

**JUSSIMARA MONTEIRO**

**Caracterização molecular dos mecanismos de resistência  
aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas  
de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE  
Brasil**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**JUSSIMARA MONTEIRO**

**Caracterização molecular dos mecanismos de resistência  
aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas  
de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE  
Brasil**

Tese apresentada à Universidade Federal de  
São Paulo – Escola Paulista de Medicina para  
obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos Campos  
Pignatari

Co-Orientadora: Soraya Sgambatti de Andrade

Este trabalho foi realizado com auxílio  
financeiro fornecido pela Fundação de Amparo  
à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)  
Processo nº 2006/57700-0

**São Paulo**

**2009**

MONTEIRO, Jussimara

Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -Lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil - **Jussimara Monteiro - São Paulo, 2009.**

xv, 129 p.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Infectologia

**Título em inglês:** Molecular characterization of the mechanisms of resistance to antibiotics  $\beta$ -Lactamics in *Klebsiella* spp. isolated from blood stream infections of Brazil SCOPE Project.

1. *Klebsiella* spp.; 2. Infecção de corrente sanguínea; 3. Biologia Molecular; 4. Resistência a antibióticos; 5.  $\beta$ -lactâmicos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**DISCIPLINA DE INFECTOLOGIA**

**Chefe do Departamento:**

Prof. Dr. Angelo Amato Vincenzo de Paola

**Coordenador do Curso de Pós-graduação:**

Prof. Dr. Ricardo Sobieh Diaz

**São Paulo**  
**2009**

**JUSSIMARA MONTEIRO**

**Caracterização molecular dos mecanismos de  
resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Klebsiella*  
spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do  
Projeto SCOPE Brasil**

**BANCA EXAMINADORA:**

**Titular:** Profa. Dra. Angela Maria da Silva

**Titular:** Profa. Dra. Silvia Figueiredo Costa

**Titular:** Dr. Alexandre Rodrigues Marra

**Titular:** Dr. Carlos Alberto Pires Pereira

**Suplente:** Profa. Dra. Elsa Massae Mamizuka

**Suplente:** Dr. Guilherme Henrique Campos Furtado

*Aos meus pais, Cristovão e Neuza por todo entusiasmo, dedicação, auxílio e amor incondicionais em todos os momentos da minha vida. Vocês serão para sempre a minha grande inspiração. Essa conquista é nossa!!!*

*Ao meu marido, Eduardo Nürnberger, pelo imenso companheirismo, partilhando com amor e carinho este momento importante da minha vida. O seu apoio foi fundamental.*

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Carlos Campos Pignatari, meu respeito e admiração pelo maravilhoso exemplo de ética profissional, pelo grande entusiasmo na condução deste estudo, pela valiosa orientação e pela confiança depositada em meu trabalho. Muito obrigada por tantas oportunidades concedidas ao longo destes anos no LEMC.

À minha co-orientadora, Dra. Soraya Sgambatti de Andrade, pelos valiosos ensinamentos durante o convívio diário no LEMC, pela amizade, pela orientação e pela disponibilidade em todos os momentos que precisei, sempre com muita competência e profissionalismo.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Gales, pelas constantes ensinamentos, pelo exemplo de caráter e por ter me concedido o privilégio de fazer parte da equipe LEMC/ALERTA. Muito obrigada também, pela oportunidade do grande desenvolvimento profissional e pessoal, como sua aluna de mestrado.

Aos professores da Disciplina de Doenças Infecciosas da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina, pelos ensinamentos enriquecedores que contribuíram muito para a minha formação profissional.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Angela Maria da Silva reafirmo o meu agradecimento pela oportunidade da concretização de um grande sonho profissional.

À Dr<sup>a</sup> Suzane Silbert, pela amizade, pela parceria e pela forma profissional que você me acolheu e apresentou os primeiros ensinamentos da epidemiologia molecular.

Às minhas eternas amigas, Andrea Pereira e Liana Carballo, pelo amor, pela parceria em tantos projetos desenvolvidos juntas ao longo da nossa história acadêmica. Começamos juntas... mas, agora seguiremos diferentes caminhos rumo aos nossos ideais. Estarei sempre torcendo pelo nosso sucesso!!!

Às amigas mestrandas, Talita Trevizani e Adriana Nicoletti, pelo auxílio dispensado com muita presteza e competência durante a realização dos testes laboratoriais. A colaboração de vocês foi fundamental para o desenvolvimento deste estudo.

Às amigas doutorandas, Fernanda Inoue e Raquel Girardello, pela amizade, carinho e auxílio, tão importantes durante o processo de formatação deste estudo.



Aos amigos, Paulo Bispo, Rodrigo Cayô, Anderson e Renata Picão pelos valiosos conhecimentos disponibilizados durante o desenvolvimento deste estudo e pelos momentos de alegria juntos.

À Eliete Aguiar, supervisora do LEMC, pela gentileza e vasta experiência microbiológica.

À amiga e secretária do LEMC, Rosana Capecce, pela dedicação e valioso apoio em todos os momentos.

À secretária da DIPA, Tereza Cristina, pela presteza e competência. Ao secretário da Pós- Graduação, Charlys Costa pela colaboração ao longo destes anos.

A todos que passaram pelo LEMC/Alerta nestes últimos anos e que eu tive a alegria e o privilégio de conviver. Em especial Adryella, Loren, Kelly, Martha, Zonta, Fernanda Marques, Thaís, Karen, André, Vinicius, Roberto, Thomas, Eloiza, Danilo, Lorena Jéssica, Cecília Cergole, Cecília Godoy, Paula Peraro, Paula Ignez, Paula Koga e Amilton pelo convívio agradável e carinho demonstrado durante a realização deste trabalho.

Aos meus amigos, Cristina, Kátia, Gildo e Mirella do setor de Biologia Molecular da AFIP/Medicina Laboratorial, em especial ao Prof. Dr. Sérgio Tufik pela oportunidade concedida.

Aos meus grandes amigos, Carole, Márcio Rogers e Andréa, por estarem sempre ao meu lado vibrando com as conquistas.

À minha família paulistana, “Nürmberger”, pelo amor, incentivo, apoio, aconchegante refúgio familiar e por entender todos os momentos que estive ausente.

À minha família, minha especial referência, cunhadas (o), sobrinhos e em especial aos meus irmãos, que mesmo distantes fisicamente, sempre estiveram presentes nas minhas decisões, escolhas e conquistas. Agradeço o amor, o apoio e a amizade fundamentais a nossa união.

A todos que participaram diretamente ou indiretamente do meu trabalho, o meu muito obrigada!

## Sumário

<b>SUMÁRIO</b> .....	IX
<b>ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	XI
<b>ÍNDICE DE TABELAS</b> .....	XII
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1. Agente Etiológico .....	1
1.2. Epidemiologia das Infecções por <i>Klebsiella</i> spp. ....	5
1.3. Infecções da Corrente Sanguínea Causada por <i>Klebsiella</i> spp. ....	8
1.3.1. Programas de Vigilância .....	9
1.4. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de ICS por <i>Klebsiella</i> spp. ....	10
1.5. Mortalidade Associada à Infecção por <i>Klebsiella</i> spp. ....	11
1.6. Mecanismos de Resistência aos $\beta$ -Lactâmicos em <i>Klebsiella</i> spp. ....	12
1.6.1. Produção de $\beta$ -Lactamases .....	13
1.6.2. Impermeabilidade de Membrana Externa .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	32
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	33
3.1. Casuística do Estudo .....	33
3.2. Amostras Bacterianas .....	33
3.3. Coleta dos Dados Epidemiológicos e Microbiológicos .....	34
3.4. Testes Microbiológicos e Moleculares .....	35
3.4.1. Confirmação da Identificação Bacteriana, Teste de Sensibilidade e Detecção de ES $\beta$ L pelo Sistema Automatizado Phoenix .....	35
3.4.2. Testes Fenotípicos para Detecção de Carbapenemase de acordo com as Recomendações do CLSI 2009 .....	37
3.4.3. Perfil de Sensibilidade aos Carbapenens e a Cefoxitina pela Metodologia de Diluição em Ágar .....	40
3.4.4. PCR para a Detecção dos Genes Codificadores de $\beta$ -Lactamases .....	42
3.4.5. Multiplex PCR para Detecção dos Genes Codificadores de AmpC Plasmidiais .....	44
3.4.6. Reação de Sequenciamento e Interpretação dos Resultados .....	47
3.4.7. Teste de Hidrólise para Detecção de Carbapenemase .....	48
3.4.8. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de <i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i> (PFGE) e Interpretação dos Padrões Moleculares ...	49

3.4.9. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa .....	51
3.4.10. Pesquisa dos Genes que Codificam as Porinas OmpK35 e OmpK36 .....	53
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>55</b>
4.1. Amostras Bacterianas com Identificação Confirmada pelo Sistema Automatizado Phoenix .....	55
4.2. Distribuição dos Dados Epidemiológicos .....	58
4.3. Análises dos Dados Microbiológicos e Moleculares.....	60
4.3.1. Teste de Sensibilidade e Detecção de ESβL pelo Sistema Automatizado Phoenix .....	60
4.3.2. Avaliação de Testes Fenotípicos para Detecção de Carbapenemase de acordo com as Recomendações do CLSI 2009.....	63
4.3.3. Confirmação do Perfil de Sensibilidade aos Carbapenens e a Cefoxitina pela Metodologia de Diluição em Ágar para as Amostras Resistentes a Ertapenem .....	67
4.3.4. Detecção dos Genes Codificadores de β-Lactamases por PCR.....	69
4.3.5. Análise do Sequenciamento e Interpretação dos Resultados .....	69
4.3.6. Teste de Hidrólise para Detecção de Carbapenemase.....	74
4.3.7. Avaliação da Similaridade Genética entre as Amostras de <i>Klebsiella pneumoniae</i> Resistentes a Ertapenem .....	74
4.3.8. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa .....	76
4.3.9. Avaliação dos Genes que Codificam as Porinas OmpK35 e OmpK36 .....	78
<b>5. DISCUSSÃO .....</b>	<b>80</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>103</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>104</b>
<b>8. RESUMO .....</b>	<b>126</b>
<b>9. ABSTRACT .....</b>	<b>127</b>
<b>10. ANEXOS .....</b>	<b>128</b>

## Índice de Abreviaturas e Siglas

ATCC - American Type Culture Collection

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute

ES $\beta$ L - Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase

IS - Insertion Sequence

KPC - *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase

LB - Luria Bertani

LEMC - Laboratório Especial de Microbiologia Clínica

M $\beta$ L - Metallo- $\beta$ -Lactamase

OMP - Outer Membrane Protein

SDS-PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis

PBP - Penicillin Binding Protein

PCR - Polymerase Chain Reaction

PFGE - Pulsed Field Gel Electrophoresis

SCOPE - Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance

TBE - Tris-Borato-EDTA

TSB - Tryptone Soy Broth

UFC - Unidade formadora de colônia

UTI - Unidade de Terapia Intensiva

UV - Ultravioleta

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Nomenclatura, sítio de isolamento e significância clínica das espécies de <i>Klebsiella</i> .....	4
<b>Tabela 2.</b> Características funcionais e moleculares dos principais grupos de $\beta$ -lactamases.....	16
<b>Tabela 3.</b> Classificação dos principais grupos de $\beta$ -Lactamases do tipo CTX-M, de acordo com a similaridade genética entre as sequências de aminoácidos.....	22
<b>Tabela 4.</b> Centros Médicos Participantes do Programa SCOPE Brasileiro entre Junho 2007 a Dezembro de 2008.....	35
<b>Tabela 5.</b> Gene alvo, oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ( <i>primers</i> ) e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores de $\beta$ -lactamases.....	44
<b>Tabela 6.</b> Iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de $\beta$ -lactamases AmpC pela PCR multiplex.....	46
<b>Tabela 7.</b> Gene alvo, oligonucleotídeos utilizados como iniciadores ( <i>primers</i> ) e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores das porinas.....	54
<b>Tabela 8.</b> Distribuição das amostras de <i>Klebsiella</i> spp. incluídas no estudo de acordo com o centro médico, espécie bacteriana, cidade, estado e região brasileira onde foram isoladas.....	57
<b>Tabela 9.</b> Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, realizado pelo sistema automatizado BD Phoenix, das 167 amostras de <i>Klebsiella</i> spp. incluídas no estudo.....	61

<b>Tabela 10.</b> Comparação entre os resultados do Teste de Triagem e o Teste Confirmatório para detecção fenotípica de carbapenemase das amostras de <i>Klebsiella</i> spp. com halo de inibição por disco-difusão $\leq 21$ mm para ertapenem.....	66
<b>Tabela 11.</b> Perfil de sensibilidade aos $\beta$ -lactâmicos entre os 15 isolados de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a ertapenem pela técnica de diluição em ágar.....	68
<b>Tabela 12.</b> Frequência de ES $\beta$ L caracterizada nas amostras de <i>Klebsiella</i> spp. de acordo com a região brasileira onde foram isoladas.....	71
<b>Tabela 13.</b> Distribuição dos tipos de ES $\beta$ L caracterizados nas amostras de <i>Klebsiella</i> spp. de acordo com o centro médico, cidade, estado e região brasileira onde foram isoladas.....	72
<b>Tabela 14.</b> Similaridade genética entre as 15 amostras de <i>K. pneumoniae</i> resistentes a ertapenem de acordo com o centro médico e a região geográfica onde foram isoladas.....	75

## Índice de Figuras

- Figura 1.** Placa modelo do teste de Hodge modificado utilizada para a detecção fenotípica da produção de carbapenemase..... 40
- Figura 2.** Distribuição das espécies de *Klebsiella* isoladas de infecção de corrente sanguínea do Projeto SCOPE (Junho 2007 a Dezembro 2008)..... 56
- Figura 3.** Distribuição dos casos de infecção de corrente sanguínea por *Klebsiella* spp. isoladas em 14 centros médico hospitalares, representativos das cinco regiões brasileiras, no período de Junho de 2007 a Dezembro de 2008 ..... 58
- Figura 4.** Fluxograma I: Avaliação dos mecanismos de resistência às cefalosporinas das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea..... 62
- Figura 5.** Fluxograma II: Avaliação dos mecanismos de resistência aos carbapenens das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea..... 65
- Figura 6.** Representação do Teste Hodge positivo. **A**: controle positivo (A28006), **B1** e **B2**: (Amostras Positivas: 30279 e 32548), **C**: controle negativo (A37202) e a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922..... 67
- Figura 7.** Frequência dos principais tipos de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado caracterizados em amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea nas cinco regiões brasileiras..... 73
- Figura 8.** Dendograma pelo programa *BioNumerics* demonstrando o coeficiente de similaridade entre as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem . Padrão de PFGE segundo critérios de Tenover, 1995..... 76
- Figuras 9A e 9B.** Perfil das proteínas de membrana externa em gel de Poliacrilamida 15%, pela técnica de SDS-PAGE. Amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem

(K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K10, K11, K12, K13, K14 e K17); S: amostra de *K. pneumoniae* sensível aos  $\beta$ -lactâmicos; M: padrão de peso molecular baixo.....78

**Figuras 10A e 10B.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação da PCR para os genes que codificam as porinas OmpK35 (Figura 10A) e OmpK36 (Figura 10B). M: padrão de peso molecular (100 pb). Amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem (K1,K2, K3, K5, K6, K7, K9, K10, K11, K12, K13, K14, K17 e K20); C(-): controle negativo; C(+): controle positivo (*K. pneumoniae* ATCC 700603)..... 79



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Agente Etiológico

A família *Enterobacteriaceae* é constituída por um grupo grande e heterogêneo de bactérias Gram negativas que são comumente isoladas de amostras biológicas e encontram-se amplamente distribuídas na natureza, podendo ser isoladas da água, solo, plantas e do trato gastrointestinal de seres humanos e animais (Konemam et al. 2001, Abbott 2007).

Ewing, em 1986, propôs um critério de classificação da família *Enterobacteriaceae*, que, atualmente, ainda promove um melhor entendimento da taxonomia dessa família, fragmentando-a em sete tribos diferentes: tribo I - *Escherichieae*, tribo II - *Edwardsielleaea*, tribo III - *Salmonelleae*, tribo IV - *Citrobactereaceae*, tribo V - *Klebsielleae*, tribo VI - *Proteeae* e tribo VII - *Yersinieae*. A tribo *Klebsielleae* é constituída por um grupo heterogêneo de bactérias, dividido em cinco gêneros: *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Hafnia*, *Pantoea* e *Serratia* (Konemam et al. 2001). A aplicação de técnicas de biologia molecular para o estudo da taxonomia dos microrganismos tem propiciado o descobrimento de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia desta família (Bergeys 2004;Farmer et al.2007).

As espécies do gênero *Klebsiella*, nome dado em homenagem ao microbiologista alemão Edwin Klebs, foram inicialmente classificadas em três espécies, de acordo com as características bioquímicas e importância clínica das doenças por elas causadas: *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella ozaenae* e *Klebsiella rhinoscleromatis*. Posteriormente, com a introdução de métodos de hibridização do ácido desoxirribonucléico (DNA), ficou demonstrado que essas

espécies bacterianas possuíam sequências de DNA homólogas, permitindo agrupá-las em uma única espécie de *Klebsiella pneumoniae* e subclassificá-las em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subsp. *rhinoscleromatis*. (Bergeys 2004).

Outras espécies do gênero *Klebsiella*, tais como: *K. planticola*, *K. terrigena*, *K. ornithinolytica*, *K. singaporensis* e *K. variicola* foram posteriormente descritas (Martinez *et al.* 2004; Rosenblueth *et al.* 2004). Estas espécies possuem pouca importância clínica e são, geralmente, isoladas de amostras do meio ambiente, como: solo, água e vegetais (Podschun *et al.* 1998; Podschun and Ullmann 1998). Entretanto, as demais bactérias do gênero *Klebsiella* também podem ser encontradas nos alimentos e nas fezes humanas e de outros animais. Nos seres humanos, podem colonizar a pele, nasofaringe e o trato gastrointestinal (Abbott 2007).

Entre as espécies de *Klebsiella* descritas como sendo capazes de causar doença em humanos, *K. pneumoniae* e *K. oxytoca* são as espécies mais frequentemente isoladas e são, portanto, consideradas patógenos oportunistas que podem causar bacteremia, pneumonia, infecção do trato urinário e de tecidos moles (Friedland *et al.* 2003; Lockhart *et al.* 2007). São agentes etiológicos isolados com frequência em casos de infecção hospitalar em unidades de urologia, pneumologia, neonatologia, geriatria e unidade de terapia intensiva (UTI) (Gupta 2002; Lockhart *et al.* 2007; Sewell *et al.* 1988). As demais espécies patogênicas raramente são isoladas de espécimes clínicos (Podschun and Ullmann 1998). A maioria das espécies de *Klebsiella* pode ser

identificada e diferenciada por testes laboratoriais convencionais baseados, principalmente, no perfil bioquímico das amostras.

Atualmente, o gênero *Klebsiella* está composto por oito espécies e três subespécies, citadas na Tabela 1, de acordo com a 9ª edição do *Manual of Clinical Microbiology* (Abbott 2007).

**Tabela 1.** Nomenclatura, sítio de isolamento e significância clínica das espécies de *Klebsiella*.

Designação Atual	Dados Clínicos			Fonte Ambiental
	Frequência	Sítio de Infecção	Significância	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	++++	Todos os sítios, Trato urinário, Trato respiratório	1	Ubiquitária, Alimentos e Água
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>ozaenae</i>	++	Trato urinário, Trato respiratório e Sangue	2	Desconhecido
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>rhinoscleromatis</i>	++	Trato respiratório	1	Desconhecido
<i>Klebsiella oxytoca</i>	++++	Todos os sítios	2	Ubiquitária, Alimentos e Água
<i>Klebsiella granulomatis</i>	++	Trato genital	1	Desconhecido
<i>Klebsiella variicola</i>	++	Sangue	1	Plantas
<i>Klebsiella singaporensis</i>	-			Solo
<i>Klebsiella ornithinolytica</i> ( <i>Raoultella</i> )	+	Ferida, Trato urinário e Sangue	2	Alimentos
<i>Klebsiella planticola</i> ( <i>Raoultella</i> )	Desconhecido	Similar a <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	3	Plantas e Água
<i>Klebsiella terrigena</i> ( <i>Raoultella</i> )	Desconhecido	Similar a <i>K.</i> <i>pneumoniae</i>	3	Solo e Água

Abreviações e símbolos: +++++, frequente; ++, raro; -, nunca foi isolado em humanos; 1, espécie mais patogênica ao homem; 2, raros casos de doença comprovada; 3, isolado de humanos, significância desconhecida. (Adaptado do livro *Manual of Clinical Microbiology*, 9º ed - Abbott, 2007).

*Klebsiella* spp. são bactérias capsuladas, compostas por um complexo ácido polissacáride, um importante fator de patogenicidade que protege a bactéria da fagocitose pelos granulócitos e contra a ação de fatores bactericidas do soro (Simoons-Smit *et al.* 1985; Simoons-Smit *et al.* 1986). Possuem de 0,3 a 1 µm de diâmetro e 0,6 a 6 µm de comprimento, não esporuladas, imóveis, anaeróbias facultativas, fermentadoras de glicose, não produtoras de ácido sulfídrico (H<sub>2</sub>S), capazes de crescer em meios contendo

cianato de potássio e de utilizarem o citrato como fonte de carbono. Podem ou não formar gás a partir da fermentação de glicose e hidrolisam a uréia (Konemam et al. 2001; Abbott 2007).

As amostras de *K. pneumoniae* apresentam-se sobre a superfície do ágar como colônias grandes, com diâmetro de 3 a 4 mm, brilhantes, de aspecto mucóide, que adquirem coloração rósea quando semeadas em ágar MacConkey, indicando a fermentação de lactose e produção de ácidos. Pela coloração de Gram são visualizadas como grandes bacilos Gram negativos, isolados aos pares ou em cadeias curtas (Konemam et al. 2001).

## **1.2. Epidemiologia das Infecções por *Klebsiella* spp.**

As Enterobactérias apresentam-se amplamente distribuídas na natureza, sendo um dos principais agentes Gram negativos causadores de infecção hospitalar, especialmente infecção de corrente sanguínea (Diekema *et al.* 2002; Wisplinghoff *et al.* 2004). As espécies de *Klebsiella* têm emergido como patógenos oportunistas, capazes de desenvolver também quadros de infecções adquiridas na comunidade (Ko *et al.* 2002). Entretanto, a maioria das infecções causadas por estes microrganismos continua sendo de origem hospitalar, cenário em que emergem rapidamente como uma das principais bactérias Gram negativas causadoras de infecção do trato urinário, pneumonia, infecções intra-abdominais e de corrente sanguínea, em pacientes imunocomprometidos e/ou com sérias doenças de base (Podschun and Ullmann 1998).

Uma análise da frequência dos principais patógenos de acordo com o programa SENTRY em hospitais brasileiros, no período de 2003 a 2008

demonstrou que *K. pneumoniae* foi o quarto patógeno mais comumente isolado de infecções da corrente sanguínea (12,5% de todos os isolados), pneumonia (13,5%) e infecções do trato respiratório (13,5%), e o quinto patógeno mais comumente isolado de infecções de pele e tecido moles (8,4%) (Andrade *et al.* 2008).

O isolamento de *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -Lactamase de espectro ampliado (ES $\beta$ L) tem tornado-se frequente em pacientes com infecção de corrente sanguínea (Tumbarello *et al.* 2006). Os microrganismos que produzem essas enzimas hidrolizam todas as cefalosporinas (exceto cefamicinas), penicilinas e monobactâmicos, reduzindo drasticamente o arsenal terapêutico disponível para o tratamento de infecções causadas por esses patógenos, que, em geral, apresentam sensibilidade apenas aos carbapenens e limitada sensibilidade às fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Perez *et al.* 2007).

A prevalência de cepas produtoras de ES $\beta$ L varia muito de região para região, sendo muito mais alta na América do Sul quando comparada a outras regiões do mundo (Villegas *et al.* 2008). Nos Estados Unidos, a prevalência de amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ES $\beta$ L, de forma geral, não ultrapassa 5% (Bush 2008). Na Europa, de acordo com particularidades de cada país, varia entre 9% e 13% (Canton *et al.* 2008) e na Ásia, a prevalência é de 17,2%, de acordo com dados do Programa de vigilância SENTRY (Bell *et al.* 2007). No Brasil, as taxas das infecções causadas por este microrganismo são muito maiores do que as taxas encontradas em outras partes do mundo. Marra e colaboradores constataram que 51% das amostras de *K. pneumoniae* isoladas em infecções da corrente sanguínea entre 1996 e 2001, em um hospital brasileiro, eram produtoras de ES $\beta$ L (Marra *et al.* 2006). Em 2008,

Andrade e colaboradores ao avaliar amostras de *Klebsiella* spp. de quatro cidades (Brasília, São Paulo, Porto Alegre e Florianópolis) localizadas em diferentes estados brasileiros constataram que aproximadamente 50% das amostras de *K. pneumoniae* eram também produtoras de ESβL (Andrade *et al.* 2008).

Infecções por enterobactérias resistentes a carbapenens e/ou produtoras de carbapenemase estão emergindo como um importante desafio no contexto de cuidados à saúde (Schwaber *et al.* 2008). Atualmente, *K. pneumoniae* é a espécie mais comum entre as enterobactérias resistentes a carbapenens descritas no mundo e disseminadas na Costa Leste dos Estados Unidos (Queenan and Bush 2007). Normalmente, essas cepas apresentam resistência concomitante a quase todos os agentes antimicrobianos testados e estão associadas a altas taxas de mortalidade, particularmente entre pacientes muito debilitados, expostos a procedimentos invasivos e com tempo de hospitalização prolongado (CDC 2009). Desde que foi relatado o primeiro caso em 1999, na Carolina do Norte, cepas de *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem e produtoras da enzima KPC (“*Klebsiella pneumoniae* carbapenemases”) foram identificadas em diversas partes do Mundo (Queenan and Bush 2007).

Nos Estados Unidos, estão localizadas as principais regiões endêmicas desse perfil de resistência e 24 Estados americanos já relataram episódios de infecção por *K. pneumoniae* produtora de KPC, que é constantemente detectado em alguns hospitais de Nova Iorque e Nova Jersey (Srinivasan and Patel 2008). Em uma análise de dados realizada pelo CDC, 8% dos casos de infecção relacionada à assistência a saúde, em 2007, foram representados por

episódios infecciosos causados por *K. pneumoniae* resistentes a carbapenens, comparado a menos de 1% dos casos relatados em 2000 (CDC 2009).

### **1.3. Infecções da Corrente Sanguínea Causada por *Klebsiella* spp.**

As Infecções de corrente sanguínea (ICS) caracterizam-se como uma importante causa de morbidade e mortalidade mundial, representando 5 a 15% de todos os casos de infecções adquiridas no ambiente hospitalar (Diekema and Pfaller 2007), estando, conseqüentemente, representada entre as dez mais frequentes causas de morte nos Estados Unidos (CDC 2009;Freidland *et al.* 2003). Apesar da falta de conhecimento da verdadeira incidência de ICS hospitalar, estima-se que ocorram aproximadamente 250.000 novos casos anualmente nos Estados Unidos (Wisplinghoff *et al.* 2004).

Atualmente, tanto na Europa quanto nos Estados Unidos, o número de ICS causadas por bactérias Gram positivas têm se tornado cada vez mais frequentes, correspondendo a 52,9% e 65%, respectivamente (Bouza *et al.* 2001; Wisplinghoff *et al.* 2004). No Brasil, apesar da maior incidência das ICS estar também representada por episódios infecciosos por *Staphylococcus aureus* (15,9%) e por *Staphylococcus coagulase negativo* (15,7%), os bacilos Gram negativos representam mais de 50% de todos os patógenos causadores de ICS (Andrade *et al.* 2008).

Alguns estudos descreveram que a incidência dessas infecções varia de 1%, em unidades de terapia intensiva (Warren *et al.* 2001), a 36% em transplantados de medula óssea (Collin *et al.* 2001). A taxa de mortalidade pode variar de 12%, em unidades de internação geral, a 80% entre os pacientes internados na UTI (Gatell *et al.* 1988;Pittet *et al.* 1993). O tempo de



permanência prolongado na UTI, associado a uma terapia antimicrobiana empírica inapropriada, caracteriza-se como um importante preditor de morte entre esse grupo de pacientes (Bryan *et al.* 1983;Kollef and Fraser 2001;Pittet *et al.* 1994;Tumbarello *et al.* 2006).

### **1.3.1. Programas de Vigilância**

Diante do significativo aumento da resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos em todo o mundo, programas de vigilância de resistência tornaram-se fundamentais para: (i) definir os principais patógenos bacterianos isolados de sitios infecciosos específicos; (ii) caracterizar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, para que, dessa forma, torne-se possível estabelecer uma base para terapia empírica adequada; (iii) avaliar o modo de disseminação de bactérias resistentes; (iii) detectar o surgimento de novos tipos de resistência e; (iv) desenvolver um monitoramento local e/ou global da disseminação de patógenos resistentes (Felmingham 2002;Jones and Masterton 2001;Wisplinghoff *et al.* 2004).

Dentre os programas de vigilância que monitoram infecções por Enterobactérias, destacam-se o Programa SCOPE (“Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance”) (Wisplinghoff *et al.* 2004), o Programa SENTRY (“Antimicrobial Surveillance Program”) (Andrade *et al.* 2008), o Programa MYSTIC (“Meropenem Yearly Susceptibility Test Information”) (Goossens and Grabein 2005) e o Programa EARSS (“European Antimicrobial Resistance Surveillance System”) EUROPEAN ANTIMICROBIAL RESISTANCE SURVEILLANCE SYSTEM (EARSS) 2006.

Dados do programa SENTRY demonstraram que *Klebsiella* spp. foi o quarto patógeno mais comum entre todos os microrganismos recuperados de infecções da corrente sanguínea, no período de 2003 a 2008, no Brasil (Andrade *et al.* 2008), entretanto, de acordo com dados do Programa SCOPE americano, *Klebsiella* spp. representou o segundo patógeno (5%) mais frequente entre todos os bacilos Gram negativos isolados neste mesmo sítio de infecção (Wisplinghoff *et al.* 2004).

#### **1.4. Fatores de Risco para o Desenvolvimento de ICS por *Klebsiella* spp.**

Vários fatores de risco associados à aquisição de ICS por *Klebsiella* spp. têm sido observados. Entre os quais, destacam-se: a realização de procedimentos invasivos (cateter venoso central, cateter vesical, ventilação mecânica e cateteres urinários), tempo de hospitalização prolongado, principalmente em UTI; gravidade da doença de base, especialmente processos oncológicos, queimaduras e diabetes; imunossupressão por qualquer causa e; prematuridade ou baixo peso ao nascer (Bouza *et al.* 2001; Tumbarello *et al.* 2006).

Outro fator de risco muito importante é o uso prévio de antimicrobianos, principalmente cefalosporinas de amplo espectro, por propiciar a emergência de mecanismos de resistência, entre os quais, destaca-se a produção ESβL (MacAdam *et al.* 2006; Tumbarello *et al.* 2007). Na Europa e nos Estados Unidos, o número de ICS causadas por *K. pneumoniae* produtora de ESβL é uma tendência crescente, que expresa um impacto significativo sobre as taxas de mortalidade e os custos hospitalares (Schwaber and Carmeli 2007; Tumbarello *et al.* 2006).

A grande diversidade dos fatores de risco, associada à aquisição de ICS hospitalar por microrganismos multiresistentes, deve-se às grandes diferenças epidemiológicas locais ou mesmo às diferenças epidemiológicas avaliadas em cada estudo. Dessa forma, é de extrema importância a identificação dos fatores de risco para aquisição de infecção hospitalar, tendo em vista que o conhecimento desses fatores permite a elaboração de estratégias específicas de prevenção para limitar o aparecimento de tais infecções (CDC 2009).

### **1.5. Mortalidade Associada à Infecção por *Klebsiella* spp.**

As infecções da corrente sanguínea hospitalares estão, diretamente relacionadas, com o aumento da mortalidade, especialmente em pacientes gravemente doentes (Wisplinghoff *et al.* 2004). Quadros de sepse por bactérias Gram negativas, choque séptico, gravidade da doença de base e terapia antimicrobiana inicial inadequada são apontados como os principais fatores associados ao aumento da mortalidade em pacientes internados em UTI, visto que esses pacientes apresentam maior vulnerabilidade para o desenvolvimento de episódios de infecção hospitalar (Diekema and Pfaller 2007). Outro fator relacionado com o aumento da mortalidade são as infecções causadas por bactérias multiresistentes, pois os pacientes acometidos por esses microrganismos podem ter uma maior probabilidade de evoluir para o óbito (Schwaber and Carmeli 2007).

Dentre os diversos mecanismos de resistência aos antimicrobianos, a produção ES $\beta$ L tem gerado preocupação devido a sua crescente incidência e ao fato de estar relacionada com falha terapêutica e com o aumento da mortalidade. Schwaber e colaboradores concluíram que o percentual de

mortalidade foi duas vezes maior entre os pacientes que apresentaram episódio de infecção de corrente sanguínea por enterobactérias produtoras de ESβL (Schwaber *et al.* 2006). Estudo de revisão sistemática e meta-análise, baseado em dados de dezesseis trabalhos publicados em diferentes partes do mundo, constatou que cerca da metade dos estudos avaliados não apresentaram correlação significativa entre o percentual de mortalidade associado à produção de ESβL (Schwaber and Carmeli 2007). A justificativa da falta de um consenso na literatura, quanto ao percentual de mortalidade relacionado à produção de ESβL, está, em grande parte, associada ao reduzido número de amostras testadas em cada estudo, e conseqüentemente, a falta desses dados demonstram a ausência de um significativo efeito estatístico. Além disso, apenas um dos 16 estudos avaliados relatou o resultado de uma análise multivariada. Dessa forma, não foi possível tirar conclusões sobre mortalidade atribuível, ou causalidade, somente sobre índice de mortalidade bruta (Schwaber and Carmeli 2007).

#### **1.6. Mecanismos de Resistência aos β-Lactâmicos em *Klebsiella* spp.**

Os β-lactâmicos são os agentes antimicrobianos utilizados com maior frequência na clínica médica e o uso indiscriminado, principalmente das cefalosporinas de segunda e terceira gerações para o tratamento de infecções de corrente sanguínea hospitalar causadas por enterobactérias, foi acompanhado pelo surgimento de cepas bacterianas produtoras de ESβLs. A resistência a esses agentes dificulta o tratamento e aumenta a morbimortalidade e os custos com o paciente (Tumbarello *et al.* 2006).

A resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em *Klebsiella spp.* pode ocorrer mais especificamente por dois mecanismos de resistência: (i) Produção de  $\beta$ -lactamases; (ii) perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (porinas).

### **1.6.1. Produção de $\beta$ -Lactamases**

A produção de  $\beta$ -lactamases caracteriza o mecanismo de maior frequência e relevância descrito em amostras de *Klebsiella spp.* Inicialmente, o desenvolvimento de cefalosporinas de amplo espectro no final da década de 80 foi resguardado como um importante arsenal terapêutico na luta contra a resistência bacteriana mediada pela produção de  $\beta$ -lactamases (Bush 2002; Medeiros 1997). De forma lamentável, a emergência de *E. coli* e *K. pneumoniae* resistentes a ceftazidima e outras cefalosporinas comprometeram seriamente a atividade e potência destes antibióticos (Perez *et al.* 2007).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel  $\beta$ -lactâmico, impossibilitando assim a sua atividade antimicrobiana (Livermore 1995). Em geral, vários membros da família das  $\beta$ -lactamases são capazes de hidrolisar as penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenens. Dessa forma, a interação entre estas enzimas e seus substratos resulta em compostos inativos que permitem a sobrevivência da célula bacteriana (Bush 2001). Entretanto, alguns fatores podem interferir na capacidade da  $\beta$ -lactamase em conferir resistência, entre os quais destacam-se a quantidade de enzima produzida, a habilidade da enzima em hidrolisar o antimicrobiano e a velocidade com que o  $\beta$ -lactâmico penetra pela membrana celular externa (Livermore 1991).

As  $\beta$ -lactamases são produzidas por inúmeras espécies bacterianas, porém com diversidades estruturais e localizações diferentes. Nas bactérias Gram positivas, as  $\beta$ -lactamases são, em sua maioria, induzíveis e excretadas para o meio extracelular, aonde acontece a hidrólise do composto  $\beta$ -lactâmico antes que este se ligue as PBP (“Penicillin Binding Protein”) na membrana celular, dessa forma irão apresentar uma atividade menor que as  $\beta$ -lactamases produzidas pelas bactérias Gram negativas. Nestas bactérias, as  $\beta$ -lactamases encontram-se estrategicamente situadas no espaço periplasmático, podendo alcançar maiores concentrações e agir de modo mais eficaz sobre os  $\beta$ -lactâmicos que estão atravessando este espaço para atingir as PBP (Bush *et al.* 1995).

A síntese das  $\beta$ -lactamases pode ser cromossômica ou mediada por plamídios e transposons, podendo ser induzida tanto pela presença de  $\beta$ -lactâmicos, como de precursores de parede celular no meio extracelular (Konemam *et al.* 2001).

Devido à grande diversidade de tipos de  $\beta$ -lactamases, três diferentes tentativas de estabelecer um sistema de classificação para estas enzimas foram propostos ao longo dos anos (Bradford 2001). O primeiro esquema foi sugerido por Richmond e Sykes (1973) e foi baseado no perfil do substrato das enzimas e na localização do gene codificador das mesmas (Richmond and Sykes 1973; Bradford 2001). Atualmente, dois esquemas de classificações têm sido considerados como de maior importância. A classificação de Ambler, desenvolvida em 1980, foi baseada nas sequências de nucleotídeos e aminoácidos das enzimas e somente quatro classes moleculares de  $\beta$ -lactamases foram descritas: A)  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado (ES $\beta$ Ls),

penicilinas e carbenicilinas; B) metalo- $\beta$ -lactamases; C) cefalosporinas cromossomais; e D) oxacilinas (Ambler 1980). Em 1995, Bush, Jacoby e Medeiros propuseram um esquema baseado nas propriedades bioquímicas, estrutura molecular e sequência nucleotídica das enzimas, combinando as características estruturais e funcionais das  $\beta$ -lactamases, classificando-as em grupos funcionais (Bush *et al.* 1995).

A Tabela 2 apresenta, de modo simplificado, a correlação entre a classificação molecular de Ambler (1980) e a de Bush, Jacoby e Medeiros (Bush *et al.* 1995), além das características funcionais das  $\beta$ -lactamases.

**Tabela 2.** Características funcionais e moleculares dos principais grupos de  $\beta$ -lactamases.

Classificação de BUSH – JACOBY - MEDEIROS, 1995		Classificação de AMBLER, 1989	Características funcionais
Grupo Funcional	Subgrupos	Classe Molecular	
1		C	Enzimas cromossômicas e plasmidiais frequente em Gram negativos. Isoladamente conferem resistência a todos os $\beta$ -lactâmicos, exceto carbapenens (a menos que exista alteração de porina). Não são inibidas pelo ácido clavulânico.
2		A, D	A grande maioria das enzimas é inibida por ácido clavulânico.
	2 <sup>a</sup>	A	Penicilinas produzidas por <i>Staphylococcus</i> spp. e <i>Enterococcus</i> spp. conferem altos níveis de resistência às penicilinas.
	2b	A	$\beta$ -lactamases de espectro reduzido de bactérias Gram-negativas. Inclui TEM-1 e SHV-1.
	2be	A	$\beta$ -lactamases de espectro ampliado conferem resistência às cefalosporinas de amplo espectro e monobactâmicos (ESBLs).
	2br	A	$\beta$ -lactamases derivadas da TEM e SHV resistentes aos inibidores de $\beta$ -lactamases (IRT).
	2c	A	Enzimas que hidrolisam a carbenicilina.
	2d	D	Enzimas que hidrolisam a cloxacilina (oxacilina), pouco inibidas pelo ácido clavulânico.
	2e	A	Cefalosporinases inibidas pelo ácido clavulânico.
	2f	A	Enzimas que possuem um sítio ativo serina, que hidrolisam carbapenens e são inibidas pelo ácido clavulânico.
3	3a, 3b, 3c	B	Metallo- $\beta$ -lactamases, que conferem resistência aos carbapenens e todos os outros $\beta$ -lactâmicos, com exceção dos monobactâmicos. Não são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam.
4		ND	Enzimas não sequenciadas, que não são categorizadas em outros grupos.

Abreviatura: N.D., não determinada (Adaptado do artigo de Bush, 2001).



### 1.6.1.1. $\beta$ -Lactamases de Espectro Ampliado (ES $\beta$ Ls)

Estas enzimas representam o maior grupo de  $\beta$ -lactamases estudadas atualmente (Bradford 2001; Bush *et al.* 1995; Gniadkowski 2008). Descritas inicialmente em *K. pneumoniae* e *E. coli*, as ES $\beta$ L encontram-se disseminadas entre as espécies de enterobactérias, sendo encontradas também em *P. aeruginosa* (Bradford 2001). São enzimas capazes de hidrolisar todos os antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos com exceção das cefamicinas (cefotina, cefotetan) e dos carbapenems (imipenem, meropenem) e, são inibidas pelo ácido clavulânico, tazobactam e sulbactam. Pertencem à classe molecular A de Ambler (1989) e estão distribuídas no grupo 2 de Bush, Jacoby e Medeiros (1995). As ES $\beta$ L apresentam uma serina no seu sítio ativo e são codificadas por genes localizados em plasmídeos que podem também codificar resistência aos aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol e trimetoprim/sulfametoxazol (Rossolini *et al.* 2008; Winokur *et al.* 2001).

A descrição da primeira  $\beta$ -lactamase, denominada TEM-1 (subgrupo 2b) ocorreu em 1960. Esta enzima foi encontrada em uma amostra clínica de *Escherichia coli* isolada da corrente sanguínea de uma jovem paciente grega chamada Temoniera, origem da sigla da  $\beta$ -lactamase TEM (Turner 2005). Atualmente é responsável por mais de 90% da resistência a ampicilina em amostras de *E. coli*, sendo também responsável pela resistência a ampicilina e penicilina em amostras de *Haemophilus influenzae* e *Neisseria gonorrhoeae* (Paterson and Bonomo 2005; Livermore 2008). A  $\beta$ -lactamase TEM-1 é codificada por genes localizados, usualmente, em elementos genéticos móveis, plasmídios e transposons, que por meio de uma série de eventos de transposição e rearranjos, migram para diferentes plasmídios entre

microrganismos da mesma espécie ou de espécies diferentes. Devido à grande facilidade de disseminação, esta enzima tem sido descrita em diversas espécies de Enterobactérias, e em outras espécies bacterianas (Paterson and Bonomo 2005).

A  $\beta$ -lactamase TEM-2 foi a primeira derivada da TEM-1 e, apesar de ter sofrido alteração de um aminoácido e, conseqüentemente, uma alteração em seu ponto isoelétrico de 5,4 para 5,6, não apresentou modificação no perfil do substrato (Barthelemy *et al.* 1985); (Bradford 2001). A  $\beta$ -lactamase TEM-3 (subgrupo 2be) reportada em 1988 foi a primeira a apresentar o fenótipo ES $\beta$ L (Sougakoff *et al.* 1988). Atualmente existem mais de 160 derivados de TEM (<http://www.lahey.org/Studies/temtable.asp>) sendo algumas resistentes aos inibidores de  $\beta$ -lactamase e a grande maioria apresenta o fenótipo ES $\beta$ L (Bradford 2001). As substituições de aminoácidos que ocorrem em determinadas posições da enzima TEM resultam em leves alterações nos fenótipos de ES $\beta$ L, com a habilidade de hidrolisar oximino-cefalosporinas específicas como ceftazidima e cefotaxima, ou alterar seus pontos isoelétricos de 5,2 para 6,5. (Bradford 2001). Estudos laboratoriais de indução de mutações para a  $\beta$ -Lactamase TEM-1 (Blazquez *et al.* 2000;Huang *et al.* 1996;Vakulenko *et al.* 1995) demonstraram que essas mutações, ocorridas naturalmente em ES $\beta$ L do tipo TEM, são resultado da pressão seletiva de vários agentes  $\beta$ -lactâmicos utilizados em uma determinada instituição (Blazquez *et al.* 2000). Embora essas  $\beta$ -lactamases sejam mais frequentemente relatadas em *E. coli*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter aerogenes*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Proteus rettgeri*, e *Salmonella* spp. (Bonnet *et al.* 1999;Marchandin *et al.* 1999;Morosini *et al.* 1995;Palzkill *et al.* 1995;Perilli *et al.* 2000;Tessier *et al.*

1998), têm sido, também, reportadas entre bactérias Gram negativas não Enterobacteriaceae. As  $\beta$ -lactamases TEM-21 (Dubois *et al.* 2005) e TEM-42 (Mugnier *et al.* 1996) foram descritas em uma cepa de *P. aeruginosa* e a TEM-17 em uma cepa de *Capnocytophaga ochracea* (Rosenau *et al.* 2000).

Outra  $\beta$ -lactamase comumente encontrada em *K. pneumoniae* é a enzima SHV-1, responsável por até 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídios nesta espécie (Tzouvelekis and Bonomo 1999). Em muitas cepas de *K. pneumoniae* o gene  $bla_{SHV-1}$ , ou outro gene relacionado, apresenta-se integrado ao cromossomo bacteriano (Livermore 1995). A denominação da sigla SHV vem de uma propriedade bioquímica da enzima variável sulfidrílica (“sulphydryl variable”) (Tzouvelekis and Bonomo 1999). Neste gene, o fenótipo ES $\beta$ L é caracterizado a partir de substituições de aminoácidos que ocorrem no gene  $bla_{SHV-1}$ , e estas alterações assemelham-se as que acontecem com as ES $\beta$ L do tipo TEM (Huletsky *et al.* 1993). Em 1983, foi descrito o primeiro relato de uma SHV de espectro ampliado, denominada SHV-2, encontrada em amostras clínicas de *K. pneumoniae*, *K. ozaenae* e *Serratia marcescens* (Knothe *et al.* 1983). Em 1988, SHV-3 e SHV-4 foram descritas por Jarlier e colaboradores (Jarlier *et al.* 1988) e Buré e colaboradores (Bure *et al.* 1988), respectivamente. Ambas foram encontradas em amostras clínicas de *K. pneumoniae* recuperadas de hospitais franceses. Desde então, inúmeros relatos de surtos envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado têm sido reportados (Coque *et al.* 2008).

Apesar de grande parte das  $\beta$ -lactamases do tipo SHV apresentar fenótipo ES $\beta$ L, a beta-lactamase SHV-10 possui fenótipo de resistência aos inibidores das  $\beta$ -lactamases e apesar de hidrolisar as penicilinas, essa enzima

apresenta uma hidrólise reduzida para as cefalosporinas e, dessa forma, não é classificada como ES $\beta$ L (Bradford 2001). Desde 1982, quando a ceftazidima foi disponibilizada para o uso clínico, até o presente momento, foram descritas mais de 140 variantes da  $\beta$ -lactamase da classe SHV (<http://www.lahey.org/Studies/webt.asp#SHV>). Os genes do tipo *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> possuem propriedades bioquímicas parecidas, conservando, assim, um grau de similaridade entre si. A diferença estrutural entre estas enzimas é discreta, e está relacionada com mudanças de aminoácidos junto ao sítio ativo da enzima (Bradford 2001). Entretanto, as ES $\beta$ L do tipo CTX-M apresentam apenas 40% de similaridade com as  $\beta$ -lactamases TEM e SHV (Tzouveleakis *et al.* 2000). Estas  $\beta$ -lactamases são codificadas por genes, *bla*<sub>CTX-M</sub>, localizados em plasmídios, os quais normalmente abrigam outros genes que conferem resistência aos aminoglicosídeos, ao cloranfenicol, às sulfonamidas, ao trimetoprim e à tetraciclina. De acordo com relato de Humeniuk e colaboradores, acredita-se que a  $\beta$ -lactamase tipo CTX-M foi originada a partir da enzima cromossômica AmpC de *Kluyvera ascorbata*, devido ao seu alto grau de homologia (Bonnet 2004).

Os primeiros casos de infecções causadas por isolados de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de CTX-M foram relatados no final dos anos 80 no Japão, Europa e Argentina. Desde então, essas enzimas vêm se disseminando mundialmente em diferentes gêneros de enterobactérias (Bonnet 2004; Rossolini *et al.* 2008). Atualmente, encontram-se descritos na literatura mais de 80 tipos de CTX-M diferentes (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). As variantes alélicas de CTX-M estão agrupadas em seis diferentes grupos (CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8,

CTX-M-9, CTX-M-25 e CTX-M-45) e cada grupo é representado pelo tipo da  $\beta$ -lactamase CTX-M que foi descrito pela primeira vez (Tabela 3). As enzimas pertencentes ao mesmo grupo diferem umas das outras por apenas um, ou por pouquíssimos aminoácidos (Rossolini *et al.* 2008). Essas  $\beta$ -lactamases têm a propriedade de conferir resistência a todas as cefalosporinas de espectro ampliado, porém, apresentam como substrato preferencial a cefotaxima e a ceftriaxona. Embora tenha sido descrito na literatura a ocorrência de  $\beta$ -lactamases do tipo CTX-M com maior atividade hidrolítica contra a ceftazidima que a cefotaxima, esse achado tem sido justificado devido ao uso extensivo de ceftazidima na prática médica (Bonnet 2004;Cartelle *et al.* 2004;Rossolini *et al.* 2008).

No início da década de 1990, a  $\beta$ -lactamase CTX-M-2 disseminou-se rapidamente na Argentina e em países vizinhos (Rossolini *et al.* 2008). Outros membros da família CTX-M estão distribuídos em diversos lugares do mundo; CTX-M-9 e CTX-M-14 predominantemente na Ásia e na Espanha (Hernandez *et al.* 2005;Munday *et al.* 2004), CTX-M-3 e CTX-M-15 na Europa. Apesar de não ter sido isolada no Reino Unido antes de 2001, a enzima CTX-M-15 é atualmente a ES $\beta$ L mais prevalente em amostras bacterianas de *E. coli* e *K. pneumoniae* nesta região (Livermore and Hawkey 2005). Durante os últimos 15 anos, estas enzimas já foram relatadas em quase todas as partes do mundo (Rossolini *et al.* 2008) e, em algumas regiões, superam a incidência das clássicas ES $\beta$ L do tipo TEM e do tipo SHV (Pournaras *et al.* 2004;Yan *et al.* 2006). A disseminação da  $\beta$ -lactamase do tipo CTX-M está causando importantes e imprevisíveis mudanças na epidemiologia da resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos (Rossolini *et al.* 2008).

**Tabela 3.** Classificação dos principais grupos de  $\beta$ -Lactamases do tipo CTX-M, de acordo com a similaridade genética entre as sequências de aminoácidos.

Grupos de ES $\beta$ L do tipo CTX-M	Variantes dos grupos	Origem do gene <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	Referência
CTX-M-1	CTX-M-1/3/10-12/15/22/23/28-30/32-34/36/37/42/52-54/57/58/60/61	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Rodriguez et al., 2004
CTX-M-2	CTX-M-2/4-7/20/31/35/43/44	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Bonnet; 2004
CTX-M-8	CTX-M-8/40/63	<i>Kluyvera georgian</i>	Rodriguez et al., 2004
CTX-M-9	CTX-M-9/13/14/16/17-19/21/24/27/38/46-51/55/65	<i>Kluyvera georgian</i>	Olson et al., 2005
CTX-M-25	CTX-M-25/26/39/41	NI	
CTX-M-45	CTX-M-45	NI	

Abreviatura: NI - A fonte original dos genes que codificam os membros dos grupos CTX-M-25 e CTX-M-45 estão sendo caracterizadas (Rossolini *et al.* 2008).

As  $\beta$ -lactamases do tipo OXA não apresentam similaridade genética com as ES $\beta$ L (TEM e SHV), pertencem ao grupo 2d de Bush (Bush *et al.* 1995) e à classe molecular D de Ambler (Ambler 1980). São encontradas com maior frequência em cepas de *P. aeruginosa* do que em cepas de Enterobactérias, conferem resistência a ampicilina e cefalotina e apresentam alta atividade hidrolítica contra a oxacilina e cloxacilina, fato este que deu origem ao nome do grupo. São fracamente inibidas pelo ácido clavulânico, com exceção da OXA-18 (Bradford 2001; Philippon *et al.* 1997).

As  $\beta$ -lactamases OXA-14, OXA-11, OXA-16, OXA-13, e OXA-19 diferem da OXA-10 por apenas um, dois ou até nove aminoácidos. Essas  $\beta$ -lactamases apresentam-se fracamente resistentes a oximino cefalosporinas quando clonadas em cepas de *E. coli*, entretanto apresentam alto nível de resistência em cepas de *P. aeruginosa* tranconjugantes (Hall *et al.* 1993). Diferente da

maioria das ES $\beta$ L do tipo OXA, a  $\beta$ -Lactamase OXA-17 confere maior nível de resistência a cefoxitina e ceftriaxona, que a ceftazidima (Danel *et al.* 1999). Atualmente, encontra-se descrito na literatura mais de 140 tipos diferentes de OXA (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Muitos dos mais recentes membros da família de  $\beta$ -Lactamase do tipo OXA não são classificados como ES $\beta$ L e incluem OXA-20 (Naas *et al.* 1998), OXA-22 (Nordmann *et al.* 2000), OXA-24 (Bou *et al.* 2000), OXA-25, -26 e -27 (Afzal-Shah *et al.* 2001), e OXA-30 (Siu *et al.* 2000). Essas enzimas foram caracterizadas em amostras bacterianas isoladas na Turquia e na França, apesar desse fato não caracterizar esses países como prováveis focos dessas enzimas (Bradford 2001).

Outras variantes de ES $\beta$ L também já foram descritas em diferentes organismos como BES (*Serratia marcescens*), FEC-1 (*E. coli*), CME-1 (*Cryseobacterium meningosepticum*), PER (5 variantes - *P. aeruginosa* e *Salmonella enterica*), SFO (*E. cloacae*), TLA (*E. coli*) e VEB (7 variantes - *E. coli*), sendo pouco frequentes (Bradford 2001) (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>). Essas enzimas também conferem resistência a todas as oximino cefalosporinas, especialmente a ceftazidima e ao aztreonam.

#### **1.6.1.2. $\beta$ -Lactamases Plasmidiais do Tipo AmpC**

As  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC pertencem ao grupo 1 de Bush (Bush *et al.* 1995) e a classe molecular C de Ambler (Ambler 1980). As enzimas do tipo AmpC plasmidiais são provavelmente originárias das AmpCs cromossomais que foram mobilizadas entre espécies por meio de plasmídeos. As enzimas AmpCs cromossomais já foram descritas em diferentes patógenos, entre os quais

destaca-se o grupo CESP (*Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Serratia marcescens*, *Providência stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii*), podendo ter atividade induzível ou constitutiva (Philippon *et al.* 2002).

As primeiras enzimas do tipo AmpC plasmidiais foram relatadas por Papanicolaou e colaboradores, 1990. Os autores caracterizaram uma enzima localizada em um plasmídeo com 90% de similaridade com o gene *ampC* de *E. cloacae*, dando início a um novo grupo de enzimas pertencentes a classe C, conhecidas como AmpC plasmidiais (Papanicolaou *et al.* 1990). Desde então, essas enzimas já foram descritas, principalmente, em isolados de *K. pneumoniae*, *K. oxytoca*, *Salmonella* spp., *Proteus mirabilis* e *E. coli*. As AmpC plasmidiais conferem resistência às penicilinas, às cefalosporinas de 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup> e 3<sup>a</sup> gerações, aos monobactâmicos (aztreonam) e as associações com inibidores de  $\beta$ -lactamases (sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico). Até o momento já foram descritos: BIL-1, CMY, FOX, MOX, LAT, ACT, ACC, MIR-1 e DHA (Philippon *et al.* 2002). Relatos demonstraram que a associação da produção de AmpC plasmidial com perda de porina resultou na resistência aos carbapenems em *K. pneumoniae* (Wang *et al.* 2009).

#### **1.6.1.3. Carbapenemases da Classe A e D**

Os carbapenems são considerados os agentes mais potentes contra infecções causadas por bactérias Gram negativas devido à sua elevada afinidade pelas PBP, estabilidade diante da maioria das  $\beta$ -lactamases, incluindo as ES $\beta$ L e as do tipo AmpC, e pela excelente permeabilidade através da membrana externa bacteriana (Woodford *et al.* 2000). No entanto, nos últimos anos, o isolamento de bactérias Gram negativas resistentes também



aos carbapenens vêm se tornando mais frequente em diversas partes do mundo (Nordmann and Poirel 2002).

Esses mecanismos de resistência em enterobactérias podem ser causados pelas carbapenemases da classe A ou em raras ocasiões pelas carbapenemases da classe D. Estão incluídas no grupo das carbapenemases da classe A (Ambler 1980) ou grupo 2f de Bush (Bush *et al.* 1995) as enzimas do tipo GES (11 variantes), KPC (10 variantes), SME (3 variantes), IMI, NMC-A e SFC-1 (Walther-Rasmussen and Hoiby 2007).

As carbapenemases do tipo KPC são enzimas estritamente plasmidiais que apresentam resistência a todas as cefalosporinas e monobactâmicos e redução da sensibilidade para os carbapenens (Queenan and Bush 2007). O primeiro membro da família KPC foi descrito em uma cepa de *K. pneumoniae* isolada na Carolina do Norte em 1996 (Yigit *et al.* 2001). Em 1998, a variação de um único aminoácido, caracterizou por uma mutação pontual a primeira variante, denominada KPC-2 (Moland *et al.* 2003) também descrita numa cepa de *K. pneumoniae*. A partir de então, relatos de KPC-2 tornaram-se frequentes na Costa Leste dos Estados Unidos e rapidamente expandiu-se, sendo descrito em diversas partes do mundo (Queenan and Bush 2007). A grande capacidade de disseminação dessa enzima, devido a sua localização plasmidial e ao fato de ser, frequentemente, encontrada em cepas de *K. pneumoniae*, que é conhecida por sua capacidade de acumular e transferir determinantes de resistência, é motivo de muita preocupação pelas agências nacionais de saúde (Queenan and Bush 2007). Embora as carbapenemases do tipo KPC sejam predominantemente descritas em cepas de *K. pneumoniae*, existem relatos dessa enzima em cepas de *Enterobacter* spp. (Hossain *et al.* 2004; Bratu *et al.*

2005), *Escherichia coli* (Navon-Venezia *et al.* 2006), *Salmonella* spp. (Miriagou *et al.* 2003), *Citrobacter freundii* e *Pseudomonas aeruginosa* (Villegas *et al.* 2007). O tratamento de infecções causadas por microrganismos que expressam esse determinante de resistência é extremamente difícil, resultando muitas vezes em altas taxas de mortalidade, devido à resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (Bratu *et al.* 2005).

As carbapenemases do tipo GES foram descritas pela primeira vez em 2000. Inicialmente, essas enzimas foram classificadas como sendo pertencentes ao grupo das ES $\beta$ L (grupo 2be de Bush), devido a característica de hidrolisar penicilinas e cefalosporinas de amplo espectro (Giakkoupi *et al.* 2000). Entretanto, após a descrição de GES-2 em *P. aeruginosa* com capacidade de hidrolisar, também, carbapenem (imipenem), este grupo foi transferido para o grupo 2f (Poirel *et al.* 2001;Queenan and Bush 2007). Poirel e colaboradores descreveram o primeiro relato de GES-1 numa cepa de *K. pneumoniae* isolada na Guiana Francesa (Poirel *et al.* 2000). Desde então onze variantes do tipo GES foram descritas em membros da família Enterobacteriaceae e *P. aeruginosa* na África do Sul, Japão, Grécia, França e Brasil (Picao *et al.* 2009;Poirel *et al.* 2001;Poirel *et al.* 2005;Vourli *et al.* 2004;Wachino *et al.* 2004).

As carbapenemases da classe D (Ambler 1980), também chamadas de carbapenemases do tipo OXA, apresentam baixa atividade hidrolítica aos carbapenens (oxa-carbapenemases). A produção destas enzimas, em associação com outro mecanismo de resistência, como por exemplo, alteração da permeabilidade da membrana externa, hiperexpressão de um sistema de

efluxo ou alteração do sítio de ligação do antimicrobiano, pode resultar em alto grau de resistência aos carbapenens (Queenan and Bush 2007).

Em 2004, Poirel e colaboradores descreveram a oxacilinase OXA-48 com alta atividade hidrolítica contra os carbapenens, caracterizada em uma amostra clínica de *K. pneumoniae*, na Turquia (Poirel *et al.* 2004). Apesar dessa OXA ter sido codificada por genes inseridos em plasmídios, as demais OXA presentes em Enterobactérias são codificadas por genes localizados no cromossomo bacteriano, fato que contribui positivamente para a lenta propagação desta enzima. Até hoje, somente duas OXA com atividades contra os carbapenêmicos foram encontradas em enterobactérias: a OXA-23 e a OXA-48, em *Proteus mirabilis* e *K. pneumoniae*, respectivamente (Bonnet *et al.* 2002; Poirel *et al.* 2004).

#### **1.6.1.4. Metallo- $\beta$ -Lactamases (M $\beta$ Ls)**

A diminuição de sensibilidade aos carbapenêmicos devido à produção das enzimas metallo- $\beta$ -lactamases (M $\beta$ Ls) está sendo cada vez mais frequente entre as cepas de enterobactérias. (Galani *et al.* 2004; Morfin-Otero *et al.* 2009). Estas enzimas pertencentes ao grupo 3 de Bush (Bush *et al.* 1995) e à classe molecular B de Ambler (Ambler 1980). Hidrolisam todos os  $\beta$ -lactâmicos comercialmente disponíveis, exceto o aztreonam e são inibidas pelo ácido etilenodiaminoacético (EDTA) ou por compostos derivados do ácido tiolático (ácido mercaptopropiônico), não sofrendo ação dos inibidores das serino- $\beta$ -lactamases, como o ácido clavulânico (Queenan and Bush 2007). Essas enzimas caracterizam-se por necessitarem de dois íons divalentes, usualmente zinco, como co-fator para a atividade catalítica, por terem a mesma estrutura

tridimensional e por apresentarem resíduos conservados, os quais são responsáveis pela interação da enzima com cátions divalentes (Murphy *et al.* 2003).

As M $\beta$ L intrínsecas são normalmente mediadas por cromossomo (Walsh *et al.* 1994) e são encontradas em um número limitado de espécies, como: *Bacillus cereus*, *Aeromonas hydrophila*, *Flavobacterium odoratum*, *Legionella gormanii*, *Bacteroides fragilis*, *Stenotrophomonas maltophilia* (Hirakata *et al.* 1998).

M $\beta$ L adquiridas apresentam-se em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene, facilitando a disseminação dessa enzima entre diferentes espécies bacterianas. Atualmente, foram descritos seis tipos de M $\beta$ L adquiridas: IMP com 24 variantes, VIM com 22 variantes, SPM-1, GIM-1, SIM-1, AIM-1 e KHM-1 com apenas um tipo representante, cada. (<http://www.lahey.org/Studies/other.asp#table1>).

Atualmente, embora sejam mais frequentemente isoladas em espécies de bactérias Gram negativas não-fermentadoras, como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*, cada vez mais estas enzimas têm sido reportadas em membros da família *Enterobacteriaceae*, incluindo *K. pneumoniae* (Lincopan *et al.* 2005; Morfin-Otero *et al.* 2009). Nestas espécies, os determinantes de resistência são conhecidos como M $\beta$ L móveis ou também M $\beta$ L adquiridas, por serem encontradas inseridas em estruturas genéticas que fornecem mobilidade ao gene.

As M $\beta$ L adquiridas são codificadas por cassetes gênicos localizados no cromossomo ou plasmídeo bacteriano. No entanto, com exceção da enzima SPM-1, que é codificada por um gene localizado no cromossoma, as demais

M $\beta$ L adquiridas, como, por exemplo, a IMP-1, foram codificadas por genes localizados em elementos genéticos, integrons de classe 1 (Mendes *et al.* 2007; Toleman *et al.* 2002).

O primeiro relato de M $\beta$ L adquirida, ocorreu em 1994 (Osano *et al.* 1994), sendo descrito como uma subclasse denominada IMP-1. Esta enzima foi encontrada em uma cepa clínica de *Serratia marcescens* isolada no Japão, a qual apresentava fenótipo de resistência a imipenem e cefalosporinas de amplo espectro. Durante muitos anos, a ocorrência de isolados produtores de IMP-1 foi restrita a este país, entretanto, atualmente novas variantes desta subclasse têm sido reportadas em diversos países, sendo comumente encontradas em microrganismos não-fermentadores de glicose, como *Achromobacter xylosoxidans*, *Pseudomonas* spp. e *Acinetobacter* spp. (Osano *et al.* 1994). Em 2005, Lincopan e colaboradores relataram o primeiro caso de *K. pneumoniae* produtora de IMP-1 isolada de uma única amostra, na América Latina (Lincopan *et al.* 2005). Outras amostras de *K. pneumoniae* produtoras de IMP-1 foram relatadas por Penteado e colaboradores, sendo que, nesta ocasião foi possível caracterizar que as amostras relatadas nos dois estudos brasileiros possuíam um perfil clonal idêntico (Penteado *et al.* 2009).

### **1.6.2. Impermeabilidade de Membrana Externa**

As bactérias Gram negativas apresentam uma estrutura membranosa caracterizada como membrana externa que é composta por fosfolipídeos, lipopolissacarídeos e por proteínas de membrana externa (OMP - “*outer membrane proteins*”), também conhecidas como porinas. A membrana externa está localizada acima da membrana citoplasmática e da camada de

peptídeoglicano, atuando como uma barreira permeável que elimina os compostos nocivos à célula, presentes no meio externo (Nikaido 1994).

As porinas são proteínas que formam canais de água no seu interior e permitem a difusão de solutos hidrofílicos através da membrana externa e a extrusão de produtos não utilizados pela célula bacteriana (Nikaido 1985; Nikaido 1989). As porinas variam de tamanho e carga elétrica de acordo com cada microrganismo (Parr, Jr. *et al.* 1987; Yamazaki *et al.* 1989). A perda ou a diminuição da expressão dos genes codificadores das OMP desencadeia a redução da entrada de antibióticos na célula, diminuindo a concentração interna do antimicrobiano contribuindo, conseqüentemente, no mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (Hernandez-Alles *et al.* 1999a). Este mecanismo de resistência ocorre somente em microrganismos Gram negativos, devido à presença da membrana externa, podendo, ocasionalmente, estar associado à produção de  $\beta$ -lactamases (Girlich *et al.* 2009; Yang *et al.* 2009).

Em *K. pneumoniae* foram descritas duas porinas principais (OmpK35 e OmpK36) e uma porina quiescente (OmpK37). Estudos demonstraram que as porinas OmpK35 e OmpK36 apresentam grande homologia à família OmpF e OmpC, respectivamente presentes em cepas de *E. coli* (Alberti *et al.* 1995; Martinez-Martinez 2008). Domenech-Sanchez e colaboradores revelaram que estas porinas permitem a difusão de nutrientes e de uma grande variedade de moléculas (Domenech-Sanchez *et al.* 1999). A redução de expressão ou perda destas porinas contribui para o aumento nos níveis de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos, especialmente quando mecanismos adicionais de resistência são expressos (Martinez-Martinez 2008).

Dessa forma, tanto a diminuição da expressão, quanto a perda das porinas têm sido reportadas em inúmeras espécies bacterianas como um importante mecanismo de resistência (Domenech-Sanchez *et al.* 1999;Martinez-Martinez 2008). A perda da porina OmpK36 está associada com a resistência à cefoxitina e aumento da concentração inibitória mínima (CIM) de cefalosporinas e fluoroquinolonas (Martinez-Martinez *et al.* 1996). A redução de sensibilidade aos carbapenems, particularmente ao ertapenem, em isolados de *K. pneumoniae* têm sido relacionada à diminuição da permeabilidade da membrana externa, associada à produção de ES $\beta$ L (Crowley *et al.* 2002;Doumith *et al.* 2009).

## 2. OBJETIVOS

- ✓ Avaliar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos e caracterizar a frequência e tipos de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado, entre isolados clínicos de *Klebsiella* spp. provenientes de infecção de corrente sanguínea de pacientes hospitalizados nos centros médicos do Programa de Vigilância SCOPE Brasil, entre junho de 2007 e dezembro de 2008;
- ✓ Pesquisar os mecanismos de resistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* que apresentaram diminuição de sensibilidade aos carbapenens;
- ✓ Avaliar a acurácia dos testes de triagem e confirmatório recomendados pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” para detecção de carbapenemases em enterobactérias, na população bacteriana estudada.



### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. Casuística do Estudo**

O Projeto SCOPE Brasileiro é uma extensão de um estudo realizado pela *Virginia Commonwealth University*, nos Estados Unidos, denominado de SCOPE (*Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance*) coordenado pelo Dr. Richard P. Wenzel e Dr. Michael B. Edmond, que mostraram dados epidemiológicos sobre mais de 24.000 infecções da corrente sanguínea em 49 hospitais norte-americanos durante um período de sete anos (Wisplinghoff *et al.* 2004). Todas as amostras clínicas caracterizadas epidemiologicamente e microbiologicamente neste trabalho fazem parte do Projeto SCOPE Brasileiro. O Laboratório Especial de Microbiologia Clínica (LEMC), Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina é o centro coordenador deste estudo no Brasil.

#### **3.2. Amostras Bacterianas**

O Programa SCOPE Brasileiro incluiu o envio de dados epidemiológicos dos pacientes acometidos com infecções de corrente sanguínea, sendo facultativo o envio das amostras bacterianas pelos centros médicos participantes para o LEMC. Foram selecionadas para esse estudo todas as amostras clínicas de *Klebsiella* spp. recebidas pelo centro coordenador, entre o período de Junho 2007 a Dezembro 2008. As amostras de *Klebsiella* spp. foram provenientes de 15 diferentes centros médicos hospitalares participantes do Programa SCOPE Brasileiro (Tabela 4), sendo esses centros médicos representativos das cinco regiões brasileiras (Norte, Nordeste, Sul, Sudeste e

Centro-Oeste). Apenas um centro médico participante do estudo optou por enviar somente os dados epidemiológicos. Todas as amostras identificadas pelos centros participantes como *Klebsiella* spp. provenientes do primeiro episódio de infecção de corrente sanguínea hospitalar, isoladas de hemocultura com pelo menos 48 horas de admissão do paciente no hospital, foram incluídas no estudo. Episódios de infecção de corrente sanguínea que ocorreram em um mesmo paciente em diferentes admissões foram considerados como casos distintos e portanto também incluídos.

Os centros médicos participantes do estudo enviaram mensalmente as amostras bacterianas de *Klebsiella* spp. em meio de transporte com carvão ativado (Copan<sup>®</sup>, Brescia, Itália) para o centro coordenador. No LEMC, todas as amostras foram semeadas em placas de ágar sangue ou Mac Conkey para detecção de possíveis contaminantes, e em seguida armazenadas em caldo trípico de soja (TSB - Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com glicerol 15% a -20°C no banco de microrganismos.

### **3.3. Coleta dos Dados Epidemiológicos e Microbiológicos**

Juntamente com as amostras de *Klebsiella* spp. foi encaminhada uma ficha clínica, preenchida com os dados clínicos e epidemiológicos de cada paciente, e com os dados microbiológicos das amostras. Essa ficha clínica foi elaborada e padronizada pelo Programa SCOPE Brasileiro (Anexo 1). Os dados contidos em cada ficha clínica foram digitados em um banco de dados criado especialmente para esta finalidade.

**Tabela 4.** Centros Médicos Participantes do Programa SCOPE Brasileiro entre Junho 2007 a Dezembro de 2008.

Centro Médico	Início da coleta dos dados	Cidade/ Estado
1	Junho de 2007	São Paulo/SP
2	Junho de 2007	São Paulo/SP
3	Junho de 2007	São Paulo/SP
4	Junho de 2007	São Paulo/SP
5	Junho de 2007	São Paulo/SP
6	Junho de 2007	São Paulo/SP
7	Outubro de 2007	Porto Alegre/RS
8	Fevereiro de 2008	Natal/RN
9	Janeiro de 2008	Fortaleza/CE
10	Dezembro de 2007	Belém/PA
11	Fevereiro de 2008	Natal/RN
12	Janeiro de 2008	Goiania/GO
13	Janeiro de 2008	Brasília/DF
14	Maio de 2008	Porto Alegre/RS
15	Julho de 2008	Salvador/BA

### 3.4. Testes Microbiológicos e Moleculares

#### 3.4.1. Confirmação da Identificação Bacteriana, Teste de Sensibilidade e Detecção de ESβL pelo Sistema Automatizado Phoenix

Todas as amostras encaminhadas pelos centros médicos participantes como pertencentes ao gênero *Klebsiella* spp. ou mesmo aquelas que já tinham a espécie identificada pelo centro de origem, foram submetidas a re-identificação pelo sistema BD Phoenix 5.1™ (Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA) para a confirmação do gênero e da espécie bacteriana.

Através desse sistema também foi possível estabelecer o perfil de sensibilidade das amostras de *Klebsiella* spp. pela detecção da concentração inibitória mínima (CIM), de acordo com as recomendações do CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), documento M100-S18, 2008. Os agentes

antimicrobianos testados e as respectivas concentrações ( $\mu\text{g/mL}$ ) foram: ceftazidima (0.5-32  $\mu\text{g/mL}$ ), ceftriaxona (2-32  $\mu\text{g/mL}$ ), cefepima (1-16  $\mu\text{g/mL}$ ), ciprofloxacina (0.5-2  $\mu\text{g/mL}$ ), levofloxacina (1-4  $\mu\text{g/mL}$ ), gatifloxacina (1-4  $\mu\text{g/mL}$ ), amicacina (8-32  $\mu\text{g/mL}$ ), gentamicina (2-8  $\mu\text{g/mL}$ ), tetraciclina (2-8  $\mu\text{g/mL}$ ), imipenem (1-8  $\mu\text{g/mL}$ ), meropenem (1-8  $\mu\text{g/mL}$ ), piperacilina (2-64  $\mu\text{g/mL}$ ), ticarcilina (4-64  $\mu\text{g/mL}$ ), piperacilina - tazobactam (2/4-64/4  $\mu\text{g/mL}$ ) e ticarcilina - ácido clavulânico (2/2-64/2  $\mu\text{g/mL}$ ).

A re-identificação bacteriana e o teste de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados, após isolamento e subcultivo das amostras em ágar sangue por duas vezes, conforme recomendado pelo CLSI, 2008. Para a realização dos testes de identificação e sensibilidade aos antimicrobianos, inicialmente, foi preparada uma única suspensão bacteriana de aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC)/mL, correspondente a 0,5 da escala de McFarland. Para o teste de sensibilidade, foi reservado 25  $\mu\text{L}$  dessa suspensão bacteriana, que em seguida foi diluída em 8 mL de caldo e acrescida de 50  $\mu\text{L}$  do indicador de oxido-redução específicos do fabricante. Essas duas suspensões foram dispensadas em orifícios específicos presentes no painel NMIC/ID 104 (Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA) utilizado apenas para bactérias Gram negativas. Após o preenchimento de todos os poços contidos no painel, este foi incubado por 6 a 18 horas no aparelho BD Phoenix 5.1. Os procedimentos metodológicos seguintes, assim como os descritos acima foram realizados conforme as recomendações descritas pelo fabricante.

Definiu-se a concentração inibitória mínima como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano. As

CIM50 e CIM90 foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras, respectivamente. As amostras foram classificadas como sensíveis, intermediárias ou resistentes empregando os limites de sensibilidade preconizados pelo documento M07-A8 (CLSI, 2009).

Através do sistema BD Phoenix também foi possível avaliar a produção de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ES $\beta$ L) pelos testes de triagem e confirmatório, de acordo com as recomendações do CLSI, 2008 (M100-S18). Pelo teste de triagem foram avaliadas as drogas cefpodoxima (0,5  $\mu$ g/mL), ceftazidima (0,5  $\mu$ g/mL) e cefepima (2  $\mu$ g/mL), seguidas pelo teste confirmatório que utilizou as drogas combinadas: ceftazidima/ácido clavulânico (0,125/4  $\mu$ g/mL), ceftriaxona/ácido clavulânico (0,25/4  $\mu$ g/mL) e cefotaxima/ácido clavulânico (0,25/4  $\mu$ g/mL). Para a validação do lote do painel e para o controle de qualidade desses testes foram incluídas as amostras de *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853, além da cepa de *K. pneumoniae* ATCC 700603 que foi incluída como controle positivo para avaliar a acurácia do sistema para a detecção de ES $\beta$ L.

### **3.4.2. Testes Fenotípicos para Detecção de Carbapenemase de acordo com as Recomendações do CLSI 2009**

De acordo com as recomendações do CLSI, 2009, o teste de difusão em disco para ertapenem foi realizado para todas as amostras que apresentaram resistência para uma ou mais cefalosporinas de terceira geração, e o teste confirmatório (Teste de Hodge modificado) foi realizado apenas para as

amostras que apresentaram halo de inibição menor ou igual a 21 mm para ertapenem.

#### **3.4.2.1. Teste de Triagem com Disco-difusão para Ertapenem**

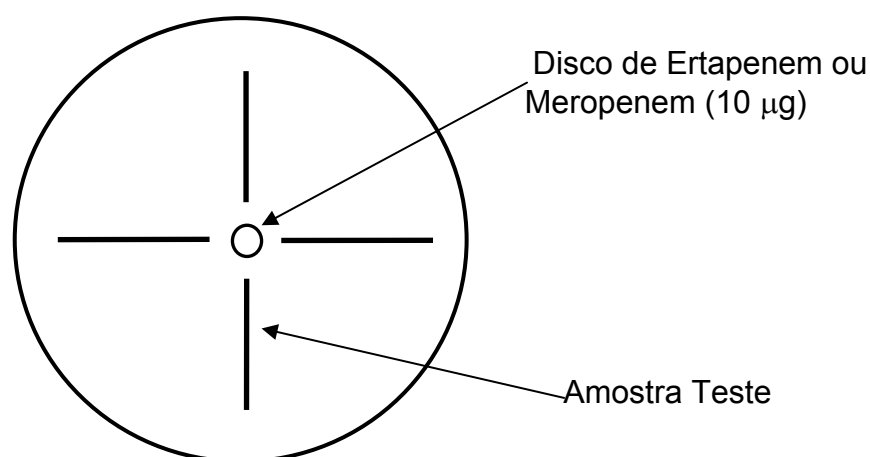
A preparação do inóculo bacteriano foi realizada após o crescimento em placas de ágar Mac Conkey por 18 horas. Com o auxílio de alça de semeadura, uma a três colônias isoladas de *Klebsiella* spp. foram transferidas para tubos contendo 4 mL de salina (NaCl - Sigma, St. Louis, MO). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter<sup>®</sup>, Sacramento, EUA), para a obtenção de uma concentração bacteriana correspondente a 0,5 da escala de McFarland, em seguida as amostras foram semeadas em placa de ágar Müeller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com auxílio de swab estéril. O perfil de sensibilidade foi realizado utilizando discos de ertapenem (10µg), (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). As placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 18 a 24 horas. Após este período, a leitura foi realizada e o halo de inibição interpretado de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI para *Enterobacteriaceae*. As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) (CLSI, 2009).

#### **3.4.2.2. Teste Confirmatório pela Metodologia de Hodge**

O teste de Hodge modificado (Lee *et al.* 2005), foi desenvolvido de acordo com a metodologia descrita no documento M100-S19 (CLSI,2009).

Foi preparada uma suspensão bacteriana (0,5 da escala de McFarland) com a cepa de *E. coli* ATCC 25922, em seguida a suspensão foi diluída na proporção 1:10 com água destilada estéril, e com o auxílio de um swab essa diluição foi semeada numa placa de Müller-Hinton (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra). Um disco de meropenem 10 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra) foi colocado no centro da placa. As amostras bacterianas testadas apresentavam colônias frescas com menos de 25 horas de incubação. Duas ou três dessas colônias bacterianas foram estriadas sob a placa de Müller-Hinton (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra) com uma alça de *loop* descartável, começando 5 mm após a extremidade do disco até a periferia da placa. As placas foram incubadas por 16 a 20 horas a 37°C. O teste foi considerado positivo, quando houve o crescimento da amostra ATCC 25922 na área de encontro da bactéria teste com o halo de inibição do meropenem, indicando a hidrólise do meropenem e possivelmente a produção de carbapenemase. O teste foi repetido utilizando-se o disco de ertapenem 10 µg (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra) como substrato, além do meropenem.

Para o controle positivo do teste de Hodge foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* A26006 carreadora do gene *bla<sub>KPC</sub>* (número de acesso no *GenBank* EU784136) (Monteiro *et al.* 2009), e como controle negativo foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* A37202, sensível a todos os β-lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas testadas, esta cepa pertence ao banco de microrganismos do LEMC. A leitura e interpretação deste ensaio foi realizada por dois observadores independentes.



**Figura 1.** Placa modelo do teste de Hodge modificado utilizada para a detecção fenotípica da produção de carbapenemase.

### 3.4.3. Perfil de Sensibilidade aos Carbapenens e a Cefoxitina pela Metodologia de Diluição em Ágar

O teste de diluição em ágar foi realizado para confirmação das amostras resistentes a ertapenem por difusão em disco e a imipenem e meropenem pelo sistema automatizado. Este teste também foi empregado para definição da CIM para cefoxitina para a mesma população de amostras.

Após o crescimento bacteriano em placas de ágar sangue por 18 horas, uma a três colônias isoladas de *Klebsiella* spp. foram transferidas para tubos contendo 4 mL de salina (NaCl - Sigma, St. Louis, MO). A suspensão bacteriana foi homogeneizada e a turvação medida em turbidímetro digital (Baxter<sup>®</sup>, Sacramento, EUA), para a obtenção de uma concentração bacteriana em torno de  $1,5 \times 10^8$  unidades formadoras de colônias (UFC)/mL correspondente a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2009).

As CIMs foram calculadas pela metodologia de diluição em ágar seguindo as recomendações do CLSI (CLSI, 2009) para os seguintes  $\beta$ -



lactâmicos e respectivas diluições: cefoxitina (0,125-256 µg/mL), imipenem (0,125-32 µg/mL), meropenem (0,125-32 µg/mL) e ertapenem (0,125-32 µg/mL). Esta metodologia foi realizada através da incorporação de concentrações seriadas e logarítmicas do respectivo antimicrobiano em placas de Petri individuais contendo ágar Müller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra). Cada placa representava uma única concentração do antimicrobiano. Foram testadas diferentes concentrações, de acordo com o antimicrobiano testado.

Após preparo e diluição do inóculo, as amostras bacterianas foram inoculadas simultaneamente sobre a superfície do ágar utilizando o multi-inoculador, o qual dispensa de 1 a 3 µL contendo aproximadamente o inóculo final de  $1 \times 10^4$  UFC/mL. As placas inoculadas foram incubadas por 18-24 horas, a 37°C. Após este período, a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração de antimicrobiano capaz de inibir o crescimento bacteriano (CLSI, 2009).

Como controle de qualidade dos testes de sensibilidade foram utilizadas as cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. As amostras foram classificadas como sensíveis (S), intermediárias (I) ou resistentes (R) aos antimicrobianos testados, de acordo com os *breakpoints* de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI (CLSI, 2009).

#### 3.4.4. PCR para a Detecção dos Genes Codificadores de $\beta$ -Lactamases

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada apenas para as amostras que apresentaram fenótipo positivo de ES $\beta$ L, detectado pelo sistema Phoenix, com o intuito de confirmar a presença ou ausência dos genes que codificam as  $\beta$ -lactamases.

O DNA alvo utilizado para a PCR foi extraído a partir do crescimento bacteriano, obtido do subcultivo em ágar sangue (Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England) enriquecido com 5% de sangue de carneiro desfibrinado. Após o isolamento de colônias puras, uma a duas colônias de cada amostra foram transferidas para um tubo de microcentrifuga contendo 300  $\mu$ L de água MilliQ estéril, livre de DNase e RNase. Esta suspensão foi submetida a fervura por 5 minutos e posterior centrifugação por 1 min a 12000 rpm, o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e transferido para um novo microtubo estéril. Em fluxo laminar, foi preparada uma solução mãe (*master mix*) contendo: 0,5  $\mu$ L de cada um dos *primers* com concentração de 10  $\mu$ mol/cada, 12,5  $\mu$ L de Go Taq® Green Master Mix 2X (Tampão de reação pH 8,5, 400  $\mu$ M dATP, 400  $\mu$ M dGTP, 400  $\mu$ M dCTP, 400  $\mu$ M dTTP, 3 mM MgCl<sub>2</sub> e Taq DNA Polymerase) e água MilliQ estéril para um volume final de 25  $\mu$ L, subtraído do volume de DNA alvo. A solução-mãe foi mantida em gelo a aproximadamente 4°C durante o seu preparo. Um volume de 24  $\mu$ L foi distribuído em microtubos individuais de 200  $\mu$ L e, então foi adicionado nesses tubos de amplificação 1  $\mu$ L do DNA extraído.

As condições utilizadas no termociclador (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) para amplificação do DNA foram:

denaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 15 segundos, 52°C por 15 segundos, 72°C por 1 minuto. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após amplificação do DNA, o produto amplificado final foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio e visibilizado sob luz ultravioleta.

Foram utilizadas como controle positivo da reação da PCR, cepas caracterizadas geneticamente pelo laboratório ALERTA (Universidade Federal de São Paulo - Disciplina de Infectologia - UNIFESP) como produtoras de β-lactamases e como controle negativo uma alíquota da solução mãe sem DNA.

Os *primers* utilizados para a detecção dos genes codificadores das β-lactamases: ESβLs (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>); MβL (*bla*<sub>IMP</sub>) e carbapenemases da Classe A e D (*bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>OXA</sub>), encontram-se listados na Tabela 5. Esses *primers* foram desenhados no Laboratório Alerta e posteriormente encaminhados para síntese na empresa IDT (Integrated DNA Technologies Inc., Coralville, EUA).

**Tabela 5.** Gene alvo, oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores de  $\beta$ -lactamases.

Gene Alvo	Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>bla</i> <sub>TEM</sub>	TEM F	ATGAGTATTCAACATTTCCG	868
	TEM R	CTGACAGTTACCAATGCTTA	
<i>bla</i> <sub>SHV</sub>	SHV F	ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC	1018
	SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC	
<i>bla</i> <sub>CTX-M</sub>	CTX-M F	CGCTTTGCGATGTGCAG	600
	CTX-M R	ACCGCGATATCGTTGGT	
<i>bla</i> <sub>OXA-48</sub>	OXA-48 F	TGGGTGGCATCGATTATCGG	744
	OXA-48 R	GAGCACTTCTTTTGTGATGGC	
<i>bla</i> <sub>IMP</sub>	IMP F	GAATAGRRTGGCTTAAYTCTC	108
	IMP R	CCAAACYACTASGTTATC	
<i>bla</i> <sub>KPC</sub>	KPC F	TCGCTAAACTCGAACAGG	800
	KPC R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC	
<i>bla</i> <sub>GES</sub>	GES F	TCACGCACTATTACTGGC	900
	GES R	TATTTGTCCGTGCTCAGG	

pb: pares de bases

### 3.4.5. Multiplex PCR para Detecção dos Genes Codificadores de AmpC Plasmidiais

A técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) multiplex foi empregada para a detecção dos genes *cmy*, *mir*, *acc*, *act*, *mox*, *lat*, *fox* e *dha* de acordo com a técnica descrita por Pérez-Pérez e Hanson em 2002 (Perez-Perez and Hanson 2002).

As amostras bacterianas foram cultivadas em ágar nutriente (Oxoid<sup>®</sup>, Basingstoke, Inglaterra) contendo 50 µg/mL de ampicilina. Uma colônia de cada amostra foi inoculada em 5 mL de caldo TSB. Os tubos foram incubados a 37°C por 12 horas, sob agitação. Um mililitro e meio da suspensão bacteriana foi transferido para um tubo de microcentrifuga, o qual foi centrifugado por 5 minutos a 13000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o

centrifugado ressuspenso em 500 µL de água deionizada. As células foram lisadas por aquecimento a 95°C por 10 minutos. Os debris celulares foram removidos por centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado para reação da PCR. Em fluxo laminar foi preparada uma solução mãe contendo: água MilliQ estéril, solução tampão com MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, KCl 50 mM e Tris-HCl 20 mM [pH 8,4], 0,2 mM de desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dTTP, dGTP e dCTP), 0,6 mM dos iniciadores MPCMY1-F, MPCMY1-R, MPCMY2-F, MPCMY2-R, MPDHA-F e MPDHA-R; 0,5 mM dos iniciadores MPACC-F, MPACC-R, MPMAC-F E MPMAC-R; 0,4 mM dos iniciadores MPFOX-F e MPFOX-R e 1,25 unidades/L de Taq DNApolimerase. A solução mãe foi mantida a 4°C durante seu preparo e, após leve agitação, 48 µL dessa solução foi transferida para cada tubo de amplificação, contendo 2 µL do DNA alvo. Na Tabela 6 estão descritos os iniciadores utilizados para detecção dos genes *bla*<sub>CMY</sub>, *bla*<sub>MOX</sub>, *bla*<sub>MIR</sub>, *bla*<sub>ACC</sub>, *bla*<sub>ACT</sub>, *bla*<sub>LAT</sub>, *bla*<sub>FOX</sub> e *bla*<sub>DHA</sub>.

**Tabela 6.** Iniciadores utilizados para amplificação dos genes codificadores de  $\beta$ -lactamases AmpC pela PCR multiplex (Pérez-Pérez e Hanson, 2002).

Gene Alvo	Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>bla</i> <sub>MOX1-2</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY1</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY8-11</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY19</sub>	MPCMY-1F MPCMY-1R	GCTGCTCAAGGAGCACAGGAT CACATTGACATAGGTGTGGTGC	520
<i>bla</i> <sub>CMY2-7</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY12-16</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY18</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY21-24</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY26-33</sub> , <i>bla</i> <sub>CMY36-37</sub> , <i>bla</i> <sub>LAT1-4</sub>	MPCMY-2F MPCMY-2R	TGGCCAGAACTGACAGGCAAA TTTCTCCTGAACGTGGCTGGC	462
<i>bla</i> <sub>DHA-1-3</sub>	MPDHA-1F MPDHA-1R	AACTTTTACAGGTGTGCTGGGT CCGTACGCATACTGGCTTTGC	405
<i>bla</i> <sub>ACC1-2</sub>	MPACC-F MPACC-R	AACAGCCTCAGCAGCCGGTTA TTCGCCGCAATCATCCCTAGC	346
<i>bla</i> <sub>MIR1-4</sub> , <i>bla</i> <sub>ACT1-3</sub>	MPMAC-F MPMAC-R	TCGGTAAAGCCGATGTTGCCGG CTTCCACTGCGGCTGCCAGTT	302
<i>bla</i> <sub>FOX1-7</sub>	MPFOX-F MPFOX-R	AACATGGGGTATCAGGGAGATG CAAAGCGCGTAACCGGATTGG	190

pb: pares de bases

As condições utilizadas no termociclador foram: denaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por 25 ciclos de denaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 64°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72°C por 7 minutos. Após a amplificação do DNA, a revelação do produto amplificado foi feita com eletroforese em gel de agarose a 2% e visibilizado sob luz ultravioleta.

Foram utilizadas cepas produtoras de  $\beta$ -lactamases plasmidiais como controles positivos. Entre elas: *E. coli* transconjugante pBL23 *bla*<sub>LAT-1</sub>, *E. coli* transconjugante 200 *bla*<sub>FOX-5</sub>, *E. coli* transconjugante C600 R96D *bla*<sub>MIR-1</sub>, *Morganella morganii* *bla*<sub>DHA-1</sub> e *Hafnia alvei* A7.307 *bla*<sub>AAC</sub>. As cepas de *E. coli* ATCC 25922 e *K. pneumoniae* ATCC 700603 foram utilizadas como controles negativos.

### 3.4.6. Reação de Sequenciamento e Interpretação dos Resultados

As reações de sequenciamento foram realizadas a partir dos produtos obtidos das reações da PCR para as  $\beta$ -Lactamases. Os produtos amplicados foram purificados a partir do gel de agarose com o kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. A quantificação do DNA genômico amplificado foi determinada por densidade óptica em espectrofotômetro (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis, versão 3.2.1; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Um volume de 2  $\mu$ L do DNA total purificado foi submetido ao aparelho NanoDrop que fez a leitura da absorbância e forneceu a concentração do DNA em ng/mL. A partir daí quantidades necessárias de DNA foram submetidas à reação preparatória para o sequenciamento com o kit *Big Dye Terminator Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Após o término da reação de PCR, o produto foi precipitado para a eliminação dos d-dNTPs marcados não incorporados à reação, através de lavagens com isopropanol e etanol. Em seguida, as amostras foram submetidas a 95°C por 1 min para evaporação de possíveis resíduos de etanol. O produto foi ressuspenso em 20  $\mu$ L formamida e colocado no aparelho ABI PRISM 3130, *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, Perkin Elmer, Califórnia). As seqüências de DNA obtidas e as seqüências protéicas derivadas foram analisadas utilizando o programa *Lasergene Software Package* (DNASTAR, Madison, WI) e então submetidas à comparação com bases de dados genéticos disponíveis na internet (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33/> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

### 3.4.7. Teste de Hidrólise para Detecção de Carbapenemase

O teste de hidrólise teve como objetivo principal a detecção da atividade enzimática nas amostras avaliadas. Depois de isoladas, 10 colônias foram inoculadas em 10 mL caldo de TSB (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) com 4 µg/mL de cefoxitina. Os tubos ficaram incubados na estufa a 37°C por 18 horas sob agitação. A suspensão bacteriana foi transferida para um tubo cônico e passou por uma centrifugação de 15 minutos à 3.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de solução de hidrólise (Tris-HCl 1 mM e ZnSO<sub>4</sub> 1 mM). As amostras suspensas foram ultrasonicadas com 4 ciclos de 30 segundos e o produto sonicado foi transferido para tubo de microcentrífuga e, então, centrifugado por 3 minutos à 4°C e 13.000 rpm (Centrifuge 5415R, Eppendorf, Hamburg, Germany). O sobrenadante (extratos brutos de proteínas) foi transferido para um novo tubo e as amostras mantidas no gelo até o momento do ensaio.

Para verificar a atividade de hidrólise foram preparadas soluções de meropenem, imipenem e ertapenem em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,0 a uma absorbância de aproximadamente 1,5 a 2 unidades de absorbância a 260 nm. Em uma cubeta de quartzo foram adicionados 900 µL da solução de antimicrobiano, juntamente com 100 µL do extrato bruto de β-lactamase. O monitoramento da absorbância da solução foi realizado por 1 minuto em espectrofotômetro. A diminuição da absorbância da solução de antimicrobianos indica um resultado positivo para a produção de carbapenemase. A variação da absorbância foi calculada através da diferença entre o valor de absorbância final e inicial após um minuto de leitura ( $\Delta$ Abs/min).



Como controle positivo do teste foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* A26006 carreadora do gene *bla<sub>KPC</sub>* (número de acesso no *GenBank* EU784136) (Monteiro *et al.* 2009).

#### **3.4.8. Avaliação da Similaridade Genética pela Técnica de *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE) e Interpretação dos Padrões Moleculares**

Para a observação do padrão molecular das amostras clínicas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem, a técnica utilizada foi a análise do DNA cromossômico pela eletroforese de campo pulsado "*Pulsed-Field Gel Electrophoresis*" – PFGE (Pfaller *et al.* 1992).

Foi preparada para cada amostra de *K. pneumoniae* uma suspensão bacteriana em 4 mL de caldo tríptico de soja (TSB – Oxoid, Inglaterra). Após 18-24 horas de incubação a 37°C, os tubos foram centrifugados por 15 minutos. Em seguida, o centrifugado (células) foi diluído em 1 mL de solução salina e transferido para um tubo de microcentrífuga de peso conhecido. Os tubos foram centrifugados a 15.000 rpm por aproximadamente 30 segundos e o sobrenadante foi cuidadosamente aspirado e desprezado.

Com a finalidade de se determinar o peso do centrifugado (células), os tubos foram novamente pesados. O centrifugado foi diluído em salina na proporção de 1:1, isto é, o volume da salina em  $\mu\text{L}$  foi equivalente ao peso do centrifugado em  $\mu\text{g}$ . Um volume de 5  $\mu\text{L}$  desta suspensão celular foi transferido para outro tubo, onde foi adicionado 300  $\mu\text{L}$  da solução tampão TEM (Tris 100 mM; pH 7,5; EDTA 100 mM; NaCl 150 mM; água destilada). Essa nova solução foi homogeneizada e misturada com 340  $\mu\text{L}$  de agarose ("low melt" – FMC,

Rockland, USA) para a formação de pequenos blocos de géis contendo o DNA cromossômico ("plugs"). Os blocos foram incubados por um período mínimo de cinco horas em solução EC (Tris 6mM, pH 7,5; NaCl 1M; EDTA 0,01 M ; Brij 58 0,5%; Sarcosil 0,5%; Deoxicolato 0,2% e água destilada) a 37°C, a seguir os plugs foram incubados a 50°C, em 2 mL de solução ES (EDTA 0,4M, pH 9,3; Sarcosil 1,0%) contendo proteinase K (20 mg/mL, Invitrogen, Germany) numa proporção de 1:1, por um período de 12 horas. Após este período de incubação, os blocos foram lavados com solução CHEF-TE (Tris 0,1M, pH 7,5; EDTA 0,1M) e armazenados nessa solução até serem submetidos à digestão enzimática e posterior eletroforese.

Foram realizadas lavagens com tampão DNS (MgCl 1M; Tris 1 M, pH 8.0; água destilada). O DNA bacteriano foi digerido com a enzima de restrição SpeI (New England Biolab, Inc., Beverly, Mass, USA - 10U por amostra), incubado por 12 a 18 horas à 37°C. A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 1% no sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Richmond, CA) e o padrão de variação da corrente elétrica ("switch time") foi de 5 a 60 segundos. A eletroforese foi realizada por 23 horas, em solução 0,5 x TBE (Tris 0,089M; ácido bórico 0,089M; EDTA, 0,002M) à temperatura de 13°C e corrente elétrica de 200 volts (6 V/cm). Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 µL/mL) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e fotografados sob luz ultravioleta.

De acordo com os critérios de Tenover e colaboradores (Tenover *et al.* 1995) foram consideradas idênticas todas as amostras que apresentaram perfil migratório idêntico de todas as bandas. Foram consideradas semelhantes e pertencentes a um mesmo clone as amostras que apresentaram perfil

migratório com diferença em até seis bandas. As amostras que apresentaram mais de seis bandas discordantes foram consideradas amostras distintas. Para a interpretação dos padrões moleculares e seus subtipos, os representantes de cada clone foram categorizados com uma letra maiúscula e um número arábico.

Além disso, os géis de PFGE foram também processados pelo programa *BioNumerics* versão 5.0 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). A definição da imagem das bandas foi realizada automaticamente pelo programa e depois conferida visualmente. O coeficiente de similaridade de Dice foi utilizado (Dice 1945), e o dendograma foi construído utilizando o algoritmo de análise filogenética UPGMA (“Unweighted Pair-Groups Method using arithmetic averages”) (Sneath and Sokal 1973). Os valores de otimização e tolerância utilizados para o conjunto de isolados foram de 0,8 e 1,5%, respectivamente. Um coeficiente de similaridade acima de 80% foi selecionado para definir cada cluster de isolados.

#### **3.4.9. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa**

As amostras de *K. pneumoniae* foram inicialmente repicadas em ágar Mac Conkey para certificação da pureza das culturas, em seguida com uma alça de *loop* estéril, 2 a 3 colônias bacterianas foram inoculadas em 5 mL de caldo “Luria Bertani” (LB, Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) e incubadas sob leve homogeneização a 37°C por 18 a 20 horas. Após este período, 5 mL desta cultura foi transferido para outro tubo contendo 45mL de caldo LB, o qual foi incubado por 4 horas a 37°C. Em seguida as células bacterianas foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, à temperatura ambiente, e

suspensas em 5 mL de Tris-HCl 30mM, pH 8.0. Após a suspensão das células, as mesmas foram centrifugadas a 4000 rpm por 20 minutos, re-suspensas em 5mL de Tris-HCl 30mM, pH 8.0 e lisadas por sonicação (4 pulsos de 30 segundos, cada) em sonicador XL2000 Ultrasonic Cell Disruptor-Fisher (Scientific International Inc.). Durante esse processo as amostras foram mantidas em gelo. Em seguida, a suspensão de células foi centrifugada a 8000 rpm por 25 minutos a 4°C para a remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e submetido à centrifugação de 38000 rpm por 35 minutos a 4°C, em ultracentrífuga Hitachi Himac CP85β utilizando o rotor fixo P55AT (Hitachi Koki Corp. Tokio, Japão). Em seguida, o precipitado foi suspenso em 1 mL de Tris-HCl 30mM, pH 8.0 e 100 µL de sarcosil 20% foi adicionado para precipitação das OMPs. Após cuidadosa homogeneização, este precipitado foi incubado à temperatura ambiente por 20 minutos seguida de uma nova etapa de centrifugação a 38000 rpm por 35 minutos a 22°C e, finalmente, o precipitado suspenso em 100 µL de água deionizada. Os preparados protéicos foram submetidos à análise do perfil de proteínas de membrana externa pela técnica de SDS-PAGE, as amostras e os padrões de peso molecular foram aplicadas no gel de dodecil sulfato de sódio (SDS), contendo 15% de acrilamida (SDS-PAGE 15%). A eletroforese foi realizada a 100 volts por 3 horas no sistema V-16 *Vertical Gel Electrophoresis System* (Gibco BRL Life Technologies, Rockville, MD, EUA). Após a corrida eletroforética, o gel foi corado durante uma hora com cromassie blue R250 (Sigma-Aldrich Corp., St Louis, EUA). Como descorante foi utilizado ácido acético a 10%. A análise do gel foi feita visualmente.

Como controle foi utilizada a amostra de *K. pneumoniae* A37202 sensível a todos os  $\beta$ -lactâmicos, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas testadas, esta cepa pertence ao banco de microrganismos do LEMC.

#### **3.4.10. PCR para Detecção dos Genes que Codificam as Porinas OmpK35 e OmpK36**

As amostras foram cultivadas em ágar Mac Conkey e uma suspensão com três colônias de cada amostra foi preparada em um tubo de microcentrifuga contendo 300  $\mu$ L de água MilliQ estéril. Essa suspensão foi utilizada diretamente para a reação da PCR. Em fluxo laminar, foram preparadas para cada reação uma mistura (solução mãe) contendo 10  $\mu$ L de Go Taq® Green Master Mix 2X, 7  $\mu$ L de água MilliQ e 0,2  $\mu$ M de iniciadores específicos para a amplificação dos genes codificadores das porinas OmpK35 e OmpK36 (Tabela 7). A mistura foi mantida a aproximadamente 4°C durante o seu preparo. Após leve agitação, 1  $\mu$ L da suspensão celular foi adicionado.

As condições utilizadas no termociclador (Eppendorf Mastercycler, Eppendorf AG, Hamburg, Germany) para amplificação do DNA foram: denaturação a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 94°C por 20 segundos, 53°C por 45 segundos, 72°C por 3 minutos. Após o último ciclo, houve uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Após amplificação do DNA, o produto amplificado final foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% contendo 0,5  $\mu$ g/mL de brometo de etídio e visibilizado sob luz ultravioleta.

Foi utilizada como controle positivo da reação da PCR, a cepa de *K. pneumoniae* ATCC 13883 e como controle negativo uma alíquota da mistura sem DNA.

**Tabela 7.** Gene alvo, oligonucleotídeos utilizados como iniciadores (*primers*) e tamanho do amplicon para a detecção dos genes codificadores das porinas.

Gene Alvo	Iniciadores	Seqüência (5' - 3')	Tamanho do amplicon (pb)
<i>ompK35</i>	OmpK35-F	CATTCCGCAGAATGAGACGGCAAC	1000
	OmpK35-R	CGACGATGTTATCGGTAGAGATAC	
<i>ompK36</i>	OmpK36-F	CAGCACAATGAATATAGCCGAC	1000
	OmpK36-R	GCTGTTGTCGTCCAGCAGGTTG	

pb: pares de bases

---

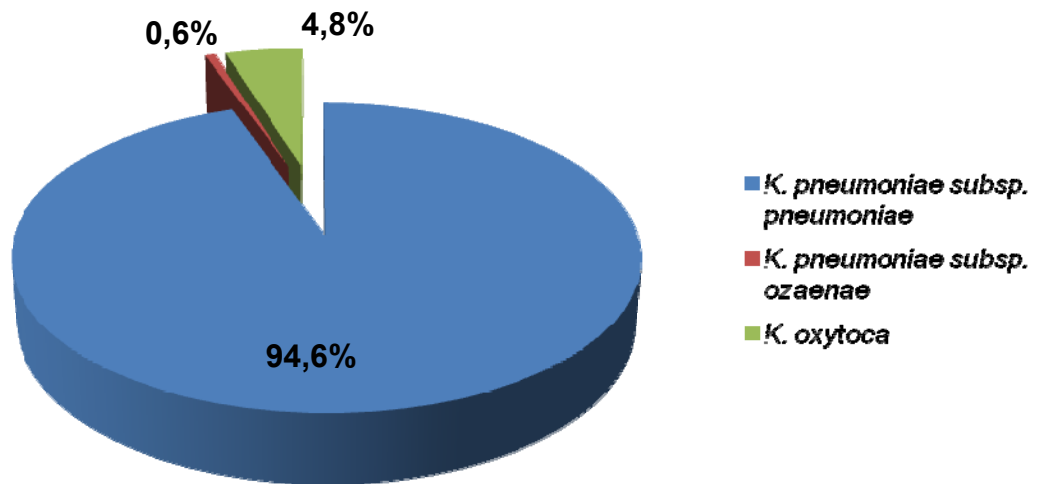
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Amostras Bacterianas com Identificação Confirmada pelo Sistema Automatizado Phoenix

Durante o período de Junho de 2007 a Dezembro de 2008, 182 amostras de *Klebsiella* spp. isoladas do primeiro episódio de infecção de corrente sanguínea hospitalar, com no mínimo 48 horas de admissão do paciente no hospital foram encaminhadas pelos 15 centros médicos participantes do estudo ao centro coordenador (LEMC). Apenas um centro médico (centro médico 14) optou por encaminhar somente as fichas clínicas com os dados epidemiológicos.

Quinze amostras foram excluídas do estudo, devido a não viabilidade das mesmas no momento do recebimento, ou presença de contaminação com outro tipo de colônia bacteriana.

Desta forma, 167 amostras de *Klebsiella* spp. foram incluídas no estudo. Essas amostras foram re-identificadas pelo sistema automatizado BD Phoenix, dentre as quais *K. pneumoniae* subsp. *pneumoniae* (n=158) representou 94,6% das amostras, seguida por *K. oxytoca* (n=8) e *K. pneumoniae* subsp. *ozaenae* (n=1) com 4,8% e 0,6%, respectivamente (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição das espécies de *Klebsiella* isoladas de infecção de corrente sanguínea do Projeto SCOPE (Junho 2007 a Dezembro 2008).

A distribuição das amostras de *Klebsiella* spp. de acordo com a espécie bacteriana re-identificada e região geográfica estão descritos na Tabela 8



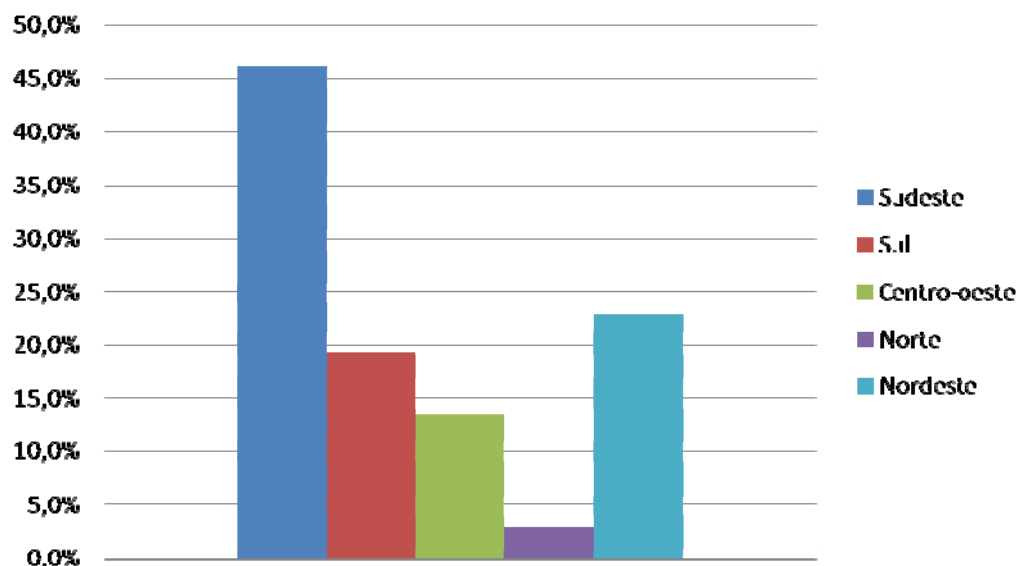
**Tabela 8.** Distribuição das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de hemocultura de acordo com o centro médico, espécie bacteriana, cidade, estado e região brasileira onde foram isoladas.

Centros médicos	Nº de amostras enviadas por centro médico	Início da coleta das amostras	Cidade / Estado	Região geográfica
Centro 1	(n = 34) <i>K. pneumoniae</i> (n = 4) <i>K. oxytoca</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 2	(n = 3) <i>K. pneumoniae</i> (n = 1) <i>K. oxytoca</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 3	(n = 15) <i>K. pneumoniae</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 4	(n = 8) <i>K. pneumoniae</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 5	(n = 8) <i>K. pneumoniae</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 6	(n = 1) <i>K. pneumoniae</i> (n = 1) <i>K. oxytoca</i> (n = 1) <i>K. ozaenae</i>	Junho / 2007	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 7	(n = 27) <i>K. pneumoniae</i> (n = 2) <i>K. oxytoca</i>	Outubro / 2007	Porto Alegre/RS	Sul
Centro 14	a	Maio / 2008	Porto Alegre/RS	Sul
Centro 12	(n = 6) <i>K. pneumoniae</i>	Janeiro / 2008	Goiania/GO	Centro-Oeste
Centro 13	(n = 15) <i>K. pneumoniae</i>	Janeiro / 2008	Brasília/DF	Centro-Oeste
Centro 10	(n = 6) <i>K. pneumoniae</i>	Dezembro /2007	Belém/PA	Norte
Centro 8	(n = 11) <i>K. pneumoniae</i>	Fevereiro / 2008	Natal/RN	Nordeste
Centro 9	(n = 21) <i>K. pneumoniae</i>	Janeiro / 2008	Fortaleza/CE	Nordeste
Centro 11	b	Fevereiro / 2008	Natal/RN	Nordeste
Centro 15	(n = 3) <i>K. pneumoniae</i>	Julho / 2008	Salvador/BA	Nordeste

a: Foram enviadas somente as fichas clínicas; b: Nenhum isolado foi enviado por esse centro médico até dezembro de 2008.

#### 4.2. Distribuição dos Dados Epidemiológicos

A distribuição dos casos de infecção de corrente sanguínea por *Klebsiella* spp. de acordo com as cinco regiões brasileiras está demonstrado no Figura 3. A taxa de isolamento de *Klebsiella* spp. nas regiões Sudeste (45,5%), Sul (17,4%), Centro-Oeste (12,5%), Norte (3,6%) e Nordeste (21%) estão representadas por 6, 2, 2, 1 e 4 hospitais, respectivamente. Os hospitais da região sudeste representaram o projeto piloto desse estudo, e por esse motivo iniciaram a coleta dos dados e das amostras num período anterior (junho/2007) aos demais hospitais. Durante o período do desenvolvimento desse estudo, o centro médico 11 não enviou nenhuma amostra clínica de *Klebsiella* spp. ao centro coordenador, e o centro médico 14 optou por encaminhar somente as fichas clínicas com os dados da amostra e do paciente.



**Figura 3.** Distribuição dos casos de infecção de corrente sanguínea por *Klebsiella* spp. isoladas em 14 centros médico hospitalares, representativos das cinco regiões brasileiras, no período de Junho de 2007 a Dezembro de 2008.

Entre as 167 amostras de *Klebsiella* spp. estudadas, verificou-se que mais de 52% foram isoladas de pacientes que estavam internados em unidades de terapia intensiva (UTI) no momento da coleta da primeira hemocultura.

Em relação à fonte de bacteremia, a maioria dos casos foi proveniente de infecção primária associada à utilização de cateter venoso central (40,2%), seguido por infecções do trato respiratório inferior (13,6%), infecção do trato urinário (12,4%), ferida cirúrgica (6,5%) e infecção gastrointestinal (4,7%). As amostras de *Klebsiella* spp. isoladas sem o conhecimento da fonte da infecção representaram 16,5% dos casos analisados e em 6,1% dos casos não foi informado a fonte da infecção bacteriana.

A frequência de distribuição das patologias de base dos pacientes com infecção de corrente sanguínea foram as neoplasias (28,1%), doenças gastrointestinais (12,5%), cardiovasculares (12%) e neurológicas (10%), seguidas pela prematuridade (7,7%), insuficiência renal (5,9%), insuficiência respiratória (4,7%), transplante de órgão sólidos (4,7%) e 14,4% dos casos foram representados por patologias de base como transplante de medula, trauma, HIV, caquexia, diabetes mellitus, entre outros.

O uso de cateter venoso central associado ao cateter periférico, vesical e a ventilação mecânica representou mais de 90% de possíveis fatores de risco associados ao desenvolvimento das bacteremias por *Klebsiella* spp. Apenas 49,1% dos pacientes receberam alta hospitalar, sendo que 37,1% foram a óbito. Em 13,8% dos casos esta informação ainda não estava disponível, pois o paciente continuava internado no momento de envio dos dados.

### 4.3. Análises dos Dados Microbiológicos e Moleculares

#### 4.3.1. Teste de Sensibilidade e Detecção de ESβL pelo Sistema Automatizado Phoenix

O teste de sensibilidade quantitativo foi realizado pelo sistema BD Phoenix para todas as amostras de *Klebsiella* spp. (n=167), das quais 94 (56,3%) apresentaram resistência para uma ou mais cefalosporinas de terceira e/ou quarta gerações e foram classificadas como produtoras de β-lactamase de espectro ampliado e 73 (43,7%) amostras como não produtora de β-lactamase de espectro ampliado (Figura 4). Fluxograma I

Foi realizada a comparação do perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, as respectivas concentrações inibitórias e as porcentagens de sensibilidade podem ser avaliadas na Tabela 9. As amostras foram separadas em dois grupos: produtoras e não produtoras de ESβL. Os resultados apresentados demonstram uma diferença importante da atividade dos β-lactâmicos nos dois grupos de amostras. As amostras de *Klebsiella* spp. com fenótipo ESβL exibiram diminuição da sensibilidade para todos os agentes antimicrobianos testados, exceto para os carbapenens e apenas 7,4% destas amostras foram sensíveis a piperacilina/tazobactam (CIM<sub>90</sub>, > 64/4 µg/ml). Por outro lado, 100% das amostras não produtoras foram sensíveis a amicacina, cefepima, ceftazidima, gentamicina e carbapenens, com exceção apenas da ceftriaxona, ciprofloxacina e levofloxacina, que apresentaram sensibilidade de 95,8%, 91,7% e 93,1%, respectivamente.

Os carbapenêmicos imipenem (CIM<sub>90</sub>, ≤1 µg/ml) e meropenem (CIM<sub>90</sub>, ≤1 µg/ml) mantiveram excelente atividade tanto entre os isolados produtores,

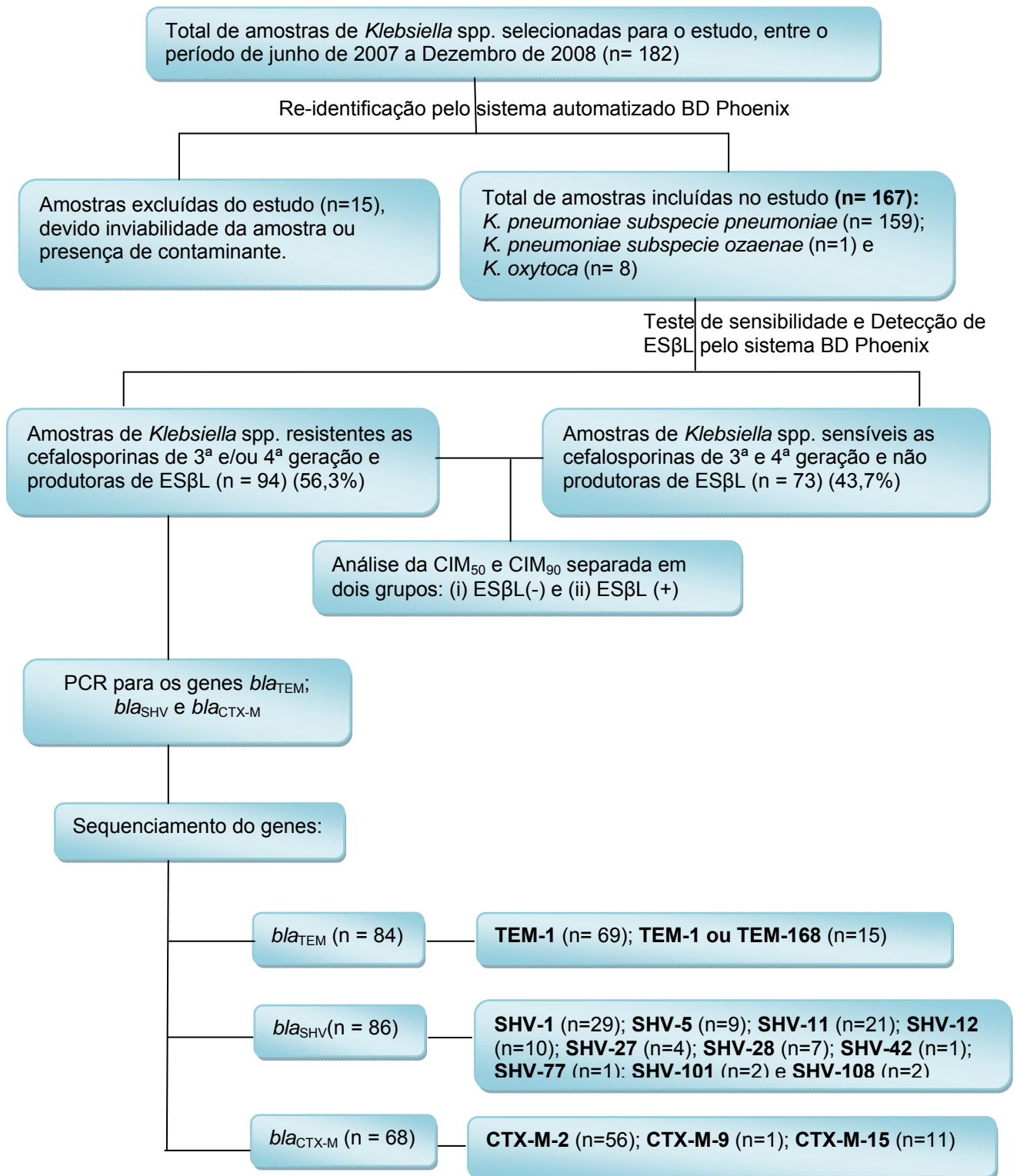
como os não produtores de ESβL. Entre os aminoglicosídeos, amicacina (CIM<sub>90</sub>, 32 µg/ml) e gentamicina (CIM<sub>90</sub>, >8 µg/ml) foram ativos contra 76,5% e 26,6% das amostras produtoras de ESβL. O percentual de atividade da amicacina foi razoavelmente menor contra amostras produtoras de ESβL quando comparada com amostras não produtoras (76,5 versus 100% de sensibilidade).

**Tabela 9.** Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, realizado pelo sistema automatizado BD Phoenix, das 167 amostras de *Klebsiella* spp. incluídas no estudo.

Antimicrobianos	<i>Klebsiella</i> spp. ESβL negativa (n=73)			<i>Klebsiella</i> spp. ESβL positiva (n = 94)			Sensib <sup>b</sup> (%)	<i>Klebsiella</i> spp. (n= 167)			Diluições testadas (µg/mL)
	CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		Sensib <sup>b</sup> (%)	CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		CIM (µg/mL) <sup>a</sup>		Sensib <sup>b</sup> (%)			
	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>		CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>	CIM <sub>50</sub>	CIM <sub>90</sub>				
Amicacina	8	8	100	8	32	76,5	≤8	32	86,7	8-32	
Cefepima	≤1	≤1	100	≥16	≥16	12,7	8	>16	50,9	1-16	
Ceftazidima	≤0,5	≤0,5	100	32	≥32	23,3	4	>32	56,5	0.5-32	
Ceftriaxona	≤2	≤2	95,8	≥32	≥32	4,25	>32	>32	44,3	2-32	
Ciprofloxacina	≤0,5	≤0,5	91,7	>2	>2	28,7	1	>2	56,9	0.5-2	
Gentamicina	≤2	≤2	100	>8	>8	26,6	≤2	>8	58	2-8	
Levofloxacina	≤1	≤1	93,1	>4	>4	32,9	≤1	>4	59,1	1-4	
Imipenem	≤1	≤1	100	≤1	≤1	97,8	≤1	≤1	98,1	1-8	
Meropenem	≤1	≤1	100	≤1	≤1	94	≤1	≤1	96,9	1-8	
Piperacilina / Tazobactam	4/64	64/4	87,5	>64/4	>64/4	7,4	64/4	>64/4	43,7	2/4-64/4	
Ticarcilina / clavulanato	4/2	8/2	95,7	>64/2	>64/2	4,2	>64/2	>64/2	44,2	8-32	

<sup>a</sup>A CIM 50 e a CIM 90 foram definidas como as menores concentrações de antimicrobianos capazes de inibir o crescimento de 50% e 90% das amostras analisadas, respectivamente.

<sup>b</sup>As percentagens de sensibilidade foram calculadas de acordo com os limites de sensibilidade estabelecidos pelo CLSI.



**Figura 4.** Fluxograma I: Avaliação dos mecanismos de resistência às cefalosporinas das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea

---

---

#### **4.3.2. Avaliação de Testes Fenotípicos para Detecção de Carbapenemase de acordo com as Recomendações do CLSI 2009**

##### **4.3.2.1. Avaliação do Teste de Triagem com Difusão em Disco para Detecção da Sensibilidade *in vitro* para Ertapenem**

O teste de difusão em disco para ertapenem foi realizado para as 94 amostras de *Klebsiella* spp. que apresentaram resistência para uma ou mais cefalosporinas de terceira e/ou quarta gerações. Apenas 15 amostras (15,9%) apresentaram um halo de inibição  $\leq 15$  mm e foram classificadas como resistentes para ertapenem, sete amostras (7,5%) apresentaram halo de inibição entre 19-21 mm (apesar de classificadas como sensíveis, estas sete amostras foram submetidas ao testes de Hodge modificado, seguindo as recomendações do CLSI, 2009 / documento M100S-19) e 72 amostras apresentaram halo de inibição  $> 21$  mm para ertapenem e foram, portanto classificadas como sensíveis de acordo com o CLSI, 2009 (Figura 5).

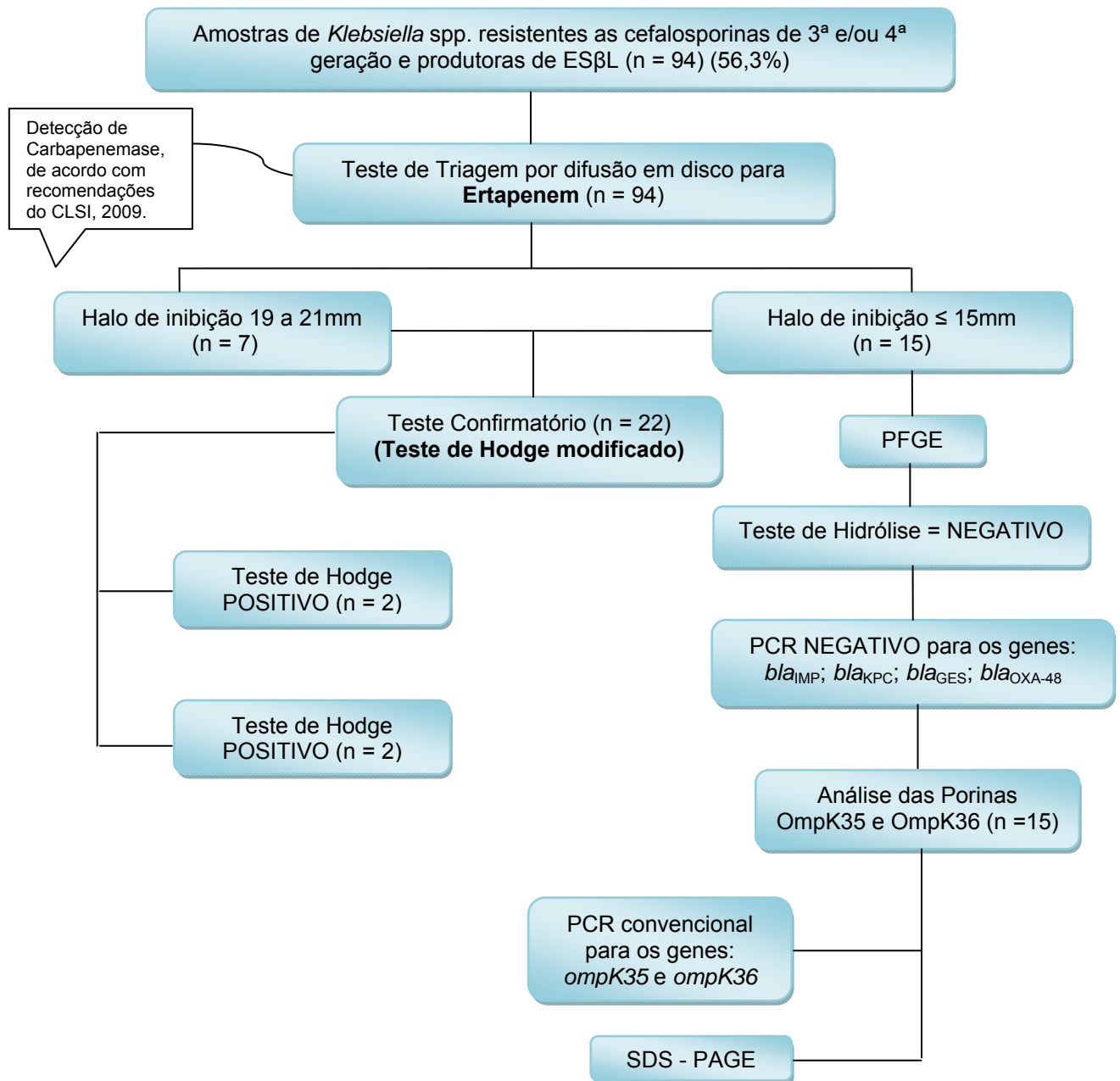
##### **4.3.2.2. Avaliação da Metodologia de Hodge modificada, usada como Teste Confirmatório para a Detecção Fenotípica de Carbapenemase**

O teste de Hodge foi realizado somente para as amostras de *Klebsiella* spp. que apresentaram halo de inibição  $\leq 21$  mm (Figura 5). A interpretação do teste foi avaliada por dois diferentes observadores e, a leitura dos testes foi idêntica para os dois antimicrobianos testados (ertapenem e meropenem). Apenas duas amostras apresentaram resultados positivos para o teste de Hodge modificado (Tabela 10). As duas amostras (30279 e 32548) positivas

para o teste de Hodge apresentaram halo de inibição de 6 mm para ertapenem. CIM de 4 µg/mL para imipenem e CIM de 16 e 32µg/mL para meropenem.

Como pode ser observado na Figura 6, as amostras positivas para o teste de Hodge apresentaram crescimento da amostra ATCC 25922 na área de encontro da amostra teste com o halo de inibição para os dois carbapenens testados (ertapenem e meropenem), demonstrando um maior poder de hidrólise sobre o antimicrobiano, quando comparada com o controle negativo do teste.



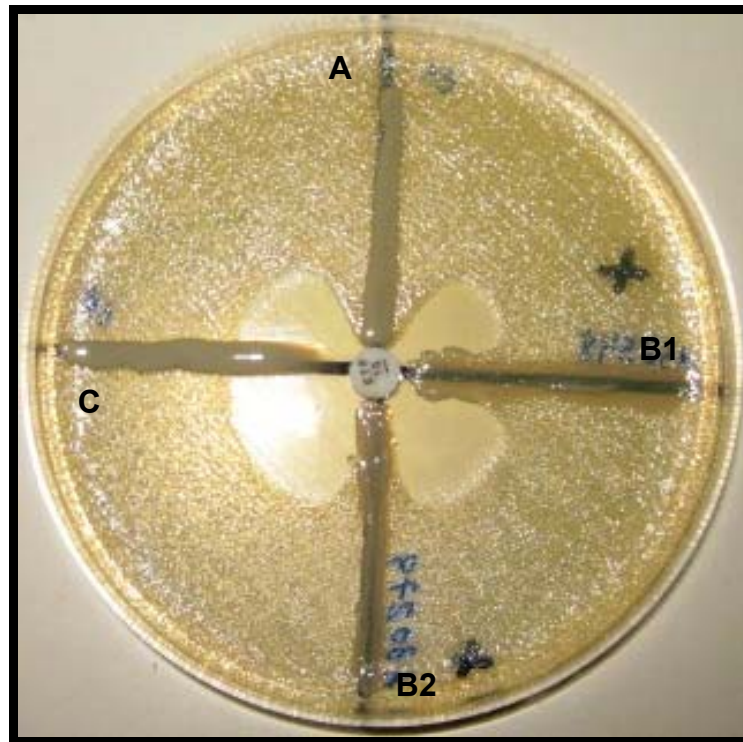


**Figura 5.** Fluxograma II: Avaliação dos mecanismos de resistência aos carbapenens das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea

**Tabela 10.** Comparação entre os resultados do Teste de Triagem e o Teste Confirmatório para detecção fenotípica de carbapenemase das amostras de *Klebsiella* spp. com halo de inibição por disco-difusão  $\leq 21$  mm para ertapenem

Identificação da amostra	Disco Difusão (Ertapenem)		
	Halo (mm)	Categoria <sup>a</sup>	Teste de Hodge modificado
30.279	6	R	POSITIVO
31.054	6	R	NEGATIVO
31.964	6	R	NEGATIVO
32.548	6	R	POSITIVO
36.271	6	R	NEGATIVO
36.502	6	R	NEGATIVO
30.556	10	R	NEGATIVO
33.342	10	R	NEGATIVO
33.480	10	R	NEGATIVO
34.815	10	R	NEGATIVO
31.470	11	R	NEGATIVO
33.213	14	R	NEGATIVO
37.055	15	R	NEGATIVO
37.492	15	R	NEGATIVO
37.440	10	R	NEGATIVO
31.055	19	S	NEGATIVO
32.991	19	S	NEGATIVO
31.406	20	S	NEGATIVO
35.227	20	S	NEGATIVO
30.120	21	S	NEGATIVO
30.659	21	S	NEGATIVO
30.984	21	S	NEGATIVO

a. Categoria de sensibilidade interpretada de acordo com o documento M02-A10, CLSI, 2009; R: resistente; S: sensível.



**Figura 6.** Representação do Teste Hodge positivo. A: controle positivo (A28006), B1 e B2: (Amostras Positivas: 30279 e 32548), C: controle negativo (A37202) e a cepa de *Escherichia coli* ATCC 25922.

#### **4.3.3. Confirmação do Perfil de Sensibilidade aos Carbapenems e a Cefoxitina pela Metodologia de Diluição em Ágar para as Amostras Resistentes a Ertapenem**

As concentrações inibitórias mínimas (CIM) calculadas pela técnica de diluição em ágar para os  $\beta$ -lactâmicos ertapenem, imipenem, meropenem e cefoxitina estão demonstradas na Tabela 11.

De acordo com os pontos de corte estabelecidos pelo documento M07-A8 (CLSI, 2009) foram observados altos níveis de resistência a cefoxitina (CIM,  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ) entre as 15 amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Todas as amostras confirmaram a resistência a ertapenem (CIM,  $\geq 8$   $\mu\text{g/mL}$ ) e três amostras apresentaram redução da sensibilidade ao imipenem (CIMs, 4  $\mu\text{g/mL}$ ). Duas amostras apresentaram resistência intermediária (CIM, 8  $\mu\text{g/mL}$ ).

e três amostras foram resistentes para meropenem (CIM,  $\geq 16$   $\mu\text{g/mL}$ ). Apenas uma dessas amostras apresentou resistência concomitante para ertapenem, imipenem e meropenem (CIM, 32  $\mu\text{g/mL}$ ).

**Tabela 11.** Perfil de sensibilidade aos  $\beta$ -lactâmicos entre os 15 isolados de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem pela técnica de diluição em ágar.

Amostras	CIM( $\mu\text{g/mL}$ ) <sup>a</sup>			
	Ertapenem (0,125-32 $\mu\text{g/mL}$ )	Imipenem (0,125-32 $\mu\text{g/mL}$ )	Meropenem (0,125-32 $\mu\text{g/mL}$ )	Cefoxitina (0,5-512 $\mu\text{g/mL}$ )
30.279	32 (R)	4 (S)	16 (R)	64 (R)
30.556	32 (R)	4 (S)	4 (S)	32 (R)
31.054	8 (R)	1 (S)	8 (I)	64 (R)
31.470	8 (R)	1 (S)	2 (S)	64 (R)
31.964	32 (R)	32 (R)	32 (R)	>512 (R)
32.548	16 (R)	4 (S)	32 (R)	128 (R)
33.213	8 (R)	0,5 (S)	1 (S)	64 (R)
33.342	16 (R)	1 (S)	2 (S)	64 (R)
33.480	16 (R)	1 (S)	2 (S)	32 (R)
34.815	32 (R)	0.5 (S)	1 (S)	64 (R)
36.271	>32 (R)	2 (S)	8 (I)	64 (R)
36.502	16 (R)	0.25 (S)	1 (S)	16 (I)
37.055	8 (R)	0.25 (S)	1 (S)	32 (R)
37.440	16 (R)	<0.125 (S)	0.5(S)	16 (I)
37.492	8 (R)	<0.125 (S)	1 (S)	64 (R)

a. Categoria de sensibilidade interpretada de acordo com o documento M07-A8, CLSI (2009); S: sensível; I: Intermediário e R: resistente

#### 4.3.4. Detecção dos Genes Codificadores de $\beta$ -Lactamases por PCR

Todas as 94 amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de ES $\beta$ L apresentaram reação da PCR positiva para um ou mais genes codificadores de  $\beta$ -lactamases. Desta forma, os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub> foram detectados em 84, 86 e 68 amostras, respectivamente (Figura 4).

A detecção dos genes *bla*<sub>IMP</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>OXA</sub> codificadores de metalo- $\beta$ -Lactamases e carbapenemases foi realizada apenas para as 15 amostras de *Klebsiella pneumoniae* resistentes a ertapenem (Figura 5). Esse ensaio revelou que nenhuma das amostras que apresentou atividade *in vitro* contra o ertapenem foi produtora de M $\beta$ L ou carbapenemase.

##### 4.3.4.1. Multiplex PCR para Detecção dos Genes Codificadores de AmpC Plasmidiais

A identificação dos genes que codificam  $\beta$ -lactamases do tipo AmpC plasmidiais foi realizada apenas para as 15 amostras de *Klebsiella pneumoniae* que apresentaram resistência para ertapenem. Estas mesmas amostras foram também resistentes para cefoxitina pela metodologia de diluição em ágar, como pode ser observado na tabela 8. Todas as amostras testadas apresentaram reação negativa para os genes testados na reação da multiplex PCR para detecção de AmpC plasmidial.

#### 4.3.5. Análise do Sequenciamento e Interpretação dos Resultados

As reações de sequenciamento foram realizadas para todas as amostras de *Klebsiella* spp. que apresentaram reação da PCR positiva para os genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>. Os produtos do sequenciamento foram editados no

---

---

programa SeqMan e submetidos aos programas (<http://www.ebi.ac.uk/fasta33>) e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) para determinação do percentual de homologia entre os produtos sequenciados e as sequências descritas na literatura.

Mais de 80% das amostras sequenciadas para o gene *bla*<sub>TEM</sub> apresentaram 100% de similaridade com a  $\beta$ -lactamase TEM-1, 15 amostras apresentaram o mesmo percentual de similaridade genética (99%) para as  $\beta$ -lactamases TEM-1 e TEM-168, concomitantemente. Portanto, não foi possível estabelecer a que subtipo da  $\beta$ -lactamase pertencem essas amostras. Entre as 86 amostras de *Klebsiella* spp. que apresentaram reação da PCR positiva para o gene *bla*<sub>SHV</sub>, 10,5% e 11,6% carregavam as ES $\beta$ L SHV-5 e SHV-12, respectivamente. Outras  $\beta$ -lactamases como SHV-1 e SHV-11 foram caracterizadas em 33,7% e 24,4% das amostras.

As ES $\beta$ Ls do tipo CTX-M foram mais prevalentes nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste. A ES $\beta$ L do tipo CTX-M-9 foi caracterizada somente em uma amostra isolada da região Centro-Oeste do país. A ES $\beta$ L do tipo CTX-M-15 foi identificada em quatro amostras de dois centros da região sudeste, uma amostra de um centro da região centro-oeste e seis amostras de um único centro da região nordeste (Tabela 13).

Foi observada uma maior diversidade de ES $\beta$ L entre as cepas isoladas da região Sudeste (Tabela 12). Somente a região Nordeste apresentou a peculiaridade de quase 26,3% das cepas carregarem mais de uma ES $\beta$ L (Figura 7). Entre todas as  $\beta$ -lactamases descritas neste estudo, as ES $\beta$ L mais prevalentes no território brasileiro foram CTX-M-2 (59,6%) e CTX-M-15 (11,7%).

**Tabela 12.** Frequência de ES $\beta$ L detectada nas amostras de *Klebsiella* spp. de acordo com a região brasileira onde foram isoladas.

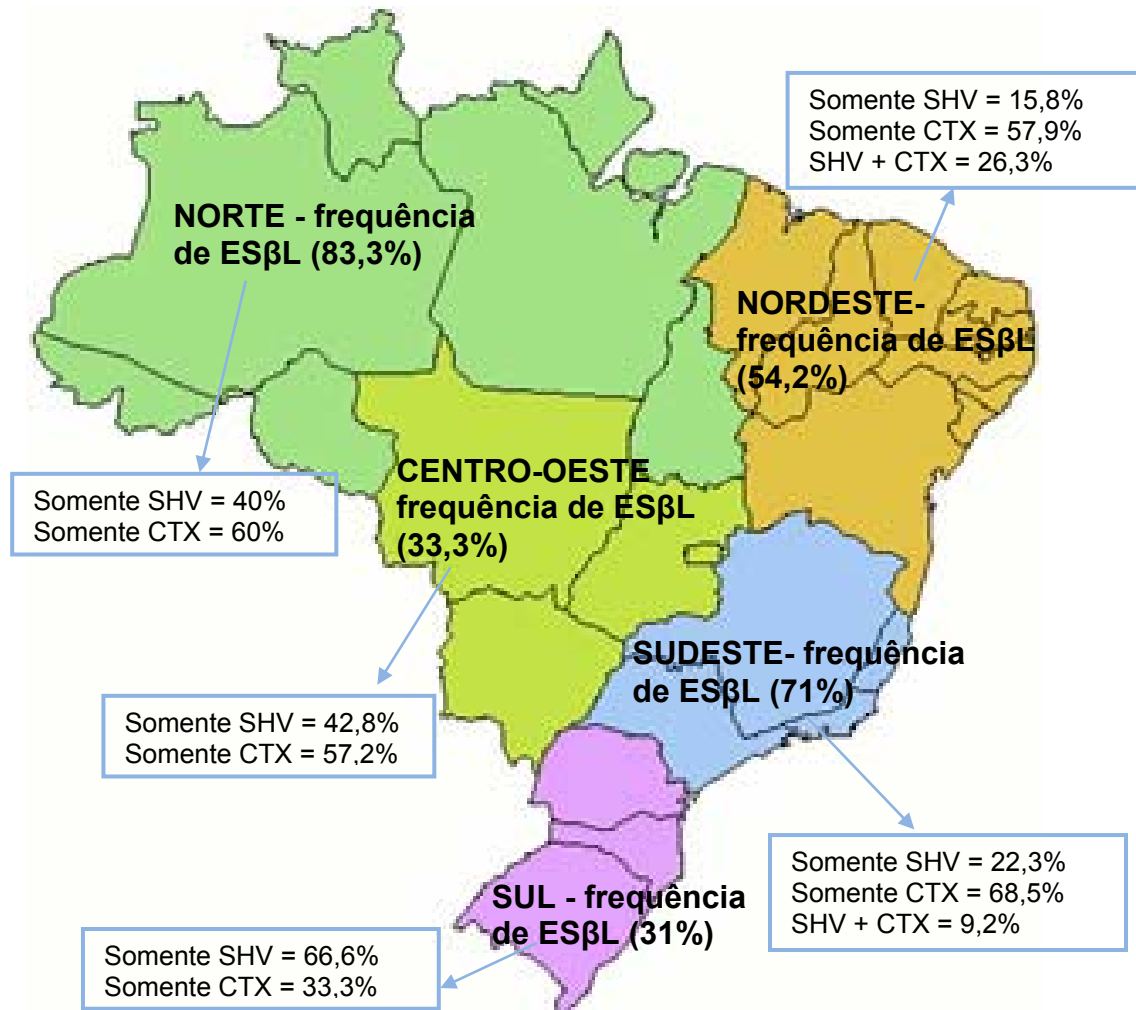
Região geográfica	Nº de amostras de <i>Klebsiella</i> spp. avaliadas (N = 167 amostras)	Nº de amostras produtoras de ES $\beta$ L (N = 94 amostras)	Tipos de ES $\beta$ L caracterizadas por região brasileira
Sudeste	N = 76 amostras	N = 54 (71%)	SHV-5; SHV-12; SHV-27; SHV-28; SHV-108; CTX-M-2; CTX-M-15
Sul	N = 29 amostras	N = 9 (31%)	SHV-5; SHV-12; CTX-M-2
Centro-Oeste	N = 21 amostras	N = 7 (33,3%)	SHV-12; SHV-42; SHV-77; CTX-M-2; CTX-M-9; CTX-M-15
Norte	N = 6 amostras	N = 5 (83,3%)	SHV-5; SHV-12; CTX-M-2
Nordeste	N = 35 amostras	N = 19 (54,2%)	SHV-12; SHV-28; SHV-101; CTX-M-2; CTX-M-15

**Tabela 13.** Distribuição dos tipos de ESβL detectados nas amostras de *Klebsiella* spp. de acordo com o centro médico, cidade, estado e região brasileira onde foram isoladas.

Centros médicos	Nº de amostras enviadas por centro médico	Nº Amostras produtoras de ESβLs	Tipos de ESβLs caracterizadas	Cidade / Estado	Região geográfica
Centro 1	(n = 34) <i>K. pneumoniae</i> (n = 04) <i>K. oxytoca</i>	29	SHV-12 (n= 2) SHV-27 (n= 2) SHV-28 (n= 1) CTX-M-2 (n= 24) CTX-M-15 (n= 3)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 2	(n = 03) <i>K. pneumoniae</i> (n = 01) <i>K. oxytoca</i>	04	SHV-5 (n=1) CTX-M-2 (n=3)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 3	(n = 15) <i>K. pneumoniae</i>	11	SHV-12 (n=3) SHV-27 (n=2) SHV-28 (n=1) CTX-M-2 (n=7)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 4	(n = 08) <i>K. pneumoniae</i>	05	SHV-5 (n=2) CTX-M-2 (n=2) CTX-M-15 (n=1)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 5	(n = 08) <i>K. pneumoniae</i>	03	SHV-5 (n=1) CTX-M-2 (n=2)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 6	(n = 01) <i>K. pneumoniae</i> (n = 01) <i>K. oxytoca</i> (n = 01) <i>K. ozaenae</i>	02	SHV-108 (n=2)	São Paulo/SP	Sudeste
Centro 7	(n = 27) <i>K. pneumoniae</i> (n = 02) <i>K. oxytoca</i>	08	SHV-5 (n=3) SHV-12 (n=2) CTX-M-2 (n=3)	Porto Alegre/RS	Sul
Centro 12	(n = 06) <i>K. pneumoniae</i>	02	CTX-M-2 (n=1) CTX-M-9 (n=1)	Goiânia/GO	Centro-Oeste
Centro 13	(n = 15) <i>K. pneumoniae</i>	05	SHV-12(n=1) SHV-42 (n=1) SHV-77 (n=1) CTX-M-2 (n=1) CTX-M-15 (n=1)	Brasília/DF	Centro-Oeste
Centro 10	(n = 06) <i>K. pneumoniae</i>	05	SHV-5(n=1) SHV-12 (n=1) CTX-M-2 (n=3)	Belém/PA	Norte
Centro 8	(n = 11) <i>K. pneumoniae</i>	04	SHV-12 (n=1) CTX-M-2 (n=3)	Natal/RN	Nordeste
Centro 9	(n = 21) <i>K. pneumoniae</i>	15	SHV-28 (n= 5) SHV-101 (n= 2) CTX-M-2 (n= 7) CTX-M-15 (n= 6)	Fortaleza/CE	Nordeste
Centro 15	(n = 03) <i>K. pneumoniae</i>	NI	NI	Salvador/BA	Nordeste

NI: Nenhum isolado desse centro foi produtor de ESβL.





**Figura 7.** Frequência dos principais tipos de ESβL detectados em amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea nas cinco regiões brasileiras.

#### **4.3.6. Teste de Hidrólise para Detecção de Carbapenemase**

O teste de hidrólise enzimática foi realizado para as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem avaliadas neste estudo. Todas as amostras apresentaram resultado negativo na presença dos substratos ertapenem, imipenem e meropenem.

#### **4.3.7. Avaliação da Similaridade Genética entre as Amostras de *Klebsiella pneumoniae* Resistentes a Ertapenem**

A análise da similaridade genética pela técnica do PFGE demonstrou uma variabilidade genética representada por sete diferentes padrões moleculares de PFGE (De “A” a “G”). As 15 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem foram isoladas de oito diferentes centros médicos, representados pelas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste.

Como pode ser observado na Tabela 14, os subtipos “A1”, “A2” e “A3” foram encontrados em três diferentes centros médicos localizados na cidade de São Paulo. O centro médico 3 apresentou três diferentes padrões “B”, “C” e “D” caracterizando uma diversidade clonal. Entretanto, o mesmo padrão “B” de PFGE foi caracterizado em cepas avaliadas nos centros 3 e 4, ambos centros médicos pertencem a região sudeste. Dois subtipos do padrão “F” foram observados em três amostras (33213, 37440 e 36502) isoladas de dois diferentes centros médicos, localizados em diferentes capitais da região nordeste do país. O padrão “G” foi determinado na única amostra (37055) que representou a região centro-oeste do Brasil.

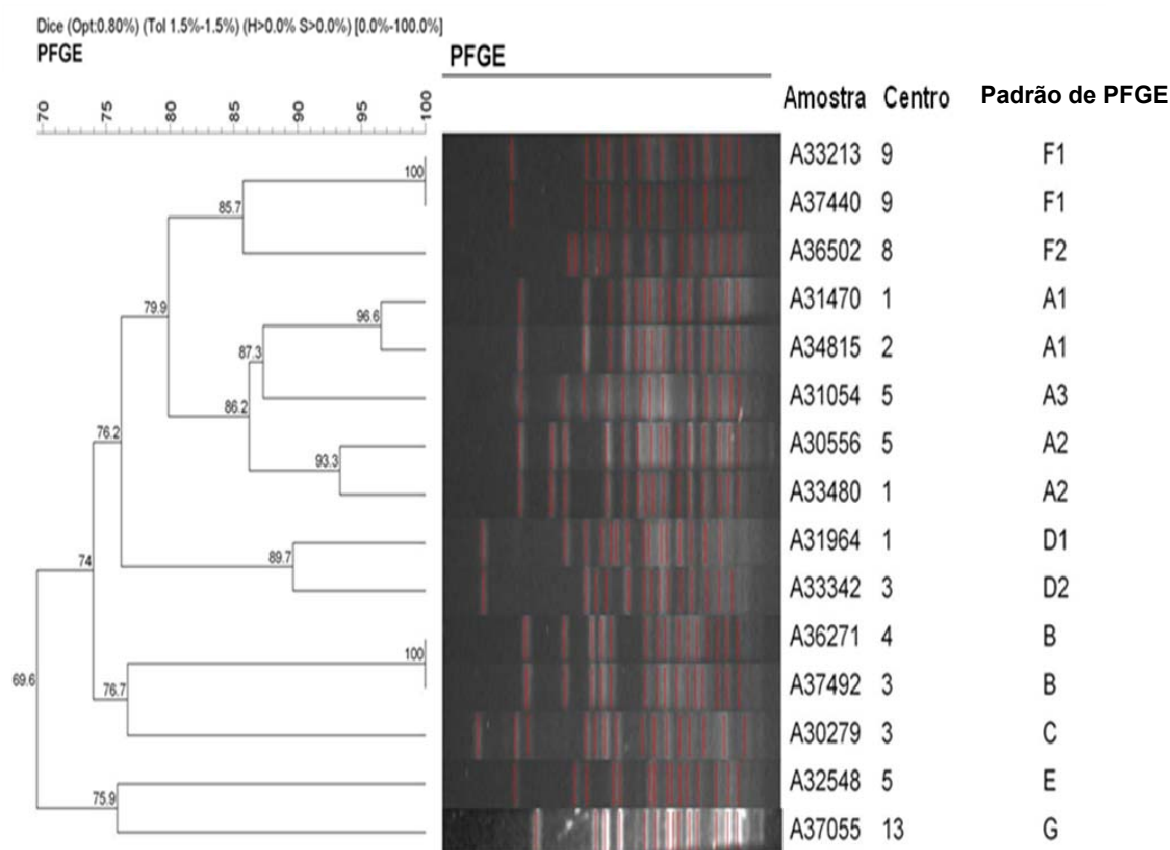
**Tabela 14.** Similaridade genética entre as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem de acordo com o centro médico e a região geográfica onde foram isoladas.

Amostra	Padrão de PFGE Tenover <i>et al.</i> , 1995	Centro Médico	Região Geográfica
34.815	A1	2	Sudeste
31.470	A1	1	Sudeste
33.480	A2	1	Sudeste
30.556	A2	5	Sudeste
31.054	A3	5	Sudeste
36.271	B	4	Sudeste
37.492	B	3	Sudeste
30.279	C	3	Sudeste
31.964	D1	1	Sudeste
33.342	D2	3	Sudeste
32.548	E	5	Sudeste
37.440	F1	9	Nordeste
33.213	F1	9	Nordeste
36.502	F2	8	Nordeste
37.055	G	13	Centro-oeste

Os dados obtidos a partir do gel de PFGE corroboram com a análise do dendograma (Figura 8) realizada através do programa *BioNumerics* onde também foram encontrados sete diferentes padrões de PFGE, com coeficiente de similaridade acima de 80% entre os isolados pertencentes ao mesmo padrão de PFGE.

Embora as cepas representadas pelo padrão “A” tenham apresentado um coeficiente de similaridade de 86,2%, dois pares de amostras dos subtipos “A1” e “A2” apresentaram similaridade genética de 96,6% e 92,3%. O padrão B apresentou um coeficiente de similaridade de 100%, entre si. O padrão “F”, que apresentou dois subtipos (F1 e F2), apresentou um coeficiente de

similaridade de 85,7%, sendo que entre os dois isolados pertencentes ao subtipo F1 (37440 e 36502) foi observado um coeficiente de similaridade de 100%.



**Figura 8.** Dendrograma pelo programa *BioNumerics* demonstrando o coeficiente de similaridade entre as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem . Padrão de PFGE segundo critérios de Tenover, 1995.

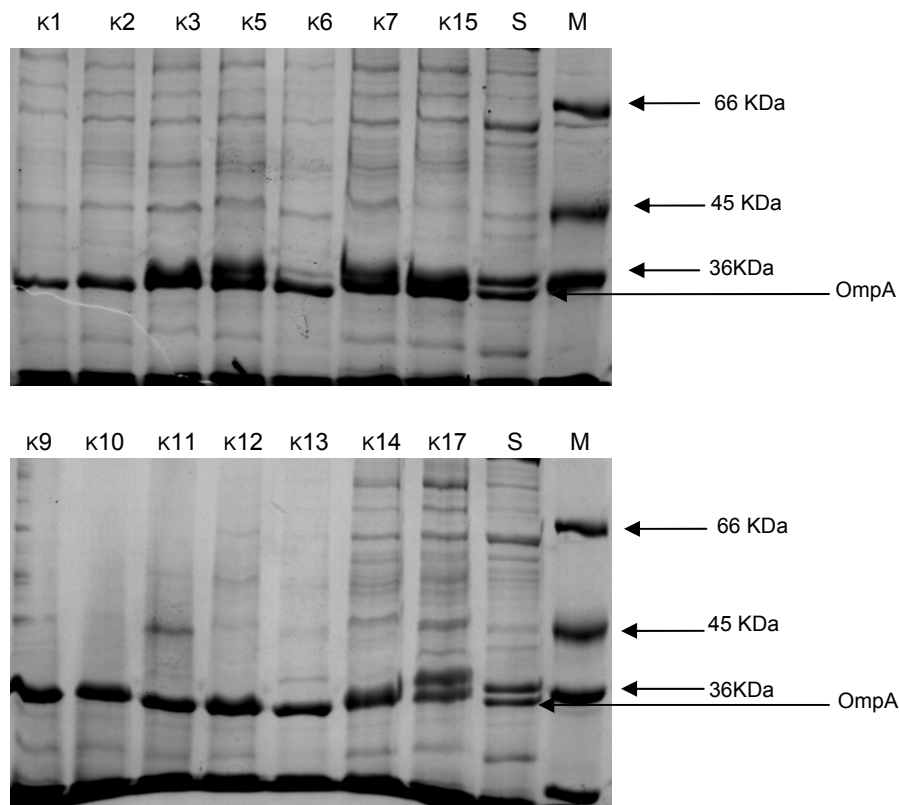
#### 4.3.8. Avaliação do Perfil das Proteínas de Membrana Externa

Como pode ser visibilizado nas Figuras 9A e 9B, a análise do perfil das proteínas de membrana externa pela técnica de SDS-PAGE demonstrou a presença de uma única banda, em nove (amostras: K1, K2, K9, K10, K11, K12, K13, K14 e K20) das 15 amostras que apresentaram resistência ao ertapenem. Possivelmente, a banda visibilizada corresponde a OmpA, sugerindo, portanto,

a ausência da expressão das proteínas OmpK35 e OmpK36. Embora, a amostra K20 faça parte do grupo das nove amostras citadas acima, devido à falta de espaço no gel de poliacrilamida, a mesma não foi demonstrada nas figuras 9A e 9B.

Seis amostras (K3, K5, K6, K7 e K15) apresentaram além da OmpA, uma banda de aproximadamente 36 KDa. Entretanto não foi possível estabelecer com precisão qual das porinas foi expressa somente por meio da técnica de SDS-PAGE.

A expressão da proteína OmpA visibilizada em todas as amostras avaliadas foi interpretada como um importante controle da qualidade da extração das OMPs.

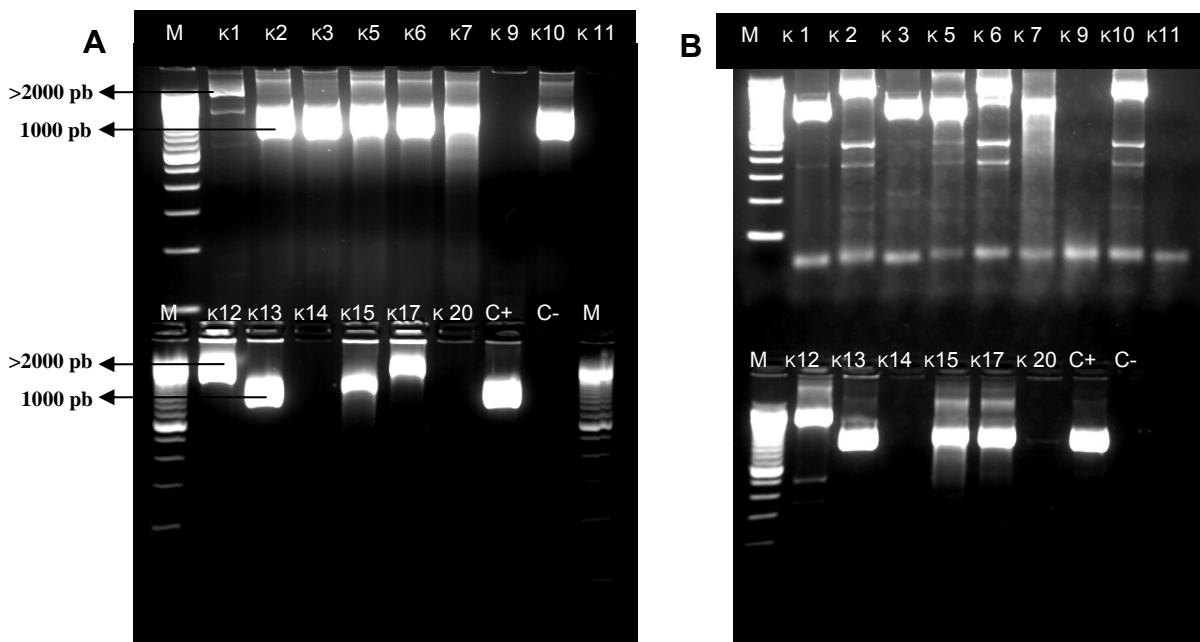


**Figuras 9A e 9B.** Perfil das proteínas de membrana externa em gel de Poliacrilamida 12%, pela técnica de SDS-PAGE. Amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem (K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K10, K11, K12, K13, K14 e K17); S: amostra de *K. pneumoniae* sensível aos  $\beta$ -lactâmicos; M: padrão de peso molecular baixo.

#### 4.3.9. Avaliação dos Genes que Codificam as Porinas OmpK35 e OmpK36

Entre as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem foram observados cinco perfis de amplificação para os genes *ompK35* e *ompK36* (Figuras 10A e 10B): (i) produto de amplificação com o tamanho esperado (1000 pb) para os dois genes (amostras: K3, K5, K7, K13 e K15); (ii) produto de amplificação com o tamanho esperado para o gene *ompK35* e > 2000 pb para

o gene *ompK36* (amostras: K2, K6 e K10); (iii) produto de amplificação com o tamanho esperado para *ompK36* e > 2000 pb para *ompK35* (amostras: K1 e K17); (iv) produto de amplificação com o tamanho > 2000 pb para *ompK35* e *ompK36* (amostra: K12) e (v) ausência de produto amplificado para *ompK35* e *ompK36* (amostras: K9, K11, K14 e K20).



**Figuras 10A e 10B.** Eletroforese em gel de agarose 1,5% do produto de amplificação da PCR para os genes que codificam as porinas OmpK35 (Figura 10A) e OmpK36 (Figura 10B). M: padrão de peso molecular (100 pb). Amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem (K1, K2, K3, K5, K6, K7, K9, K10, K11, K12, K13, K14, K17 e K20); C(-): controle negativo; C(+): controle positivo (*K. pneumoniae* produtora de ES $\beta$ L ATCC 700603).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo permitiu a caracterização dos possíveis mecanismos de resistência aos antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos em amostras de *Klebsiella* spp. obtidas de um programa de vigilância de ICS envolvendo 13 centros médicos brasileiros. Considerando-se a reduzida disponibilidade de opções terapêuticas, agravada pelo progressivo aumento de episódios de ICS causada por *Klebsiella* spp. multirresistente, frequentemente isoladas em hospitais brasileiros, este estudo contribuiu com novos elementos que devem ser agregados ao panorama atual de ICS hospitalar no Brasil, tais como: **(i)** o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos entre amostras de *Klebsiella* spp. produtoras e não produtoras de ES $\beta$ L; **(ii)** a caracterização molecular das  $\beta$ -lactamases dos tipos TEM, SHV e CTX entre os isolados brasileiros de *Klebsiella* spp. e sua distribuição entre as diferentes regiões geográficas; **(iii)** a emergência da  $\beta$ -lactamase CTX-M-15 e a persistência da  $\beta$ -lactamase CTX-M-2; **(iv)** a acurácia do Teste de Hodge modificado para este grupo de amostras, e **(v)** associação de mecanismos de resistência, justificando a diminuição da sensibilidade aos carbapenens.

### Dados epidemiológicos

Apesar deste estudo não ter sido desenhado para avaliar os principais fatores de risco relacionados à ICS hospitalar por *Klebsiella* spp., constatamos que mais de 40% das amostras foram provenientes de infecção primária por uso de cateter venoso, seguido por infecção do trato respiratório inferior



(13,6%) e infecção do trato urinário (12,4%). Os dados apresentados divergem dos descritos por Marra e colaboradores, que estudaram 108 pacientes com ICS hospitalar por *K. pneumoniae*, em hospital universitário brasileiro. Os autores observaram que a fonte mais comum para aquisição de bacteremia foi infecção respiratória (38% dos casos), seguida por infecção abdominal (25,9%) e uso de cateter venoso (13,9%) (Marra *et al.* 2006). Tumbarello e colaboradores, ao estudarem retrospectivamente 147 casos de ICS ocasionada por *K. pneumoniae* provenientes do Hospital da Universidade Católica de Roma, constataram que a fonte mais comum de bacteremia, tanto para o grupo de amostras produtoras de ES $\beta$ L, quanto para o grupo de amostras não produtoras, foi infecção do trato urinário (29 e 17%), seguido por infecção do trato respiratório (8 e 12%) e cateter venoso central (2 e 3%), respectivamente (Tumbarello *et al.* 2006).

Provavelmente, a divergência entre os dados descritos acima está relacionada aos diferentes critérios de inclusão de pacientes entre os diversos estudos. O presente trabalho avaliou prospectivamente amostras de *Klebsiella* spp. isoladas exclusivamente da primeira hemocultura do paciente. Os outros estudos aqui descritos avaliaram, retrospectivamente, pacientes com resultado prévio de hemocultura positiva para *K. pneumoniae*, independentemente de terem sido provenientes da primeira hemocultura do paciente. Este fato pode ter selecionado pacientes com maior tempo de internação e utilização de dispositivos como sonda vesical de demora e necessidade de ventilação mecânica.

---

---

Perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e frequência de ESβL

No presente estudo, a prevalência das ICS causadas por *Klebsiella* spp. produtoras de ESβL foi de 56,2%. Resultados semelhantes foram descritos em dois estudos anteriores, também realizados no Brasil com taxas de 51% e 41,7% de *K. pneumoniae* isoladas de ICS e produtoras de ESβL (Marra *et al.* 2006; Ribas *et al.* 2007). Andrade e colaboradores relataram em um estudo multicêntrico brasileiro que a incidência de *Klebsiella* spp. produtora de ESβL foi detectada em, aproximadamente, 50% das amostras avaliadas de quatro diferentes sítios infecciosos (Andrade *et al.* 2008). De acordo com pesquisas realizadas em vários continentes, Winokur e colaboradores reportaram que, no período de 1997 a 1999, a América Latina deteve o primeiro lugar na incidência mundial de *Klebsiella* spp. produtora de ESβL (45,4%), seguida pela região do Pacífico Ocidental (24,6%), Europa (22,6%), Estados Unidos (7,6%) e Canadá (4,9%) (Winokur *et al.* 2001). Em outro estudo, realizado em um período de seis anos (1997-2002), Biedenbach e colaboradores reportaram que 42,7% das amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de ICS da América Latina apresentaram fenótipo ESβL, seguidas de 21,7% na Europa e 5,8% na América do Norte (Biedenbach *et al.* 2004).

Resultados semelhantes aos descritos nesse estudo também foram relatados por outras instituições internacionais. De modo geral, a disseminação de patógenos produtores de ESβL tem sido mais expressiva nos países que detém poucos recursos econômicos. Isso fica claro quando se compara os dados de prevalência de ESβL na Suécia (3%) *versus* Grécia, Turquia e Portugal (>25%) (Paterson and Bonomo 2005), América do Sul (>30%) ou

mesmo o Brasil (>50%) (Marra *et al.* 2006; Sader *et al.* 2002) (Andrade *et al.* 2008). Villegas e colaboradores descreveram algumas razões que poderiam justificar essa disparidade: (i) baixas condições sócio-econômicas; (ii) hospitais que excedem sua capacidade de atendimento; (iii) automedicação da população, devido à falta de rigor na venda destes compostos pelas farmácias; (iv) deficiência nos cuidados de assepsia hospitalar, resultando em altas taxas de colonização e infecção por *Klebsiella* spp. produtora de ES $\beta$ L (Villegas *et al.* 2008).

Encontra-se bem descrito na literatura que a produção de ES $\beta$ L em microrganismos Gram negativos gera um impacto clínico significativo nos serviços de saúde em todo o mundo. Esse fato reforça, cada vez mais, a necessidade de adesão a programas de racionalização e/ou uso criterioso de antimicrobianos em estabelecimento hospitalares, assim como enfatiza a importância de implementação de medidas de barreira que evitem ou reduzam as taxas de disseminação desses importantes determinantes de resistência.

O desenvolvimento das cefalosporinas de amplo espectro, no início da década de 80, foi considerado uma grande adição ao arsenal terapêutico na luta contra os organismos produtores de  $\beta$ -lactamases. Porém, o aumento da prevalência das infecções causadas por enterobactérias, bem como as altas taxas de resistência aos antimicrobianos, comprometeu gravemente a eficácia desses antibióticos (Perez *et al.* 2007).

No presente estudo foram detectadas altas taxas de resistência aos agentes antimicrobianos avaliados contra as amostras clínicas de *Klebsiella* spp. isoladas de treze hospitais brasileiros, representativos das cinco regiões geográficas. Somente os carbapenens apresentaram boa atividade contra

---

---

esses isolados ( $\text{CIM}_{50} \leq 1,0 \mu\text{g/ml}$ ), sendo que o imipenem (97,8% de sensibilidade) apresentou uma taxa de sensibilidade discretamente maior que o meropenem (94% de sensibilidade).

Estes achados reforçam a dificuldade para a seleção da terapia antimicrobiana adequada para o tratamento dessas infecções. Entretanto, é importante ressaltar que, ao avaliarmos separadamente as amostras produtoras e não produtoras de ES $\beta$ L, foi notável a importância dessa distinção; pois as amostras produtoras de ES $\beta$ L apresentaram, de modo geral, baixo percentual de sensibilidade para ciprofloxacina (28,7%) e levofloxacina (32,9%). Estes achados podem ser decorrentes de pressão seletiva pela ampla utilização de quinolonas para o tratamento de infecções do trato urinário comunitárias e/ou hospitalares.

Resultados muito semelhantes para as cefalosporinas, aminoglicosídeos e fluoroquinolonas foram descritos pelo Programa SENTRY – Brasil, no período de 2003-2008. Entretanto, as taxas de sensibilidade para  $\beta$ -lactâmicos combinados a inibidores de  $\beta$ -lactamases (piperacilina/tazobactam - 43,2% de sensibilidade) foram discordantes das apresentadas neste estudo, onde piperacilina/tazobactam e ticarcilina/clavulanato foram ativas, somente contra 7,4% e 4,2%, respectivamente das amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de ES $\beta$ L. Esses resultados representaram as menores taxas de sensibilidade entre todos os antimicrobianos avaliados nesse estudo. De acordo com dois estudos descritos por Tumbarello e colaboradores, ao analisarem amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ES $\beta$ L isoladas de ICS durante um período de cinco anos, na cidade de Roma, constataram baixos níveis de sensibilidade

---

---

para a ciprofloxacina (52,1%) e piperacilina/tazobactam (58,3%) (Tumbarello *et al.* 2006).

As altas taxas de resistência aos antimicrobianos entre as amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de ES $\beta$ L não são exclusividade de hospitais brasileiros. Um estudo realizado por Rossi e colaboradores avaliou amostras de 11 países latino-americanos durante um período de quatro anos e revelou que as taxas de sensibilidade para as amostras de *K. pneumoniae* na América Latina foram discretamente maiores que as taxas descritas neste estudo (Rossi *et al.* 2008). O programa TEST norte-americano detectou baixa frequência de ES $\beta$ L (8,9%) entre isolados de *Klebsiella* spp., entretanto, as taxas de sensibilidade para meropenem (68,8%) e levofloxacina (23,1%) foram ainda menores que as descritas no presente estudo (Dowzicky and Park 2008; Rossi *et al.* 2008). Este fato pode estar associado à presença de outros mecanismos de resistência nas amostras norte-americanas produtoras de ES $\beta$ L, ainda não prevalentes entre isolados brasileiros, como a presença de carbapenemases do tipo KPC.

Não se sabe ao certo se os resultados descritos no presente estudo representam o atual perfil de resistência a piperacilina/tazobactam entre isolados brasileiros de produtores de ES $\beta$ L. Esta análise foi realizada a partir de amostras previamente congeladas, o que, de acordo com o manual de instruções do sistema BD Phoenix, pode interferir nos resultados *in vitro* para  $\beta$ -lactâmicos combinados aos inibidores de  $\beta$ -lactamases (Painel NMIC/ID 104; Becton Dickinson, Sparks, MD 21152, USA). Entretanto, Sader e colaboradores também relataram a baixa atividade de piperacilina/ tazobactam (39,4%) e ticarcilina/clavulanato (8,1%) contra amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de

---

---

ICS no Brasil (Sader *et al.* 2001). Foi documentado em alguns estudos que, embora as ES $\beta$ L sejam inibidas pelos inibidores de  $\beta$ -lactamases por testes *in vitro* (tazobactam e ácido clavulânico), um percentual dessas cepas podem apresentar resistência às associações  $\beta$ -lactâmicos/inibidores de  $\beta$ -lactamases, provavelmente devido a outros mecanismos de resistência.

#### Tipos de $\beta$ -lactamases identificadas nos centros brasileiros

Até o momento, não se tem informações significativas sobre a frequência dos tipos de ES $\beta$ L prevalentes no Brasil, apenas dispõe-se de alguns trabalhos envolvendo curtos relatos da emergência ou disseminação de algumas  $\beta$ -lactamases em centros ou cidades brasileiras específicas, o que não reflete completamente a distribuição real das ES $\beta$ L no território brasileiro. Entretanto, o presente estudo permitiu, de forma pioneira, a caracterização molecular dos principais tipos de  $\beta$ -lactamases TEM, SHV e CTX disseminadas em unidades hospitalares brasileiras.

No presente estudo, foram utilizados os testes fenotípicos de triagem e confirmatório processados pelo sistema automatizado BD Phoenix<sup>®</sup>, seguido pelos métodos moleculares da PCR e sequenciamento para detecção e confirmação de uma ou mais ES $\beta$ Ls do grupo 2be. Optamos por trabalhar com um método menos abrangente que a metodologia do Ponto Isoelétrico (PI), mas que permitisse identificar as cepas produtoras dos tipos de ES $\beta$ L mais relevantes no contexto nacional. Apesar de não ter sido avaliado neste estudo a prevalência de ES $\beta$ L dos grupos VEB, GES, PER e OXA, que eventualmente podem ser encontradas compondo um mesmo integron, estes grupos de ES $\beta$ L

---

---

deverão ser avaliados nesta mesma coleção de amostras em estudos posteriores, pois a presença destas enzimas tem sido relatada esporadicamente em alguns países da América do Sul (Celenza *et al.* 2006; Dropa *et al.* 2009; Quinteros *et al.* 2003; Vignoli *et al.* 2005).

Devido à grande extensão do território brasileiro constatamos diferenças significativas quanto à frequência de *Klebsiella* spp. de ICS produtoras de ES $\beta$ L, com taxas que variaram de 31% na região Sul a 83% na região Norte. Entre outros fatores é importante ressaltar que a alta frequência descrita para a região Norte do Brasil provavelmente esteve relacionada ao fato de ter sido avaliado um reduzido número de amostras, entre as quais apenas uma não foi produtora de ES $\beta$ L.

Entre as 94 amostras confirmadas por PCR para a presença de genes codificadores de  $\beta$ -lactamases, 84 carregavam o gene *bla*<sub>TEM</sub>, e 86 e 68 carregavam os genes *bla*<sub>SHV</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>, respectivamente. De modo geral, foram caracterizados neste estudo que 59,6%, 11,7%, 9,6% e 11,7% das amostras produtoras de ES $\beta$ L carregavam as enzimas CTX-M-2, CTX-M-15, SHV-5 e SHV-12, respectivamente. Entretanto, outras ES $\beta$ L foram descritas com menor frequência no contexto brasileiro: SHV-27, SHV-28, SHV-42, SHV-101, SHV-108 e CTX-M-9. Apesar de ter sido constatado que a maioria das amostras deste estudo carregava apenas um tipo de ES $\beta$ L, entre as três  $\beta$ -lactamases avaliadas, é muito importante ressaltar que 73,4%, 30,8% e 22,3% das amostras produtoras de ES $\beta$ L carregavam também as  $\beta$ -lactamases TEM-1 e SHV-1 ou SHV-11, respectivamente.

Poucos estudos brasileiros caracterizaram os tipos de ES $\beta$ L de amostras de *K. pneumoniae* provenientes de sítios estéreis, como hemoculturas. Garcia

---

---

e colaboradores, ao descreverem um surto multiclonal de *K. pneumoniae* isolada de uma UTI neonatal na cidade de São Paulo, caracterizaram a produção de CTX-M-2 e emergência de CTX-M-59. Somente uma amostra foi produtora apenas da enzima SHV-5 e as demais amostras carregavam as  $\beta$ -lactamases TEM-1, SHV-1, SHV-11, SHV-77 e SHV-85. Entretanto, a maioria destas amostras era proveniente de cultura de vigilância e não de doença invasiva (de Oliveira *et al.* 2008). Corkill e colaboradores relataram a caracterização da ES $\beta$ L SHV-27 identificada e descrita pela primeira vez no Brasil em duas cepas de *K. pneumoniae* isoladas de hemocultura de neonatos, na região Nordeste do Brasil (Corkill *et al.* 2001). Dropa e colaboradores caracterizaram em uma única cepa de *K. pneumoniae*, isolada de infecção urinária, a emergência de três novas variantes gênicas de ES $\beta$ L *bla*<sub>SHV-40</sub>, *bla*<sub>TEM-116</sub> e *bla*<sub>GES-7</sub> (Dropa *et al.* 2009). Monteiro e colaboradores caracterizaram as enzimas CTX-M-2 e KPC-2 em quatro amostras de *K. pneumoniae* isoladas da corrente sanguínea e urina de pacientes hospitalizados na região nordeste do Brasil (Monteiro *et al.* 2009). De maneira semelhante, Peirano e colaboradores descreveram CTX-M-1; CTX-M-2; CTX-M-8 e KPC-2 em amostras de *K. pneumoniae* isoladas na região Sudeste do Brasil (Peirano *et al.* 2009).

Semelhante aos dados descritos neste estudo, as enzimas SHV-5 e SHV-12 além de caracterizarem as primeiras ES $\beta$ L descritas no final da década de 80 na Argentina e no Chile, atualmente estão descritas entre os principais membros circulantes dessa família na América do Sul e Europa (Coque *et al.* 2008; Villegas *et al.* 2008). Em alguns países localizados no sul da Europa como Itália e Espanha, a enzima SHV-12 é caracterizada como uma das ES $\beta$ L



---

---

mais prevalentes em cepas hospitalares de *K. pneumoniae* e está cada vez mais relacionada a infecções comunitárias por *E. coli* (Caccamo *et al.* 2006;Valverde *et al.* 2004). Já a enzima SHV-5 está amplamente disseminada nos países da Costa Oeste da Europa (Coque *et al.* 2008).

Neste estudo a frequência da  $\beta$ -lactamase TEM-1 ficou comprometida, devido à inespecificidade do produto sequenciado para este gene em 15 amostras, que apresentaram 99% de similaridade genética para as  $\beta$ -lactamases TEM-1 e TEM-168 (nº de acesso *GenBank* FJ919776). Dessa forma, será necessário sequenciar a região promotora do gene, para que seja definido se tais amostras são ou não produtoras de ES $\beta$ L. Diante deste resultado, foi constatado que a incidência deste tipo de ES $\beta$ L em isolados brasileiros se mostrou diferente do que encontra-se descrito em outras partes do mundo. Karen Bush descreveu que as enzimas TEM-10 e TEM-26 estão entre os principais tipos de TEM relatados nos Estados Unidos (Bush 2008). Entretanto, a caracterização de surtos, associados com a produção de TEM-10 e TEM-26 neste país parece ter diminuído e isso talvez esteja relacionado à substituição da ceftazidima por outros antimicrobianos no ambiente hospitalar (Bradford *et al.* 1997;Bush 2008). Mais recentemente, Jacoby e Munoz-Price descreveram que estes tipos de TEM são altamente frequentes na América do Sul (Villegas *et al.* 2008). Na Europa, merecem destaque as enzimas TEM-3 e TEM-4, frequentemente associadas a clones epidêmicos de *K. pneumoniae* na França e Espanha, enquanto a enzima TEM-24 foi bem caracterizada em clones de *E. aerogenes* na Bélgica, França, Portugal e Espanha (Arpin *et al.* 2007;Galas *et al.* 2008;Machado *et al.* 2007). Atualmente, essas enzimas também foram caracterizadas em *E. coli* e *P. mirabilis* recuperadas na

---

---

comunidade (Arpin *et al.* 2007; Machado *et al.* 2007). De acordo com os dados brasileiros, não foi constatada alta prevalência das ESβL dos tipos TEM e SHV. Este fato pode estar relacionado ao maior uso de ceftriaxona para o tratamento de pacientes com infecções comunitárias causadas por Enterobactérias que necessitem de admissão hospitalar. Este antimicrobiano é o substrato preferencial das enzimas CTX-M-2, enquanto a ceftazidima é o substrato preferencial para seleção de mutantes dos tipos TEM e SHV. Por outro lado, a ceftazidima é um antimicrobiano amplamente utilizado para o tratamento de infecções hospitalares no Brasil e seria esperada uma maior frequência de ESβL dos tipos SHV e TEM no nosso meio.

Assim como no Brasil, a enzima CTX-M-2 tornou-se claramente uma das ESβL mais predominantes na Argentina em 2002, onde foi detectada em 75% das Enterobactérias produtoras de ESβL isoladas em Buenos Aires (Villegas *et al.* 2008). Na Colômbia, sete amostras de *K. pneumoniae* isoladas de três diferentes hospitais produziam enzimas do grupo CTX-M-1 e em um isolado, foi caracterizado a enzima CTX-M-12 (Villegas *et al.* 2004). Este foi o primeiro relato de CTX-M-12 fora do Quênia, onde, em 2001, essa enzima foi detectada em *K. pneumoniae* isoladas de seis recém-nascidos (Kariuki *et al.* 2001). Pallecchi e colaboradores relataram, no Peru e Bolívia, a detecção de CTX-M-2, CTX-M-14, CTX-M-15, CTX-M-24 e, recentemente, uma nova variante CTX-M-56 em amostras de *E. coli* (Pallecchi *et al.* 2004; Pallecchi *et al.* 2007).

Um fato curioso desde a descrição da primeira ESβL, é a presença de múltiplas β-lactamases em isolados resistentes às cefalosporinas. Inicialmente a presença de duas a quatro β-lactamases era descrita em amostras com fenótipo ESβL (Bradford *et al.* 2004; Hanson *et al.* 1999). Moland e

---

---

colaboradores descreveram a produção de oito diferentes  $\beta$ -lactamases caracterizadas em uma única cepa de *K. pneumoniae* isolada de secreção respiratória, na cidade de Nova Iorque (Moland *et al.* 2007). A presença de mais de uma ES $\beta$ L foi também documentada nas amostras do presente estudo, reforçando a capacidade das amostras brasileiras de *K. pneumoniae* em acumular vários determinantes de resistência.

O ideal seria que o uso de cefalosporinas de amplo espectro e fluoroquinolonas para o tratamento de Enterobactérias fosse restrito aos casos em que alternativas terapêuticas estabelecidas de acordo com as diretrizes locais não se mostrassem eficientes. Dessa forma, poderíamos reduzir a seleção e a persistência de clones de ES $\beta$ L disseminados com plasmídios conjugativos entre diferentes cepas, reduzindo também o acúmulo de genes de resistência aos antibióticos.

#### Predominância de CTX-M-2 e emergência de CTX-M-15

De forma similar ao que aconteceu com as cepas de *Klebsiella* spp. produtoras das ES $\beta$ L TEM e SHV, neste estudo foram relatadas altas taxas de co-resistência a antimicrobianos potencialmente ativos, como fluoroquinolonas e aminoglicosídeos entre as cepas também produtoras da ES $\beta$ L CTX-M (Rossolini *et al.* 2008). A produção deste tipo de  $\beta$ -lactamase apresenta implicações clínicas idênticas à produção de outras ES $\beta$ L, resguardando os carbapenens como a única opção terapêutica entre os  $\beta$ -lactâmicos para o tratamento de infecções graves causadas por *K. pneumoniae* produtoras deste mecanismo de resistência (Paterson and Bonomo 2005).

A ESβL CTX-M-15 difere da CTX-M-3 pela substituição do ácido aspártico na posição 240 para o aminoácido glicina (Asp240 - Gly). Esta substituição aumenta a atividade hidrolítica contra ceftazidima, que não é conhecida como o substrato preferencial para as ESβL do tipo CTX-M (Poirel *et al.* 2002).

Foi constatado neste estudo que 72,3% das *Klebsiella* spp. produtoras de ESβL carregavam o gene *bla*<sub>CTX-M</sub>. O grupo de ESβL CTX-M-2 continuou prevalente entre as amostras brasileiras (59,6%), seguido pelos primeiros relatos brasileiros da ESβL CTX-M-15 caracterizada nas regiões Sudeste, Centro-oeste e Nordeste do Brasil. Desde que foi caracterizada pela primeira vez na Índia em 1999, esta ESβL tornou-se o tipo de CTX-M mais reportado em todo o mundo (Bauernfeind *et al.* 1990; Rossolini *et al.* 2008).

A emergência e a ampla disseminação da enzima CTX-M-15 na maioria dos países europeus, incluindo os países Nórdicos, onde a prevalência de ESβL é baixa, é um dos achados mais relevantes associado à epidemiologia atual de ESβL na Europa (Coque *et al.* 2008; Damjanova *et al.* 2008; Lau *et al.* 2008; Lytsy *et al.* 2008; Oteo *et al.* 2006; Yumuk *et al.* 2008). Esta enzima é, cada vez mais, associada a infecções comunitárias, incluindo centros de saúde, conforme documentado em estudos na França, Espanha e Turquia (Galas *et al.* 2008; Livermore *et al.* 2007; Yumuk *et al.* 2008). Carrer e colaboradores descreveram um surto de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M-15 isolada em swab retal de pacientes internados na UTI de um hospital francês, 92% dos pacientes foram colonizados e somente três pacientes desenvolveram quadro infeccioso por este agente. Esse dado ressalta a

---

---

possibilidade de disseminação clonal de *K. pneumoniae* produtora de CTX-M em unidades hospitalares (Carrer *et al.* 2009).

Apesar deste tipo de  $\beta$ -lactamases ser prevalente em diversas partes do mundo, não havia relatos quanto a sua disseminação nos Estados Unidos (Bush 2008). No entanto, nos últimos dois anos, importantes estudos descreveram a presença deste tipo de ES $\beta$ L em Enterobactérias em diferentes estados americanos, incluindo a produção de CTX-M-15 em cepas de Enterobactérias isoladas de nove centros médicos americanos (Castanheira *et al.* 2008;McGettigan *et al.* 2009). Mais recentemente, Sidjabat e colaboradores descreveram, no Oeste da Pensilvânia, um surto de *E.coli* onde 81% das amostras eram produtoras da ES $\beta$ L CTX-M, entre as quais 65,4% eram produtoras de CTX-M-15 (Sidjabat *et al.* 2009).

O fato é que a produção destas  $\beta$ -lactamases emergiu mundialmente e, atualmente, a persistente disseminação deste determinante de resistência é preocupante e caracterizado como um problema global, especialmente em algumas áreas como a Europa e a América Latina (Paterson and Bonomo 2005;Villegas *et al.* 2008). Estudos adicionais prospectivos necessitam ser realizados em amostras brasileiras de *K. pneumoniae* causadoras de ICS, para verificar se a CTX-M-2 continuará prevalente em nosso meio, ou se, futuramente, a CTX-M-15 pode vir a se tornar a ES $\beta$ L predominante.

#### Acurácia do Teste de Hodge modificado

Em função da emergência mundial de Enterobactérias resistentes a carbapenens pela produção de  $\beta$ -lactamases do grupo 2f, o CLSI emitiu, em

---

---

2009, uma importante recomendação, que descreve a realização de uma técnica fenotípica conhecida como teste de Hodge modificado. Este teste é recomendado para amostras de *K. pneumoniae* que apresentem halo de inibição  $\leq 21$ mm para ertapenem e/ou meropenem, para detecção de carbapenemases. Entre as 22 amostras avaliadas por este teste, apenas duas (9%) apresentaram positividade para o teste de Hodge. Embora estas duas amostras tenham apresentado elevadas CIM para ertapenem e meropenem, em nenhuma das amostras foi detectada a presença de carbapenemases ou M $\beta$ L pela técnica da PCR. As duas amostras foram produtoras das  $\beta$ -lactamases CTX-M-2 e TEM-1. Uma das amostras produziu concomitantemente SHV-11 e a outra SHV-12.

De acordo com Pasteran e colaboradores, a falsa positividade dessa metodologia, sugerindo a produção de carbapenemase, pode estar diretamente relacionada à elevada produção de ES $\beta$ L, especialmente cefotaximases. Os autores sugerem que os resultados falso-positivos possam ocorrer em locais como a Argentina, onde é alta a frequência de cepas com sensibilidade diminuída aos carbapenens, embora a prevalência de carbapenemases seja baixa (Pasteran *et al.* 2009). Nossos resultados são semelhantes, refletindo a baixa frequência de carbapenemases entre *K. pneumoniae* no Brasil. Talvez a baixa acurácia da metodologia utilizada nas amostras apresentadas neste estudo esteja relacionada à alta prevalência de outros mecanismos de resistência que possam agir como interferentes, como a produção de ES $\beta$ L e a alteração de permeabilidade de membrana, tão comuns em amostras de *Klebsiella* spp. isoladas de hospitais brasileiros. Estes dados ressaltam as dificuldades para a execução destas recomendações em regiões onde a

---

---

produção da ES $\beta$ L CTX-M é endêmica, indicando a necessidade de outras metodologias, diferentes do Teste de Hodge e que estejam adequadas à frequente resistência a carbapenens, devido a outros mecanismos de resistência que não a produção de carbapenemase.

O ideal é que tais métodos de detecção sejam acessíveis às rotinas dos laboratórios de microbiologia no Brasil e que possam garantir a realização de intervenções em tempo real pela equipe de controle de infecção hospitalar.

Associação de mecanismos de resistência que justificam a diminuição da sensibilidade aos carbapenens

Os carbapenens constituem os antimicrobianos de escolha para o tratamento dos diferentes tipos de infecções causadas por *Klebsiella* spp. produtora de ES $\beta$ L (Queenan and Bush 2007). No entanto, é cada vez mais frequente o isolamento de amostras resistentes a estes agentes. Entre os principais mecanismos responsáveis por resistência aos carbapenens em amostras de enterobactérias, temos: (i) a produção de carbapenemases, seja da classe A ou B de Ambler; e (ii) a associação de mecanismos de impermeabilidade aos beta-lactâmicos a mecanismos enzimáticos, tais como a perda de porinas associadas à produção de ES $\beta$ L ou AmpC, ainda que tais enzimas não hidrolisem carbapenens com eficácia (Elliott *et al.* 2006; Rossolini *et al.* 2008).

Leavitt e colaboradores reportaram uma taxa de resistência a ertapenem de 2,3% entre 663 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ES $\beta$ L isoladas em seis hospitais israelenses e constataram, ainda, que a resistência a

---

---

ertapenem esteve associada à produção de múltiplas ESβL e à perda de expressão da OmpK36 (Leavitt *et al.* 2009). Behera e colaboradores avaliaram 205 cepas de enterobactérias produtoras de ESβL isoladas de distintos sítios infecciosos de dois diferentes hospitais indianos, constataram que, 7%, 4% e 5% das cepas foram resistentes a ertapenem, imipenem e meropenem, respectivamente (Behera *et al.* 2009).

Wang e colaboradores caracterizaram a produção de AmpC plasmidial (DHA-1), a produção das enzimas TEM-1 e CTX-M-14 e a perda de expressão da porina OmpK36, como resultado do perfil de resistência a ertapenem e redução de sensibilidade a imipenem e meropenem, em duas amostras de *K. pneumoniae* não relacionadas geneticamente (Wang *et al.* 2009).

Recentemente, Nicoletti e colaboradores descreveram os mecanismos de resistência apresentados por isolados clínicos de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem (n=32), isoladas de diferentes sítios, provenientes de 10 hospitais brasileiros. Entre estas amostras, 21,9% e 37,5% eram também resistentes a imipenem e meropenem, respectivamente. Dez amostras apresentaram a produção da carbapenemase de classe A KPC-2, enquanto outras duas amostras eram produtoras da MβL, IMP-1. As demais amostras apresentaram alteração na expressão da OmpK35 e/ou OmpK36, além da produção de ESβL (SHV-27; SHV-75; SHV-108; CTXM-2; CTX-M-9; CTX-M-15 e CTX-M-59) (Nicoletti *et al.*, ICAAC; 2009).

No presente estudo foi detectado um total de 15,9% (n=15) de resistência a ertapenem e 3,1% de resistência a imipenem e/ou meropenem, entre as amostras de *Klebsiella* spp. produtoras de ESβL (n=94). Quando foi feita a análise somente das amostras resistentes a ertapenem (n=15), ficou



---

---

constatado que 20% delas eram resistentes a imipenem e/ou meropenem. Estes dados refletem a necessidade de se testar um segundo carbapenem, além de ertapenem no teste de sensibilidade aos antimicrobianos, e reforçam que os dados de sensibilidade para ertapenem em *K. pneumoniae* não devem ser extrapolados para imipenem e/ou meropenem.

Como já era esperado, não houve relação clonal entre as 15 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem. No entanto, é importante ressaltar que cinco cepas isoladas de três diferentes centros da região sudeste foram classificadas com subtipos representativos de um mesmo padrão de PFGE. Entre outros fatores, a presença de um mesmo padrão de PFGE entre as cepas isoladas de diferentes hospitais da região sudeste, talvez esteja relacionada à transferência de pacientes entre estes hospitais e/ou existência de profissionais em comum trabalhando nos diversos estabelecimentos.

Adicionalmente, as 15 cepas de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem apresentaram a produção de uma ou mais  $\beta$ -lactamases do tipo TEM, SHV e/ou CTX-M. Nenhuma  $\beta$ -lactamase do tipo AmpC plasmidial, ou carbapenemase foi detectada. A resistência adquirida aos carbapenens nestas cepas esteve, portanto, relacionada à produção de ES $\beta$ L, associada à diminuição ou perda da expressão das porinas OmpK35 e/ou OmpK36.

A metodologia ideal para a análise da expressão das porinas OmpK35 e OmpK36 é a técnica de SDS-PAGE, complementada pela metodologia de *Western blot*, associada à marcação com anticorpos monoclonais. Porém, a aplicação conjunta destas técnicas dispõe de um custo muito elevado, além de ser extremamente trabalhoso, o que, em muitos casos, inviabiliza a sua utilização. Por isso, assim como descrito neste estudo, muitos pesquisadores

---

---

utilizam somente a metodologia de SDS-PAGE para avaliar a expressão das porinas. Entretanto, quando esta técnica é utilizada como metodologia única, nos deparamos com algumas dificuldades para interpretação dos resultados, tais como: (i) o perfil migratório das porinas no gel de poliacrilamida pode ser variável de uma amostra para outra, ou seja, porinas com o mesmo peso molecular podem apresentar um perfil migratório diferente, representado por diferentes alturas no gel de poliacrilamida, (ii) alteração de osmolaridade do meio de cultura utilizada para replicação bacteriana caracteriza um dos fatores mais relevantes, podendo influenciar seriamente tanto no aumento, quanto na redução da expressão da porina OmpK35 (Crowley *et al.* 2002; Hernandez-Alles *et al.* 1999a).

Outra dificuldade encontrada durante a análise das amostras deste estudo, foi o fato de não se dispor em nosso laboratório de uma cepa controle que apresentasse as duas principais porinas, além da OmpA, pois muitas vezes amostras sensíveis aos  $\beta$ -lactâmicos e que teoricamente poderiam ser usadas como controle, podem, eventualmente, não apresentar as duas porinas (OmpK35 e OmpK36). Adicionalmente, não foi possível observar a expressão da porina OmpK37 na membrana externa das cepas avaliadas neste estudo. Assim como já descrito na literatura, esse fato está possivelmente relacionado à característica quiescente desta OMP (Yang *et al.* 2009).

Entre as 15 amostras resistentes à ertapenem avaliadas neste estudo ficou constatado pela metodologia de SDS-PAGE a perda da expressão das duas principais porinas (OmpK35 e OmpK36) em nove amostras, associado à produção das  $\beta$ -lactamases TEM-1; SHV-1; SHV-11 e as ES $\beta$ L SHV-12; CTX-M-2 ou CTX-M-15, as quais apresentaram CIM,  $\geq 32$   $\mu$ g/mL para cefoxitina.

---

---

Duas amostras apresentaram redução da sensibilidade para imipenem (CIM, 4 µg/mL) e foram resistentes a meropenem (CIM, ≥16 µg/mL). Um isolado apresentou redução de sensibilidade a imipenem e meropenem (CIM, 4 µg/mL). Outro isolado foi resistente tanto a imipenem, quanto a meropenem (CIM, 32 µg/mL).

As demais amostras avaliadas neste estudo (n=6) expressaram uma das porinas (OmpK35 ou OmpK36), e, pelas razões acima mencionadas, não foi possível definir qual das porinas foi expressa em quatro destas amostras. Entretanto, quando associou-se os resultados do SDS-PAGE com a PCR convencional para a amostra K17, observou-se que esta amostra perdeu somente a porina OmpK35.

Por meio da metodologia da PCR convencional foi observado neste estudo que cinco amostras apresentaram um produto amplificado maior que o tamanho esperado para os genes *ompK35* ou *ompK36*. Doumith e colaboradores relataram a perda das porinas OmpK35 e OmpK36 em nove amostras de *K. pneumoniae*, entre as quais, oito apresentaram inserção de sequências (IS) nos genes *ompK35* ou *ompK36* e uma amostras não apresentou produto amplificado para estes genes (Doumith *et al.* 2009). Assim, nas cinco amostras deste estudo que apresentaram produto amplificado maior que o tamanho esperado, provavelmente, houve a inserção de uma sequência de aproximadamente 1000 pb nestes genes. Para a certificação quanto a este evento genético, será necessário que se faça o sequenciamento destes produtos amplificados.

Quatro amostras não apresentaram produto amplificado tanto para o gene *ompK35*, quanto para *ompK36*. Isso pode ser resultado de mutações nas

regiões de anelamento dos *primers*, deleção total do gene ou deleção da região onde um dos *primers* deveria ser anelado; ou ainda, a inserção de grandes sequências, que não permitiram que a amplificação do produto fosse concluída com sucesso, devido ao tempo de extensão empregado na reação de ciclagem.

Com base nos dados descritos por Doumith e colaboradores, as amostras deste estudo que apresentaram produto amplificado com tamanho normal pela PCR, mas não apresentaram a porina na técnica de SDS-PAGE, provavelmente, pode ter ocorrido mutações que resultassem em um *stop códon*, finalizando precocemente a tradução das proteínas; ou ainda, mutações que ocasionassem a expressão de uma porina deficiente. Entretanto, essas mutações somente poderão ser detectadas, após a realização da metodologia de sequenciamento dos genes.

De acordo com a literatura, é importante destacar que a perda da expressão da porina OmpK36 poderá estar relacionada à resistência à cefoxitina, à elevada resistência às cefalosporinas em cepas produtoras de ES $\beta$ L e à redução de sensibilidade aos carbapenêmicos, particularmente, ao ertapenem, podendo ainda resultar em moderado aumento de resistência as fluoroquinolonas em cepas com alteração da topoisomerase e/ou atividade de efluxo para quinolonas (Domenech-Sanchez *et al.* 2003).

Domenech-Sanchez e colaboradores reportaram que a perda da OmpK35 representa um importante papel na emergência de resistência aos antimicrobianos. Ao realizarem estudos clonando o gene *ompK35* em uma cepa de *K. pneumoniae* (desprovida de OmpK35 e OmpK36), constataram que a CIM para cefalosporinas e meropenem reduziu mais de 128 vezes e a CIM

---

---

de imipenem, ciprofloxacina e cloranfenicol reduziu mais de oito vezes. As reduções das CIM pela expressão da OmpK35 foram quatro vezes (cefepime), oito vezes (cefotetan, cefotaxima e cefpirona) e 128 vezes (ceftazidima) maiores do que a redução da CIM pela expressão da OmpK36. No entanto, para outros agentes avaliados, a CIM entre as duas porinas foi similar ou apresentou uma diluição menor (Domenech-Sanchez *et al.* 2003).

Hernández-Allés e colaboradores também constataram que é possível as cepas produtoras de ES $\beta$ L responderem à pressão de antimicrobianos, suprimindo porinas e/ou aumentando a expressão de ES $\beta$ Ls, com a subsequente diminuição da captação ou aumento da degradação do antimicrobiano (Hernandez-Alles *et al.* 1999b).

Apesar da disponibilidade na literatura de muitos trabalhos sobre a estrutura e regulação das porinas OmpF (homóloga à OmpK35) e OmpC (homóloga à OmpK36) para a cepa K-12 de *Escherichia coli*, existe pouco consenso acerca destas informações em relação aos isolados clínicos de *Klebsiella* spp. (Martinez-Martinez 2008).

Uma suposta identificação do mecanismo de resistência, baseada somente no perfil de sensibilidade aos antimicrobianos, pode levar a conclusões errôneas, com consequências tanto no tratamento do processo infeccioso, quanto na escolha de medidas de controle de infecção hospitalar. É importante ressaltar que, as evidências de casos de *Klebsiella* spp. com diminuição de sensibilidade aos carbapenens é preocupante, especialmente em um momento em que se discute a necessidade do uso criterioso de agentes antimicrobianos, almejando a redução da seleção e disseminação de patógenos multi-resistentes.

Os dados parciais do projeto SCOPE Brasil ressaltaram uma alta taxa de mortalidade (38%) entre os diferentes patógenos isolados do primeiro episódio de ICS de hospitais brasileiros. *Klebsiella* spp. representou o segundo agente mais prevalente e o primeiro entre os bacilos Gram negativos (Marra *et al*, ICAAC; 2009).

Neste estudo, a descrição da elevada prevalência de amostras de *Klebsiella* spp produtoras de ESβL e resistentes a ertapenem e com sensibilidade reduzida para os demais carbapenens, poderá ser útil na elaboração de protocolos terapêuticos empíricos para infecções da corrente sanguínea em nosso meio. A vigilância da resistência antimicrobiana em *Klebsiella* spp., assim como a caracterização dos mecanismos de resistência envolvidos, fazem parte do projeto SCOPE Brasil, que terá continuidade nos próximos dois anos.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Altas taxas de resistência a antimicrobianos foram detectadas entre as amostras de *Klebsiella* spp., com 56,3% de produção de ES $\beta$ L, sendo CTX-M-2 prevalente e CTX-M-15 emergente nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste. Isolados clínicos contendo concomitantemente dois tipos de ES $\beta$ L, CTX e SHV, foram detectados somente nas regiões Nordeste e Sudeste;
- ✓ A resistência aos carbapenems foi relacionada à produção de cefotaximase, associada à alteração das porinas OmpK35 e/ou OmpK36. Não foi detectada a presença das carbapenemases dos tipo A (KPC e GES), nem do tipo B (IMP);
- ✓ O teste de Hodge apresentou baixa acurácia na população estudada, possivelmente relacionado à elevada produção de ES $\beta$ L, especialmente cefotaximases, entre as amostras brasileiras.

---

---

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott S. Klebsiella, Enterobacter, Citrobacter, Serratia, Plesiomonas, and other Enterobacteriaceae. In: Manual of Clinical Microbiology By Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. American Society for Microbiology - ASM, Washington, DC, 2007; 1:698-715.

Afzal-Shah,M., Woodford,N. and Livermore,D.M. (2001) Characterization of OXA-25, OXA-26, and OXA-27, molecular class D beta-lactamases associated with carbapenem resistance in clinical isolates of Acinetobacter baumannii. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 583-588.

Alberti,S., Rodriquez-Quinones,F., Schirmer,T., Rummel,G., Tomas,J.M., Rosenbusch,J.P. and Benedi,V.J. (1995) A porin from Klebsiella pneumoniae: sequence homology, three-dimensional model, and complement binding. *Infect. Immun.* **63**, 903-910.

Ambler,R.P. (1980) The structure of beta-lactamases. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* **289**, 321-331.

Andrade, S.S. ;Sader, H.S.;Barth, A.L.;Ribeiro, J.; Zoccoli, C.; Pignatari, A.C.C.; Gales, A.C..(2008) Antimicrobial susceptibility of Gram negative bacilli isolate in Brazilian hospitals participating in the SENTRY program (2003-2008).*Braz J Infect Dis.***12 Suppl 2**, 3-9.

Arpin,C., Coulange,L., Dubois,V., Andre,C., Fischer,I., Fourmaux,S., Grobost,F., Jullin,J., Dutilh,B., Couture,J.F., Noury,P., Lagrange,I., Ducastaing,A., Doermann,H.P. and Quentin,C. (2007) Extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae strains in various types of private health care centers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 3440-3444.

Barthelemy,M., Peduzzi,J. and Labia,R. (1985) [Distinction between the primary structures of TEM-1 and TEM-2 beta-lactamases]. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* **136A**, 311-321.

Bauernfeind,A., Grimm,H. and Schweighart,S. (1990) A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of Escherichia coli. *Infection* **18**, 294-298.



Behera,B., Mathur,P., Das,A. and Kapil,A. (2009) Ertapenem susceptibility of extended spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae at a tertiary care centre in India. *Singapore Med. J.* **50**, 628-632.

Bell,J.M., Chitsaz,M., Turnidge,J.D., Barton,M., Walters,L.J. and Jones,R.N. (2007) Prevalence and significance of a negative extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1478-1482.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology,. Taxonomic outline of the prokaryotes.p.118, 2º edition, release 5.0 May 2004

Biedenbach,D.J., Moet,G.J. and Jones,R.N. (2004) Occurrence and antimicrobial resistance pattern comparisons among bloodstream infection isolates from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (1997-2002). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **50**, 59-69.

Blazquez,J., Morosini,M.I., Negri,M.C. and Baquero,F. (2000) Selection of naturally occurring extended-spectrum TEM beta-lactamase variants by fluctuating beta-lactam pressure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2182-2184.

Bonnet,R. (2004) Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1-14.

Bonnet,R., De Champs,C., Sirot,D., Chanal,C., Labia,R. and Sirot,J. (1999) Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2671-2677.

Bonnet,R., Marchandin,H., Chanal,C., Sirot,D., Labia,R., De Champs,C., Jumas-Bilak,E. and Sirot,J. (2002) Chromosome-encoded class D beta-lactamase OXA-23 in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 2004-2006.

Bou,G., Oliver,A. and Martinez-Beltran,J. (2000) OXA-24, a novel class D beta-lactamase with carbapenemase activity in an *Acinetobacter baumannii* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1556-1561.

Bouza,E., San Juan,R., Munoz,P., Voss,A. and Kluytmans,J. (2001) A European perspective on nosocomial urinary tract infections II. Report on incidence, clinical characteristics and outcome (ESGNI-004 study). European Study Group on Nosocomial Infection. *Clin. Microbiol. Infect.* **7**, 532-542.

Bradford,P.A. (2001) Extended-spectrum beta-lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev.* **14**, 933-51, table.

Bradford,P.A., Bratu,S., Urban,C., Visalli,M., Mariano,N., Landman,D., Rahal,J.J., Brooks,S., Cebular,S. and Quale,J. (2004) Emergence of carbapenem-resistant *Klebsiella* species possessing the class A carbapenem-hydrolyzing KPC-2 and inhibitor-resistant TEM-30 beta-lactamases in New York City. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 55-60.

Bradford,P.A., Urban,C., Mariano,N., Projan,S.J., Rahal,J.J. and Bush,K. (1997) Imipenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* is associated with the combination of ACT-1, a plasmid-mediated AmpC beta-lactamase, and the loss of an outer membrane protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 563-569.

Bratu,S., Tolaney,P., Karumudi,U., Quale,J., Mooty,M., Nichani,S. and Landman,D. (2005) Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY: molecular epidemiology and in vitro activity of polymyxin B and other agents. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 128-132.

Bryan,C.S., Reynolds,K.L. and Brenner,E.R. (1983) Analysis of 1,186 episodes of gram-negative bacteremia in non-university hospitals: the effects of antimicrobial therapy. *Rev. Infect. Dis.* **5**, 629-638.

Bure,A., Legrand,P., Arlet,G., Jarlier,V., Paul,G. and Philippon,A. (1988) Dissemination in five French hospitals of *Klebsiella pneumoniae* serotype K25 harbouring a new transferable enzymatic resistance to third generation cephalosporins and aztreonam. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 780-782.

Bush,K. (2001) New beta-lactamases in gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. *Clin. Infect. Dis.* **32**, 1085-1089.

Bush,K. (2002) The impact of beta-lactamases on the development of novel antimicrobial agents. *Curr. Opin. Investig. Drugs* **3**, 1284-1290.

Bush,K. (2008) Extended-spectrum beta-lactamases in North America, 1987-2006. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 134-143.

Bush,K., Jacoby,G.A. and Medeiros,A.A. (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1211-1233.

Caccamo,M., Perilli,M., Celenza,G., Bonfiglio,G., Tempera,G. and Amicosante,G. (2006) Occurrence of extended spectrum beta-lactamases among isolates of Enterobacteriaceae from urinary tract infections in southern Italy. *Microb. Drug Resist.* **12**, 257-264.

Canton,R., Novais,A., Valverde,A., Machado,E., Peixe,L., Baquero,F. and Coque,T.M. (2008) Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 144-153.

Carrer,A., Lassel,L., Fortineau,N., Mansouri,M., Anguel,N., Richard,C. and Nordmann,P. (2009) Outbreak of CTX-M-15-Producing *Klebsiella pneumoniae* in the Intensive Care Unit of a French Hospital. *Microb. Drug Resist.* **15**, 47-54.

Cartelle,M., del Mar,T.M., Molina,F., Moure,R., Villanueva,R. and Bou,G. (2004) High-level resistance to ceftazidime conferred by a novel enzyme, CTX-M-32, derived from CTX-M-1 through a single Asp240-Gly substitution. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 2308-2313.

Castanheira,M., Mendes,R.E., Rhombert,P.R. and Jones,R.N. (2008) Rapid emergence of blaCTX-M among Enterobacteriaceae in U.S. Medical Centers: molecular evaluation from the MYSTIC Program (2007). *Microb. Drug Resist.* **14**, 211-216.

Celenza,G., Pellegrini,C., Caccamo,M., Segatore,B., Amicosante,G. and Perilli,M. (2006) Spread of bla(CTX-M-type) and bla(PER-2) beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospitals. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**, 975-978.

Centers for Disease Control and Prevention. Guidance for Control of Infections with Carbapenem-Resistant or Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae in Acute Care Facilities. *MMWR* 2009;58: (256-260).

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Seventh Edition: Approved Standard M02-A10. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M02-A10. (2009).

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Seventeenth Informational Supplement. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Approved Standard M100-S19. (2009).

Collin,B.A., Leather,H.L., Wingard,J.R. and Ramphal,R. (2001) Evolution, incidence, and susceptibility of bacterial bloodstream isolates from 519 bone marrow transplant patients. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 947-953.

Coque,T.M., Baquero,F. and Canton,R. (2008) Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Euro. Surveill* **13**.

Corkill,J.E., Cuevas,L.E., Gurgel,R.Q., Greensill,J. and Hart,C.A. (2001) SHV-27, a novel cefotaxime-hydrolysing beta-lactamase, identified in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a Brazilian hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **47**, 463-465.

Crowley,B., Benedi,V.J. and Domenech-Sanchez,A. (2002) Expression of SHV-2 beta-lactamase and of reduced amounts of OmpK36 porin in *Klebsiella pneumoniae* results in increased resistance to cephalosporins and carbapenems. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3679-3682.

Damjanova,I., Toth,A., Paszti,J., Hajbel-Vekony,G., Jakab,M., Berta,J., Milch,H. and Fuzi,M. (2008) Expansion and countrywide dissemination of ST11, ST15 and ST147 ciprofloxacin-resistant CTX-M-15-type beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* epidemic clones in Hungary in 2005--the new 'MRSA's'? *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 978-985.

Danel,F., Hall,L.M., Duke,B., Gur,D. and Livermore,D.M. (1999) OXA-17, a further extended-spectrum variant of OXA-10 beta-lactamase, isolated from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 1362-1366.

de Oliveira,G.D., Doi,Y., Szabo,D., ms-Haduch,J.M., Vaz,T.M., Leite,D., Padoveze,M.C., Freire,M.P., Silveira,F.P. and Paterson,D.L. (2008) Multiclonal outbreak of *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-2 and novel variant CTX-M-59 in a neonatal intensive care unit in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1790-1793.

Dice L.R. (1945) Measures of the amount of ecological association between species. pp. 297-302

Diekema,D.J., Pfaller,M.A. and Jones,R.N. (2002) Age-related trends in pathogen frequency and antimicrobial susceptibility of bloodstream isolates in North America: SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997-2000. *Int. J. Antimicrob. Agents* **20**, 412-418.

Diekema DJ, Pfaller MA. Infection control epidemiology and clinical microbiology. In: Manual of Clinical Microbiology By Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. American Society for Microbiology - ASM, Washington, DC, 2007; 1:698-715.

Domenech-Sanchez,A., Hernandez-Alles,S., Martinez-Martinez,L., Benedi,V.J. and Alberti,S. (1999) Identification and characterization of a new porin gene of *Klebsiella pneumoniae*: its role in beta-lactam antibiotic resistance. *J. Bacteriol.* **181**, 2726-2732.

Domenech-Sanchez,A., Martinez-Martinez,L., Hernandez-Alles,S., del Carmen,C.M., Pascual,A., Tomas,J.M., Alberti,S. and Benedi,V.J. (2003) Role of *Klebsiella pneumoniae* OmpK35 porin in antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 3332-3335.

Doumith,M., Ellington,M.J., Livermore,D.M. and Woodford,N. (2009) Molecular mechanisms disrupting porin expression in ertapenem-resistant *Klebsiella* and *Enterobacter* spp. clinical isolates from the UK. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **63**, 659-667.

Dowzicky,M.J. and Park,C.H. (2008) Update on antimicrobial susceptibility rates among gram-negative and gram-positive organisms in the United States: results from the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial (TEST) 2005 to 2007. *Clin. Ther.* **30**, 2040-2050.

Dropa,M., Balsalobre,L.C., Lincopan,N., Mamizuka,E.M., Cassettari,V.C., Matte,G.R. and Matte,M.H. (2009) 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.*

Dubois,V., Arpin,C., Noury,P., Andre,C., Coulange,L. and Quentin,C. (2005) Prolonged outbreak of infection due to TEM-21-producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and enterobacteria in a nursing home. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 4129-4138.

Elliott,E., Brink,A.J., van Greune,J., Els,Z., Woodford,N., Turton,J., Warner,M. and Livermore,D.M. (2006) In vivo development of ertapenem resistance in a patient with

pneumonia caused by *Klebsiella pneumoniae* with an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Infect. Dis.* **42**, e95-e98.

European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS). (2006) EARSS annual Report 2006. <http://www.earss.rivm.nl>. Acessado em janeiro 2008.

Farmer JJ, Boatwright KD, Janda JM. Enterobacteriaceae: Introduction and identification. In: Manual of Clinical Microbiology By Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Landry ML, Pfaller MA. 9 ed. *American Society for Microbiology - ASM*, Washington, DC, 2007; 1:698-715.

Felmingham,D. (2002) The need for antimicrobial resistance surveillance. *J. Antimicrob. Chemother.* **50 Suppl S1**, 1-7.

Friedland,I., Stinson,L., Ikaidi,M., Harm,S. and Woods,G.L. (2003) Resistance in Enterobacteriaceae: results of a multicenter surveillance study, 1995-2000. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **24**, 607-612.

Galani,I., Souli,M., Chryssouli,Z., Katsala,D. and Giamarellou,H. (2004) First identification of an *Escherichia coli* clinical isolate producing both metallo-beta-lactamase VIM-2 and extended-spectrum beta-lactamase IBC-1. *Clin. Microbiol. Infect.* **10**, 757-760.

Galas,M., Decousser,J.W., Breton,N., Godard,T., Allouch,P.Y. and Pina,P. (2008) Nationwide study of the prevalence, characteristics, and molecular epidemiology of extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae in France. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 786-789.

Gatell,J.M., Trilla,A., Latorre,X., Almela,M., Mensa,J., Moreno,A., Miro,J.M., Martinez,J.A., Jimenez de Anta,M.T., Soriano,E. and . (1988) Nosocomial bacteremia in a large Spanish teaching hospital: analysis of factors influencing prognosis. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 203-210.

Giakkoupi,P., Tzouveleki,L.S., Tsakris,A., Loukova,V., Sofianou,D. and Tzelepi,E. (2000) IBC-1, a novel integron-associated class A beta-lactamase with extended-spectrum properties produced by an *Enterobacter cloacae* clinical strain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2247-2253.

Girlich,D., Poirel,L. and Nordmann,P. (2009) CTX-M expression and selection of ertapenem resistance in *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 832-834.

Gniadkowski,M. (2008) Evolution of extended-spectrum beta-lactamases by mutation. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 11-32.

Goossens,H. and Grabein,B. (2005) Prevalence and antimicrobial susceptibility data for extended-spectrum beta-lactamase- and AmpC-producing Enterobacteriaceae from the MYSTIC Program in Europe and the United States (1997-2004). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 257-264.

Gupta,A. (2002) Hospital-acquired infections in the neonatal intensive care unit--*Klebsiella pneumoniae*. *Semin. Perinatol.* **26**, 340-345.

Hall,L.M., Livermore,D.M., Gur,D., Akova,M. and Akalin,H.E. (1993) OXA-11, an extended-spectrum variant of OXA-10 (PSE-2) beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **37**, 1637-1644.

Hanson,N.D., Thomson,K.S., Moland,E.S., Sanders,C.C., Berthold,G. and Penn,R.G. (1999) Molecular characterization of a multiply resistant *Klebsiella pneumoniae* encoding ESBLs and a plasmid-mediated AmpC. *J. Antimicrob. Chemother.* **44**, 377-380.

Hernandez,J.R., Martinez-Martinez,L., Canton,R., Coque,T.M. and Pascual,A. (2005) Nationwide study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* producing extended-spectrum beta-lactamases in Spain. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 2122-2125.

Hernandez-Alles,S., Alberti,S., Alvarez,D., Domenech-Sanchez,A., Martinez-Martinez,L., Gil,J., Tomas,J.M. and Benedi,V.J. (1999a) Porin expression in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Microbiology* **145 ( Pt 3)**, 673-679.

Hernandez-Alles,S., Benedi,V.J., Martinez-Martinez,L., Pascual,A., Aguilar,A., Tomas,J.M. and Alberti,S. (1999b) Development of resistance during antimicrobial therapy caused by insertion sequence interruption of porin genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 937-939.

Hirakata,Y., Izumikawa,K., Yamaguchi,T., Takemura,H., Tanaka,H., Yoshida,R., Matsuda,J., Nakano,M., Tomono,K., Maesaki,S., Kaku,M., Yamada,Y., Kamihira,S. and Kohno,S. (1998) Rapid detection and evaluation of clinical characteristics of emerging

multiple-drug-resistant gram-negative rods carrying the metallo-beta-lactamase gene blaIMP. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2006-2011.

Hossain,A., Ferraro,M.J., Pino,R.M., Dew,R.B., III, Moland,E.S., Lockhart,T.J., Thomson,K.S., Goering,R.V. and Hanson,N.D. (2004) Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4438-4440.

Huang,W., Petrosino,J., Hirsch,M., Shenkin,P.S. and Palzkill,T. (1996) Amino acid sequence determinants of beta-lactamase structure and activity. *J. Mol. Biol.* **258**, 688-703.

Huletsky,A., Knox,J.R. and Levesque,R.C. (1993) Role of Ser-238 and Lys-240 in the hydrolysis of third-generation cephalosporins by SHV-type beta-lactamases probed by site-directed mutagenesis and three-dimensional modeling. *J. Biol. Chem.* **268**, 3690-3697.

Jarlier,V., Nicolas,M.H., Fournier,G. and Philippon,A. (1988) Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 867-878.

Jones,R.N. and Masterton,R. (2001) Determining the value of antimicrobial surveillance programs. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **41**, 171-175.

Kariuki,S., Corkill,J.E., Revathi,G., Musoke,R. and Hart,C.A. (2001) Molecular characterization of a novel plasmid-encoded cefotaximase (CTX-M-12) found in clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates from Kenya. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2141-2143.

Knothe,H., Shah,P., Krcmery,V., Antal,M. and Mitsuhashi,S. (1983) Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* **11**, 315-317.

Ko,W.C., Paterson,D.L., Sagnimeni,A.J., Hansen,D.S., Von Gottberg,A., Mohapatra,S., Casellas,J.M., Goossens,H., Mulazimoglu,L., Trenholme,G., Klugman,K.P., McCormack,J.G. and Yu,V.L. (2002) Community-acquired *Klebsiella pneumoniae* bacteremia: global differences in clinical patterns. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 160-166.



Kollef, M.H. and Fraser, V.J. (2001) Antibiotic resistance in the intensive care unit. *Ann. Intern. Med.* **134**, 298-314.

Konemam EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Jr. WCW. Enterobacteriaceae. In: *Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido*. 5 ed. Editora Médica e Científica Ltda - MDSI, Rio de Janeiro, RJ, 2001:177-261.

Lau, S.H., Kaufmann, M.E., Livermore, D.M., Woodford, N., Willshaw, G.A., Cheasty, T., Stamper, K., Reddy, S., Cheesbrough, J., Bolton, F.J., Fox, A.J. and Upton, M. (2008) UK epidemic *Escherichia coli* strains A-E, with CTX-M-15 beta-lactamase, all belong to the international O25:H4-ST131 clone. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 1241-1244.

Leavitt, A., Chmelnitsky, I., Colodner, R., Ofek, I., Carmeli, Y. and Navon-Venezia, S. (2009) Ertapenem resistance among extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 969-974.

Lee, K., Hong, S.G., Park, Y.J., Lee, H.S., Song, W., Jeong, J., Yong, D. and Chong, Y. (2005) Evaluation of phenotypic screening methods for detecting plasmid-mediated AmpC beta-lactamases-producing isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 319-323.

Lincopan, N., McCulloch, J.A., Reinert, C., Cassettari, V.C., Gales, A.C. and Mamizuka, E.M. (2005) First isolation of metallo-beta-lactamase-producing multiresistant *Klebsiella pneumoniae* from a patient in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 516-519.

Livermore, D.M. (1991) Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. *Scand. J. Infect. Dis. Suppl* **78**, 7-16.

Livermore, D.M. (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **8**, 557-584.

Livermore, D.M. (2008) Defining an extended-spectrum beta-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 3-10.

Livermore, D.M., Canton, R., Gniadkowski, M., Nordmann, P., Rossolini, G.M., Arlet, G., Ayala, J., Coque, T.M., Kern-Zdanowicz, I., Luzzaro, F., Poirel, L. and Woodford, N. (2007) CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. *J. Antimicrob. Chemother.* **59**, 165-174.

Livermore,D.M. and Hawkey,P.M. (2005) CTX-M: changing the face of ESBLs in the UK. *J. Antimicrob. Chemother.* **56**, 451-454.

Lockhart,S.R., Abramson,M.A., Beekmann,S.E., Gallagher,G., Riedel,S., Diekema,D.J., Quinn,J.P. and Doern,G.V. (2007) Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli causing infections in intensive care unit patients in the United States between 1993 and 2004. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 3352-3359.

Lytsy,B., Sandegren,L., Tano,E., Torell,E., Andersson,D.I. and Melhus,A. (2008) The first major extended-spectrum beta-lactamase outbreak in Scandinavia was caused by clonal spread of a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* producing CTX-M-15. *APMIS* **116**, 302-308.

MacAdam,H., Zaoutis,T.E., Gasink,L.B., Bilker,W.B. and Lautenbach,E. (2006) Investigating the association between antibiotic use and antibiotic resistance: impact of different methods of categorising prior antibiotic use. *Int. J. Antimicrob. Agents* **28**, 325-332.

Machado,E., Coque,T.M., Canton,R., Novais,A., Sousa,J.C., Baquero,F. and Peixe,L. (2007) High diversity of extended-spectrum beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae from Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 1370-1374.

Marchandin,H., Carriere,C., Sirot,D., Pierre,H.J. and Darbas,H. (1999) TEM-24 produced by four different species of Enterobacteriaceae, including *Providencia rettgeri*, in a single patient. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**, 2069-2073.

Marra A.R, Pignatari A.C.C., Camargo L.F.A., Andrade S.S., Sukienni T., Behar P., Medeiros E.A.S., Ribeiro J., Girão E., Guerra C., Pereira C.A.P., Carneiro I., Brites C., Cal R.G.R., Edmond M.B. and Brazillian SCOPE Study Group. Nosocomial Bloodstream Infections: Analysis Of 1,715 Cases From A Prospective Nationwide Surveillance Study. In: 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2009. Poster, K-243.

Marra,A.R., Wey,S.B., Castelo,A., Gales,A.C., Cal,R.G., Filho,J.R., Edmond,M.B. and Pereira,C.A. (2006) Nosocomial bloodstream infections caused by *Klebsiella pneumoniae*: impact of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) production on clinical outcome in a hospital with high ESBL prevalence. *BMC. Infect. Dis.* **6**, 24.

Martinez,J., Martinez,L., Rosenblueth,M., Silva,J. and Martinez-Romero,E. (2004) How are gene sequence analyses modifying bacterial taxonomy? The case of Klebsiella. *Int. Microbiol.* **7**, 261-268.

Martinez-Martinez,L. (2008) Extended-spectrum beta-lactamases and the permeability barrier. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 82-89.

Martinez-Martinez,L., Hernandez-Alles,S., Alberti,S., Tomas,J.M., Benedi,V.J. and Jacoby,G.A. (1996) In vivo selection of porin-deficient mutants of Klebsiella pneumoniae with increased resistance to cefoxitin and expanded-spectrum-cephalosporins. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 342-348.

McGettigan,S.E., Hu,B., Andreacchio,K., Nachamkin,I. and Edelstein,P.H. (2009) Prevalence of CTX-M beta-lactamases in Philadelphia, Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 2970-2974.

Medeiros,A.A. (1997) Evolution and dissemination of beta-lactamases accelerated by generations of beta-lactam antibiotics. *Clin. Infect. Dis.* **24 Suppl 1**, S19-S45.

Mendes,R.E., Castanheira,M., Toleman,M.A., Sader,H.S., Jones,R.N. and Walsh,T.R. (2007) Characterization of an integron carrying blaIMP-1 and a new aminoglycoside resistance gene, aac(6')-31, and its dissemination among genetically unrelated clinical isolates in a Brazilian hospital. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2611-2614.

Miriagou,V., Tzouveleki,L.S., Rossiter,S., Tzelepi,E., Angulo,F.J. and Whichard,J.M. (2003) Imipenem resistance in a Salmonella clinical strain due to plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 1297-1300.

Moland,E.S., Black,J.A., Hossain,A., Hanson,N.D., Thomson,K.S. and Pottumarthy,S. (2003) Discovery of CTX-M-like extended-spectrum beta-lactamases in Escherichia coli isolates from five US States. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2382-2383.

Moland,E.S., Hong,S.G., Thomson,K.S., Larone,D.H. and Hanson,N.D. (2007) Klebsiella pneumoniae isolate producing at least eight different beta-lactamases, including AmpC and KPC beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 800-801.

Monteiro,J., Santos,A.F., Asensi,M.D., Peirano,G. and Gales,A.C. (2009) First report of KPC-2-producing Klebsiella pneumoniae strains in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 333-334.

Morfin-Otero,R., Rodriguez-Noriega,E., Deshpande,L.M., Sader,H.S. and Castanheira,M. (2009) Dissemination of a bla(VIM-2)-Carrying Integron Among Enterobacteriaceae Species in Mexico: Report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Microb. Drug Resist.* **15**, 33-35.

Morosini,M.I., Canton,R., Martinez-Beltran,J., Negri,M.C., Perez-Diaz,J.C., Baquero,F. and Blazquez,J. (1995) New extended-spectrum TEM-type beta-lactamase from *Salmonella enterica* subsp. *enterica* isolated in a nosocomial outbreak. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 458-461.

Mugnier,P., Dubrous,P., Casin,I., Arlet,G. and Collatz,E. (1996) A TEM-derived extended-spectrum beta-lactamase in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **40**, 2488-2493.

Munday,C.J., Xiong,J., Li,C., Shen,D. and Hawkey,P.M. (2004) Dissemination of CTX-M type beta-lactamases in Enterobacteriaceae isolates in the People's Republic of China. *Int. J. Antimicrob. Agents* **23**, 175-180.

Murphy,T.A., Simm,A.M., Toleman,M.A., Jones,R.N. and Walsh,T.R. (2003) Biochemical characterization of the acquired metallo-beta-lactamase SPM-1 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 582-587.

Naas,T., Sougakoff,W., Casetta,A. and Nordmann,P. (1998) Molecular characterization of OXA-20, a novel class D beta-lactamase, and its integron from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2074-2083.

Navon-Venezia,S., Chmelnitsky,I., Leavitt,A., Schwaber,M.J., Schwartz,D. and Carmeli,Y. (2006) Plasmid-mediated imipenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 among multiple carbapenem-resistant *Escherichia coli* clones in Israel. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 3098-3101.

Nicoletti AG, Picão RC ,Santos AF, Xavier DE, Fehlberg LCC, Gales AC. *Klebsiella pneumoniae* non-susceptible to carbapenems (KPN-NSC) in Brazil: What are the mechanisms behind?. In: 49th Annual Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC). 2009. Poster C2-663

Nikaido,H. (1985) Role of permeability barriers in resistance to beta-lactam antibiotics. *Pharmacol. Ther.* **27**, 197-231.

Nikaido,H. (1989) Outer membrane barrier as a mechanism of antimicrobial resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **33**, 1831-1836.

Nikaido,H. (1994) Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes. *J. Biol. Chem.* **269**, 3905-3908.

Nordmann,P. and Poirel,L. (2002) Emerging carbapenemases in Gram-negative aerobes. *Clin. Microbiol. Infect.* **8**, 321-331.

Nordmann,P., Poirel,L., Kubina,M., Casetta,A. and Naas,T. (2000) Biochemical-genetic characterization and distribution of OXA-22, a chromosomal and inducible class D beta-lactamase from *Ralstonia* (*Pseudomonas*) *pickettii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2201-2204.

Osano,E., Arakawa,Y., Wacharotayankun,R., Ohta,M., Horii,T., Ito,H., Yoshimura,F. and Kato,N. (1994) Molecular characterization of an enterobacterial metallo beta-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **38**, 71-78.

Oteo,J., Navarro,C., Cercenado,E., Delgado-Iribarren,A., Wilhelmi,I., Orden,B., Garcia,C., Miguelanez,S., Perez-Vazquez,M., Garcia-Cobos,S., Aracil,B., Bautista,V. and Campos,J. (2006) Spread of *Escherichia coli* strains with high-level cefotaxime and ceftazidime resistance between the community, long-term care facilities, and hospital institutions. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 2359-2366.

Pallecchi,L., Bartoloni,A., Fiorelli,C., Mantella,A., Di,M.T., Gamboa,H., Gotuzzo,E., Kronvall,G., Paradisi,F. and Rossolini,G.M. (2007) Rapid dissemination and diversity of CTX-M extended-spectrum beta-lactamase genes in commensal *Escherichia coli* isolates from healthy children from low-resource settings in Latin America. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2720-2725.

Pallecchi,L., Malossi,M., Mantella,A., Gotuzzo,E., Trigoso,C., Bartoloni,A., Paradisi,F., Kronvall,G. and Rossolini,G.M. (2004) Detection of CTX-M-type beta-lactamase genes in fecal *Escherichia coli* isolates from healthy children in Bolivia and Peru. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 4556-4561.

Palzkill,T., Thomson,K.S., Sanders,C.C., Moland,E.S., Huang,W. and Milligan,T.W. (1995) New variant of TEM-10 beta-lactamase gene produced by a clinical isolate of *proteus mirabilis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1199-1200.

Papanicolaou,G.A., Medeiros,A.A. and Jacoby,G.A. (1990) Novel plasmid-mediated beta-lactamase (MIR-1) conferring resistance to oxyimino- and alpha-methoxy beta-lactams in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **34**, 2200-2209.

Parr,T.R., Jr., Moore,R.A., Moore,L.V. and Hancock,R.E. (1987) Role of porins in intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas cepacia*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **31**, 121-123.

Pasteran,F., Mendez,T., Guerriero,L., Rapoport,M. and Corso,A. (2009) Sensitive screening tests for suspected class A carbapenemase production in species of Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **47**, 1631-1639.

Paterson,D.L. and Bonomo,R.A. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases: a clinical update. *Clin. Microbiol. Rev.* **18**, 657-686.

Peirano,G., Seki,L.M., Val,P., V, Pinto,M.C., Guerra,L.R. and Asensi,M.D. (2009) Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Antimicrob. Chemother.* **63**, 265-268.

Penteado,A.P., Castanheira,M., Pignatari,A.C., Guimaraes,T., Mamizuka,E.M. and Gales,A.C. (2009) Dissemination of bla(IMP-1)-carrying integron In86 among *Klebsiella pneumoniae* isolates harboring a new trimethoprim resistance gene dfr23. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **63**, 87-91.

Perez,F., Endimiani,A., Hujer,K.M. and Bonomo,R.A. (2007) The continuing challenge of ESBLs. *Curr. Opin. Pharmacol.* **7**, 459-469.

Perez-Perez,F.J. and Hanson,N.D. (2002) Detection of plasmid-mediated AmpC beta-lactamase genes in clinical isolates by using multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **40**, 2153-2162.

Perilli,M., Segatore,B., de Massis,M.R., Riccio,M.L., Bianchi,C., Zollo,A., Rossolini,G.M. and Amicosante,G. (2000) TEM-72, a new extended-spectrum beta-lactamase detected in *Proteus mirabilis* and *Morganella morganii* in Italy. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2537-2539.

Pfaller MA, Hollis RJ, Sader HS. Molecular Biology - PFGE Analysis of chromosomal restriction fragments. In: Isenberg HD - Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, ASM Press, p.10.5.c.1-10.5.c.11, 1992.

- Philippon,A., Arlet,G. and Jacoby,G.A. (2002) Plasmid-determined AmpC-type beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 1-11.
- Philippon,L.N., Naas,T., Bouthors,A.T., Barakett,V. and Nordmann,P. (1997) OXA-18, a class D clavulanic acid-inhibited extended-spectrum beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **41**, 2188-2195.
- Picao,R.C., Poirel,L., Gales,A.C. and Nordmann,P. (2009) Diversity of beta-lactamases produced by ceftazidime-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates causing bloodstream infections in Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**, 3908-3913.
- Pittet,D., Li,N. and Wenzel,R.P. (1993) Association of secondary and polymicrobial nosocomial bloodstream infections with higher mortality. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **12**, 813-819.
- Pittet,D., Tarara,D. and Wenzel,R.P. (1994) Nosocomial bloodstream infection in critically ill patients. Excess length of stay, extra costs, and attributable mortality. *JAMA* **271**, 1598-1601.
- Podschun,R., Acktun,H., Okpara,J., Linderkamp,O., Ullmann,U. and Borneff-Lipp,M. (1998) Isolation of *Klebsiella planticola* from newborns in a neonatal ward. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2331-2332.
- Podschun,R. and Ullmann,U. (1998) *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogens: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**, 589-603.
- Poirel,L., Brinas,L., Fortineau,N. and Nordmann,P. (2005) Integron-encoded GES-type extended-spectrum beta-lactamase with increased activity toward aztreonam in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3593-3597.
- Poirel,L., Gniadkowski,M. and Nordmann,P. (2002) Biochemical analysis of the ceftazidime-hydrolysing extended-spectrum beta-lactamase CTX-M-15 and of its structurally related beta-lactamase CTX-M-3. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 1031-1034.
- Poirel,L., Heritier,C., Tolun,V. and Nordmann,P. (2004) Emergence of oxacillinase-mediated resistance to imipenem in *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 15-22.

Poirel,L., Le,T., I, Naas,T., Karim,A. and Nordmann,P. (2000) Biochemical sequence analyses of GES-1, a novel class A extended-spectrum beta-lactamase, and the class 1 integron In52 from *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 622-632.

Poirel,L., Weldhagen,G.F., Naas,T., De Champs,C., Dove,M.G. and Nordmann,P. (2001) GES-2, a class A beta-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with increased hydrolysis of imipenem. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2598-2603.

Pournaras,S., Ikonomidis,A., Kristo,I., Tsakris,A. and Maniatis,A.N. (2004) CTX-M enzymes are the most common extended-spectrum beta-lactamases among *Escherichia coli* in a tertiary Greek hospital. *J. Antimicrob. Chemother.* **54**, 574-575.

Queenan,A.M. and Bush,K. (2007) Carbapenemases: the versatile beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Rev.* **20**, 440-58, table.

Quinteros,M., Radice,M., Gardella,N., Rodriguez,M.M., Costa,N., Korbenfeld,D., Couto,E. and Gutkind,G. (2003) Extended-spectrum beta-lactamases in enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, public hospitals. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**, 2864-2867.

Ribas,R.M., Freitas,C. and Gontijo Filho,P.P. (2007) Nosocomial bloodstream infections: organisms, risk factors and resistant phenotypes in the Brazilian University Hospital. *Braz. J. Infect. Dis.* **11**, 351-354.

Richmond,M.H. and Sykes,R.B. (1973) The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv. Microb. Physiol* **9**, 31-88.

Rosenau,A., Cattier,B., Gousset,N., Harriau,P., Philippon,A. and Quentin,R. (2000) Capnocytophaga ochracea: characterization of a plasmid-encoded extended-spectrum TEM-17 beta-lactamase in the phylum Flavobacter-bacteroides. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 760-762.

Rosenblueth,M., Martinez,L., Silva,J. and Martinez-Romero,E. (2004) *Klebsiella variicola*, a novel species with clinical and plant-associated isolates. *Syst. Appl. Microbiol.* **27**, 27-35.

Rossi,F., Garcia,P., Ronzon,B., Curcio,D. and Dowzicky,M.J. (2008) Rates of antimicrobial resistance in Latin America (2004-2007) and in vitro activity of the glycolcyclycline tigecycline and of other antibiotics. *Braz. J. Infect. Dis.* **12**, 405-415.



Rossolini,G.M., D'Andrea,M.M. and Mugnaioli,C. (2008) The spread of CTX-M-type extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 33-41.

Sader,H.S., Gales,A.C., Pfaller,M.A., Mendes,R.E., Zoccoli,C., Barth,A. and Jones,R.N. (2001) Pathogen frequency and resistance patterns in Brazilian hospitals: summary of results from three years of the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. *Braz. J. Infect. Dis.* **5**, 200-214.

Sader,H.S., Jones,R.N., Andrade-Baiocchi,S. and Biedenbach,D.J. (2002) Four-year evaluation of frequency of occurrence and antimicrobial susceptibility patterns of bacteria from bloodstream infections in Latin American medical centers. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**, 273-280.

Schwaber,M.J. and Carmeli,Y. (2007) Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 913-920.

Schwaber,M.J., Klarfeld-Lidji,S., Navon-Venezia,S., Schwartz,D., Leavitt,A. and Carmeli,Y. (2008) Predictors of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* acquisition among hospitalized adults and effect of acquisition on mortality. *Antimicrob. Agents Chemother.* **52**, 1028-1033.

Schwaber,M.J., Navon-Venezia,S., Kaye,K.S., Ben-Ami,R., Schwartz,D. and Carmeli,Y. (2006) Clinical and economic impact of bacteremia with extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1257-1262.

Sewell,C.M., Koza,M.A., Luchi,R.J. and Young,E.J. (1988) Risk factors associated with a cluster of urinary tract infections in a geriatric unit caused by *Klebsiella pneumoniae* resistant to multiple antibiotics. *Am. J. Infect. Control* **16**, 66-71.

Sidjabat,H.E., Paterson,D.L., ms-Haduch,J.M., Ewan,L., Pasculle,A.W., Muto,C.A., Tian,G.B. and Doi,Y. (2009) Molecular Epidemiology of CTX-M-producing *Escherichia coli* at a Tertiary Medical Center in Western Pennsylvania. *Antimicrob. Agents Chemother.*

Simoons-Smit,A.M., Verweij-Van Vught,A.M., Kanis,I.Y. and MacLaren,D.M. (1985) Biochemical and serological investigations on clinical isolates of *Klebsiella*. *J. Hyg. (Lond)* **95**, 265-276.

Simoons-Smit,A.M., Verweij-Van Vught,A.M. and MacLaren,D.M. (1986) The role of K antigens as virulence factors in Klebsiella. *J. Med. Microbiol.* **21**, 133-137.

Siu,L.K., Lo,J.Y., Yuen,K.Y., Chau,P.Y., Ng,M.H. and Ho,P.L. (2000) beta-lactamases in Shigella flexneri isolates from Hong Kong and Shanghai and a novel OXA-1-like beta-lactamase, OXA-30. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 2034-2038.

Sougakoff,W., Goussard,S., Gerbaud,G. and Courvalin,P. (1988) Plasmid-mediated resistance to third-generation cephalosporins caused by point mutations in TEM-type penicillinase genes. *Rev. Infect. Dis.* **10**, 879-884.

Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. (1973) Numerical taxonomy. pp. 573.

Srinivasan,A. and Patel,J.B. (2008) Klebsiella pneumoniae carbapenemase-producing organisms: an ounce of prevention really is worth a pound of cure. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **29**, 1107-1109.

Tenover,F.C., Arbeit,R.D., Goering,R.V., Mickelsen,P.A., Murray,B.E., Persing,D.H. and Swaminathan,B. (1995) Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by pulsed-field gel electrophoresis: criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2233-2239.

Tessier,F., Arpin,C., Allery,A. and Quentin,C. (1998) Molecular characterization of a TEM-21 beta-lactamase in a clinical isolate of Morganella morganii. *Antimicrob. Agents Chemother.* **42**, 2125-2127.

Toleman,M.A., Simm,A.M., Murphy,T.A., Gales,A.C., Biedenbach,D.J., Jones,R.N. and Walsh,T.R. (2002) Molecular characterization of SPM-1, a novel metallo-beta-lactamase isolated in Latin America: report from the SENTRY antimicrobial surveillance programme. *J. Antimicrob. Chemother.* **50**, 673-679.

Tumbarello,M., Sanguinetti,M., Montuori,E., Trearichi,E.M., Posteraro,B., Fiori,B., Citton,R., D'Inzeo,T., Fadda,G., Cauda,R. and Spanu,T. (2007) Predictors of mortality in patients with bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae: importance of inadequate initial antimicrobial treatment. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1987-1994.

Tumbarello,M., Spanu,T., Sanguinetti,M., Citton,R., Montuori,E., Leone,F., Fadda,G. and Cauda,R. (2006) Bloodstream infections caused by extended-spectrum-beta-

lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae*: risk factors, molecular epidemiology, and clinical outcome. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 498-504.

Turner,P.J. (2005) Extended-spectrum beta-lactamases. *Clin. Infect. Dis.* **41 Suppl 4**, S273-S275.

Tzouvelekis,L.S. and Bonomo,R.A. (1999) SHV-type beta-lactamases. *Curr. Pharm. Des* **5**, 847-864.

Tzouvelekis,L.S., Tzelepi,E., Tassios,P.T. and Legakis,N.J. (2000) CTX-M-type beta-lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int. J. Antimicrob. Agents* **14**, 137-142.

Vakulenko,S.B., Toth,M., Taibi,P., Mobashery,S. and Lerner,S.A. (1995) Effects of Asp-179 mutations in TEMpUC19 beta-lactamase on susceptibility to beta-lactams. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1878-1880.

Valverde,A., Coque,T.M., Sanchez-Moreno,M.P., Rollan,A., Baquero,F. and Canton,R. (2004) Dramatic increase in prevalence of fecal carriage of extended-spectrum beta-lactamase-producing Enterobacteriaceae during nonoutbreak situations in Spain. *J. Clin. Microbiol.* **42**, 4769-4775.

Vignoli,R., Varela,G., Mota,M.I., Cordeiro,N.F., Power,P., Ingold,E., Gadea,P., Sirok,A., Schelotto,F., Ayala,J.A. and Gutkind,G. (2005) Enteropathogenic *Escherichia coli* strains carrying genes encoding the PER-2 and TEM-116 extended-spectrum beta-lactamases isolated from children with diarrhea in Uruguay. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2940-2943.

Villegas,M.V., Correa,A., Perez,F., Zuluaga,T., Radice,M., Gutkind,G., Casellas,J.M., Ayala,J., Lolans,K. and Quinn,J.P. (2004) CTX-M-12 beta-lactamase in a *Klebsiella pneumoniae* clinical isolate in Colombia. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 629-631.

Villegas,M.V., Kattan,J.N., Quinteros,M.G. and Casellas,J.M. (2008) Prevalence of extended-spectrum beta-lactamases in South America. *Clin. Microbiol. Infect.* **14 Suppl 1**, 154-158.

Villegas,M.V., Lolans,K., Correa,A., Kattan,J.N., Lopez,J.A. and Quinn,J.P. (2007) First identification of *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing a KPC-type carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 1553-1555.

- Vourli,S., Giakkoupi,P., Miriagou,V., Tzelepi,E., Vatopoulos,A.C. and Tzouvelekis,L.S. (2004) Novel GES/IBC extended-spectrum beta-lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 209-213.
- Wachino,J., Doi,Y., Yamane,K., Shibata,N., Yagi,T., Kubota,T., Ito,H. and Arakawa,Y. (2004) Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class a beta-lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**, 1960-1967.
- Walsh,T.R., Hall,L., Assinder,S.J., Nichols,W.W., Cartwright,S.J., MacGowan,A.P. and Bennett,P.M. (1994) Sequence analysis of the L1 metallo-beta-lactamase from *Xanthomonas maltophilia*. *Biochim. Biophys. Acta* **1218**, 199-201.
- Walther-Rasmussen,J. and Hoiby,N. (2007) Class A carbapenemases. *J. Antimicrob. Chemother.* **60**, 470-482.
- Wang,X.D., Cai,J.C., Zhou,H.W., Zhang,R. and Chen,G.X. (2009) Reduced susceptibility to carbapenems in *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates associated with plasmid-mediated beta-lactamase production and OmpK36 porin deficiency. *Journal of Medical Microbiology* **58**, 1196-1202.
- Warren,D.K., Zack,J.E., Elward,A.M., Cox,M.J. and Fraser,V.J. (2001) Nosocomial primary bloodstream infections in intensive care unit patients in a nonteaching community medical center: a 21-month prospective study. *Clin. Infect. Dis.* **33**, 1329-1335.
- Winokur,P.L., Canton,R., Casellas,J.M. and Legakis,N. (2001) Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. *Clin. Infect. Dis.* **32 Suppl 2**, S94-103.
- Wisplinghoff,H., Bischoff,T., Tallent,S.M., Seifert,H., Wenzel,R.P. and Edmond,M.B. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. *Clin. Infect. Dis.* **39**, 309-317.
- Yamazaki,E., Ishii,J., Sato,K. and Nakae,T. (1989) The barrier function of the outer membrane of *Pseudomonas maltophilia* in the diffusion of saccharides and beta-lactam antibiotics. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**, 85-88.

Yan,J.J., Hsueh,P.R., Lu,J.J., Chang,F.Y., Shyr,J.M., Wan,J.H., Liu,Y.C., Chuang,Y.C., Yang,Y.C., Tsao,S.M., Wu,H.H., Wang,L.S., Lin,T.P., Wu,H.M., Chen,H.M. and Wu,J.J. (2006) Extended-spectrum beta-lactamases and plasmid-mediated AmpC enzymes among clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* from seven medical centers in Taiwan. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**, 1861-1864.

Yang,D., Guo,Y. and Zhang,Z. (2009) Combined Porin Loss and Extended Spectrum beta-Lactamase Production is Associated with an Increasing Imipenem Minimal Inhibitory Concentration in Clinical *Klebsiella pneumoniae* Strains. *Current Microbiology* **58**, 366-370.

Yigit,H., Queenan,A.M., Anderson,G.J., Domenech-Sanchez,A., Biddle,J.W., Steward,C.D., Alberti,S., Bush,K. and Tenover,F.C. (2001) Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1151-1161.

Yumuk,Z., Afacan,G., Nicolas-Chanoine,M.H., Sotto,A. and Lavigne,J.P. (2008) Turkey: a further country concerned by community-acquired *Escherichia coli* clone O25-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* **62**, 284-288.

## 8. RESUMO

**Objetivos:** Avaliar (i) o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e caracterizar os tipos de  $\beta$ -lactamases de espectro ampliado, entre isolados clínicos de *Klebsiella* spp. (KSP); (ii) os mecanismos de resistência em isolados clínicos de *Klebsiella pneumoniae* (KPN) que apresentaram diminuição de sensibilidade aos carbapenens; (iii) a acurácia do teste de Hodge para detecção de carbapenemases.

**Material e Métodos:** Foram avaliadas 167 amostras de KSP isoladas do primeiro episódio de infecção de corrente sanguínea (ICS) de pacientes hospitalizados em 15 centros médicos de diferentes regiões do país, participantes do programa de vigilância SCOPE Brasil, entre junho de 2007 e dezembro de 2008. Todas as amostras foram submetidas a re-identificação e teste de sensibilidade pelo sistema automatizado BD Phoenix. As amostras foram classificadas em dois grupos de acordo com a sensibilidade *in vitro* aos agentes  $\beta$ -lactâmicos e detecção de ES $\beta$ L: (i) KSP produtora de ES $\beta$ L e (ii) KSP não produtora de ES $\beta$ L. As amostras representativas do grupo KSP produtora de ES $\beta$ L foram submetidas a testes fenotípicos e moleculares. Os principais tipos de  $\beta$ -lactamases foram caracterizados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido pelo sequenciamento dos produtos amplificados. Testes adicionais foram realizados para o subgrupo KPN produtora de ES $\beta$ L e resistente a ertapenem (KPN-ES $\beta$ L-RE).

**Resultados:** As espécies mais comuns foram *K. pneumoniae* (n=158), seguida por *K. oxytoca* (n=8) e *K. ozaenae* (n=1). Altas taxas de resistência aos antimicrobianos foram constatadas, sendo que 56,3% das amostras foram classificadas como produtoras de ES $\beta$ L. As ES $\beta$ L mais frequentes foram CTX-M-2, CTX-M-15, SHV-5 e SHV-12. Isolados clínicos contendo concomitantemente dois tipos de ES $\beta$ L (CTX e SHV) foram detectados somente nas regiões Nordeste e Sudeste. O mecanismo de resistência detectado nas amostras KPN-ES $\beta$ L-RE foi a produção de cefotaximase, associada à alteração das porinas OmpK35 e/ou OmpK36. O teste de Hodge apresentou baixa acurácia nessas amostras.

**Conclusões:** Evidenciamos a disseminação de CTX-M-2 e a emergência de CTX-M-15, associada a alterações nas porinas OmpK35 e OmpK36 em amostras de KSP isoladas de ICS em hospitais brasileiros. Nenhuma carbapenemase foi detectada.

## 9. ABSTRACT

**Objectives:** To evaluate (i) the antimicrobial susceptibility profile of *Klebsiella* spp. (KSP) clinical isolates and characterize the extended spectrum  $\beta$ -lactamases. (ii) the resistance mechanisms in *Klebsiella* spp. clinical isolates that showed decrease of carbapenem susceptibility. (iii) the accuracy of the Hodge Test for carbapenemase activity detection. **Material and Methods:** 167 KPS strains were evaluated in this study. The strains were isolated from the first bloodstream infection episode of patients hospitalized at 15 medical centers from different regions of the country participating of SCOPE Brazilian surveillance program, between June, 2007 and December, 2008. The isolates were re-identified and susceptibility tested by the automated system BD Phoenix and classified in two groups according antimicrobial susceptibility profile and ES $\beta$ L detection: (i) KSP ES $\beta$ L-producing and (ii) KSP ES $\beta$ L-non-producing. KSP ES $\beta$ L-producing were submitted to phenotypic and molecular tests. The  $\beta$ -lactamase types were characterized by PCR, followed by DNA sequencing. Additional tests were performed for ertapenem resistant *K. pneumoniae* ES $\beta$ L-producing (KPN-ES $\beta$ L-ER). **Results:** The most common species were *K. pneumoniae* (n=158), followed by *K. oxytoca* (n=8) and *K. ozaenae* (n=1). High rates of antimicrobial resistance were observed and 56.3% of isolates were classified as ES $\beta$ L-producing. The most frequent ES $\beta$ L were CTX-M-2, CTX-M-15, SHV-5 and SHV-12. Clinical isolates with two ES $\beta$ L types (CTX and SHV) were only detected in the northeast and southeast regions. The resistance mechanism detected in the KPN-ES $\beta$ L-ER isolates was the cefotaximase production associated with OmpK35 and/or OmpK36 porin alteration. The Hodge test showed low accuracy in these isolates. **Conclusions:** We showed the dissemination of CTX-M-2 and emergence of CTX-M-15, associated with OmpK35 and OmpK36 porin modification, in KSP strains isolated from bloodstream infection in Brazilian hospitals. No carbapenemase was detected.

## 10. ANEXOS

**ANEXO 1:** Ficha elaborada para a coleta de dados clínicos e epidemiológicos dos pacientes e dados microbiológicos das amostras avaliadas no Projeto SCOPE Brasil.

Número do Hospital \_\_\_\_\_ Idade \_\_\_\_\_ Sexo:  M  F Nº Prontuário \_\_\_\_\_ RGLab \_\_\_\_\_

Data da admissão: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Data da 1ª hemocultura positiva \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ Condições na alta:  Alta  Óbito

<b>Diagnóstico primário:</b> <input type="checkbox"/> Neoplasia/Leucemia/linfoma <input type="checkbox"/> Cardíaco <input type="checkbox"/> Renal <input type="checkbox"/> Hepático <input type="checkbox"/> Neurológico <input type="checkbox"/> Diabetes mellitus <input type="checkbox"/> Transplante <input type="checkbox"/> sólido <input type="checkbox"/> MO <input type="checkbox"/> Pulmonar <input type="checkbox"/> Vascular <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Trauma <input type="checkbox"/> Outro #Nomeie o órgão _____	<b>Unidade de internação</b> <input type="checkbox"/> Cirurgia geral <input type="checkbox"/> Cirurgia cardíaco-torácica <input type="checkbox"/> Clínica Médica <input type="checkbox"/> Hematologia adulto/oncologia <input type="checkbox"/> Neurocirurgia <input type="checkbox"/> Obstetrícia <input type="checkbox"/> Ginecologia <input type="checkbox"/> Oftalmo/Otorrino/Cab.pescoco <input type="checkbox"/> Ortopedia <input type="checkbox"/> Pediatria <input type="checkbox"/> Ped. Hematologia/oncologia <input type="checkbox"/> Psiquiatria  <input type="checkbox"/> Urologia <input type="checkbox"/> Outro	<b>Fatores risco (com 48hrs):</b> <input type="checkbox"/> Cateter periférico <input type="checkbox"/> Cateter venoso central <input type="checkbox"/> NPP <input type="checkbox"/> Acesso arterial <input type="checkbox"/> PIC (neuro) <input type="checkbox"/> Cateter vesical <input type="checkbox"/> Hemodiálise <input type="checkbox"/> Diálise peritoneal <input type="checkbox"/> Ventilação mecânica  <input type="checkbox"/> N° neutrófilos < 1,000  <input type="checkbox"/> Outro (liste) _____	<b>Fonte da bacteremia:</b> <input type="checkbox"/> Desconhecida <input type="checkbox"/> Queimadura <input type="checkbox"/> Ouvido, nariz, garganta <input type="checkbox"/> Gastrointestinal <input type="checkbox"/> Ginecológico <input type="checkbox"/> Primária (acesso central) <input type="checkbox"/> Trato resp. inferior <input type="checkbox"/> Pele <input type="checkbox"/> Trato urinário <input type="checkbox"/> Ferida cirúrgica <input type="checkbox"/> Ferida, outra  <input type="checkbox"/> Outro (liste) _____
--	--	---	---

UTI  S  N  Urologia  Outro

**DADOS MICROBIOLÓGICOS**

Identificação do organismo\*

- 1- \_\_\_\_\_  
 2- \_\_\_\_\_  
 3- \_\_\_\_\_

**Resultados do antibiograma \***

Antimicrobianos	Antimicrobianos	Org. # 1	Org. # 2	Org # 3
Penicilinas	Ampicilina			
	Oxacilina			
	Penicilina			
β-lactam/inibidores de β-Lactamase	Ampicilina/Sulbactam			
	Piperacilina/Tazobactam			
	Ticarcilina/Clavulanato			
Cefalosporinas	Cefalotina/ Cefazolina			
	Cefuroxime			
	Cefoxitina			
	Cefotetan			
	Cefotaxime			
	Ceftriaxone			
	Cefoperazone			
	Ceftazidime			
Outros β - lactams	Cefepime			
	Aztreonam			
	Imipenem			
	meropenem			
Aminoglicosídeos	Ertapenem			
	Amicacina			
	Gentamicina			
Fluoroquinolonas	Tobramicina			
	Ciprofloxacina			
	Ofloxacina			
	Moxifloxacina			
Drogas com espectro para Gram (+)	Levofloxacina			
	Clindamicina			
	Eritromicina			
	Teicoplanina			
	Vancomicina			
	Quinupristin/Dalfopristin			
Outras drogas	Linezolid			
	Daptomicina			
	Rifampicina			
	Trim./Sulfa			

\* O nome dos isolados clínicos e o perfil de sensibilidade deve ser preenchido antes do transporte da cepa. A sensibilidade antimicrobiana deve ser listada pela categoria (S, I, R) de acordo com o CLSI.



**ANEXO 2: Síntese dos principais testes fenotípicos e moleculares realizados para as 15 amostras de *K. pneumoniae* resistentes a ertapenem**

N° da amostra	N° Banco LEMC	Padrão de PFGE	Teste de Hodge	SDS-PAGE		PCR		Sequenciamento			Agar-Diluição CIM (µg/mL)				Phoenix CIM (µg/mL)							
				OmpK35	OmpK36	ompK35	ompK36	CTX-M	TEM	SHV	ERT	IMP	MER	CFO	*AK	*FEP	*CAZ	*CRO	*CIP	*GM	*LEV	*PTZ
K1	37.055	G	NEG	Ausência	Ausência	>2kb	1kb	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	8	0.25	1	32	16	>16	>32	>32	>2	>8	>4	>64/4
K2	33.480	A2	NEG	Ausência	Ausência	1kb	>2kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	16	1	2	32	<=8	>16	16	>32	>2	>8	4	>64/4
K3	36.271	B	NEG	Alterada	Alterada	1kb	1kb	CTX-M-15	TEM-1	SHV-1	16	2	8	64	<=8	>16	>32	>32	>2	<=2	>4	>64/4
K5	36.502	F2	NEG	Alterada	Alterada	1kb	1kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-1	16	0.25	1	16	16	>16	32	>32	>2	<=2	>4	>64/4
K6	31.054	A3	NEG	Alterada	Alterada	1kb	>2Kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	8	1	8	64	32	>16	4	>32	>2	>8	>4	>64/4
K7	37.440	F1	NEG	Alterada	Alterada	1kb	1kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	16	<0.125	0.5	16	>32	>16	32	>32	>2	>8	>4	>64/4
K9	34.815	A1	NEG	Ausência	Ausência	NA	NA	CTX-M-2	TEM-1	SHV-1	32	0.5	1	64	<=8	>16	32	>32	>2	>8	>4	>64/4
K10	31.470	A1	NEG	Ausência	Ausência	1kb	>2kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	8	1	2	64	<=8	>16	>32	>32	>2	>8	>4	>64/4
K11	30.279	C	NEG	Ausência	Ausência	NA	NA	CTX-M-2	TEM-1	SHV-12	32	4	16	64	>32	4	16	>32	>2	>8	4	>64/4
K12	30.556	A2	POS	Ausência	Ausência	>2kb	>2kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	32	4	4	32	32	>16	32	>32	>2	>8	>4	>64/4
K13	32.548	E	NEG	Ausência	Ausência	1kb	1kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	16	4	32	128	16	4	32	16	>2	>8	>4	>64/4
K14	33.342	D2	NEG	Ausência	Ausência	NA	NA	CTX-M-2	TEM-1	SHV-1	16	1	2	64	16	>16	8	>32	>2	>8	>4	>64/4
K15	33.213	F1	NEG	Alterada	Alterada	1kb	1kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	8	0.5	1	64	>32	>16	16	16	>2	>8	>4	>64/4
K17	37.492	B	NEG	Ausência	Alterada	>2Kb	1kb	CTX-M-2	TEM-1	SHV-1	8	<0.125	1	64	<=8	>16	>32	>32	>2	<=2	>4	>64/4
K20	31.964	D1	POS	Ausência	Ausência	NA	NA	CTX-M-2	TEM-1	SHV-11	32	32	32	>512	16	>16	16	16	2	>8	2	>64/4

CIM: concentração inibitória mínima (µg/mL); \*: Testado pelo Sistema Automatizado Phoenix; ERT: ertapenem; IMP: imipenem; MER: meropenem; CFO: cefoxitina; AK: amicacina; FEP: cefepima; CAZ: ceftazidima; CRO: ceftriaxona; CIP: ciprofloxacina; GM: gentamicina; LEV: levofloxacina e TZP: piperacilina/tazobactam.



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)