a prevenção e desaceleração da perda gradativa desses fármacos do nosso arsenal terapêutico.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar aspectos fisiológicos e moleculares relacionados à virulência e resistência aos carbapenêmicos em *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes*, isolados pelo serviço de microbiologia clínica em um hospital terciário, na cidade de Juiz de Fora – Minas Gerais, durante o ano de 2012.

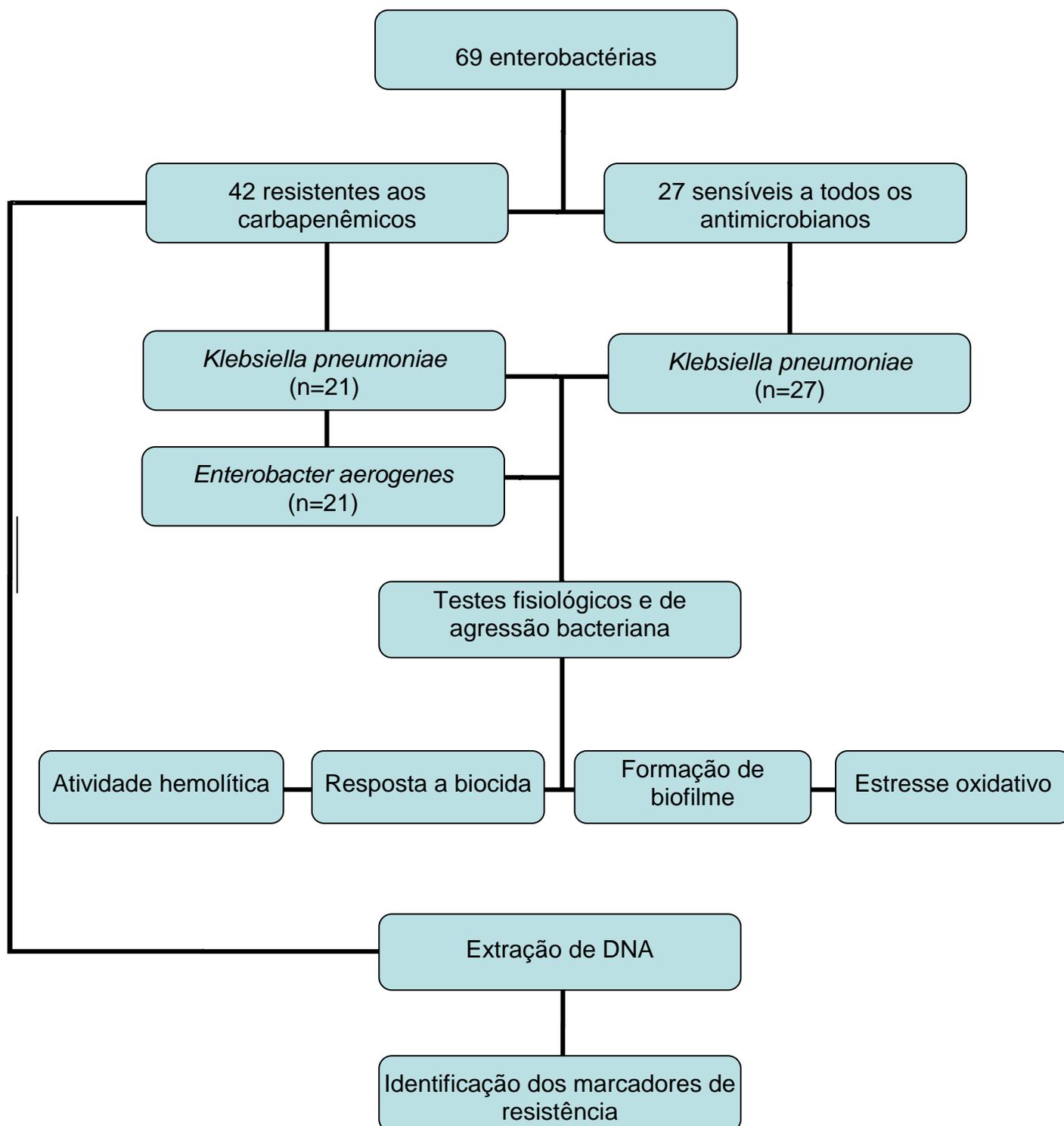
3.2 Objetivos específicos

- Avaliar as características clínicas epidemiológicas e perfil dos pacientes internados no hospital amostrado.
- Recuperar amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* isoladas de pacientes internados em um hospital terciário da cidade de Juiz de Fora, MG, cujo perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas indica resistência aos carbapenêmicos;
- Recuperar amostras de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* isoladas de pacientes internados em um hospital terciário da cidade de Juiz de Fora, MG, cujo perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas indica sensibilidade a todos os antimicrobianos;
- Avaliar o perfil de recuperação dos espécimes clínicos por tipo de amostra;

- Determinar o perfil de susceptibilidade aos biocidas de uso hospitalar (hipoclorito de sódio, quaternário de amônio, sabão antisséptico a base de triclosan e peróxido de hidrogênio) das bactérias isoladas resistentes ou não a carbapenêmicos;
- Avaliar características de virulência (atividade hemolítica, tolerância ao estresse oxidativo e capacidade de formação de biofilme) nas bactérias isoladas, resistentes ou não a carbapenêmicos;
- Pesquisar genes associados à expressão de β -lactamases (TEM, SHV, CTX-M, KPC, NDM, IMP, VIM, GIM, SIM e SPM);
- Correlacionar resistência múltipla aos antimicrobianos, detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência entre os microrganismos avaliados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Fluxograma de atividades



4.2 Isolamento das amostras bacterianas

Durante o período de Janeiro a Dezembro de 2012, foram processadas pelo serviço de microbiologia do Laboratório Côrtes Villela – Juiz de Fora – Minas Gerais, um total de 3437 espécimes clínicos de diferentes materiais biológicos proveniente de pacientes hospitalizados em um hospital terciário da cidade. As amostras clínicas foram semeadas em meios de cultura específicos (urina em ágar Cled/BD-Difco), secreção traqueal em ágar sangue e ágar (MacConkey/BD-Difco), cateter central e demais materiais biológicos em ágar sangue e caldo (Tioglicolato/BD-Difco), e incubadas a 35°C por até 48 horas em estufa bacteriológica, conforme manual da ANVISA (2013b).

Do total das amostras, 1076 tiveram culturas positivas, onde foram recuperadas 42 linhagens não-replicadas de *E. aerogenes* e *K. pneumoniae* resistentes ao imipenem e/ou meropenem e 27 *K. pneumoniae* sensíveis a todos antimicrobianos, que foram mantidas em ágar Muller Hinton (meio inclinado) a temperatura ambiente até a realização do estudo.

O hospital onde os pacientes avaliados nesta pesquisa estavam internados, conta com aproximadamente 120 leitos, incluindo unidade de terapia intensiva (adulto e neonatal), unidade coronariana, enfermarias e atendimento ambulatorial. Dispõe de serviços de clínicas especializadas e serviços de diagnóstico, com atendimento restrito à rede privada.

Este estudo encontra-se em conformidade com a legislação vigente sobre pesquisa científica envolvendo seres humanos (resolução CNS 196/96) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFJF (parecer 346/2011, protocolo 2587.327.2011) (Anexo 1).

4.3 Identificação bacteriana

A identificação das bactérias foi realizada a partir de culturas puras empregando sistema Vitek 2 Compact (BioMerieux/França), por meio do cartão GN, de acordo com as instruções do fabricante.

Para controle de qualidade, foi incluída a amostra de referência *Enterobacter cloacae* ATCC 700323 e *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666, de acordo com instruções do fabricante.

4.4 Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos

Para as enterobactérias isoladas foi determinado o perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas pelo método de disco-difusão, segundo recomendações do CLSI (2012), utilizando-se discos impregnados com as drogas. O critério utilizado para interpretação do halo de inibição para tigeciclina foi baseado nos protocolos da ANVISA (2013). Foram utilizados os seguintes antimicrobianos: amicacina (30µg), gentamicina (10µg), ciprofloxacina (5µg), sulfazotrim (25µg), tetraciclina (30µg) e tigeciclina (15µg). Os β-lactâmicos testados foram ampicilina-sulbactam (10/10µg), piperacilina/tazobactam (100/10µg), ertapenem (10µg), meropenem (10µg) e imipenem (10µg).

Após crescimento, a densidade das culturas bacterianas foi ajustada com a escala 0,5 de McFarland. Com o auxílio de um swab estéril, foi realizado inóculo por esgotamento na superfície da placa de ágar Mueller Hinton (BD-Difco) de forma a obter um crescimento confluyente. Os discos foram depositados sobre o meio e a leitura dos halos de inibição foi realizada após 24 horas de incubação a 35°C,

determinando-se o diâmetro do halo de inibição de crescimento bacteriano e comparando às tabelas de referência utilizadas. Para controle de qualidade foram incluídas as amostras de referência *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35218.

4.5 Detecção fenotípica da produção de carbapenemases

O teste de triagem empregado para detecção fenotípica de carbapenemases foi o teste de Hodge modificado, conforme recomendação de CLSI (2012). Uma suspensão equivalente à escala de 0,5 de McFarland de *E. coli* ATCC 25922 foi inoculado em placa de petri contendo ágar Muller Hinton (BD-Difco). A seguir, discos de ertapenem (10µg), imipenem (10µg) e meropenem (10µg) foram colocados sobre a placa e a partir dos mesmos, foram realizadas estrias das amostras suspeitas e dos controles. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 horas. Após este período, foram consideradas amostras positivas aquelas que apresentaram um achatamento do halo de inibição ao redor da estria da bactéria testada (Figura 3). O resultado é considerado presuntivo, pois necessita de confirmação de testes de biologia molecular, como o PCR.

Foram utilizadas como controle negativo e positivo, respectivamente, linhagens de *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706 e *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705.

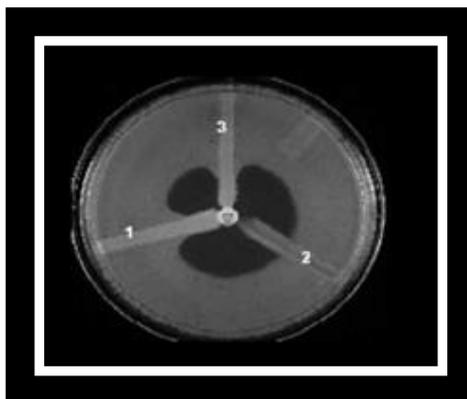


Figura 3. Teste de Hodge modificado empregando discos de ertapenem. (1) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1705, resultado positivo; (2) *K. pneumoniae* ATCC BAA 1706, resultado negativo; (3) isolado clínico, resultado positivo. Fonte: OLIVEIRA e CARDOSO, 2012.

4.6 Revisão dos prontuários dos pacientes

Os prontuários médicos dos pacientes com isolados de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos foram avaliados. Dados como idade, sexo, espécime clínico e mortalidade intra-hospitalar associada à infecção ou colonização por estes microrganismos foram considerados.

4.7 Avaliação fisiológica de habilidades bacterianas associadas à agressão

4.7.1 Avaliação da atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica foi realizada de acordo com metodologia descrita por Quiblier et al. (2011).

Suspensão bacteriana compatível com a escala 0,5 de McFarland de cada isolado bacteriano a ser testado foi transferida com auxílio de uma micropipeta automática, em um volume de 250µL, para replicador de Steers. As amostras foram tocadas à superfície de placas contendo ágar sangue (BD-Difco) suplementado com 5% de sangue de carneiro (Ebefarma), com o replicador de Steers. As placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após este período, foi avaliada a capacidade hemolítica do microrganismo, visualizada pela formação ou não do halo ao redor da colônia.

Linhagens de *K. pneumoniae* (n=27) sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo.

4.7.2 Avaliação da tolerância ao estresse oxidativo

O estudo da tolerância ao estresse oxidativo foi avaliado segundo metodologia proposta por Santos et al. (2007).

Pré-inóculos bacterianos foram obtidos em caldo *Tryptic Soy Broth* (TSB) (BD-Difco) (3ml) após serem cultivados por 24 horas, a 35°C. As culturas foram centrifugadas (6000 x g, 10min) em condições assépticas, e a massa celular lavada 3x em salina tamponada, para a remoção de resíduos do meio de cultura. Em seguida, as massas celulares foram suspensas em salina e a concentração bacteriana ajustada para 10⁸ UFC/mL (escala de MacFarland 0,5).

As suspensões bacterianas foram, então, uniformemente espalhadas sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton (BD-Difco), com o auxílio de um swab. Na sequência, um disco de papel filtro padronizado (Cecon) foi disposto no centro de cada placa e inoculado com 5µl de solução de peróxido de hidrogênio

20%. Após 24 e 48h de crescimento a 35°C, os halos de inibição gerados em torno dos discos de papel foram medidos.

Os testes foram realizados em duplicata. Linhagens de *K. pneumoniae* (n=27) sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo.

4.7.3 Teste de formação de biofilme em poliestireno

A formação de biofilme foi analisada de acordo com o método de Tendolkar et al. (2004) com pequenas alterações. Os isolados foram cultivados em caldo TSB e incubados a 35°C por 24 horas. As linhagens de *K. pneumoniae* (n=27) sensíveis a todos antibióticos testados foram usadas como controles negativo, sendo cultivadas sob as mesmas condições.

Após crescimento, 400µL da cultura foi diluída em tubos contendo 4mL do caldo TSB. Em uma placa de poliestireno de 96 poços de fundo chato foram pipetados 200µL da cultura de cada isolado, em quatro réplicas.

A placa foi incubada a 35°C por 24 horas. Em seguida, foi lavada cuidadosamente, por três vezes, com solução salina a 0,85% estéril (Arboreto – EUROFARMA LTDA - Brasil). Foi adicionado 300µl de metanol (Vetec – QUIMICA FINA LTDA - Brasil) em cada poço e a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente foram adicionados 250µl de corante cristal violeta a 0,1% (Newprov - Brasil) em cada poço e a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. A seguir, o cristal violeta foi aspirado, cada poço foi lavado cuidadosamente três vezes com solução salina 0,85%. Após aspirar a solução salina, foi adicionado 300µl de etanol-acetona (80:20, v/v) (Vetec). A placa

foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente e realizada leitura em leitor de Elisa (*Thermo Scientific*) com filtro de 596nm. Os valores obtidos foram usados para se determinar média aritmética de cada linhagem bacteriana.

4.7.4 Avaliação da susceptibilidade aos biocidas

O estudo da susceptibilidade aos biocidas foi realizado através de adaptação da metodologia da técnica disco-difusão preconizado pelo CLSI (2012).

Inóculos das amostras bacterianas estudadas foram obtidos seguindo o padrão de turbidez 0,5 da escala de MacFarland. As suspensões bacterianas foram, então, uniformemente espalhadas sobre a superfície de placas contendo ágar Mueller Hinton, com o auxílio de um swab. Na sequência, um disco de papel filtro padronizado (Cecon) foi disposto no centro de cada placa e inoculado com 5µl de solução de hipoclorito de sódio 1%, 1,5% e 2% (Start), quaternário de amônio (Rioquímica), sabão antisséptico (triclosan) (Suprimax) e peróxido de hidrogênio (Rioquímica), (concentrado e diluído 1:15, conforme instrução de uso do fabricante). Após 24 e 48h, de crescimento a 35°C, os halos de inibição gerados em torno dos discos de papel foram medidos.

Os testes foram realizados em duplicata. Linhagens de *K. pneumoniae* (n=27) sensíveis a todos os antimicrobianos, isoladas no mesmo período, foram utilizadas como controle negativo.

4.8 Extração de DNA bacteriano

Para a obtenção de DNA genômico, as amostras bacterianas foram cultivadas em TSB, por 24 horas, a 35°C. A seguir, 1mL da cultura foi utilizada para extração de DNA genômico total, usando-se o *Kit Wizard Genomic DNA Purification* (Promega Corporation, Madison WI, USA), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA foi estocado em freezer a -20°C, para posteriormente ser usado como DNA molde em PCR.

4.9 Identificação dos marcadores de β -lactamases por PCR

As análises por PCR foram realizadas utilizando oligoiniciadores específicos para amplificação de genes que codificam as enzimas ESBL (CTX-M, SHV e TEM), SPM-1, IMP, SIM, VIM, GIM, incluindo as carbapenemases (KPC e NDM-1) (Tabela 2).

Tabela 2. Oligoiniciadores utilizados e tamanhos dos fragmentos

GENES	SEQUÊNCIA (5'-3')	AMPLICONS (pb)	CONDIÇÕES DE AMPLIFICAÇÃO	REFERÊNCIAS	
<i>bla</i> CTX-M	F-5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAA G-3'	562	94°C, 7'; 35 x (94°C, 1'; 54°C, 45"; 72°C, 1'); 72°C, 1'	JONES et al., 2009	
	R-5'-GGT CAC CAG AAG GAG C-3'				
<i>bla</i> SHV	F-5'-CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC-3'	982	95°C, 5'; 35 x (95°C, 45'; 59°C, 45'; 72°C, 1'); 72°C, 1'		
	R-5'-TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC-3'				
<i>bla</i> TEM	F-5'-GTG CGC GGA ACC CCT ATT-3'	968	94°C, 4'; 30 x (94°C, 1'; 56°C, 1'; 72°C, 1'); 72°C, 5'		
	R-5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC-3'				
<i>bla</i> KPC	F-5'-ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT-3'	829	94°C, 4'; 30 x (94°C, 1'; 56°C, 1'; 72°C, 1'); 72°C, 5'		
	R-5'-TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC-3'				
SPM-1	F-5'-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3'	649			CLIMACO et al., 2010
	R-5'-TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3'				
IMP	F-5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3'	188			
	R-5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'				
SIM	F-5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G-3'	570	94°C, 5'; 36 x (94°C, 30"; 52°C, 40"; 72°C, 50"); 72°C, 5'	ELLINGTON et al., 2007	
	R-5'-TAA TGGC CTG TTC CCA TGT G-3'				
VIM	F-5'-GAT GGT GTTT GGT CGC ATA-3'	390			
	R-5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'				
GIM	F-5'-TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA-3'	477			
	R-5'-AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC-3'				
NDM-1	F-5'-GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC-3'	621		NORDMANN et al., 2009	
	R-5'-CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC-3'				

As reações foram realizadas em volumes de 25µL, contendo 1µL de DNA molde, 12,5µL de *Gotaq Green Master Mix 2X* (*Promega Corporation, Madison WI, USA*), 1µL dos iniciadores e 9,5µL de água ultra pura.

As reações foram realizadas em termociclador automatizado (*Bioer Genepro*) e os amplicons esperados foram observados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o marcador 1kb DNA ladder (*Life Technologies Inc., Gaithersburg, MD, USA*). O controle negativo foi realizado a partir de reações sem DNA molde, e como controle positivo para reações de KPC, SHV, CTX-M e TEM foram utilizadas amostras da nossa coleção (DIAS et al., 2013), cujos amplicons foram confirmados por sequenciamento. Para as demais reações foi realizado sequenciamento de amplicons selecionados numa amostragem de 10% das reações específicas de cada um dos marcadores. As reações de sequenciamento foram realizadas a partir dos produtos de PCR onde foram visualizados amplicons dos tamanhos esperados sem a visualização de amplificação inespecífica ou formação de dímeros de oligoiniciadores, por eletroforese capilar (Método de Sanger), utilizando uma plataforma ABI3130 (*Life Technologies*) na empresa Valid Biotecnologia.

4.10 **Análise estatística**

Os dados coletados foram tabulados pelo *Microsoft® Office® Excel* para análise estatística e disponibilizados em gráficos e tabelas. A variação na resposta aos testes de biofilme e agressão bacteriana, foi analisada pelo teste *T-student*, sendo considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$ (95%).

A análise da correlação entre resistência múltipla aos antimicrobianos, detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência entre os microrganismos, foi avaliada calculando-se o *odds ratio* (OR) (BLAND e ALTMAN, 2000). Valor de OR igual a 1 indica que a condição sob estudo é igualmente

provável de ocorrer nos dois grupos. OR maior do que 1 indica que a condição tem maior probabilidade de ocorrer no primeiro grupo, e valor de OR menor do que 1 indica que a probabilidade é menor no primeiro grupo do que no segundo.

5 RESULTADOS

5.1 Isolamento das amostras bacterianas

No período entre Janeiro a Dezembro de 2012 foram recuperadas 42 linhagens bacterianas não replicadas de *Klebsiella pneumoniae* (n=21) e *Enterobacter aerogenes* (n=21) resistentes aos carbapenêmicos, isoladas das amostras de urina, sangue, cateter central, lavado brônquico e aspirado traqueal. Do total de isolados estudados, 26 (61,9%) foram provenientes de pacientes internados em unidade de tratamento intensivo (UTI), 7 (16,7%) em enfermaria, 6 (14,3%) em unidade coronariana e 3 (7,1%) de pacientes ambulatoriais (Gráfico 1).

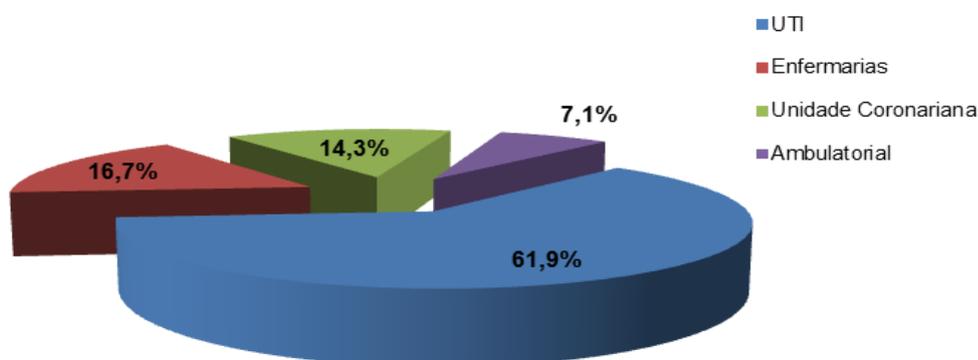


Gráfico 1. Frequência de distribuição dos pacientes por setor hospitalar.

A distribuição dos isolados por espécime clínico (Gráfico 2) demonstra que o material biológico de onde se isolou com maior frequência as bactérias de interesse foi urina 40,5%. Cateter central e sangue também exibiram elevada frequência: 26,2% e 16,7%, respectivamente.

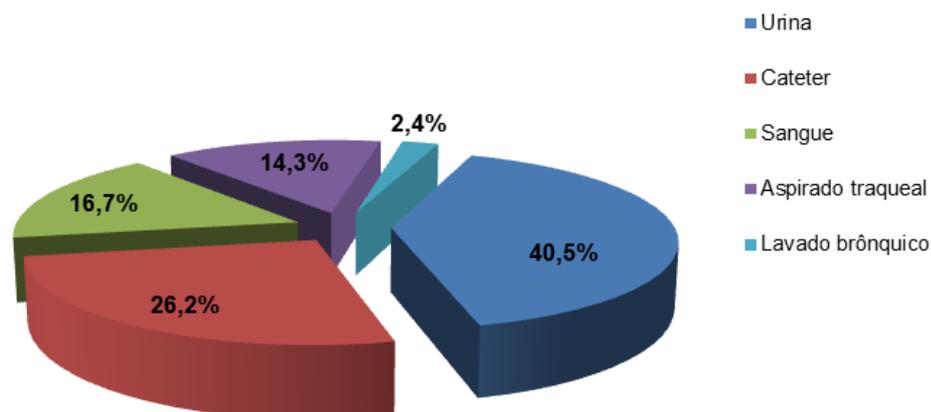


Gráfico 2. Frequência de distribuição dos espécimes clínicos.

Em relação à distribuição percentual por sexo dos pacientes avaliados no presente estudo, oriundos dos diversos setores hospitalares analisados observou-se que 57,1% eram do sexo masculino e 42,9% do sexo feminino. A média de idade dos pacientes que apresentaram infecção por microrganismos resistente aos carbapenêmicos foi de 72,6 ($\pm 20,8$) anos (variação de 23-97 anos). A distribuição dos pacientes por grupos etários pode ser analisada no gráfico 3.

O índice de mortalidade intra-hospitalar associada à infecção ou colonização por estes microrganismos foi de 81%.

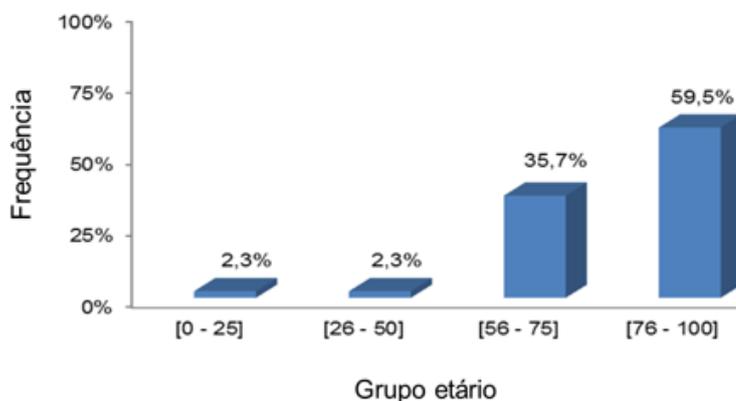


Gráfico 3. Distribuição por grupos etários dos pacientes infectados por *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* resistente aos carbapenêmicos durante o ano de 2012.

5.2 Perfil de susceptibilidade a drogas antimicrobianas

De maneira geral, a atividade antimicrobiana menos eficaz foi apresentada pelos antimicrobianos ciprofloxacina, nitrofurantoina e ampicilina/sulbactam com resistência bacteriana de 100%, piperacilina/tazobactam com 88%, gentamicina com 55%, tetraciclina com 47% e sulfazotrim com 31%. Os aminoglicosídeos amicacina e tigeciclina foram os antibióticos com menor percentagem de resistência, ambas em apenas 7% (Gráfico 4).

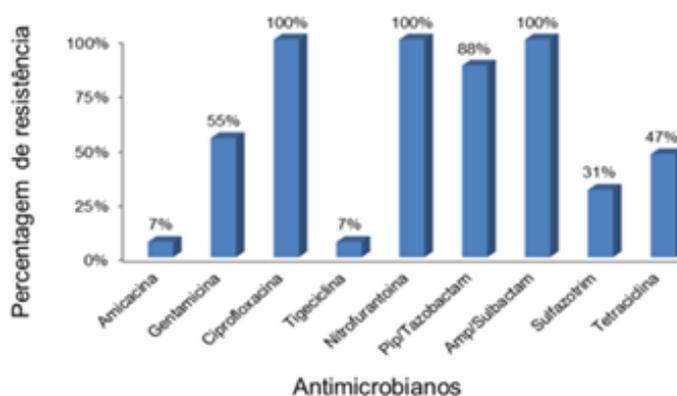


Gráfico 4. Perfil de susceptibilidade a antimicrobianos dos isolados de *K. pneumoniae* e *E. aerogenes* resistentes aos carbapenêmicos durante o ano de 2012.

Para todos os isolados avaliados, observaram-se altos níveis de resistência simultânea a dois ou mais antimicrobianos. Assim sendo, 2,4% apresentaram-se resistentes a dois antimicrobianos, 21,4% a três, 26,2% a quatro, 31% a cinco, 9,6% a seis e 9,5% a sete antimicrobianos, simultaneamente (Tabela 3).

Tabela 3. Distribuição dos fenótipos de resistência a diversos antimicrobianos de *K. pneumoniae* (n=21) e *E. aerogenes* (n=21)

Fenótipo de Resistência de <i>K. pneumoniae</i> e <i>E. aerogenes</i>							Números de amostras	
							N	%
CIP	PTZ						1	2,4
CIP	PTZ	GEN					9	21,4
CIP	SZT	NFT	GEN				2	4,8
CIP	PTZ	SZT	GEN				4	9,5
CIP	PTZ	SZT	TET				1	2,4
CIP	PTZ	SZT	SAM				4	9,5
CIP	PTZ	SZT	TET	GEN			1	2,4
CIP	PTZ	SZT	TET	SAM			3	7,1
CIP	PTZ	SZT	SAM	TEG			1	2,4
CIP	PTZ	SZT	NFT	TET			3	7,1
CIP	SZT	NFT	TET	SAM			1	2,4
CIP	PTZ	SZT	NFT	GEN			1	2,4
CIP	PTZ	SZT	GEN	AMK			1	2,4
CIP	PTZ	SZT	TET	GEN			2	4,8
CIP	PTZ	SZT	TET	SAM	AMK		1	2,4
CIP	PTZ	SZT	SZT	SAM	TGC		1	2,4
CIP	PTZ	SZT	NFT	TET	SAM		2	4,8
CIP	PTZ	NFT	TET	SAM	TGC	AMK	1	2,4
CIP	PTZ	SZT	SZT	TET	SAM	GEN	3	7,1

Legenda: CIP - ciprofloxacina, PTZ – piperacilina/tazobactam, NFT – nitrofurantoina, SAM – ampicilina/sulbactam, SZT – sulfazotrim, TET – tetraciclina, GEN – gentamicina e AMK – amicacina.

5.3 Testes fisiológicos de agressão bacteriana

5.3.1 Avaliação da atividade hemolítica

No presente estudo, nenhum dos microrganismos isolados demonstrou capacidade hemolítica aos eritrócitos do sangue de carneiro presente em meio de cultura (Figura 4).



Figura 4. Atividade hemolítica negativa em placa com ágar sangue de carneiro.

Fonte: Arquivo pessoal.

5.3.2 Estresse oxidativo

A avaliação da tolerância ao estresse oxidativo (Figura 5) das linhagens de bactérias isoladas a solução de peróxido de oxigênio demonstrou que o grupo de estudo (*K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos) apresentaram média do

halo de inibição menor em relação ao grupo controle (*K. pneumoniae* sensível a todos antimicrobianos), diferença considerada estatisticamente significativa quando aplicado o teste *T-student* (Tabela 4).

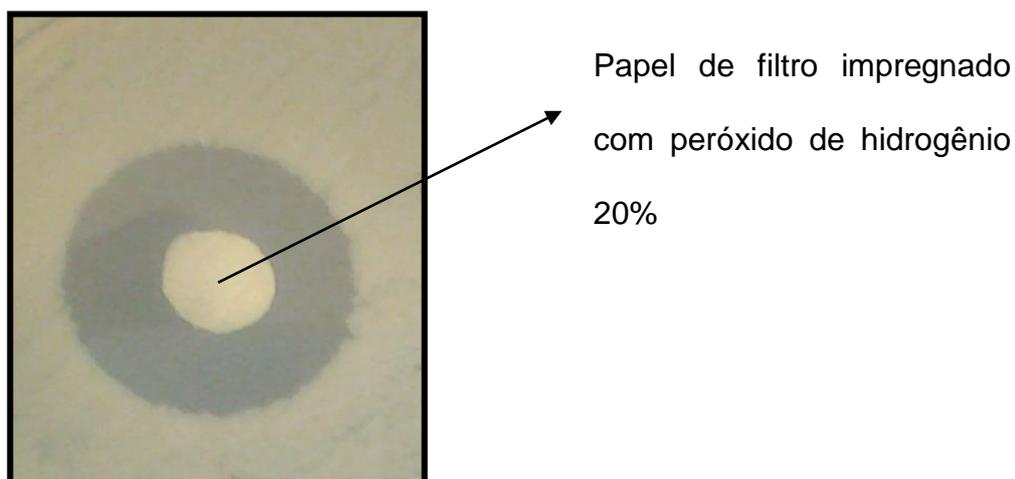


Figura 5. Teste de resposta ao estresse oxidativo.

Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 4. Perfil de avaliação da tolerância ao estresse oxidativo de *K. pneumoniae* resistente e sensível aos carbapenêmicos

Composto químico	Média do diâmetro do halo de inibição (mm)		Valor de p
	Grupo controle (n=27)	Grupo de estudo (n=21)	
Peróxido de hidrogênio a 20%	13.36 (±1.25)	12.93 (±0.77)	0.04

5.3.3 Avaliação da habilidade de formação de biofilme

O grupo de estudo apresentou maior número de células bacterianas coradas e agregadas a superfície da placa de poliestireno comparativamente ao grupo controle, diferença considerada estatisticamente significativa quando aplicado o teste *T-student* (Tabela 5).

Tabela 5. Perfil de habilidade de formação de biofilme de *K. pneumoniae* resistente e sensível aos carbapenêmicos

Densidade óptica	Quantidade de células coradas e fixas na superfície da placa		Valor de p
	Grupo controle (n=27)	Grupo de estudo (n=21)	
DO596nm	0.31 (± 0.12)	0.47 (± 0.16)	4.67×10^{-25}

5.3.4 Perfil de susceptibilidade aos biocidas

Na Tabela abaixo se observa que a maioria das variações dos halos de inibição foram altamente significativas ($p < 0,05$), excetuando peróxido de hidrogênio puro e sabão antisséptico (triclosan) em que não houveram diferenças significativas quando aplicado o teste *T-student* (Tabela 6).

Tabela 6. Avaliação da susceptibilidade aos biocidas entre isolados de *K. pneumoniae* resistente e sensível aos carbapenêmicos

Composto químico	Média do diâmetro do halo de inibição (mm)		Valor de p
	Grupo controle (n=27)	Grupo de estudo (n=21)	
Hipoclorito 1%	8,79 (±0,57)	4,83 (±4,72)	5,94 x 10 ⁻⁰⁷
Hipoclorito 1,5%	10,7 (±0,66)	7,95 (±03,74)	5,65 x 10 ⁻⁰⁶
Hipoclorito 2%	12,23 (±1,03)	11,12 (±1,88)	0,04
Quaternário de amônio	28 (±2,14)	24,39 (±2,42)	5,29 x 10 ⁻⁰⁶
Peróxido de hidrogênio diluído	0	0	-
Peróxido de hidrogênio puro	26,93 (±3,54)	24,93 (±2,46)	0,12
Sabão antisséptico (triclosan)	18,29 (±9,11)	14,31 (±14,20)	0,10

5.4 Caracterização dos genes de resistência

No presente trabalho, foram realizadas pesquisas dos principais marcadores genéticos de β -lactamase (TEM, SHV e CTX-M), metalo- β -lactamases (NDM, SPM, GIM e SIM) e carbapenemases (KPC) em 42 isolados resistentes aos carbapenêmicos obtidos durante o ano de 2012.

Entre os marcadores mais detectados, citam-se KPC (97,6%) e TEM (95,2%). Além disso, SHV e CTX-M também foram detectados, numa frequência de (69%) e (38,1%), respectivamente (Figuras 6 a 9). Não foram identificados nos isolados bacterianos marcadores para NDM, SPM, GIM, VIM e SIM.

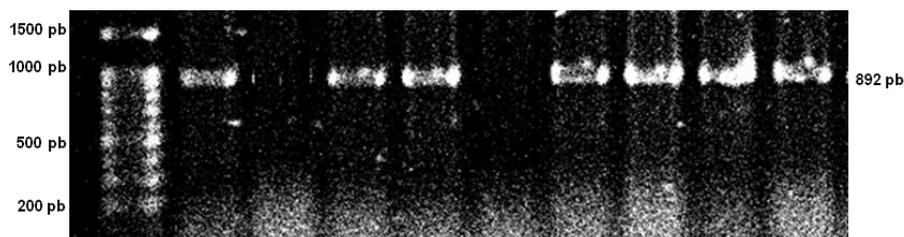


Figura 6: Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido *bla*_{KPC} (892pb) em enterobactérias. Fonte: Arquivo pessoal.

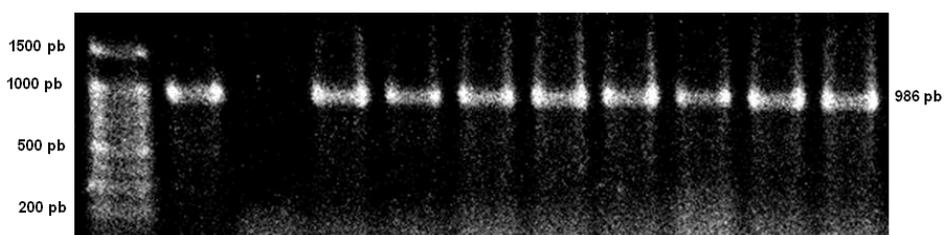


Figura 7: Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido *bla*_{TEM} (986pb) em enterobactérias. Fonte: Arquivo pessoal.

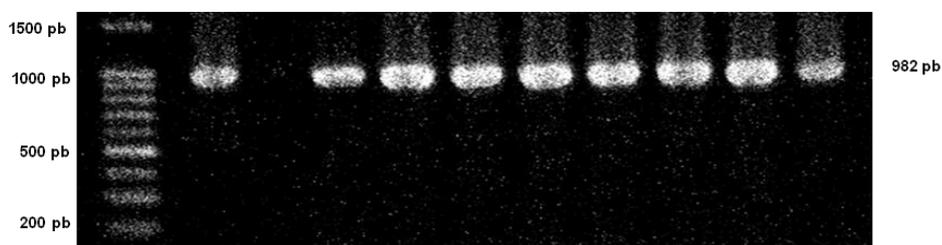


Figura 8: Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido *bla*_{SHV} (982pb) em enterobactérias. Fonte: Arquivo pessoal.

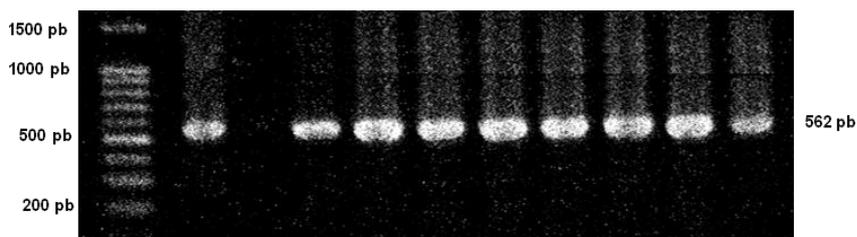


Figura 9: Eletroforegrama representativo da amplificação de segmento parcial do gene codificador para β -lactamase de espectro estendido *bla*_{CTX-M} (562pb) em enterobactérias. Fonte: Arquivo pessoal.

Os marcadores genéticos de resistência *bla*_{KPC} e *bla*_{TEM} foram observados em todos os isolados de *E. aerogenes*, tal como pode se observar na tabela 7.

O número de marcadores genéticos detectados por isolado clínico, variou de 1 a 4. Assim sendo, 2,4% dos isolados apresentaram 1 marcador, 23,8% apresentaram 2 marcadores, 45,2% apresentaram 3 e 28,6% apresentaram 4 marcadores pesquisados (Tabela 8).

Tabela 7. Frequência de detecção dos genes codificadores β -lactamase pesquisadas nas espécies bacterianas isoladas em 2012

Espécies bacterianas	Frequência de detecção n (%)			
	<i>bla</i> _{KPC}	<i>bla</i> _{TEM}	<i>bla</i> _{SHV}	<i>bla</i> _{CTX-M}
<i>K. pneumoniae</i> (n=21)	20 (95,2)	19 (90,5)	18 (85,7)	10 (47,6)
<i>E. aerogenes</i> (n=21)	21 (100)	21 (100)	11 (52,4)	6 (28,6)

Tabela 8. Perfil genotípico das bactérias resistentes aos carbapenêmicos, isoladas em 2012

Espécies bacterianas	Genótipo	Frequência de detecção n (%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=21)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	8 (38)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	9 (42,8)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	1 (4,8)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M}	1 (4,8)
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	1 (4,8)
	<i>bla</i> _{KPC}	1 (4,8)
<i>E. aerogenes</i> (n=21)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	4 (19,1)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	7 (33,3)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	2 (9,5)
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM}	8 (38,1)

5.5 Análise da correlação entre resistência múltipla aos antimicrobianos, detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência entre os microrganismos resistentes aos carbapenêmicos

A tabela 9, mostra que a correlação foi positiva entre detecção de marcadores genéticos de resistência e habilidade de formação de biofilmes, tolerância ao sabão antisséptico (triclosan), quaternário de amônio e todas as concentrações testadas do peróxido de hidrogênio.

Tabela 9. Odds ratio para associação de linhagens de *Klebsiella* com marcadores genéticos de resistência e fenótipos para fatores de virulência (formação de biofilme, estresse oxidativo e tolerância a biocida)

Microrganismo	OR (95% intervalo de confiança)							
	Formação de biofilme	Estresse oxidativo	Hipoclorito puro	Sabão (triclosan)	Quaternário de amônio	Hipoclorito de sódio (1%)	Hipoclorito de sódio (1,5%)	Hipoclorito de sódio (2%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=48)	18,50 (2,10-158,70)	0,25 (0,07-0,83)	0,74 (0,20-2,72)	1,6 (0,50-5,05)	1,42 (0,40-4,98)	1,85 (0,57-6,04)	3,52 (0,82-15,05)	2,50 (0,65-9,55)

6 DISCUSSÃO

A evolução constante observada nos microrganismos, inclusive nas bactérias, tem gerado uma diversidade de mecanismos de resistência, cujo objetivo é se adaptarem às diferentes pressões seletivas ocorridas no meio ambiente, seja ele intra ou extra-hospitalar (MUGNIER et al., 2010). O aumento de pacientes infectados por bactérias multi-resistentes aos antimicrobianos no ambiente hospitalar tornou-se um problema mundial de saúde pública. Estas infecções estão associadas as mais altas taxas de morbidade, mortalidade, bem como a internação mais prolongada e custos mais expressivos (HULSCHER et al., 2010). Em países da América Latina, a frequência destes isolados é ainda mais alta quando comparada à de países desenvolvidos, particularmente de bacilos Gram-negativos (GALES et al., 2012).

A disseminação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos está relacionada a diversos fatores, incluindo a característica da população e do hospedeiro (ZAMPARETTE, 2014). Apesar dos dados gerais mostrarem o predomínio dos pacientes portadores de infecções resistentes aos carbapenêmicos, nesta pesquisa, serem do sexo masculino (57,1%) e a urina (40,5%) ter sido o espécime clínico que mais frequente foi colhido, é importante mencionar que 70,6% das bactérias recuperadas de infecções do trato urinário foram isoladas de pacientes do sexo feminino. De acordo com Dias et al. (2013) o sexo feminino está intimamente associado à presença de fatores predisponentes: uretra mais curta e maior proximidade do ânus com o vestíbulo vaginal e uretra. No homem, maior comprimento uretral, maior fluxo urinário e o fator antibacteriano prostático desempenham papel protetor frente às infecções do trato urinário. Diante do exposto, considerando-se a epidemiologia e os fatores de risco associados, seria de

se esperar que neste estudo, o maior índice de bactérias resistentes aos carbapenêmicos estivesse relacionado a indivíduos predisponentes e com média de idade elevada, tivesse contribuído para elevada taxa de mortalidade intra-hospitalar observada no estudo. Patel et al. (2008) e Mouloudi et al. (2010) relataram taxas de mortalidade de 79% e 48% em infecções por KPC, respectivamente. Dados de Lopez et al. (2010) evidenciaram que um surto de KPC na Colômbia mostrou taxa de mortalidade de 63% entre os pacientes infectados.

A prevalência crescente de microrganismos resistentes aos carbapenêmicos é resultado do aumento nos últimos anos da dependência do uso destas drogas, que são consideradas opção para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multi-resistentes (LIVERMORE, 2012). O fato crucial decorrente da emergência aos carbapenêmicos consiste nas poucas alternativas terapêuticas de tratamento, que incluem colistina e tigeciclina (CUZON et al., 2013; LIVERMORE et al., 2011). Em nosso estudo foi observado alta frequência de sensibilidade frente à amicacina (93%) e baixa para gentamicina (45%). Dados literários afirmam que esta diferença de susceptibilidade para a mesma classe de antimicrobiano pode estar relacionada com a presença de enzimas específicas codificadas por genes carregados principalmente por integrons, o que determina a resistência direcionada para um tipo de aminoglicosídeo específico (MENDES et al., 2004b).

Neste estudo, o setor de internação que mais apresentou registros de infecções hospitalares foi a UTI (61,9%), corroborando com dados de outros pesquisadores (CCIH/HU, 2013; ECDC, 2013; BARROS et al., 2012; DAL-BÓ et al., 2012; PARUCKER, 2010; ROSENTHAL et al., 2010). A distribuição de bactérias multi-resistentes por espécime clínico, assim como dos microrganismos mais prevalentes em infecções hospitalares, pode variar de instituição para instituição,

região ou país. Por isso, ressalta-se a importância de estudos epidemiológicos locais para que se conheça a microbiota do ambiente e o perfil de susceptibilidade para que se tomem as medidas de controle e prevenção de infecções devidamente cabíveis a este local. Apesar da ocorrência frequente de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos em ambientes hospitalares, já existem evidências de sua emergência e disseminação na comunidade de forma esporádica, sem relação epidemiológica ou como surtos nosocomiais (PATERSON e BONOMO, 2005; PITOUT et al., 2005). Estudos recentes apontam clínicas de reabilitação e casas de repouso como reservatórios não hospitalares de enterobactérias portadoras de genes de resistência (DALMARCO et al., 2006). Os casos de infecção comunitária relacionam-se como fatores predisponentes além daqueles mencionados, diabetes mellitus e uso prévio de antibióticos (PATERSON e BONOMO, 2005). Pesquisas alertam para o aumento de casos, sobretudo na comunidade, de infecções bacterianas multi-resistentes, o que pode refletir em falha da terapia antimicrobiana e em desenvolvimento de quadros clínicos complicados com maior morbidade, além da disseminação de genes de resistência a esses antimicrobianos (MINARINI et al., 2007; DIAS et al., 2013).

A baixa sensibilidade dos microrganismos a droga, em especial aos carbapenêmicos não está apenas associada a produção de enzimas específicas, porém, os biofilmes bacterianos conferem importantes vantagens aos microrganismos como o caso da tolerância a desidratação, a oxidação, a ação dos desinfetantes e antibióticos (WOODFORD et al., 2011). Os nossos resultados mostram que os isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos, apresentam-se como mais tolerantes aos biocidas de uso intra-hospitalar e com maior habilidade de formar de biofilme em relação aos isolados sensíveis, o que

permite sugerir que existe uma correlação positiva entre resistência aos antimicrobianos, capacidade de formação de biofilme e tolerância a biocidas, o que faz com que estas bactérias tenham maior relação com a resistência/persistência hospitalar frente aos mecanismos de controle de população microbiana. Existe correlação entre habilidade de formação de biofilme e expressão de genes de virulência, como a hemolisina (SAFADI et al., 2012) e tolerância aos biocidas, pelo baixo alcance dos desinfetantes as bactérias nesta estrutura, favorecendo a colonização e persistência desses microrganismos no ambiente (CAPITA e ALONSO-CALLEJA, 2013; SHI e ZHU, 2009; VESTBY et al., 2009).

Os biofilmes são comunidades microbianas complexas que se aderem a superfícies bióticas ou abióticas, envoltas por matriz extracelular polimérica (STEENACKERS et al., 2012) e a diferença na sua arquitetura pode estar de alguma forma relacionada com a patogenicidade (NAVES et al., 2008; SANDAL et al., 2007). Acredita-se que as bactérias, inclusive *Klebsiella* spp., possuam uma alta capacidade de adesão e formação de biofilmes em superfícies de materiais hidrofóbicos, como plástico, material utilizado amplamente na confecção de equipamentos utilizados nas instituições hospitalares (STEENACKERS et al., 2012). Assim, pode-se formar um reservatório de patógenos nestas estruturas, aumentando o risco de contaminação na sua manipulação, levando a problemas de saúde pública e potencial impacto econômico (SHI e ZHU, 2009; STEENACKERS et al., 2012; VESTBY et al., 2009).

Em 1985 um estudo de Albesa et al. (1985) descreveu isolados de *K. pneumoniae* com atividade hemolítica em *Rabbit Bold Agar* mas sem atividade hemolítica para os eritrócitos humano. Posteriormente, vários estudos mostraram que esta hemolisina também tem um efeito hemolítico em células de carneiro, ratos

e humanos (BARBERIS et al., 1986; GUNDOGAN e YAKAR; 2007). No entanto, a hemolisina era codificada pelo gene *khe*, e o seu papel como fator de virulência em *K. pneumoniae* não se encontram plenamente estudados (BRAUN e FOCARETA, 1991; YIN-CHING et al., 2002), apesar de ainda na década de 80 Barberis e colaboradores (1986), terem descrito a detecção de duas frações protéicas com atividade hemolítica, com peso estimado 19000 Daltons e outra com 8400 Daltons em cromatografia, que foram denominadas de klebolisina. No presente estudo, não foi observado nenhum isolado com atividade hemolítica, considerando-se eritrócitos de carneiro, corroborando os resultados de Szramka et al. (1998) demonstrando que *Klebsiella* spp. possui atividade hemolítica seletiva.

Confrontando a pesquisa fenotípica com a genotípica de carbapenemases, verificou-se a presença de um isolado resultado falso positivo na pesquisa pelo método fenotípico, pois por PCR foi possível observar que 97,6% (41/42) dos isolados amplificaram para o marcador genético *bla_{KPC}*. Este resultado credibiliza o desempenho da metodologia analítica usada, tendo a PCR como parâmetro de confirmação e comparação. Geralmente, a resistência aos carbapenêmicos está associada à produção de carbapenemases, porém pode se dar por outros mecanismos, como a diminuição na expressão dos canais de porinas associada à produção de ESBL, produção de bombas de efluxo e outras enzimas com atividade hidrolítica frente aos carbapenêmicos (BRADFORD et al., 1997).

Nos Estados Unidos, o CDC reportou um crescimento significativo de enterobactérias resistentes aos carbapenêmicos de <1% em 2000 para 8% em 2007. Na Europa, os dados da EARS-Net mostram que na Grécia, a taxa foi de 68,2% em 2011 (PENA et al., 2014). O primeiro relato de linhagens produtoras de KPC no Brasil ocorreu somente em Janeiro de 2009. Os genes *bla_{KPC}* e *bla_{CTX-M}*

foram detectados em todas amostras analisadas (MONTEIRO et al., 2009). As amostras de *K. pneumoniae* em questão que apresentavam sensibilidade reduzida aos carbapenêmicos e produção da enzima KPC-2, também eram produtores de ESBL, mas não de metalo- β -lactamases (PEIRANO et al., 2009).

Durante a década de 1990, as ESBLs dominantes eram as do tipo TEM e SHV, associadas principalmente com clones epidêmicos em surtos hospitalares relacionados com enterobactérias (PATERSON e BONOMO, 2005). No entanto, no século XXI, ocorreu uma mudança na epidemiologia e o novo cenário incluiu o aumento do número de diferentes tipos de CTX-M, encontrados mais em enterobactérias e o reconhecimento de vários clones e elementos genéticos que carregam esse gene. Essa mudança ocorreu mais rapidamente na América Latina e Europa (CANTON e COQUE, 2006). A prevalência de ESBLs na Ásia de amostras intra-abdominais em 2002 era de aproximadamente 17% e em 2011 ultrapassou 40%. Na América Latina, em 2002, era 20% e em 2011 passou para 28%. Na Europa, a prevalência em 2002 girava em torno de 5% e em 2011 um pouco mais que 12%. E a América do Norte possui a menor prevalência, em 2002 era de 5% e em 2011 em torno de 8%. Além disso, as ESBLs tipo CTX-M foram as mais prevalentes, seguidas de SHV e TEM (SHENG et al., 2013). No Brasil, os estudos de prevalência de ESBL são escassos e as publicações são mais pontuais (PEREIRA et al., 2011). Um estudo realizado em um hospital público em São Paulo detectou o gene *bla*_{SHV} em 63% das amostras, 33,9% de *bla*_{CTX-M} e 17,3% de *bla*_{TEM} (DROPA et al., 2010). Dois anos mais tarde, Nogueira encontrou 24,02% de enterobactérias produtoras de ESBL em 1827 isolados provenientes de pacientes internados no Hospital de Clínicas da UFPR, em Curitiba. Dessas, 74,3% eram do tipo CTX-M, e 22% eram do tipo SHV (NOGUEIRA, 2011).

Os resultados obtidos em nosso estudo diferem dos dados publicados na literatura científica nacional e internacional, quando mostram a prevalência massiva de TEM em 95,2% dos isolados, SHV em 69% e CTX-M em 38,1%. Mas dados regionais observados por Minarini et al. (2007) e Dias et al. (2013) ao descreverem frequência de TEM (86,6%), SHV (59%) e CTX-M (31,4%), utilizando linhagens ESBL recuperadas de urinas de pacientes comunitários mostram similaridade aos resultados reportados em nosso estudo. Foi observado também em nosso estudo que 80% dos isolados eram produtores de ESBL, e uma prevalência de 41,1% em *K. pneumoniae* e 58,9% em *E. aerogenes*. Outro trabalho realizado em Curitiba encontrou ESBL em 24% dos isolados, e uma prevalência de 57,4% em *K. pneumoniae*, 21,4% em *K. oxytoca* e 7,2% em *E. coli* (NOGUEIRA et al., 2006). Por outro lado, em Passo Fundo foi encontrado 46,2% de *E. coli* produtoras de ESBL, seguida de 30,3% de *Enterobacter* spp. e apenas 2,4% de *Klebsiella* spp. (LAGO et al., 2010). Um estudo realizado em um hospital de Ribeirão Preto mostrou que 19,8% dos isolados de *K. pneumoniae* e 25,8% de *K. oxytoca* eram produtoras de ESBL, onde 90% desses isolados expressavam o gene *bla*_{TEM} e 39% das estirpes de *K. pneumoniae* expressaram a ESBL do tipo CTX-M (MINARINI et al., 2008).

Atualmente, é cada vez mais comum observar microrganismos produtores de ESBL que expressam outras β -lactamases. Alguns estudos relatam a expressão de β -lactamases TEM ou SHV no mesmo microrganismo que expressa CTX-M (CARATTOLI, 2009; OLIVEIRA e TAO, 2008; SHENG et al., 2013), outros, a coexistência de ESBL e AmpC (ANSSOUR et al., 2009; SHENG et al., 2013). Em 2011, Nogueira relatou a presença de duas ESBLs em uma mesma estirpe bacteriana, CTX-M-2 e CTX-M-9 (NOGUEIRA, 2011). Chagas e colaboradores (2011) observaram que em seu estudo 53% dos isolados coproduziam TEM, CTX-M

e SHV, e 47% CTX-M e TEM. Estas combinações podem potencialmente resultar num maior risco para o fracasso terapêutico (SHENG et al., 2013). Nesse sentido, não dá para relacionar apenas o *bla_{KPC}* com fenótipo de resistência aos carbapenêmicos e não se observou em nosso estudo, nenhum produto de amplificação utilizando os oligonucleotídeos iniciadores específicos para os marcadores genéticos *bla_{IMP}*, *bla_{NDM}*, *bla_{SIM}*, *bla_{VIM}*, *bla_{GIM}* e *bla_{SPM}*, o que permite inferir que estes marcadores até ao momento da realização deste estudo ainda não tinham sido evidenciados na região.

No Brasil, há poucos estudos sobre a correlação entre resistência múltipla aos antimicrobianos, detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência entre os microrganismos, entretanto algumas generalizações podem ser feitas. O nosso estudo evidenciou correlação ($OR > 1$) entre detecção de marcadores genéticos e presença de fatores de virulência, em especial a habilidade de formação de biofilme e tolerância a biocidas.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A elevada prevalência de genes de resistência observada neste estudo sinaliza um importante vetor clínico de determinante de resistência e um notório problema epidemiológico futuro. No geral, estes resultados são alarmantes, considerando a relevância clínica de enterobactérias e de *K. pneumoniae* em particular. Esta espécie, de fato, constitui um importante agente patogênico nosocomial conhecido pela sua capacidade de atuar como reservatório para uma variedade de plasmídeos de resistência, embora a atual difusão de genes *bla_{KPC}* em *E. aerogenes* mostra também que outras enterobactérias estão se tornando importantes reservatórios de determinantes de resistência.

Estudos adicionais serão necessários para definir outros mecanismos de resistência aos carbapenêmicos envolvidos e determinar outros genes associados aos observados nesta pesquisa, para que se possa estabelecer uma terapia apropriada e com novas estratégias para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas.

Assim, acreditamos que este estudo tem potencial para contribuir para o conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na resistência em bactérias *K. pneumoniae* e *E. aerogenes*, assim como dados epidemiológicos do hospital em estudo.

8 CONCLUSÕES

- A multi-resistência observada em todas as amostras bacterianas resistentes aos carbapenêmicos confirma a dificuldade de manejo terapêutico de pacientes com infecções associadas a estes microrganismos. Amicacina e tigeciclina podem representar opções terapêuticas para controle destas bactérias circulantes na macrorregião de Juiz de Fora, MG.
- O oportunismo das amostras de *Klebsiella* e *Enterobacter* resistentes aos carbapenêmicos pode ser evidenciado pelo perfil dos pacientes de onde estes microrganismos foram majoritariamente isolados – UTI, em amostras de urina.
- Os isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos são em geral mais resistentes aos biocidas de uso intra-hospitalar, com impactos diretos no controle epidemiológico destes microrganismos nos centros de saúde.
- A maior tolerância ao estresse oxidativo dos isolados de *K. pneumoniae* resistentes aos carbapenêmicos e maior habilidade de formação de biofilme em relação aos isolados sensíveis contribuem para o entendimento da sua persistência ambiental e desfecho das infecções associadas, considerando-se hospedeiros imunocomprometidos e a evolução das doenças infecciosas.
- Os mecanismos fisiológicos associados aos marcadores KPC, TEM, SHV e CTX-M podem ser os que mais contribuem para a resistência aos β -lactâmicos entre os microrganismos isolados.

- Existe correlação entre detecção de marcadores genéticos de resistência e ocorrência de fatores de virulência, especificamente a habilidade de formação do biofilme e tolerância aos biocidas.

9 REFERÊNCIAS

ALBESA, I.; BARBERIS, L.I.; PAJARO, M.C.; FARNOCHI, M.C.; ERASO, A.J. A thiol-activated hemolysin in gram-negative bacteria. **Can. J. Microbiol.**, v.31, p.297-300, 1985.

AMBLER, R.P. The structure of beta-lactamases. *Philos Trans R Soc Lond B. Biol. Sci.*, v.289, p.321-31, 1980.

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

ANSSOUR, L.; MESSAI, Y.; DERKAOUI, M.; ALOUACHE, S.; ESTEPA, V.; SOMALO, S.; TORRES, C.; BAKOUR, R. ESBL, plasmidic AmpC, and associated quinolone resistance determinants in coliforms isolated from hospital effluent: first report of qnrB2, qnrB9, qnrB19, and *bla* in Algeria. **J. Chemother.**, 2009.

ANVISA. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multi-resistentes. **Nota Técnica nº 1**, de 2013. Brasília, DF: 17 set. 2013a.

ANVISA. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção Relacionada à Assistência à Saúde: Módulo 6: Detecção e identificação de bactérias de importância médica.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1d5166804e2574a3b08db3c09d49251b/6++Detecção+e+identificação+de+bactérias+de+importância+médica..pdf?MOD=AJPERES>>. Acesso em: 01 dez. 2013b.

APPOLINÁRIO, R.S. Absenteísmo na equipe de enfermagem: análise da produção científica. **Rev. enferm. UERJ.**, 16: 83-7, 2008.

BABIC, M.; HUJER, A.M.; BOMONO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Elsevier**, v. 10, p.1016-1032, 2006.

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

BARBERIS, L.I.; ERASO, A.J.; PAJARO, M.C.; ALBESA, I. Molecular weight determination and partial characterization of *Klebsiella pneumoniae* hemolysins. **Can. J. Microbiol.**, v.32, p.884-8, 1986.

BARROS, L.M.; BENTO, J.N.C.; CAETANO, J.A. Prevalência de micro-organismo e sensibilidade antimicrobiana de infecções hospitalares em unidade de terapia intensiva de hospital público no Brasil. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.33, n.33, p.429-435, 2012.

BERTONA, E.; RADICE, M.; RODRIGUEZ, C.H. Phenotypic and genotypic characterization of resistance to third-generation cephalosporins in *Enterobacter* spp. **Rev. Argent. Microbiol.**, v.37, n.4, p.203-208, 2005.

BERTONCHELI, C.M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo- β -lactamases. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 44, n. 4, 2008.

BERTRAND, X.; HOCQUET, D.; BOISSON, K.; SIEBOR, E.; PLE'SIAT, B.; TALON, D. Molecular epidemiology of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamase in a French university-affiliated hospital. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v.22, n.2, p.128-133, 2003.

BIONDI, S.; LONG, S.; PANUNZIO, M.; QIN, W.L. Current trends in beta-lactam based beta-lactamases inhibitors. **Curr. Med. Chem.**, v.18, n.27, p.4223-4236, 2011.

BLACK, J.A.; MOLAND, E.S.; THOMSON, K.S. AmpC disk test for detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamases in *Enterobacteriaceae* lacking chromosomal AmpC beta-lactamases. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, p.3110-3, 2005.

BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. 2000. Statistics Notes: The odds ratio. **BMJ**. 320 (7247): 1468.

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

BRADFORD, P.A.; URBAN, C.; MARIANO, N.; PROJAN, S.J.; RAHAL, J.J.; BUSH, K. Imipenem Resistance in *Klebsiella pneumoniae* Is Associated with the Combination of ACT-1, a Plasmid-Mediated AmpC b-Lactamase, and the Loss of an Outer Membrane Protein. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.41, n.3, p.563-569, 1997.

BRASIL. Portaria nº 2616 de 12 de maio de 1998. Diretrizes e normas para prevenção e controle das infecções hospitalares. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 13 de maio de 1998.

BRAUN, V.; FOCARETA, T. Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). **Crit. Rev. Microbiol.**, v.18, p.115-58, 1991.

BROWN, N.G.; SHANKER, S.; PRASAD, B.V.V.; PALZKILL, T. Structural and biochemical evidence that a TEM-1 beta-lactamase N170G active site mutant acts via substrate-assisted catalysis. **J. Biol. Chem.**, v.284, n.48, p.33703-33712, 2009.

BUSH, K. Excitement in the β -lactamases arena. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.24, p.831–836, 1989.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated Functional Classification of Beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.39, p.1211-1233, 1995.

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

CAPITA, R.; ALONSO-CALLEJA, C. Antibiotic-resistant bacteria: a challenge for the food industry. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.53, n.1, p.11–48, 2013.

CASTANHEIRA, M.; TOLEMAN, M.; JONES, R.N.; SCHMIDT, F.J.; WALSH, T.R. Molecular characterization of a β -lactamase gene, blaGIM-1, encoding a new subclass of metallo- β -lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.12, p.4654-4661, 2004.

CASTANHEIRA, M.; MENDES, R.E.; MURPHY, T.; TOLEMAN, M.; SADER, H.S.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. Characterization of mobile elements carrying metallo- β -lactamase genes, blaIMP-1, blaIMP-16, blaSPM-1, blaVIM-2 from Latin American Medical Centers: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **43rd Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, n. C2-2023, p.153, 2003.

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

CARVALHO-ASSEF, A.P.; PEREIRA, P.S.; ALBANO, R.M.; BERIÃO, G.C.; CHAGAS, T.P.G.; TIMM, L.N.; Da SILVA, R.C.F.; FALCI, D.R.; ASENSI, M.D. Isolation of NDM-producing *Providencia rettgeri* in Brazil. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.68, n.12, p.2956-2957, 2013.

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

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

CHAGAS, T.P.G.; ALVES, R.M.; VALLIM, D.C.; SEKI, L.M.; CAMPOS, L.C.; ASENSI, M.D. Diversity of genotypes in CTX-M-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in different hospitals in Brazil. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.15, n.5, p.420-425, 2011.

CHAMBERS, H.F. Antibióticos beta-lactâmicos e outros antibióticos ativos na parede celular e membrana celular. In: KATZUNG (Ed.). *Farmacologia Básica e Clínica*. 10ª São Paulo: **Amgh.**, v. p.654-670, 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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.45, n.3, p.710-4, 2001.

CLÍMACO, E.C.; MINARINI, L.A.; DA COSTA, D.A.L. CTX-M-producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.**, v.68, n.2, p.186-9, 2010.

CLINICAL AND LABORATORIAL STANDARDS INSTITUTE. M100 – S21. **Performance standard for antimicrobial susceptibility testing: 21nd information supplement.** Wayne, PA: 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. M100 - S21. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement.** Wayne, PA: CLSI; 2012.

CUZON, G.; NAAS, T.; CORREA, A.; QUINN, J.P.; VILLEGAS, M.V.; NORDMANN P. Dissemination of the KPC-2 carbapenemase in non-*Klebsiella pneumoniae* enterobacterial isolates from Colombia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.42, p. 59– 62, 2013.

DA SILVA, G.; CORREIA, M.; VITAL, C.; RIBEIRO, G.; SOUSA, J.C.; LEITÃO, R.; PEIXE, L.; DUARTE, A. Molecular characterization of *bla*IMP-5, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from an *Acinetobacter baumannii* nosocomial isolate in Portugal. **FEMS Microbiol Lett.**, v.215, n.1, p.33-9, 2002.

DAL-BÓ, K.; SILVA, R.M.; SAKAE, T.M. Infecção hospitalar em uma unidade de terapia intensiva neonatal do Sul do Brasil. **Ver. Bras. Ter. Intensiva.**, v.24, n.4, p.381-385, 2012.

DALMARCO, E.M.; BLATT, S.L.; CÓRDOVA, C.M. Identificação laboratorial de β -lactamases de Espectro Estendido (ESBL) - Revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.38, n.3, p.171-177, 2006.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v.208, p.239-41, 1965.

DAVIN-REGLI, A.; JEAN-MICHEL, B.; CHLOE, E.J.; JEAN-PHILIPPE, L.; JACQUELINE, C.; ERIC, G.; ALEXANDER, M.; JEAN-MARIE, P. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. **Curr. Drug. Targets**, v.9, n.9, p.750-759, 2008.

DAVIS, T.J.; MATSEN, J.M. Prevalence and characteristics of *Klebsiella* species: relation to association with a hospital environment. **J. Infect. Dis.**, v.130, n.4, p.402-405, 1974.

DE CHAMPS, C.; ROUBY, D.; GUELON, D.; SIROT, J.; SIROT, D.; BEYTOUT, D.; GOURGAND, J.M. A case-control study of an outbreak of infections caused by *Klebsiella pneumoniae* strains producing CTX-1 (TEM-3) beta-lactamase. **J. Hosp. Infect.**, v.18, n.1, p.5-13, 1991.

DIAS, V.C.; SILVA, V.L.; BARROS, R.; BASTOS, A.N.; BASTOS, L.Q.L.; BASTOS, V.Q.A.; DINIZ, C.G. Phenotypic and genotypic evaluation of beta-lactamases (ESBL and KPC) among enterobacteria isolated from community-acquired monomicrobial urinary tract infections. **Antimicrobial Original Research**, 2013.

DOCQUIER, J.D.; RICCIO, M.L.; MUGNAIOLI, C.; LUZZARO, ENDIMIANI, A.; TONIOLO, A.; AMICOSANTE, G.; ROSSOLINI, G.G. IMP-12, a new plasmid-encoded metallo- β -lactamase from a *Pseudomonas putida* clinical isolate. **Antimicrob Agents Chemother.**, v. 47, n. 5, p. 1522-8, 2003.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L.C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; CASSETTARI, V.C.; MATTE, G.R.; MATTE, M.H. Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the

novel extended-spectrum beta-lactamase gene variants *bla*(SHV-40), *bla*(TEM-116) and the class 1 integron-associated *bla*(GES-7) in Brazil. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.16, n.6, p.630-2, 2010.

DU, B.; LONG, Y.; LIU, H.; CHEN, D.; LIU, D.; XU, Y.; XIE, X. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* bloodstream infection: risk factors and clinical outcome. **Intensive Care Med.**, v.28, n.12, p.1718-1723, 2002.

ELLINGTON, M.J.; KISTLER, J.; LIVERMORE, D.M.; WOODFORD, N. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo-beta-lactamases. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.59, n.2, p.321-322, 2007.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Point prevalence survey of health care associated infections and antimicrobial use in European acute care hospitals: 2011-2012.** Disponível em: <<http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/healthcare-associated-infections-antimicrobial-use-PPS.pdf>>. Acesso em: 29 dez. 2013.

FARMER, J.J. III. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: MURRAY, P.R.; BARON, E.J.; PFALLER, M.A.; TENOVER, F.C.; YOLKEN, R.H. Editors. **Manual of clinical microbiology.** 7th ed. Washinton, DC: ASM Press. p.442-58, 1999.

FERNANDEZ, L.; BREIDENSTEIN, E.B.M.; HANCOCK, R.E.W. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. **Drug. Resist. Updat.**, v.14, n.1, p.1-21, 2011.

FERNANDEZ, L.; HANCOCK, R.E. Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.25, n.4, p.661-681, 2012.

FISHMAN, J.A. Infection in solid-organ transplant recipients. **The New England Journal of Medicine**, v.357, n.25, p.2601-2614, 2007.

FLEDER, K.A.; BIEDENBANCH, D.J.; JONES, R.N. Assessment of pathogen frequency and resistance patterns among pediatric patient isolates: report from the 2004 SENTRY Antimicrobial Surveillance Program on 3 continents. **Diagn Microbiol Infect Dis.**, v.56, n.4, p.427-36, 2006.

FUURSTED, K.; SCHØLER, L.; HANSEN, F.; DAM, K.; BOJER, M.S.; HAMMERUM, A.M.; DAGNÆS-HANSEN, F.; OLSEN, A.; JASEMIAN, Y.; STRUVE, C. Virulence of a *Klebsiella pneumoniae* strain carrying the New Delhi metallo-beta-lactamase-1 (NDM-1). **Microbes Infect.**, v.14, n.2, p.155-158, 2012.

GALDBART, J.O.; LEMANN, F.; AINOUZ, D.; FERON, P.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N.; BRANGER, C. TEM-24 extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacter aerogenes*: long-term clonal dissemination in French hospitals. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.6, n.6, p.316-323, 2000.

GALES, A.C.; CASTANHEIRAS, M.; JONES, R.M.; SADES, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance program (Latin America, 2008 – 2010). **Diagnostic Laboratory and Infectious Diseases**, v.73, n.4, p. 354-360, 2012.

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. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.52, n.4, p.699-702, 2003.

GIBB, A.P.; TRIBUDDHARAT, C.; MOORE, R.A.; LOUIE, T.J.; KRULICKI, W.; LIVERMORE, D.M.; PALEPOU, M.F.; WOODFORD, N. Nosocomial outbreak of carbapenem resistant *Pseudomonas aeruginosa* with a new *bla*IMP allele, *bla*IMP-7. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.46, n.1, p.255-8, 2002.

GUNDOGAN, N.; YAKAR, U.A. Siderofore production, serum resistance, hemolytic activity and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella* species isolated from milk and milk products. **Journal of Food Safety**, v.27. p. 251-264, 2007.

HUANG, Z.M.; MAO, P.H.; CHEN, Y.; WU, L.; WU, J. Study on the molecular epidemiology of SHV type beta-lactamase-encoding genes of multiple-drug-resistant. **Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi**, v.25, n.5, p.425-427, 2004.

HULSCHER, M.E.J.I.; GROL, R.P.T.M.; VAN DEER MEER, J.W.M. Antibiotic prescribing in hospitals: a social and a behavioral scientific approach. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 165-167, 2010.

IYOBE, S.; KUSADOKORO, H.; TAKAHASHI, A.; YOMODA, S.; OKUBO, T.; NAKAMURA, A.; O'HARA, k. Detection of a variant metallo- β -lactamase, IMP-10, from two unrelated strains of *Pseudomonas aeruginosa* and an *Alcaligenes xylosoxidans* strain. **Antimicrob Agents Chemother.**, v.46, n.6, p. 2014-6, 2002.

JASKULSKI, M.R. **Avaliação da presença de ESBL, carbapenemase do tipo KPC e porinas como mecanismo de resistência em cepas de *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp.** 2013. 132f. Tese (Doutorado em Medicina e Ciências da Saúde). Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A. Characterization and sequence analysis of ESBL-encoded genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, p.465-75, 2009.

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

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRUMHOLTZ, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, ceftiofur, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v.11, n.6, p.315-317, 1983.

KONG, K.F.; SCHNEPER, L.; MATHEE, K. Beta-lactam antibiotics: from antibiotic resistance to bacteriology. **APMIS**, v.118, n.1, p.1-36, 2010.

LAGO, A.; FUENTEFRIA, S.R.; FUENTEFRIA, D.B. Enterobactérias produtoras de ESBL em Passo Fundo, Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.4, p.430-434, 2010.

LAHEY CLINIC FOUNDATION. **Beta-Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes**. Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 05 jun. 2014.

LAURETTI, L.; RICCIO, M.L.; MAZZARIOL, A.; CORNAGLIA, G.; AMICOSANTE, G.; FONTANA, R.; ROSSOLINI, G.M. Cloning and characterization of blaVIM, a new integron-borne metallo- β -lactamase gene from *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.43, n.7, p.1584-1590, 1999.

LAVIGNE, J.P.; SOTTO, A.; NICOLAS-CHANOINE, M.H.; BOUZIGES, N.; BOURG, G.; DAVIN-REGLI, A.; PAGÈS, J.M. Membrane permeability, a pivotal function involved in antibiotic resistance and virulence in *Enterobacter aerogenes* clinical isolates. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.18, n.6, p.539-545, 2012.

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, blaSIM-1, in a class 1 integron from *Acinetobacter baumannii* clinical isolates from Korea. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.49, n.11, p.4485-4491, 2005.

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

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. **J. Clin. Microbiol.**, v.43, n.1, p.516-519, 2005.

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

LIVERMORE, D.M. Future directions with daptomycin. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.62, p. 41-49, 2008.

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

LIVERMORE, D.M.; WARNER, M.; MUSHTAQ, S.; DOUMITH, M.; ZHANG, J.; WOODFORD, N. What remains against carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*?

Evaluation chloramphenicol, ciprofloxacin, colistina, fosfomicin, mirociclina, nitrofurantoin, temocilin and tigecyclina. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.37, n.5, p.415-459, 2011.

LOPEZ, J.; CORREA, A.; NAVON-VENEZIA, S.; CORREA, A.; TORRES, J.; BRICENO, D.; MONTEALEGRE, M.; QUINN, J.; CARMELI, Y.; VILLEGAS, M. Intercontinental spread from Israel to Colombia of a KPC-3-producing *Klebsiella pneumoniae* strain. **Clinical microbiology and infection**, v.17, n.1, p.52-56, 2010.

MARTINEZ, J.L.; FAJARDO, A.; GARMENDIA, L.; HERNANDEZ, A.; LINARES, J.F.; MARTÍNEZ-SOLANO, L.; SÁNCHEZ, M.B. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiol. Rev.**, v.33, n.1, p.44-65, 2009.

MARTÍNEZ, J.; MARTÍNEZ, L.; ROSENBLUETH, M.; SILVA, J.; MARTINEZ, R. How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy. **Intern. Microbiol.**, n.7, p.261-8, 2004.

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

MATSUMOTO, Y.; IKEDA, F.; KAMIMURA, T.; YOKOTA, Y.; MINE, Y. Novel plasmid-mediated beta-lactamase from *Escherichia coli* that inactivates oxyimino-cephalosporins. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.32, n.8, p.1243-1246, 1988.

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

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; PIGNATARI, A.C.C.; GALES, A.C. Metallo- β -lactamases. **J Bras Patol Med Lab**, v. 42, n. 2, p.103-113, 2006.

MENDES, R.E.; CASTANHEIRA, M.; GARCIA, P.; GUZMAN, M.; TOLEMAN, M.A.; WALSH, T.R.; JONES, R.N. First isolation of blaVIM-2 in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.4, p.1433-1434, 2004a.

MENDES, C.; KIFFER, C.; SEGURA, A.; RIBEIRO, J.; TURNER, P. *Klebsiella pneumoniae* with multiple antimicrobial resistance. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.8, n.1, p.109-11, 2004b.

MINARINI, L.A.; CLIMACO, E.C.; GUIMARAES, D.B.; FERREIRA, J.C.; PALAZZO, I.C.V.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Clonal transmission of ESBL-producing *Klebsiella* spp. at a university hospital in Brazil. **Curr. Microbiol.**, v.56, n.6, p.587-591, 2008.

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

MONTEIRO, J.; SANTOS, A.F.; ASENSI, M.D.; PEIRANO, G.; GALES, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.53, n.1, p.333-334, 2009.

MOULOUDI, E., PROTONOTARIOU, E.; ZAGORIANOU, A.; IOSIFIDIS, E.; KARAPANAGIOTOU, A.; GIASNETSOVA, T.; TSIOKA, A.; ROILIDES, E.; SOFIANOU, D.; GRITSI-GEROGIANNI, N. Bloodstream Infections Caused by Metallo- β -Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase-Producing *K.*

pneumoniae among Intensive Care Unit Patients in Greece: Risk Factors for Infection and Impact of Type of Resistance on Outcomes. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.31, n.12, p.1250-1256, 2010.

MUGNIER, P.D.; POIREL, L.; NAAS, T.; NORDMANN, P. Worldwide dissemination of the blaOXA-23 carbapenemases gene of *Acinetobacter baumannii*. **Emerg. Infect. Dis.**, 16:35-40, 2010.

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

NAAS, T.; CUZON, G.; VILLEGAS, M.V.; LARTIGUE, M.F.; QUINN, J.P.; NORDMANN, P. Genetic Structures at the Origin of Acquisition of the -Lactamase blaKPC Gene. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.52, n.4, p.1257–1263, 2008.

NAVES, P.; DEL PRADO, G.; HUELVES, L.; GRACIA, M.; RUIZ.; BLANCO, J.; DAHBI, G.; BLANCO, M.; PONTE, M.D.C.; SOPRIANO, F. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *E. coli* strains. **Microbial pathogenesis**, v.45, p.86-91, 2008.

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

NOGUEIRA, K.S. **Ocorrência de Beta-lactamases de Espectro Ampliado em Enterobactérias Isoladas em dois Hospitais Universitários**. 2005. 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná. Curitiba-PR, 2005.

NOGUEIRA, K.S. **Prevalência e Caracterização Molecular de Beta-lactamases de Espectro Ampliado (ESBL) em Enterobactérias isoladas no Hospital das Clínicas em Curitiba.** 2011. 167f. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

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. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.10, n.6, p.390-395, 2006.

NOGUEIRA, P.S.F.; MOURA, E.R.F.; COSTA, M.M.F.; MONTEIRO, W.M.S.; BRONDI, L. Perfil da Infecção Hospitalar de um Hospital Universitário. **Revista Enfermagem UERJ.**, v.17, n.1, p.96-101, 2009.

NORDMANN, P.; CUZON, G.; NASS, T. The real Threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria. **The Lancet Infection Diseases**, v.9, n.4, p. 228-236, 2009.

OLIVEIRA, M.V.; CARDOSO, A.M.A Importância da Detecção de Enterobactérias Produtoras de Carbapenemases pelo Teste de Hodge Modificado. **NewsLab** - Edição 113, 2012.

OLIVEIRA, R.M.; TAO, S.A. Controle de infecção hospitalar: histórico e papel do estado. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v.10, n.3, p.775-783, 2008.

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

OSANO, E.; ARAKAWA, Y.; WACHAROTAYANKUN, R.; OHTA, M.; HORII, T.; ITO, H.; YOSHIMURA, F.; KATO, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo- β -lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.38, n.1, p.71-78, 1994.

PAGANI, L.; MIGLIAVACCA, R.; ROSSOLINI, G.M. Emerging extended-spectrum beta-lactamases in *Proteus mirabilis*. **J. Clin. Microbiol.**, v.40, n.4, p.1549-1552, 2002.

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

PARUCKER, L.M.B.B. **Epidemiologia das Infecções relacionada à Assistência à Saúde na grande Florianópolis, com ênfase em *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli***. 2010. 177f. (Doutorado em Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

PATEL, G.; HUPRIKAR, S.; FACTOR, S.H.; JENKINS, S.G.; CALFEE, D.P. Outcomes of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* infection and the impact of antimicrobial and adjunctive therapies. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.12, p.1099-1106, 2008.

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

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

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; PASSOS, V.L.V.; PINTO, M.C.F.G.; 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**, 63(2): p. 265-268, 2009.

PELEG, A.; HOOPER, D.C. Hospital-acquired infection due to Gram negative bacteria. **The New England Journal of Medicine**, v.362, n.19, p.1804-1813, 2010.

PENA, I.; PICAZO, J.J.; AVIAL, R.C.; RODRÍGUEZ-AVIAL, I. Carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in a tertiary hospital in Madrid, Spain: high percentage of colistina resistance among VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 isolates. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.43, p. 460–464, 2014.

PEREIRA, G.H.; GARCIA, D.O.; MOSTARDEIRO, M.; OGASSAVARA, C.T.; LEVIN, A.S. Spread of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in São Paulo, Brazil. **Journal of Hospital Infection.**, v.79, p.172–188, 2011.

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

PETRI, W.A. Antimicrobianos: Penicilinas, Cefalosporinas e outros antibióticos beta-lactâmicos. In: GILMAN, GOODMAN. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10^a. Rio de Janeiro: **Mcgraw-hill.**, v.1, p.891-912, 2005.

PITOUT, J.D.; LAUPLAND, K.B.; JOHNSON, J.R. Emergence of *Enterobacteriaceae* producing extended-spectrum beta-lactamases (ESBLs) in the community. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.56, n.1, p.52-59, 2005.

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

POIREL, L.; MAGALHÃES, 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. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.4, p.1406-1409, 2004.

QUEENAN, A.M.; BUSH, K. Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. **Clinical Microbiology Review**, v. 20, p. 440-458, 2007.

QUIBLIER C.; ZINKERNAGEL, A.C.; SCHUEPBACH, R.A.; BERGER-BÄCHI, B.; SENN, M.A. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. **BMC Microbiology**, v.11, n.72, 2011.

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

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

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

SADER, H.S.; GALES, A.C.; PFALLER, M.A.; MENDES, R.E.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; JONES, R.N. Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian

hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Braz. J. Infect. Dis.**, v.5, n.4, p.200-14, 2001.

SAFADI, R.; ABU-ALI, G.S.; SLOUP, R.E.; RUDRIK, J.T.; WATERS, C.M.; EATON, K. A.; MANNING, S. D. Correlation between in vivo biofilm formation and virulence gene expression in *E. coli* o104:H4. **Plos ONE**, v.7, p.1-7, 2012.

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

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

SANDAL, I.; HONG, W.; SWORDS, W.E.; INZANA, T.J. Characterization and comparison of biofilm development by pathogenic and commensal isolates of *Histophilus somni*. **Journal of Bacteriology**, v.189, p. 8179-8185, 2007.

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

SANTOS, S.G.; DINIZ, C.G.; SILVA, V.L.; MARTINS, W.A.; CARA, D.C.; SOUZA, N.C.; SERUFO, J.C.; NICOLI, J.R.; CARVALHO, M.A.; FARIAS, L.M. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection gnotobiotic mice. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.289-297, 2007.

SCARPATE, E.C.B.; JOSÉ, J. A presença de *Klebsiella pneumoniae* produtora de beta-lactamase de espectro estendido no ambiente hospitalar. **Saúde e Ambiente**, v.4, n.1, p.1-11, 2009.

SELDEN, R.; LEE, S.; WANG, W. L.L.; BENNETT, V.J.; EICKHOFF, T.C. Nosocomial *klebsiella* infections: intestinal colonization as a reservoir. **Ann. Intern. Med.**, v.74, n.5, p.657-664, 1971.

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

SHI X.; ZHU, X. Biofilm formation and food safety in food industries. Trends in **Food Science & Technology**, v.20, n.9, p.407–13, 2009.

SOUGAKOFF, W., GOUSSARD, S.; GERBAUD, G.; COURVALIN, P. Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. **Rev. Infect. Dis.**, v.10, n.4, p.879-884, 1988.

SRINIVASAN, A.; PATEL, J.B. *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.29, n.12, p.1107-1109, 2008.

STEENACKERS, H.; HERMANS, K.; VANDERLEYDEN, J.; DE KEERSMAECKER, S.C.J. Salmonella biofilms: An overview on occurrence, structure, regulation and eradication. **Food Research International**, v.45, n.2, p.502–31, 2012.

SZRAMKA, B.; KURLEND, J.; BIELAWSKI, K. Hemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. **Med. Dosw. Mikrobiol.**, v.50, n.5, p.207-213, 1998.

TENDOLKAR, P.M.; BAGHDAYAN, A.S.; GILMORE, M.S.; SHANKAR, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect. Immun.**, v.72, p.6032–6039, 2004

TENOVER F.C.; Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. **American Journal of Infectious Control**, v.34, n.5, p.3-10, 2006.

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

TOLEMAN, M.A.; ROLSTON, K.; JONES, R.N.; WALSH, T.R. blaVIM-7, an evolutionarily distinct metallo- β -lactamase gene in a *Pseudomonas aeruginosa* isolate from the United States. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.1, p.329-332, 2004.

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. **J. Antimicrob. Chemother.**, v.50, n. p.673-679, 2002.

TOLLENTINO, F.M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M.L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E.M.; REMELI, G.A.; DE ALMEIDA, M.T.; RÚBIO, F.G.; NOGUEIRA, M.C. High prevalence of bla(CTX-M) extended spectrum beta-lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of bla(SHV-

12), *bla*(SHV-31), *bla*(SHV-38), and *bla*(CTX-M-15) in Brazil. **Microb. Drug. Resist.**, v.17, n.1, p.7-16, 2011.

TZOUVELEKIS, L.S.; TZELEPI, E.; TASSIOS, P.T.; LEGAKIS, N.J. CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v.14, n.2, p.137-142, 2000.

VESTBY, L.K.; MØRETRØ, T.; LANGSRUD, S.; HEIR, E.; NESSE, L.L. Biofilm forming abilities of *Salmonella* are correlated with persistence in fish meal- and feed factories. **BMC Veterinary Research**, v.5, n.20, 2009.

WALSH, T.R.; TOLEMAN, M.A.; HRYNIEWICZ, W.; BENNETT, P.M.; JONES, R.N. Evolution of an integron carrying *bla*VIM-2 in Eastern Europe: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 52, n. 1, p.116-9, 2003.

WATANABE, M.; IYOBE, S.; INOUE, M.; MITSUHASHI, S. Transferable imipenem resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.35, n.1, p.147-151, 1991.

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

WOODFORD, N.; TIerno, P.M.; LIVERMORE, D.M. Outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing a new carbapenem-hydrolyzing Class A beta-lactamase, KPC-3, in New York Medical Center. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, p.4793-4799, 2004.

WOODFORD, N.; TURTON, J.F.; LIVERMORE, D.M. Multiresistant Gram-negative bacteria: the role of high-risk clones in the dissemination of antibiotic resistance.

FEMS Microbiol. Rev., v.35, n.1, p.736-755, 2011.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J. Novel carbapenem hydrolyzing-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain on *Klebsiella pneumoniae*.

Antimicrob. Agents Chemother., v. 45, p.1151-1161, 2001.

YIN-CHING, C.; JER-HORNG, S.; CHING-NAN, L.; MING-CHUNG, C. Cloning of a gene encoding a unique haemolysin from *Klebsiella pneumoniae* and its potential use as a species specific gene probe. **Microb. Pathog.**, v.33, p.1-6, 2002.

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

ZAMPARETTE, C.P. **Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. de pacientes internados no hospital universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC)**. 2014. 127f. Dissertação (Mestrado em Farmácia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

ZÁRATE, M.S.; GALES, A.C.; PICÃO, R.C.; PUJOL, G.S.; LANZA, A.; SMAYEVSKY, J. Outbreak of OXY-2-producing *Klebsiella oxytoca* in renal transplant unit. **Journal of Clinical Microbiology**, v.46, n.6, p.2099-2101, 2008.

10 ANEXOS

10.1 Anexo 1


 UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
 PRO-REITORIA DE PESQUISA
 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
 36036000- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

Parecer nº 346/2011

Protocolo CEP-UFJF: 2587.327.2011 **FR:** 489968 **CAAE:** 0333.0.180.180-12
Projeto de Pesquisa: Aspectos fisiológicos e moleculares da virulência e resistência aos carbapenêmicos em bastonetes Gram negativos, isolados em um hospital terciário.
Area Temática: Grupo III
Pesquisador Responsável: Vania Lúcia Silva
Data prevista para o término da pesquisa: Janeiro de 2016
Pesquisadores Participantes: Vania Lúcia Silva; Vanessa Cordeiro Dias; Cláudio Galuppo Diniz; André Netto Bastos; Ricardo Villela Bastos.
Instituição Proponente: Universidade Federal de Juiz de Fora / Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia – Instituto de Ciências Biológicas.

Análise do protocolo:

Itens Avaliados		Sim	Não	P	NA
Justificativa	O estudo proposto apresenta pertinência e valor científico	X			
	Objeto de estudo está bem delineado	X			
Objetivo(s)	Apresentam clareza e compatibilidade com a proposta	X			
	Atende ao(s) objetivo(s) proposto(s)	X			
Material e Métodos	Informa				
	Tipo de estudo	X			
	Procedimentos que serão utilizados	X			
	Número de participantes	X			
	Justificativa de participação em grupos vulneráveis				X
	Critérios de inclusão e exclusão				X
	Recrutamento	X			
	Coleta de dados	X			
Revisão da literatura	Atual e sustentam o(s) objetivo(S) do estudo	X			
	Informa os possíveis impactos e benefícios	X			
Resultados	Agenda as diversas etapas de pesquisa	X			
	Informa que a coleta de dados ocorrerá após aprovação do projeto pelo comitê	X			
Cronograma	Lista a relação detalhada dos custos da pesquisa	X			
	Apresenta o responsável pelo financiamento	X			
Referências	Segue uma normatização	X			
	Preserva o sujeito de constrangimento	X			
Instrumento de coleta de dados	Apresenta pertinência com o(s) objetivo(s) proposto(s).	X			
	Solicita dispensa	X			
Termo de dispensa de TCLE					
Termo de assentimento	Apresenta o termo em caso de participação de menores				X

1



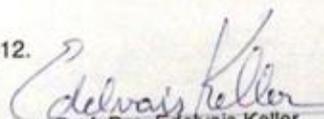
UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/UFJF
36056900- JUIZ DE FORA - MG - BRASIL

TCLE	Está em linguagem adequada, clara para compreensão do sujeito				X	
	Apresenta justificativa e objetivos				X	
	Descreve suficientemente os procedimentos				X	
	Apresenta campo para a identificação dos sujeitos				X	
	Informa que uma das vias do TCLE deverá ser entregue ao sujeito				X	
	Assegura liberdade do sujeito recusar ou retirar o consentimento sem penalidades				X	
	Garante sigilo e anonimato				X	
	Explicita	Riscos e desconfortos esperados				X
		Ressarcimento de despesas				X
		Indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa				X
Forma de contato com o pesquisador					X	
Forma de contato com o CEP					X	
	Como será o descarte de material coletado (no caso de material biológico)				X	
	O arquivamento do material coletado pelo período mínimo de 5 anos				X	
Pesquisador (es)	Apresentam titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa	X				
	Apresenta comprovante do Currículo Lattes do pesquisador principal e dos demais participantes.		X			
Documentos	Carta de Encaminhamento à Coordenação do CEP	X				
	Folha de Rosto preenchida	X				
	Projeto de pesquisa, redigido conforme Modelo de Apresentação de Projeto de Pesquisa padronizado pela Pró-Reitoria de Pesquisa (PROPESQ)	X				
	Declaração de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa, assinada pelo responsável pelo setor/serviço onde será realizada a pesquisa	X				

P= parcialmente NA=Não se aplica

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto, devendo o pesquisador entregar o relatório no final da pesquisa.

Situação: Projeto Aprovado
Juiz de Fora, 25 de abril de 2012.


Prof. Dra. Edelvais Keller
Coordenadora – CEP/UFJF

RECEBI
DATA: ___/___/2012
ASS: _____

Physiological and molecular aspects of carbapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* with involvement in bacterial virulence

Rito Santo Pereira; Cláudio G. Diniz, PhD; Vânia L. Silva, PhD; Juliana Resende, PhD; Vanessa Cordeiro Dias, MSc;

From the Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil.

Address correspondence to Cláudio Galuppo Diniz, Laboratory of Bacterial Physiology and Molecular Genetics, Department of Parasitology, Microbiology and Immunology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, 36.036-900, Juiz de Fora, MG,

Brazil. Phone/Fax: + 55 32 2102-3213. E-mail: claudio.diniz@ufjf.edu.br

ABSTRACT

Carbapenemases are enzymes produced by Gram-negative bacteria which confer resistance to β -lactams. *Klebsiella pneumoniae* and *Enterobacter aerogenes* stand out by opportunism and production capacity of these enzymes and their involvement in nosocomial infections. This work aimed to evaluate the physiological and molecular aspects of virulence and resistance to carbapenem in *K. pneumoniae* and *E. aerogenes*. 42 isolated bacteria resistant to carbapenem were included in the study. In these tests to assess the production of carbapenemases, physiological assessment of bacterial abilities associated with aggression were applied and PCR was applied to search for genetic markers of resistance to carbapenem (*bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{NDM-1}). The isolates showed high levels of sensitivity to amikacin and tigecycline (>90%). Considering the frequency of genetic markers, KPC was the most common (97.6%), followed by TEM (95.2%), SHV (69.0%) and CTX-M (38.1%). In all isolates, 2.4% had one genetic marker associated with resistance to carbapenems, 23.8% had two markers, 45.2% had three and 28.6% had four. Carbapenemase producers showed particular characteristics regarding the physiological characteristics evaluated bacterial invasion, suggesting that these bacteria may present different behaviors of microorganisms of the same species sensitive to drugs, with implications not only for antibiotic therapy, but also for its virulence and persistence in the environment nosocomial.

KEY-WORDS: Resistance. Carbapenem. *Klebsiella pneumoniae*. *Enterobacter aerogenes*. KPC. TEM. SHV. CTX-M.

INTRODUCTION

Enterobacteriaceae pathogenicity is due to various virulence factors that allow it to overcome innate host immunity and to maintain infection in a mammalian host. These factors include capsule and hypermucoviscosity, lipopolysaccharides, adhesins, iron acquisition systems, serum resistance and biofilm formation.¹⁻³ Differences in clinical features of these infections are related with nature and number of expressed virulence factors.⁴

Beta-lactams have been the mainstay of treatment for serious infections, and the most active of these are the carbapenems, which are advocated for use for the treatment of infections caused by extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae*.⁵

Carbapenems have the broadest activity spectra of any beta-lactam antibiotic and are often the most appropriate agents for use in the treatment of infections caused by multiresistant gram-negative bacteria.⁶ Unfortunately, due to continuous exposure to carbapenems, *Klebsiella pneumoniae* strains resistant to carbapenems have emerged, representing a serious clinical problem, since the antimicrobial treatment options are very limited.^{7,8}

These resistant strains and have been the source of hospital-acquired infections in severely ill patients, while mortality seems to be higher among those infected with such strains compared to patients infected with carbapenem susceptible strains.¹⁰ What makes the situation even more difficult is that the gene that encodes carbapenemase, the enzyme mostly responsible for the carbapenem-resistance, resides on a transmissible plasmid that can be transferred to other *Enterobacteriaceae*.^{11,12}

The aim of the present study was to evaluate the physiological and molecular aspects of virulence and resistance to carbapenem in *K. pneumoniae* and *E. aerogenes*.

MATERIALS AND METHODS

HOSPITAL SETTING AND STUDY POPULATION

This study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Juiz de Fora (certificate no. 346/2011 and protocol no. 2587.327.2011).

A total of 3437 consecutive, nonduplicate clinical isolates were collected at Brazilian Clinical pathology laboratory in Juiz de Fora – Minas Gerais over a period of one year (January and December 2012). All clinical samples were plated on specific culture media (Urine Cled/BD-Difco agar), tracheal aspirates in blood agar and MacConkey/BD-Difco agar, catheter tip and other biological materials in blood agar and broth (Thioglycollate/BD-Difco), and incubated at 35°C for 48 hours in a bacteriological incubator, following the ANVISA guidelines.¹³ All patients for whom culture results were positive for *E. aerogenes* or *K. pneumoniae* imipenem or meropenem resistant were eligible for inclusion in the study.

The hospital where the patients evaluated in this study were hospitalized has approximately 120 beds, including intensive care units (adult and neonatal), coronary care unit, wards and ambulatory patient care. It offers specialized clinics and diagnostic services with restricted attendance to the private network services.

A retrospective record of demographic characteristics, including age and sex of the patient, clinical specimens and in-hospital mortality associated were maintained.

MICROBIOLOGY AND SUSCEPTIBILITY TESTING

All of the isolates were identified by Vitek 2 Compact (BioMerieux/França), following the manufacturer's instructions. For quality control, were included *Enterobacter cloacae* ATCC 700323 and *Stenotrophomonas maltophilia* ATCC 17666, following the manufacturer's instructions.

Antibiotic susceptibility was made by Kirby-Bauer's disc diffusion method according to recommendations of CLSI.¹⁴ The criteria used for interpretation of inhibition zone for tigecycline was based on the ANVISA protocols.¹⁵ The following antimicrobials were used: Amikacin (30µg), gentamicin (10mg), ciprofloxacin (5µg), sulphazotrin (25 mcg), tetracycline (30µg) and tigecycline (15ug). The β-lactam antibiotics tested were ampicillin-sulbactam (10/10mcg), piperacillin / tazobactam (100/10mcg), ertapenem (10mg), meropenem (10mg) and imipenem (10mg). For quality control reference samples *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 and *Escherichia coli* ATCC 35218 were included.

Additionally, the modified Hodge test [MHT] was used for confirming carbapenemase production. *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1706 was taken as negative for KPC production and *Klebsiella pneumoniae* ATCC BAA 1705 was used as positive control according to the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) guidelines.¹⁴

PHYSIOLOGICAL ASSESSMENT OF BACTERIAL ABILITIES ASSOCIATED WITH AGGRESSION

HEMOLYTIC ACTIVITY TESTING

The evaluation of the hemolytic activity was performed according to the methodology described by Quiblier et al.¹⁶ Strains of *Klebsiella pneumoniae* (n = 27) sensitive to all antibiotics, isolated at the same time, were used as negative control. The test was performed in duplicate.

BIOCIDES SUSCEPTIBILITY TESTING

The study of susceptibility to biocides was performed by adapting the methodology of disk diffusion technique recommended by the CLSI.¹⁴ Strains of *Klebsiella pneumoniae* (n = 27) sensitive to all antibiotics, isolated at the same time, were used as negative control. The test was performed in duplicate.

OXIDATIVE STRESS TESTING

The study of resistance to oxidative stress was evaluated according to the methodology proposed by Santos.¹⁷ Strains of *Klebsiella pneumoniae* (n = 27)

sensitive to all antibiotics, isolated at the same time, were used as negative control. The test was performed in duplicate.

BIOFILM FORMATION TESTING

Biofilm formation assay were performed following the method of Tendolkar et al.¹⁸ Strains of *Klebsiella pneumoniae* (n = 27) sensitive to all antibiotics, isolated at the same time, were used as negative control. The test was performed in quadruplicate

DNA EXTRACTION AND SCREENING OF CARBAPENEMASE RESISTANCE GENES

Bacterial genomic DNA were extracted from 1 ml of overnight cultures in Tryptic Soy Broth (BD-Difco/Brasil) using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison WI, USA) following the manufacturer's instructions. DNA extracts were quantified by using NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) and stored in freezer at -20°C, to be used as templates in polymerase chain reactions (PCR). The following carbapenemases genes were screened by PCR: *bla*_{KPC}, *bla*_{TEM}, *bla*_{SHV}, *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SIM}, *bla*_{SPM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{GIM} and *bla*_{NDM-1} according to previously established methodology. All of the primers and PCR reactions were performed in duplicate (Table 1).

The expected amplicons were visualized in 1.5% agarose gel stained by ethidium bromide. The 1kb DNA ladder was used as molecular weight standard (Life Technologies Inc., Gathersburg, MD, EUA). Positive control for reactions of KPC,

SHV, CTX-M and TEM was carried out by sequencing randomly selected amplicons totalizing 10% of the total reaction (10 amplicons for each genetic marker).

RESULTS

In total, 3437 samples were collected during the study period, of which 42 (1.2%) were Enterobacteriaceae carbapenem resistant and phenotype KPC producers. 26 (61.9%) were collected from patients hospitalized in the Intensive Care Unit (ICU), 7 (16.7%) from the Ward, 6 (14.3%) from the Coronary Care Unit and 3 (7.1%) from Ambulatory Patients Care. The sociodemographic data from medical records shows that the average patients' age was 72.6 ± 20.8 years (ranging between 23 and 97 years), and 24 (57.1%) bacterial strains were isolated from male patients while 18 (42.9%) were isolated from female and the rate of intra-hospital mortality associated with infection or colonization with these micro-organisms was 81%.

Among the strains analyzed, 21 (50%) were *Klebsiella pneumoniae* and 21 (50%) *Enterobacter aerogenes* isolated from urine samples (40.5%), catheter (26.2%), blood (16.7%), tracheal aspirate (14.3%) and bronchial lavage (2.4%).

Antimicrobial agents tested, only the aminoglycoside amikacin (7%) and tigecycline (7%) had a lower percentage resistance. Each isolate showed resistance to two or more antibiotics. Thus, 2.4% of isolates were resistant to two antimicrobials, 21.4% three, 26.2% four to five 31%, 9.6% and 9.5% six to seven antimicrobials simultaneously (Table 2).

The results of physiological tests associated to aggression revealed that the mean inhibition zones of bacterial growth were lower in isolates resistant to carbapenems compared to sensitive ($p < 0.05$) except for pure hydrogen peroxide and antiseptic soap (triclosan) which also had a lower number of stained cells and aggregated in the bottom of the plate ($p < 0.05$), suggesting greater tolerance to the biocide effects, oxidative stress and increased ability of biofilm formation (Table 3 to 5).

The study of genetic markers related to carbapenems producing phenotype was detected in all bacterial species recovered in this study. Considering the frequency of detection *bla*_{KPC} (97.6%) was most observed followed by *bla*_{TEM} (95.2%), *bla*_{SHV} (69%) and *bla*_{CTX-M} (38.1%). All 42 isolates were negative for *bla*_{NDM-1}, *bla*_{VIM}, *bla*_{IMP}, *bla*_{GIM}, and *bla*_{SPM-1} (Table 6).

The number of genetic markers detected in each isolate ranging between one and four. Therefore, of all screened genes 2.4% of microbial sample were positive for one, 19.1% were positive for two, 47.6% for three and 31.0% were positive for four surveyed genetic markers.

DISCUSSION

KPC-producing bacteria are predominantly involved in nosocomial and systemic infections; although they are mostly *Enterobacteriaceae*.¹⁹ This is evidence of emergence and dissemination of KPC-producing bacteria in community, although they are more frequent in hospitalized patients. Our results corroborate this observation, because 7.1% of total carbapenem resistant strains were isolated from ambulatory patients.

Old age, prior ICU admission and prior surgical procedure are risk factors for CKP.²⁰ ²¹ The ICU has been described as a factory for creating, disseminating, and amplifying antimicrobial resistance due to its extremely vulnerable population of critically ill patients, the high use of invasive procedures and the frequent use of antibiotics. Patients with neurological disease have a high prevalence of chronic wounds.²² In our study, 61.9% of patients were admitted to ICU and the average age was 72.6 years old. This most likely explains the significantly increased risk of KPC in this group.

Several investigators have reported mortality rates ranging from 24% to 65% in patients infected with CRKP strains, with resistance to carbapenem being an independent predictor of death.^{23,24,25} Mortality in the present study was 81%.

In this study, none of the 42 isolates showed haemolysis on sheep blood agar. This is consistent with studies reporting by Szamka et al.²⁶ when demonstrated that *Klebsiella* spp; possess a selective haemolytic activity on rabbit erythrocytes. But in other hand, high intensity of antimicrobial resistance was associated with high rates of stress oxidative and disinfectant resistance and biofilm formation.^{27,28} Biofilm formation is an important step in the development of a bacterial infection. Bacteria in

biofilms are less susceptible to antimicrobials and disinfectant and shielded from opsonization and phagocytosis, and can even develop a communication between them leading to the expression of virulence.²⁹

This situation may be related with phenotypes and genes detected in our isolates and described as implicated in the antimicrobial resistant. Our results corroborate this observation showing that all samples were multi-drug resistant, remains susceptible to aminoglycosides mainly amikacin and tigecycline with levels of susceptibility above 90%. Several investigators have reported that tigecycline and colistin became the last-resort treatments for infections by multidrug-resistant.³⁰⁻³⁵

The presence of KPC has already been described worldwide,³⁶ including reports from Brazil.³⁷⁻⁴⁰ In our isolates, the majority of KPC producing isolates carried also others beta-lactamases gene. The frequent association of TEM, SHV and CTX-M with KPC in *K. pneumoniae* and *E. aerogenes* in this and other studies suggests the acquisition of transmissible plasmids carrying *bla*_{KPC} gene by local endemic strains harboring the others genes.⁴¹

The *bla*_{KPC} gene was not detected in the one isolate of *K. pneumoniae* resistant to ertapenem, perhaps due to other possible resistant mechanisms, such as an association between TEM, SHV or CTX-M production and porin loss that are also responsible for decreased susceptibility to carbapenem, as previously reported.⁴²

In conclusion, samples KPC-producing showed particular characteristics regarding the physiological characteristics of bacterial abilities associated with aggression, suggesting that these bacteria may possess different behaviors when compared with same strains carbapenem sensitive, with implications not only for antibiotic therapy, but also for its virulence and persistence in the nosocomial environment, this study provides additional information of the epidemiological scenario of KPC-types among

Enterobacteriaceae isolates circulating in Brazilian hospitals in 2012. This data reinforce the need for continuing surveillance because this scenario may have changed over the years.

REFERENCES

- 1 Barreto, S.; Zambrano, M.; Araque, M. Phenotypic variations of susceptibility in *Klebsiella pneumoniae* strains of nosocomial origin and their association with biofilm formation. **Invest Clin.** 2009;50:221–9.
- 2 Schroll, C.; Barken, K.B.; Krogfelt, K.A.; Struve, C. Role of type 1 and type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* biofilm formation. **BMC Microbiol.** 2010;10:179–88.
- 3 Wiskur BJ, Hunt JJ, Callegan MC. Hypermucoviscosity as a virulence factor in experimental *Klebsiella pneumoniae* endophthalmitis. **Invest Ophthalmol Vis Sci.** 2008;49:4931–8.
- 4 Yu VL, Hansen DS, Ko WC, Sagnimeni A, Klugman KP, Von Gottberg V, et al. Virulence characteristics of *Klebsiella* and clinical manifestations of *K. pneumoniae* bloodstream infections. **Emerg Infect Dis.** 2007;13:986–93.
- 5 Paterson DL. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Am. J. Infect. Control.** 2006;34:S20–S28.
- 6 Yang, D.; Guo, Y.; Zhang, Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Curr Microbiol.** 2009;58:366–70.
- 7 Bradford P, Bratu S, Urban C, Visalli M, Mariano N, Landman D, et al. Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A

- carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 B-lactamases in New York City. **Clin Infect Dis**. 2004;39:55-60.
- 8 Yigit, H.; Queenan, AM.; Anderson, G.J.; Domenech-Sanchez, A.; Biddle, J.W.; Steward, C.D. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**. 2001;45:1151-61.
- 10 Schwaber, M.; 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. **Antimicrob Agents Chemother**. 2008;52:1028-33.
- 11 Bratu, S.; Mooty, M.; Nichani, S.; Landman, D.; Gullans, C.; Pettinato, B. Emergence of KPC-possessing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, New York: epidemiology and recommendations for detection. **Antimicrob Agents Chemother**. 2005;49:3018e20.
- 12 Bratu, S.; Brooks, S.; Burney, S.; Kochar S, Gupta, J.; Landman, D. Detection and spread of *Escherichia coli* possessing the plasmid-borne carbapenemase KPC-2 in Brooklyn, New York. **Clin Infect Dis**. 2007;44:972-5.
- 14 Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-first informational supplement**. Document M100-S21.. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.
- 15 ANVISA. Medidas de Prevenção e Controle de Infecções Por Enterobactérias Multirresistentes. **Nota Técnica nº 1**, de 2013. Brasília, DF. 17 set. 2013.

- 16 Quiblier, C.; Zinkernagel, A.C.; Schuepbach, R.A.; Berger-Bächi, B.; Senn, M.A. Contribution of SecDF to *Staphylococcus aureus* resistance and expression of virulence factors. **BMC Microbiology**. 2011; v.11, n.72.
- 17 Santos, S.G.; Diniz, C.G.; Silva, V.L.; Martins, W.A.; Cara, D.C.; SOUZA, N.C.; Serufo, J.C.; Nicoli, J.R.; Carvalho, M.A.; Farias, L.M. Effects of oxidative stress on the virulence profile of *Prevotella intermedia* during experimental infection gnotobiotic mice. **J. Med. Microbiol.**, v.56, p.289-297, 2007.
- 18 Tendolkar, P.M.; Baghdayan, A.S.; Gilmore, M.S.; Shankar, N. Enterococcal surface protein, Esp, enhances biofilm formation by *Enterococcus faecalis*. **Infect Immun**. 2004; 72:6032–6039. 2004.
- 19 Lari, A.R.; Azimi, L.; Rahbar, M.; Fallah, F.; Alaghebandan, R. Phenotypic detection of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase among burns patients: **First report from Iran**. *Burns*. 2013;39:174–176.
- 20 Brusselaers, N.; Vogelaers, D.; Blot, S. The rising problem of antimicrobial resistance in the intensive care unit. **Ann Intensive Care**. 2011;1:47.
- 21 Naqvi, S.B.; Collins, A.J. Infectious complications in chronic kidney disease. **Adv Chronic Kidney Dis**. 2006;13:199-204.
- 22 Gardner, I.D. The effect of aging on susceptibility to infection. **Rev Infect Dis**. 1980;2:801-10.
- 23 Schwaber M, 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. **Antimicrob Agents Chemother**. 2008;52:1028e33.

- 24 Zarkotou, O.; Pournaras, S.; Tselioti, P.; Dragoumanos, V.; Pitiriga, V.; Ranellou, K. Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* and impact of appropriate antimicrobial treatment. **Clin Microbiol Infect.** 2011;17:1798-803.
- 25 Daikos, G.L.; Markogiannakis, A. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: (when) might we still consider treating with carbapenems? **Clin Microbiol Infect.** 2011;17:1135-41.
- 26 Szramka, B.; Kurlenda, J.; Bielawski, K. Hemolytic activity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca*. **Med Dosw Mikrobiol.** 1998;50:207-213.
- 27 Mulvey, M.R.; Simor, A.E. Antimicrobial resistance in hospitals: how concerned should we be? **CMAJ.** 2009;180:408-15.
- 28 Monnet, D.L.; Archibald, L.K.; Phillips, L.; Tenover, F.C.; MCGowan Jr, J.E.; Gaynes, R.P. Antimicrobial use and resistance in eight US hospitals: complexities of analysis and modeling. Intensive Care Antimicrobial Resistance Epidemiology Project and National Nosocomial Infections Surveillance System Hospitals. **Infect Control Hosp Epidemiol.** 1998;19:388-94.
- 29 Fertas-Aissani, R.E.; Messai, Y.; Alouache, S.; Bakour, R. Virulence profiles and antibiotic susceptibility patterns of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from different clinical specimens. **Pathologie Biologie.** 2013; 61;209–216.
- 30 Bergen, P.J.; Li, J.; Rayner, C.R.; Nation, R.L. Colistin methanesulfonate is an inactive prodrug of colistin against *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrob Agents Chemother.** 2006;50:1953–8.

- 31 Souli, M.; Kontopidou, F.V.; Papadomichelakis, E.; Galani, I.; Armaganidis, A.; Giamarellou, H. Clinical experience of serious infections caused by Enterobacteriaceae producing VIM-1 metallo-beta-lactamase in a Greek university hospital. **Clin Infect Dis**. 2008;46:847–54.
- 32 Bogdanovich, T.; Adams-Haduch, J.M.; Tian, G.B.; Nguyen, M.H.; Kwak, E.J.; Muto, C.A. Colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC)-producing *Klebsiella pneumoniae* belonging to the international epidemic clone ST258. **Clin Infect Dis**. 2011;53:373–6.
- 33 Zarkotou, O.; Pournaras, S.; Voulgari, E.; Chrysos, G.; Prekates, A.; Voutsinas, D. Risk factors and outcomes associated with acquisition of colistin-resistant KPC-producing *Klebsiella pneumoniae*: a matched case–control study. **J Clin Microbiol**. 2010;48:2271–4.
- 34 Mezzatesta, M.L.; Gona, F.; Caio, C.; Petrolito, V.; Sciortino, D.; Sciacca, A. Outbreak of KPC-3-producing, and colistin-resistant, *Klebsiella pneumoniae* infections in two Sicilian hospitals. **Clin Microbiol Infect**. 2011;17:1444–7.
- 35 Humphries, R.M.; Kelesidis, T.; Dien Bard, J.; Ward, K.W.; Bhattacharya, D.; Lewinski, M.A. Successful treatment of pan-resistant *Klebsiella pneumoniae* pneumonia and bacteraemia with a combination of high-dose tigecycline and colistin. **J Med Microbiol**. 2010;59:1383–6.
- 36 Cuzon, G.; Naas, T.; Truong, H. Worldwide diversity of *Klebsiella pneumoniae* that produces beta-lactamase blaKPC-2 gene. **Emerg Infect Dis**. 2010;16:1349–56.

- 37 Seki, L.M.; Pereira, P.S.; De Souza, M.P.A.H. Molecular epidemiology of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates in Brazil: the predominance of sequence type 437. **Diagn Microbiol Infect Dis**. 2011;70:274–7.
- 38 Peirano, G.; Seki, L.M.; Val Passos, V.L.; Pinto, M.C.; Guerra, L.R.; Asensi, M.D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **J Antimicrob Chemother**. 2009;63:265–8.
- 39 Andrade, L.N.; Curiao, M.; Clímaco, E.C. Dissemination of blaKPC-2 by the spread of CC258-*Klebsiella pneumoniae* clones (ST258, ST11, ST437) and plasmids (IncFII, IncN, IncL/M) among *Enterobacteriaceae* in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. 2011;55:3579–83.
- 40 Monteiro, J.; Santos, A.F.; Asensi, M.D.; Peirano, G.; Gales, A.C. First report of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrob Agents Chemother**. 2009;53:333–4.
- 41 Seki, L.M.; Pereira, P.S.; Conceição, M.S.; Souza, M.J.; Marques, E.A.; Carballido, J.M.; De Carvalho, M.E.S.; Assef, A.P.D.C.; Asensi, M.D. Article molecular epidemiology of CTX-M producing *Enterobacteriaceae* isolated from bloodstream infections in Rio de Janeiro, Brazil: emergence of CTX-M-15. **Braz J Infect Dis**. 2013;1 (6):640–646.
- 42 Yang, D.; Guo, Y.; Zhang, Z. Combined porin loss and extended spectrum beta-lactamase production is associated with an increasing imipenem minimal inhibitory concentration in clinical *Klebsiella pneumoniae* strains. **Curr Microbiol**. 2009;58:366–70.

Table 1. Primers used, expected amplicons, and polymerase chain reaction (PCR) conditions.

TARGET	PRIMER SEQUENCE (5'-3')	AMPLICONS SIZE (pb)	PCR CONDITIONS	REFERENCE
<i>bla</i> CTX-M	F-5'-ATG TGC AGY ACC AGT AAA G-3'	562	94°C, 7'; 35 x (94°C, 1'; 54°C, 45"; 72°C, 1'); 72°C, 1'	
	R-5'-GGT CAC CAG AAG GAG C-3'			
<i>bla</i> SHV	F-5'-CTT TAC TCG CCT TTA TCG GC-3'	982	95°C, 5'; 35 x (95°C, 45'; 59°C, 45'; 72°C, 1'); 72°C, 1'	JONES et al., 2009
	R-5'-TTA CCG ACC GGC ATC TTT CC-3'			
<i>bla</i> TEM	F-5'-GTG CGC GGA ACC CCT ATT-3'	968	94°C, 4'; 30 x (94°C, 1'; 56°C, 1'; 72°C, 1'); 72°C, 5'	
	R-5'-TTA CCA ATG CTT AAT CAG TGA GGC-3'			
<i>bla</i> KPC	F-5'-ATG TCA CTG TAT CGC CGT CT-3'	829		
	R-5'-TTT TCA GAG CCT TAC TGC CC-3'			
SPM-1	F-5'-CCT ACA ATC TAA CGG CGA CC-3'	649		CLIMACO et al., 2010
	R-5'-TCG CCG TGT CCA GGT ATA AC-3'			
IMP	F-5'-GGA ATA GAG TGG CTT AAY TCT C-3'	188		
	R-5'-CCA AAC YAC TAS GTT ATC T-3'			
SIM	F-5'-TAC AAG GGA TTC GGC ATC G-3'	570	94°C, 5'; 36 x (94°C, 30"; 52°C, 40"; 72°C, 50"); 72°C, 5'	ELLINGTON et al., 2007
	R-5'-TAA TGGC CTG TTC CCA TGT G-3'			
VIM	F-5'-GAT GGT GTTT GGT CGC ATA-3'	390		
	R-5'-CGA ATG CGC AGC ACC AG-3'			
GIM	F-5'-TCG ACA CAC CTT GGT CTG AA-3'	477		
	R-5'-AAC TTC CAA CTT TGC CAT GC-3'			
NDM-1	F-5'-GGT TTG GCG ATC TGG TTT TC-3'	621		NORDMANN et al., 2009
	R-5'-CGG AAT GGC TCA TCA CGA TC-3'			

Table 2. Phenotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* (n=21) and *Enterobacter aerogenes* (n=21) recovered from patients infected by enterobacteria carbapenem resistant

Resistance phenotype of <i>K. pneumoniae</i> and <i>E. aerogenes</i>							Isolates number	
							N	%
CIP	PTZ						1	2.4
CIP	PTZ	GEN					9	21.4
CIP	SZT	NFT	GEN				2	4.8
CIP	PTZ	SZT	GEN				4	9.5
CIP	PTZ	SZT	TET				1	2.4
CIP	PTZ	SZT	SAM				4	9.5
CIP	PTZ	SZT	TET	GEN			1	2.4
CIP	PTZ	SZT	TET	SAM			3	7.1
CIP	PTZ	SZT	SAM	TEG			1	2.4
CIP	PTZ	SZT	NFT	TET			3	7.1
CIP	SZT	NFT	TET	SAM			1	2.4
CIP	PTZ	SZT	NFT	GEN			1	2.4
CIP	PTZ	SZT	GEN	AMK			1	2.4
CIP	PTZ	SZT	TET	GEN			2	4.8
CIP	PTZ	SZT	TET	SAM	AMK		1	2.4
CIP	PTZ	SZT	SZT	SAM	TGC		1	2.4
CIP	PTZ	SZT	NFT	TET	SAM		2	4.8
CIP	PTZ	NFT	TET	SAM	TGC	AMK	1	2.4
CIP	PTZ	SZT	SZT	TET	SAM	GEN	3	7.1

Legend: CIP - ciprofloxacin, PTZ – piperacilin/tazobactam, NFT – nitrofurantoin, SAM – ampicilin/sulbactam, SZT – sulfazotrim, TET – tetracilin, GEN – gentamicin and AMK – amikacin.

Tabela 3. Evaluation of susceptibility to biocides among isolates of *K. pneumoniae* carbapenem resistant and non-resistant.

Chemical compound	Range inhibition halo (mm)		P value
	Control group (n=27)	Study group (n=21)	
Hypochlorite 1%	8,79 ($\pm 0,57$)	4,83 ($\pm 4,72$)	$5,94 \times 10^{-07}$
Hypochlorite 1,5%	10,7 ($\pm 0,66$)	7,95 ($\pm 03,74$)	$5,65 \times 10^{-06}$
Hypochlorite 2%	12,23 ($\pm 1,03$)	11,12 ($\pm 1,88$)	0,04
Quaternary ammonium	28 ($\pm 2,14$)	24,39 ($\pm 2,42$)	$5,29 \times 10^{-06}$
Pure hydrogen peroxide	26,93 ($\pm 3,54$)	24,93 ($\pm 2,46$)	0,12
Antiseptic soap (triclosan)	18,29 ($\pm 9,11$)	14,31 ($\pm 14,20$)	0,10

Tabela 4. Evaluation of tolerance to oxidative stress among isolates of *K. pneumoniae* carbapenem resistant and non-resistant.

Chemical compound	Range inhibition halo (mm)		P value
	Control group (n=27)	Study group (n=21)	
Hydrogen peroxide 20%	13.36 (± 1.25)	12.93 (± 0.77)	0.04

Tabela 5. Formation biofilm ability among isolates of *K. pneumoniae* carbapenem resistant and non-resistant.

Optical density	Range of cells fixed on the plate		P value
	Control group (n=27)	Study group (n=21)	
DO596nm	0.31 (± 0.12)	0.47 (± 0.16)	4.67×10^{-25}

Table 5. Genotypic characteristics of *Klebsiella pneumoniae* (n=21) and *Enterobacter aerogenes* (n=21) recovered from patients infected by enterobacteria carbapenem resistant.

Bacterials species	Genotype	Frequency (%)
<i>K. pneumoniae</i> (n=21)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	38
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	42.8
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	4.8
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{CTX-M}	4.8
	<i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	4.8
	<i>bla</i> _{KPC}	4.8
<i>E. aerogenes</i> (n=21)	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV} , <i>bla</i> _{CTX-M}	19.1
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{SHV}	33.3
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM} , <i>bla</i> _{CTX-M}	9.5
	<i>bla</i> _{KPC} , <i>bla</i> _{TEM}	38.1