



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA – PPGB

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

ANÁLISE MOLECULAR DA PREVALÊNCIA DOS GENES BETA-LACTAMASES
***bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} E *bla*_{TEM} EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM**
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO HOSPITALAR NA
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL, CEARÁ

SOBRAL – CEARÁ

2015

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

**ANÁLISE MOLECULAR DA PREVALÊNCIA DOS GENES BETA-LACTAMASES
*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} E *bla*_{TEM} EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO HOSPITALAR NA
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL, CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa

SOBRAL – CEARÁ

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

-
- R573a Rocha, Francisco Ruliglésio.
Análise molecular da prevalência dos genes beta-lactamases *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar internados na Santa casa de Misericórdia de Sobral, Ceará. / Francisco Ruliglésio Rocha . – 2015.
63 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2015.
Área de Concentração: Microbiologia aplicada.
Orientação: Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto.
Coorientação: Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa.
1. Tipagem molecular. 2. *Klebsiella pneumoniae*. I. Título.

CDD 576.192

FRANCISCO RULIGLÉSIO ROCHA

**ANÁLISE MOLECULAR DA PREVALÊNCIA DOS GENES BETA-LACTAMASES
*bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} E *bla*_{TEM} EM *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE PACIENTES COM
DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO HOSPITALAR NA
SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL, CEARÁ**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Faculdade de Medicina, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto (Orientador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

Prof. Dr. Francisco Cesar Barroso Barbosa (Examinador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner (Examinador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

Prof. Dr. Paulo Roberto Santos (Examinador)
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

Dedico este trabalho ao meu querido avô Zé Juca, minha estimada mãe, meu querido pai, minhas queridas irmãs Glesiana, Roberta e Bárbara, meu querido irmão Bruno, meus dois sobrinhos, meu cunhado Luciano, minha querida esposa Izalta que me acompanhou e me apoiou ao longo de toda esta jornada e ao meu querido e amado filho João.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelas inúmeras bênçãos e por estar sempre ao meu lado, mesmo quando me esqueço dele. Obrigado por minha família e por todas as pessoas maravilhosas que sempre me apresenta.

Ao meu orientador, Prof. Dr. **Vicente de Paulo Teixeira Pinto**, pela orientação nesta dissertação de mestrado, pela confiança e liberdade na realização deste trabalho. Não o bastante, agradeço pelo carinho e atenção que sempre teve comigo em todos os momentos ao longo desta e de outras jornadas.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. **Francisco Cesar Barroso Barbosa** pelos valiosos ensinamentos e pelo constante apoio na conclusão deste projeto. Agradeço pelo estímulo e confiança em tudo que faço. A você toda minha gratidão, respeito e consideração.

À Bioquímica **Izabelly Linhares** e a Técnica **Nádia** do Laboratório de Microbiologia da Santa Casa de Misericórdia de Sobral pela compromisso com a coleta das amostras.

À Prof. Dra. **Mirna Brayner** pelo apoio e colobaração na compra dos insumos necessários para conclusão desta pesquisa.

À Prof. Dra. **Ana Cristina Gales** ou simplesmente Ana, por ter me recebido tão bem no Simpósio Internacional de Microbiologia Clínica-SIMC 2014 e por ter me proporcionado a oportunidade de realizar meus experimentos no Laboratório ALERTA da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Muito obrigado!

Agradeço à Dra. **Lorena Fehlberg** e aos mestrandos **Jhonatha Moura**, **Ana Carolina Ramos** e **Ana Paula Streling** e a todos do Laboratório ALERTA pelo apoio que foi fundamental para conclusão do mestrado. Obrigado por terem me recebido com tanto carinho em São Paulo.

Agradeço a minha amiga **Maria Auxiliadora** do Núcleo de Biotecnologia de Sobral pela paciência e pelos ensinamentos em Biologia Molecular e ter me ajudado na realização dos experimentos.

Aos meus colegas do mestrado, em especial **Rafaele Aragão**, pela paciência e por ter compartilhado todos os momentos desta trajetória comigo.

Aos queridos **Rondinely Lima** e **Xhaulla Fonseca** pelo apoio e suporte nos experimentos em Sobral.

Aos meus amigos que de modo direto ou indiretamente colaboraram para realização deste sonho.

“Um navio no porto é seguro, mas não é para isso que os navios foram feitos.”

William Shedd

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo gram-negativo responsável por uma parcela significativa de infecções do trato urinário, respiratório e corrente sanguínea de adultos em hospitais, além de infecções em recém-nascidos em unidades de terapia intensiva. Sua importância tem aumentado devido ao surgimento de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Estas enzimas medeiam resistência aos oximino- β -lactâmicos. Em *K. pneumoniae*, a maioria das ESBL identificadas são dos tipos TEM, SHV e CTX-M. Em adição, β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos dos tipos KPC e GES tem sido detectadas nestes isolados. Surto de infecção hospitalar causados por clones de *K. pneumoniae* multiresistentes tem sido descritos em várias regiões do país. No entanto, este é o primeiro relato de caracterização genética de isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL no estado do Ceará, Brasil. Este estudo teve como objetivo, em primeiro lugar, detectar os principais genes responsáveis pela produção de ESBL em cepas de *K. pneumoniae* obtidas a partir de pacientes que desenvolveram infecções hospitalares em um hospital de cuidados terciários na região norte do estado do Ceará, de novembro de 2013 a agosto de 2014 e, em segundo lugar, analisar a similaridade genética destes isolados. Trinta e seis isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram avaliados. A detecção dos genes *bla*_{CTX-M} dos grupos 1 e 2, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_{KPC-like} e *bla*_{GES-like} foi realizada por PCR. A tipagem molecular dos isolados foi realizada por Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE). Os genes *bla*_{CTX-M} dos grupos 1 ou 2 e *bla*_{SHV-like} foram detectados em 100% dos isolados e os genes *bla*_{TEM-like} em 55,6%. Em adição, 55,6% dos produtores de CTX-M também produziram SHV e TEM. Nenhum gene *bla*_{KPC-like} e *bla*_{GES-like} foi detectado. A tipagem molecular por PFGE mostrou grande diversidade entre os isolados, contudo dois isolados coletados em diferentes clínicas mostraram o mesmo perfil de bandas e tinham os mesmos genes *bla* e, então, foram considerados como pertencentes a uma única cepa. A detecção dos genes *bla*_{CTX-M} em 100% dos isolados sugere que as enzimas CTX-M são as principais ESBL responsáveis pelo fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos nos isolados estudados. Dados apresentados neste estudo chamam atenção para um problema de resistência endêmico causado por cepas multiclonais de *K. pneumoniae* multiresistentes cujo controle passa essencialmente pelo aprimoramento das políticas de prescrição de antimicrobianos e pela implantação de programas de prevenção e controle da disseminação destes patógenos no hospital pesquisado.

Palavras-chave: Infecção hospitalar. *K. pneumoniae*. ESBL. Tipagem molecular.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a Gram-negative bacillus responsible for a significant portion of urinary tract infections, respiratory, and bloodstream of adults in hospitals, besides infections in neonates in intensive care units. Its importance has increased due the emergence of extended-spectrum beta-lactamase-producing strains (ESBLs). These enzymes mediate resistance to oxyimino- β -lactams. In *K. pneumoniae*, most of the identified ESBLs are of the TEM, SHV, and CTX-M types. In addition, carbapenem-hydrolyzing beta-lactamases of KPC and GES types has been detected in these isolates. Outbreaks of nosocomial infections caused by multidrug-resistant *K. pneumoniae* clones have been described in various regions of the country. However, this is the first report of the genetic characterization of ESBL-producing *K. pneumoniae* in the state of Ceará, Brazil. This study aimed firstly to detect the main genes responsible for ESBL production in *K. pneumoniae* strains obtained from patients who developed nosocomial infections in a tertiary support hospital in the northern region of the Ceará state, from November 2013 to August 2014 and, secondly, to analyze the genetic similarity of these isolates. Thirty-six clinical isolates of ESBL-producing *K. pneumoniae* were evaluated. The detection of *bla*_{CTX-M} groups 1 and 2, *bla*_{SHV-like}, *bla*_{TEM-like}, *bla*_{KPC-like}, and *bla*_{GES-like} genes was performed by PCR. Molecular typing of isolates was performed by pulsed-field gel electrophoresis PFGE. Groups 1 or 2 *bla*_{CTX-M} and *bla*_{SHV-like} genes were detected in 100% of the isolates and *bla*_{TEM-like} genes in 55.6%. In addition, 55.6% of CTX-M-producers also produced SHV and TEM. No *bla*_{KPC-like} and *bla*_{GES-like} genes were detected. Molecular typing by PFGE showed great diversity between the isolates, although two isolates collected in different wards showed the same banding profile and had the same bla genes and so were considered to belong to a single strain. Detection of *bla*_{CTX-M} genes in 100% of the isolates suggests that CTX-M enzymes are the major ESBLs responsible for the beta-lactam resistance phenotypes of the studied isolates. Data presented in this study call attention to an endemic resistance problem caused by multiclonal strains of multidrug-resistant *K. pneumoniae* whose control passes essentially the improvement of antimicrobial prescription policies and the implementation of prevention and control programs the spread of these pathogens in the studied hospital.

Keywords: Nosocomial infection. *K. pneumoniae*. ESBL. Molecular typing.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1- | Estrutura química dos antibióticos beta-lactâmicos..... | 20 |
| Figura 2- | Mecanismos de ação das serino- β -lactamases..... | 22 |
| Figura 3- | Cartões reagentes para identificação fenotípica dos micro- organismos..... | 28 |
| Figura 4- | Representação esquemática da técnica de MALDI-TOF MS..... | 29 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-----------|--|----|
| Tabela 1- | Características estruturais e funcionais dos principais grupos de β -lactamases..... | 23 |
|-----------|--|----|

ARTIGO I

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1- | Dendograma demonstrando o coeficiente de similaridade entre os 36 isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtores de ESBL gerado pelo programa <i>BioNumerics</i> | 47 |
| Figura 2- | Amplificação dos genes <i>bla</i> _{CTX-M-1/2} em <i>K. pneumoniae</i> | 48 |
| Figura 3- | Amplificação dos genes <i>bla</i> _{SHV-like} em <i>K. pneumoniae</i> | 49 |
| Figura 4- | Amplificação dos genes <i>bla</i> _{TEM-like} em <i>K. pneumoniae</i> | 50 |
| Figura 5- | Gel de eletroforese mostrado a ausência de amplificação dos genes <i>bla</i> _{KPC-like} nas amostras analisadas..... | 51 |
| Figura 6- | Gel de eletroforese mostrado a ausência de amplificação dos genes <i>bla</i> _{GES-like} nas amostras analisadas..... | 52 |

ARTIGO I

| | | |
|-----------|---|----|
| Tabela 1- | Primers usados neste estudo..... | 43 |
| Tabela 2- | Discordância na identificação das cepas bacterianas usando o sistema Vitek 2 e MALDI-TOF..... | 43 |
| Tabela 3- | Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados clínicos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL positivos..... | 44 |
| Tabela 4- | Comparação entre as técnicas Vitek 2 e ágar diluição na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ertapenem dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> avaliados neste estudo..... | 45 |
| Tabela 5- | Comparação entre as técnicas Vitek 2 e microdiluição em caldo cátion ajustado na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de tigeciclina dos isolados de <i>K. pneumoniae</i> avaliados neste estudo..... | 46 |
| Tabela 6- | Frequência de genes β -lactamases nos isolados de <i>K. pneumoniae</i> produtoras de ESBL..... | 46 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------------|---|
| ATCC - | American Type Culture Collection |
| CIM - | Concentração inibitória mínima |
| CLSI - | Clinical and Laboratory Standard Institute |
| CTX-M - | Cefotaximase |
| DNA - | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTP - | Desoxirribonucleotideos trifosfato |
| ES β L - | Extended Spectrum β -Lactamase |
| EUCAST - | The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| GES - | Guiana Extended Spectrum |
| KPC - | <i>Klebsiella pneumoniae</i> Carbapenemase |
| MALDI-TOF- | Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization - Time of Flight |
| M β L - | Metallo- β -lactamases |
| PBP - | Penicillin-Binding Protein |
| PCR - | Polymerase Chain Reaction |
| PFGE - | Pulsed Field Gel Electrophoresis |
| SCOPE - | Surveillance and Control of Pathogens of Epidemiological Importance |
| SENTRY | Antimicrobial Surveillance Program |
| SHV - | Sulfhydryl-Variable β -Lactamase |
| TEM - | Temoniera β -Lactamase |
| TEST | Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial |
| UNIFESP - | Universidade Federal de São Paulo |
| UTI - | Unidade de Terapia Intensiva |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|------------------------|------------------|
| μm - | Micrômetro |
| % - | Porcentagem |
| H_2S - | Ácido Sulfídrico |
| β - | Beta |
| Zn - | Zinco |
| > - | Maior que |
| \geq - | Maior ou igual |
| m/z - | Massa/carga |
| $^{\circ}\text{C}$ - | Grau Celsius |
| mL - | Mililitro |
| μl - | Microlitro |
| ng - | Nanograma |
| mM - | Milimolar |
| μM - | Micromolar |
| nm - | Nanômetro |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 18 |
| 2 | REVISÃO DE LITERATURA | 20 |
| 2.1 | Antimicrobianos β -lactâmicos..... | 20 |
| 2.1.1 | Mecanismos de ação dos antibióticos β -lactâmicos..... | 20 |
| 2.2 | Tigeciclina..... | 21 |
| 2.3 | β -lactamases..... | 21 |
| 2.3.1 | Mecanismos de ação das β -lactamases..... | 22 |
| 2.3.2 | Classificação das β -lactamases..... | 22 |
| 2.4 | Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)..... | 24 |
| 2.4.1 | ESBL do tipo TEM..... | 24 |
| 2.4.2 | ESBL do tipo SHV..... | 25 |
| 2.4.3 | ESBL do tipo CTX-M..... | 25 |
| 2.5 | Beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos..... | 26 |
| 2.5.1 | Família KPC..... | 27 |
| 2.5.2 | Família GES..... | 27 |
| 2.6 | Métodos de identificação bacteriana..... | 28 |
| 2.6.1 | Identificação fenotípica pelo sistema automatizado VITEK 2..... | 28 |
| 2.6.2 | Identificação molecular por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS) | 28 |
| 2.7 | Diagnóstico molecular de ESBL e genotipagem bacteriana..... | 29 |
| 3 | OBJETIVOS | 31 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 31 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 31 |
| 4 | ARTIGO I: Alta prevalência dos genes <i>bla</i> _{CTX-M} , <i>bla</i> _{SHV} e <i>bla</i> _{TEM} em <i>Klebsiella pneumoniae</i> produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido isoladas (ESBL) em um Hospital de Cuidados Terciários no Estado do Ceará, Brasil. | 32 |

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

53

APÊNDICES

ANEXO

1. INTRODUÇÃO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, membro da família *Enterobacteriaceae*, cujo tamanho varia de 0,3 a 1 µm de diâmetro e de 0,6 a 6 µm de comprimento. É um micro-organismo imóvel, não-esporulado, anaeróbio facultativo, fermentador de glicose, não produtor de ácido sulfídrico (H₂S) e é capaz de utilizar o citrato como fonte de carbono, além de hidrolisar uréia (KONEMAM *et al.*, 2001).

É uma bactéria ubíqua, encontrada no ambiente em fontes como água, solo, plantas e esgoto; e como saprófitas em mucosas de seres humanos e animais, podendo ser encontrada colonizando de 1 a 6% a orofaringe e de 5 a 38% as fezes de pessoas normais, sendo que estes valores podem aumentar até 19% em orofaringe e 77% em material fecal quando o paciente se encontra hospitalizado (PODSCHUN & ULLMANN, 1998).

K. pneumoniae é responsável por causar infecções relacionadas à assistência à saúde, tanto no meio ambiente comunitário quanto no hospitalar (SCARPATE & COSSATIS, 2009). Na comunidade, este patógeno é reconhecido como um importante causador de pneumonia comunitária, em pacientes com fatores predisponentes tais como idade avançada, doenças respiratórias crônicas, diabetes e alcoolismo (TOLENTINO, 2009). Em alguns casos, a pneumonia comunitária pode avançar para quadros de bacteremia e meningite (LENVINSON & JAWETZ, 2005).

No ambiente hospitalar, *K. pneumoniae* é responsável por uma parcela significativa de infecções do trato urinário, respiratório e corrente sanguínea de adultos (PODSCHUN & ULLMANN, 1998; ANDRADE *et al.*, 2014), além de infecções em neonatos internados em unidades de terapia intensiva (CASSETARI *et al.*, 2009). Sua transmissão ocorre por contato direto ou por fonte comum, podendo ocorrer em qualquer área física hospitalar e acometer pacientes clínicos, cirúrgicos e pediátricos (MARRA, 2002). Nas unidades de terapia intensiva (UTI), a colonização por cepas de *K. pneumoniae* multirresistentes está diretamente relacionada a fatores como o uso prolongado de antibióticos (BRANGER *et al.*, 1998), duração do período de internação (POLLACK, 1972), e a grande capacidade de sobrevivência e disseminação deste micro-organismo no ambiente hospitalar (TOLENTINO, 2009).

Sua importância tem aumentado ao longo dos últimos anos devido ao surgimento de cepas produtoras de Beta-Lactamases de Espectro Estendido (ESBL). Estas enzimas são produzidas por alguns bacilos Gram-negativos que medeiam resistência aos oxymino-β-lactâmicos tais como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (BUSH & JACOBY, 2010). Além disto, as ESBL estão frequentemente localizadas em plasmídeos que podem abrigar genes de

resistência a outros antibióticos, incluindo trimetropim, tetraciclina, sulfonamidas e cloranfenicol, bem como aos aminoglicosídeos (TORTORA, FUNKE & CASE, 2012; LIVERMORE, 2012).

Os surtos causados por *K. pneumoniae* produtoras de ESBL geralmente decorrem da transferência de pacientes colonizados entre unidades de internação e/ou entre hospitais ou podem estar associados ao uso abusivo de β -lactâmicos que poderão exercer pressão seletiva favorecendo o crescimento de cepas produtoras de ESBL (SCARPATE & COSSATIS, 2009).

Vale ressaltar que infecções hospitalares causadas por bactérias multirresistentes estão associadas com aumento dos custos de internação, hospitalização prolongada e, principalmente, aumento das taxas de morbidade e mortalidade (EVANS *et al.*, 2007).

A análise dos dados do programa de Avaliação e Vigilância de Tigeciclina (TEST) coletados em diversos países demonstrou que a taxa de produção de ESBL foi maior entre isolados de *K. pneumoniae* coletados na América Latina seguido pela Ásia e Pacífico, Europa e América do Norte (44,0%, 22,4%, 13,3%, e 7,5%, respectivamente) (REINERT *et al.*, 2007).

Recentemente, a análise dos dados do Programa de Vigilância Antimicrobiana (SENTRY), atualizou a frequência e as taxas de resistência de bacilos Gram-negativos isolados em 10 centros médicos na América Latina entre 2008-2010. Neste estudo, as taxas de ESBL entre *Klebsiella* spp., foram de 60,4%, 59,2%, 49,9%, e 33,3 na Argentina, Chile, Brasil e México, respectivamente (GALES *et al.*, 2012).

Na América Latina, *K. pneumoniae* é a terceira causa de infecções de corrente sanguínea, e o quarto patógeno mais frequentemente isolado em pneumonias e infecções de pele e tecidos moles (GALES *et al.*, 2012). No Brasil, de acordo com o estudo do grupo SCOPE, *K. pneumoniae* ocupa o terceiro lugar como causador de infecções de corrente sanguínea associadas à infecção hospitalar (MARRA *et al.*, 2011).

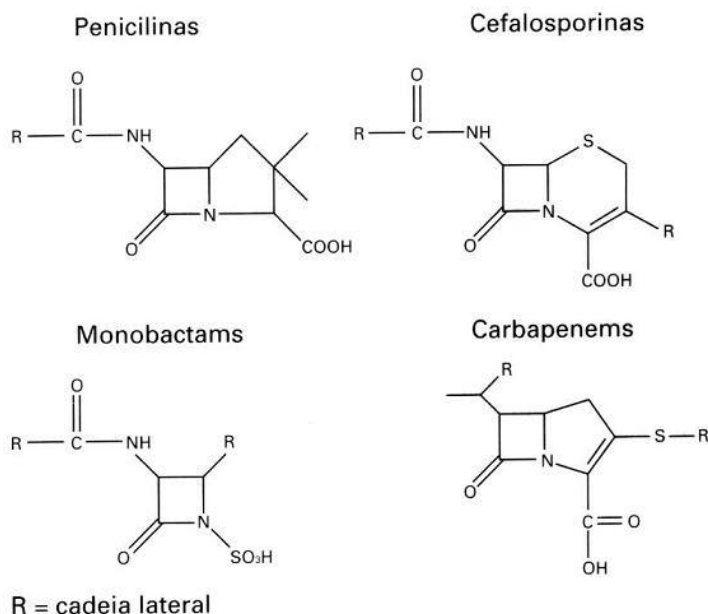
Diante deste cenário e de acordo com o nosso conhecimento, esta é a primeira iniciativa visando elucidar os mecanismos genéticos envolvidos na resistência aos antimicrobianos β -lactâmicos em cepas de *K. pneumoniae* isoladas do ambiente hospitalar no estado do Ceará. Então, diante da escassez destas informações, este estudo poderá colaborar na determinação da prevalência destes patógenos na região, a partir da geração de informações epidemiológicas que poderão auxiliar os profissionais de saúde na prevenção da disseminação destes agentes e na escolha de uma terapia mais apropriada.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antimicrobianos β -lactâmicos

Os antibióticos β -lactâmicos estão inclusos num grupo de fármacos derivados das penicilinas que engloba mais de 50 agentes quimicamente relacionados e que apresentam uma estrutura central comum, o anel β -lactâmico, que é quem determina o mecanismo de ação destes fármacos. A associação deste anel com um radical específico (radicais do carbono 6 do anel β -lactâmico) dá origem a diferentes grupos de antimicrobianos β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) (Figura 1). Vale ressaltar que as diferentes cadeias laterais proporcionam diversos perfis farmacodinâmicos, distintos espectros de ação antibacteriana e diferentes níveis de resistência as β -lactamases (CASELLI *et al.*, 2001; SUÁREZ & GUDIOL, 2009).

Figura 1 - Estrutura química dos antibióticos beta-lactâmicos



Fonte: Williams et al., 1999

2.1.1 Mecanismos de ação dos antibióticos β -lactâmicos

Os antimicrobianos β -lactâmicos interferem de modo específico na síntese dos peptidoglicanos, inibindo as transpeptidases (proteínas de ligação da penicilina [PBP]) que fazem a junção dos açúcares N-acetilglicosamina (NAG) e Ácido N-acetilmurâmico (NAM),

bloqueando a síntese de peptidoglicana que resulta na ativação de autolisinas que degradam a parede celular e causam a lise osmótica da célula (CHAMBERS, 2010; PETRI, 2005).

2.2 Tigeciclina

Este é o primeiro antibiótico da família das glicilciclinas com estrutura semelhante às tetraciclinas. Age por inibição de síntese protéica se ligando à subunidade 30s do ribossomo bacteriano e é bacteriostática. É ativa contra bactérias Gram negativas, Gram positivas e anaeróbios, porém não tem atividade contra espécies de *Pseudomonas* (ROSE & RYBAK, 2006).

2.3 β -lactamases

A produção de β -lactamases é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos β -lactâmicos em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes (BUSH & JACOBY, 2010). Estas enzimas podem ser divididas com base em seu espectro hidrolítico em: beta-lactamases ou penicilinases, beta-lactamases de espectro estendido (ESBL) e beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos, também conhecidas como carbapenemases.

As beta-lactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel β -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, inativando sua ação antimicrobiana (LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001). Exemplos deste grupo incluem as β -lactamases de espectro restrito TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1, SHV-11 e SHV-89 que não têm atividade contra cefalosporinas de terceira e quarta geração (BUSH & JACOBY, 2010).

No entanto, com a introdução das cefalosporinas de espectro estendido na prática médica, em meados dos anos de 1980, tais como cefotaxima e ceftazidima, beta-lactamases de espectro estendido (*Extended Spectrum Beta-Lactamases-ESBLs*) começaram a ser identificadas em amostras clínicas resistentes a estes novos fármacos (BRADFORD, 2001). Estas enzimas são capazes de hidrolisar antibióticos β -lactâmicos de terceira e quarta geração, restando como opção terapêutica apenas os carbapenêmicos (PATERSON & DOI, 2007). São importantes representantes deste grupo as ESBL TEM-3, TEM-10, TEM-26, SHV-2, SHV-3 e SHV-115, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15, que representam as β -lactamases mais estudadas atualmente (BUSH & JACOBY, 2010).

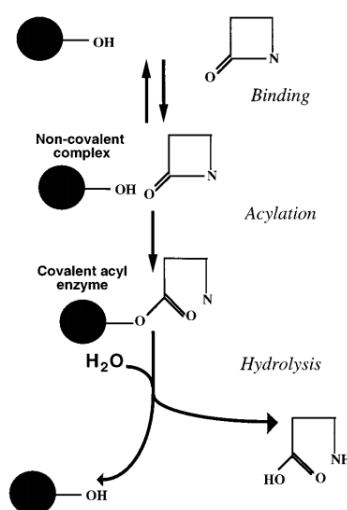
Os carbapenêmicos que são os antibióticos β -lactâmicos de espectro mais potente e amplo não ficaram ílesos. A produção de carbapenemases que são β -lactamases capazes de inativar os carbapenêmicos e todos os outros antibióticos β -lactâmicos tem sido constantemente detectados em patógenos Gram-negativos (PATEL & BONOMO, 2011). Nesta categoria,

encontram-se as carbapenemases da classe A, tais como GES-2, KPC-2 e KPC-10 (BUSH & JACOBY, 2010).

2.3.1 Mecanismos de ação das β -lactamases

O mecanismo de ação destas enzimas se dá inicialmente por meio de uma ligação não-covalente com o anel β -lactâmico (Figura 2). Em seguida, o anel é “atacado” pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de serina no sítio ativo da enzima formando um grupo acil-éster covalente. Posteriormente, a hidrólise do éster libera a enzima ativa e a droga inativa, além de uma molécula de água (LIVERMORE, 1995). Após o processo de hidrólise do agente antimicrobiano, a enzima é regenerada ficando livre para inativar outras moléculas (DRAWZ & BONOMO, 2010).

Figura 2: Mecanismos de ação das serino- β -lactamases



Fonte: Livermore et al., 1995.

2.3.2 Classificação das β -lactamases

Devido à grande importância das β -lactamases e a grande variedade das mesmas, surgiram métodos de classificação a fim de facilitar os estudos com estas enzimas. Tradicionalmente, as β -lactamases apresentam dois esquemas de classificação em razão da sua diversidade estrutural e preferência de substrato. O esquema proposto por Ambler (AMBLER, 1980) classifica as β -lactamases em quatro classes moleculares: A) Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinas e carbenicilinas; B) Metallo- β -lactamases (M β L); C) Cefalosporinas cromossomais (AmpC); e D) Oxacilinas. As enzimas das classes A, C e D são serino- β -lactamases, pois requerem um resíduo de serina no sítio ativo da enzima para

hidrolisarem seus substratos. Já as enzimas da classe B necessitam de um íon zinco (Zn) para hidrolisarem seus substratos e são denominadas metalo- β -lactamases (M β L). Nesta classificação, as enzimas do tipo ESBL pertencem à classe A.

O esquema proposto por Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação por inibidores de β -lactamases. Nesta classificação, as ESBLs pertencem ao subgrupo 2be que inclui as enzimas que hidrolisam penicilinas e os oxymino- β -lactâmicos tais como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam a uma taxa geralmente >10% do que as benzilpenicilinas, além de inibição por ácido clavulânico (BUSH, 1989; BUSH, JAOBY & MEDEIROS, 1995; BUSH & JACOBY, 2010).

A classificação de BUSH (BUSH, 1989) foi a primeira a correlacionar o substrato preferencial e propriedades inibitórias com a estrutura molecular da enzima. Recentemente, esta classificação foi atualizada (BUSH & JACOBY, 2010). A tabela 1 apresenta a correlação entre a classificação molecular de AMBLER (AMBLER, 1980) e a de BUSH e JACOBY (BUSH & JACOBY, 2010) e as características funcionais das β -lactamases.

Tabela 1: Características estruturais e funcionais dos principais grupos de β -lactamases expandido de BUSH *et al.*, 1995

| Bush-Jacoby (2010) | Ambler, 1980 | Substrato(s) Distintivo | Inibição ^a AC ou TZB | Características funcionais |
|--------------------|------------------|--|---------------------------------|--|
| Grupo Funcional | Classe Molecular | | | |
| 1 | C | Cefalosporinas | Não | Maior hidrólise de cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa cefamicinas |
| 1e | C | Cefalosporinas | Não | Aumento da hidrólise de ceftazidima e frequentemente outros oxymino- β -lactâmicos |
| 2 ^a | A | Penicilinas | Sim | Maior hidrólise de benzilpenicilinas que cefalosporinas |
| 2b | A | Penicilinas, cefalosporinas de primeira geração | Sim | Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas. Neste grupo temos as β -lactamases clássicas TEM-1, TEM-2, TEM-13, SHV-1, SHV-11 e SHV-89 |
| 2be | A | Cefalosporinas de espectro estendido, Monobactâmicos | Sim | Aumento da hidrólise dos oxymino- β -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam). Neste grupo temos as β -lactamases de espectro estendido (ESBL) TEM-3, TEM-10, TEM-26, SHV-2, SHV-3 e SHV-115, CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8 e CTX-M-15 |
| 2br | A | Penicilinas | Não | Resistentes ao ácido clavulânico, sulbactam, e tazobactam |
| 2ber | A | Cefalosporinas de espectro estendido, Monobactâmicos | Não | Aumento da hidrólise dos oxymino- β -lactâmicos combinado com a resistência ao ácido clavulânico, sulbactam, e tazobactam |

| | | | | |
|----------------|---|--------------------------------------|----------|---|
| 2c | A | Carbenicilina | Sim | Aumento da hidrólise de carbenicilina |
| 2ce | A | Carbenicilina, cefepima | Sim | Aumento da hidrólise de carbenicilina, cefepima e ceftazidima |
| 2d | D | Cloxacilina | Variável | Aumento da hidrólise de cloxacilina ou oxacilina |
| 2de | D | Cefalosporinas de espectro estendido | Variável | Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oxyimino- β -lactâmicos |
| 2df | D | Carbapenêmicos | Variável | Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e carbapenêmicos |
| 2e | A | Cefalosporinas de espectro estendido | Sim | Hidrolisa cefalosporinas e são inibidas por ácido clavulânico, mas não aztreonam |
| 2f | A | Carbapenêmicos | Variável | Aumento da hidrólise de carbapenêmicos, oxyimino- β -lactâmicos e cefamicinas. Neste grupo temos as β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos ou carbapenemases GES-2, KPC-2 e KPC-10 |
| 3 ^a | B | Carbapenêmicos | Não | Hidrólise de espectro amplo incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos |
| 3b | B | Carbapenêmicos | Não | Hidrólise preferencial de carbapenêmicos |

^aAC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam. (Fonte: BUSH & JACOBY, 2010)

2.4 Beta-lactamases de espectro estendido (ESBL)

A definição atual de ESBL é restrita as β -lactamase da classe A de Ambler e estão distribuídas no grupo 2be da classificação de Bush-Jacoby-Medeiros. Este grupo, reúne β -lactamases com atividade contra cefalosporinas de espectro estendido (ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona) e inibição por inibidores de β -lactamases tais como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (POIREL, BONNIN & NORDMANN, 2012).

As ESBL começaram a ser identificadas a partir dos anos de 1980, originadas a partir de mutações pontuais em β -lactamases do tipo TEM-1, TEM-2 e SHV-1 que não possuem atividade de espectro estendido (JACOBY & MUNOS-PRICE, 2005). O surgimento destas enzimas veio em resposta à introdução das cefalosporinas de terceira geração no início dos anos 1980, exemplificando a capacidade de adaptação apresentada por patógenos causadores de infecções hospitalares (PATERSON & BONOMO, 2005). Adicionalmente, com o aumento da pressão seletiva, surgiu a enzima CTX-M que hidrolisa preferencialmente cefotaxima, tornando-se prevalente em quase todo o mundo, particularmente em isolados clínicos de *K. pneumoniae* e *Escherichia coli* (LIVERMORE *et al.*, 2007; JONES *et al.*, 2009).

Em *K. pneumoniae*, a maioria das ESBL identificadas são dos tipos TEM, SHV e CTX-M (BRADFORD, 2001; BONNET, 2004). No entanto, existem ESBL menos comuns não relacionadas com TEM, SHV ou CTX-M, incluindo as enzimas da família BEL-1, BES-1, SFO-1, TLA-1, TLA-2 que não serão objetos deste estudo.

2.4.1 ESBL do tipo TEM

Em 1960, foi descrita a primeira β -lactamase do tipo TEM. Ela foi identificada em uma amostra clínica de *E. coli* isolada da corrente sanguínea de uma paciente grega chamada Temoniera (TEM) e foi denominada de TEM-1 (DATTA & KONTOMICHALOU, 1965). Esta enzima hidrolisa facilmente penicilinas e cefalosporinas de primeira geração, tais como cefaloridina e cefalotina e são fortemente inibidas por ácido clavulânico e tazobactam (BUSH & JACOBY, 2010). TEM-1 é a β -lactamase mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas (BRADFORD, 2001). A β -lactamase TEM-2 sofreu uma única mutação em relação a sua enzima precursora TEM-1, porém esta mutação não foi suficiente para modificar seu espectro hidrolítico e, portanto, são classificadas como β -lactamases de espectro restrito (BARTHÉLÉMY, PÉDUZZI & LABIA, 1985; BRADFORD, 2001).

A primeira ESBL do grupo TEM foi detectada em um isolado clínico de *K. pneumoniae* coletado na França em 1987 e foi denominada como TEM-3 (SOUGAKOFF, GOUSSARD & COURVALIN, 1988). Atualmente, 222 variantes TEM já foram identificados, sendo que muitas delas (n=103) exibem um fenótipo ESBL (<http://www.lahey.org/Studies/>).

2.4.2 ESBL do tipo SHV

SHV (*sulphydryl variable*) é uma β -lactamase comumente encontrada em *K. pneumoniae*, sendo responsável por até 20% da resistência a ampicilina mediada por plasmídeo nesta espécie (TZOUVELEKIS & BONOMO, 1999). Em 1983, foi descrito na Alemanha, o primeiro relato de uma SHV de espectro estendido, denominada SHV-2, encontrada em um isolado clínico de *K. ozaenae* (KNOTHE *et al.*, 1983). O sequenciamento revelou que uma substituição de glicina por serina na posição 238 deu a esta enzima propriedades de espectro estendido, diferenciando-a da sua progenitora SHV-1 (PATERSON & BONOMO, 2005).

Em 1988, SHV-3 e SHV-4 foram descritas em amostras clínicas de *K. pneumoniae* recuperadas de hospitais na França (JARLIER *et al.*, 1988; BURÉ *et al.*, 1988). Desde então, inúmeros relatos de surtos envolvendo *K. pneumoniae* produtoras de ESBL têm sido reportados (COQUE, BAQUERO & CANTON, 2008). Atualmente, 191 variantes SHV já foram identificados, sendo que muitas delas (n=47) exibem um fenótipo ESBL (<http://www.lahey.org/Studies/>).

2.4.3 ESBL do tipo CTX-M

As enzimas CTX-M começaram a ser identificadas em enterobactérias no início dos anos de 1990, e sua explosiva propagação ocorreu na década passada, levando atualmente a uma situação endêmica em todo o mundo.

As ESBL do tipo CTX-M têm a propriedade de conferir resistência a todas as cefalosporinas de espectro estendido, tendo a cefotaxima e ceftriaxona como substratos preferenciais. Além disto, são codificadas por genes *bla*_{CTX-M}, localizados em plasmídios, os quais podem abrigar outros genes que podem codificar resistência aos aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas e trimetropim (LIVERMORE *et al*, 2008).

O primeiro relato de uma ESBL do tipo CTX-M foi descrito em 1989 em um isolado clínico de *E. coli* na Alemanha, sendo designada CTX-M-1 em referência a atividade hidrolítica contra cefotaxima (BAUERNFEIND, GRIMM & SCHWEIGHART, 1990). Naquele período, observou-se um surto de cepas de *Salmonella* resistentes a cefotaxima na América do Sul, inicialmente em único hospital em La Plata e de lá para unidades neonatais de hospitais pediátricos em Buenos Aires, Norte da Argentina e Uruguai (ROSSI *et al*, 1995). Posteriormente, o sequenciamento da estrutura deste gene identificou a enzima CTX-M-2 como responsável por àquele surto (BAUERNFEIND *et al.*, 1996).

No Brasil, os primeiros relatos de uma enzima pertencente à família CTX-M foram anotados em amostras clínicas de enterobactérias coletadas em vários hospitais no Rio de Janeiro entre 1996 e 1997 (BONNET *et al.*, 2000). Nos últimos anos, as ESBL da família CTX-M apresentaram uma rápida expansão do número de enzimas identificadas, aumentando de 3% para 10% de todas as β -lactamases conhecidas entre 2000 e 2012, respectivamente (BUSH, 2013).

A propagação mundial destas enzimas ao longo dos últimos 10-15 anos é um dos fenômenos mais rápidos e importantes que se tem observado em termos de resistência aos antibióticos (POIREL, BONNIN & NORDMANN, 2012). Até o momento, já foram identificadas 166 variantes CTX-M em todo o mundo (<http://www.lahey.org/Studies/>). Estas variantes estão atualmente agrupadas de acordo com a similaridade da sequência de aminoácidos em cinco grupos filogenéticos: CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25 (NASEER & UNDSFJORD, 2011).

2.5 Beta-lactamases que hidrolisam carbapenêmicos

Os carbapenêmicos representam os fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes produtores de ESBL. Contudo, a resistência aos carbapenêmicos está sendo cada vez mais detectada, estando principalmente relacionada a ação de enzimas carbapenemases (PEIRANO *et al.*, 2009). Estas enzimas são agrupadas dentro das classes moleculares A, B e D de Ambler e tornaram-se epidemiologicamente importantes em diferentes partes do mundo.

Dentro da classe A, as enzimas KPC (*Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase) são as carbapenemases mais frequentemente encontradas, principalmente em enterobactérias (PEIRANO *et al.*, 2009). Estas enzimas eram poucas conhecidas durante os anos de 1980, porém tornaram-se uma das mais importantes carbapenemases desde a descoberta da primeira KPC em um isolado clínico de *K. pneumoniae* nos Estados Unidos em 1996 (YIGIT *et al.*, 2001).

Além das enzimas KPC, outra importante representante da classe A são as enzimas da família GES (*Guiana Extended-Spectrum β -lactamase*) que embora tenham sido reconhecidas inicialmente como ESBL, atualmente são classificadas como carbapenemases devido a mudanças no perfil hidrolítico de suas variantes que passou a incluir os carbapenêmicos (BEBRONE *et al.*, 2013).

2.5.1 Família KPC

A primeira descrição de uma KPC (KPC-1) ocorreu em um isolado de *K. pneumoniae* nos Estados Unidos em 1996 e, desde então, expandiu-se para uma ampla área geográfica (YIGIT *et al.*, 2001). Atualmente, as bactérias produtoras de KPC são consideradas endêmicas nos Estados Unidos, Argentina, Brasil, Colômbia, China, Grécia, Israel, Itália, Polônia e Porto Rico (MUNOZ-PRICE *et al.*, 2013; NORDMANN & POIREL, 2014). No Brasil, o primeiro relato de uma KPC ocorreu em isolados clínicos de *K. pneumoniae* na cidade de Recife, Pernambuco (MONTEIRO *et al.*, 2009).

As enzimas do tipo KPC são frequentemente encontradas em *K. pneumoniae* associadas com infecções nosocomiais, tais como infecções do trato urinário, sepse, pneumonia e infecções intra-abdominais, porém não é comum sua ocorrência em infecções adquiridas na comunidade (CHEN *et al.*, 2014). As β -lactamases do tipo KPC podem hidrolisar todos os antibióticos β -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e ácido clavulânico (YIGIT *et al.*, 2001; PAPP-WALLACE *et al.*, 2010). Desde o seu primeiro registro, já foram identificadas 22 variantes desta família (<http://www.lahey.org/Studies/>).

2.5.2 Família GES

O gene *bla*_{GES-1} foi inicialmente caracterizado em um isolado de *K. pneumoniae* coletado na França de um paciente vindo da Guiana Francesa (POIREL *et al.*, 2000). Desde então, GES-1 já foi identificada na Argentina, Brasil, Portugal e Holanda em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens* (NAAS, POIREL & NORDMANN, 2008).

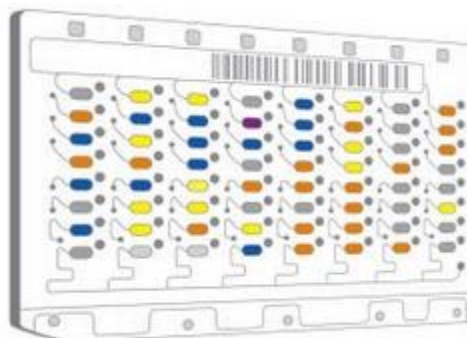
GES-1 não é uma carbapenemase, porém algumas variantes entre as 24 atualmente conhecidas (<http://www.lahey.org/Studies/>), incluindo GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 e GES-18 ampliaram seu espectro hidrolítico para os carbapenêmicos e, portanto, são atualmente classificadas como carbapenemases (BEBRONE *et al.*, 2013).

2.6 Métodos de identificação bacteriana

2.6.1 Identificação fenotípica pelo sistema automatizado VITEK 2

No processo de identificação bacteriana pelo sistema automatizado VITEK 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France) utilizam-se cartões reagentes contendo substratos liofilizados que reagem bioquimicamente com a amostra biológica gerando um perfil fenotípico específico que é comparado com um banco de dados, resultando na identificação do micro-organismo em aproximadamente 5 a 8 horas (BIOMÉRIEUX, 2014) (**Figura 3**).

Figura 3 – Cartões reagentes para identificação fenotípica dos micro-organismos



Fonte: www.biomerieux.com.br

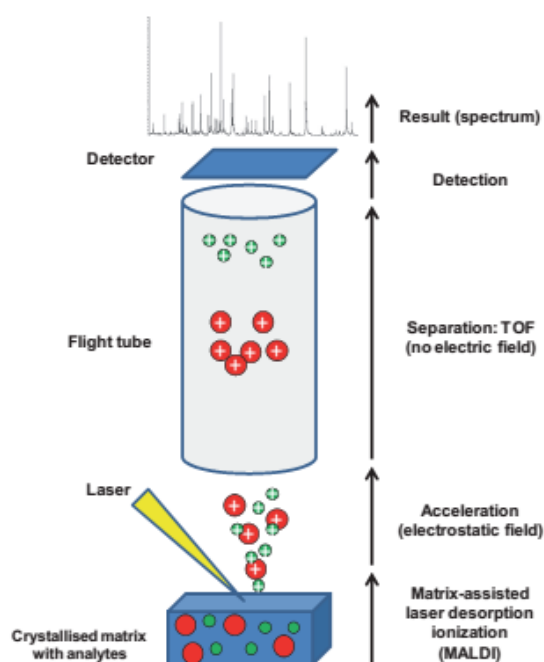
Os substratos citados mensuram as diferentes atividades metabólicas dos micro-organismos, tais como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras (PINCUS, 2005).

2.6.2 Identificação molecular por espectrometria de massa (MALDI-TOF MS)

A ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), seguido pela detecção em um analisador do tipo tempo de voo (TOF) tem sido um dos métodos mais amplamente utilizados para a análise de biomoléculas. Esta metodologia é rápida, simples, precisa e de baixo-custo para identificação de rotina de isolados bacterianos, no entanto os custos para aquisição e implantação do equipamento ainda são relativamente altos (PATEL, 2013).

Esta técnica consiste na ionização de átomos ou moléculas de uma amostra por um laser, separação destes átomos ou moléculas em função da sua relação massa/carga (m/z) dentro de um tubo metálico submetido a vácuo, com as moléculas menores atingindo o detector antes das moléculas maiores, resultando na geração de espectros de massa (Figura 4). Estes espectros são comparados com um banco de dados de espectros de referência, resultando na identificação do organismo (PATEL, 2014).

Figura 4 – Representação esquemática da técnica de MALDI-TOF MS



Fonte: CROXATTO, PROD'HOM & GREUB, 2012

O MALDI-TOF tem sido utilizado para caracterizar uma grande variedade de micro-organismos incluindo bactérias, fungos e vírus (GIEBEL *et al.*, 2010). Adicionalmente, esta técnica tem sido aplicada na investigação e identificação de proteínas e peptídeos, na genotipagem e análise de polimorfismos do DNA, na investigação de modificações pós-transcricionais no RNA, dentre outras inúmeras aplicações (MARVIN, ROBERTS & FAY, 2003; CROXATTO, PROD'HOM & GREUB, 2012).

2.7 Diagnóstico molecular de ESBL e genotipagem bacteriana

A detecção molecular de ESBL oferece maior potencial diagnóstico e informações epidemiológicas mais precisas, principalmente no controle de surtos. A identificação dos genes

bla responsáveis pela produção de ESBL pode ser obtida por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), mediante o uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos. Estes iniciadores geralmente são escolhidos por se ligar em regiões que não sofreram mutações pontuais, contudo não discrimina qual variante daquela ESBL específica a bactéria possui (PATERSON & BONOMO, 2005; SHAH *et al.*, 2004). Com isso, a confirmação de variantes alélicas ou identificação de uma nova variante requerer o sequenciamento de toda a região codificadora do gene (D'ANDREA *et al.*, 2013).

Além disto, compreender a distribuição e a similaridade genética entre os microorganismos é de suma importância para determinar a epidemiologia das infecções nosocomiais e auxiliar nos programas de prevenção e controle de disseminação de patógenos no ambiente hospitalar (ZAMPARETTE, 2014). Existem várias metodologias para genotipagem bacteriana, sendo que as mais utilizadas são: *Enterobacterial repetitive intergenic consensus sequence-based* (ERIC-PCR), *Random amplification of polymorphic DNA* (RAPD), *Multilocus Sequence Typing* (MLST) e *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Contudo, a PFGE é considerada a metodologia padrão ouro, devido a sua excelente capacidade discriminatória (PFALLER *et al.*, 2001). Esta técnica foi desenvolvida em 1984, tendo sido utilizada inicialmente para separação do cromossomo de *Saccharomyces cerevisiae* (SCHWARTZ & CANTOR, 1984).

A metodologia de PFGE utiliza uma enzima de restrição específica que corta o DNA cromossômico em locais determinados, conhecidos como sítios de restrição. Estas enzimas são selecionadas para gerar um número pequeno de fragmentos de DNA que são separados com base no seu tamanho. Inicialmente, a suspensão bacteriana é misturada com agarose que proporciona estabilidade ao DNA nas etapas etapas de lise celular (MAGALHÃES *et al.*, 2005). Após a etapa lise e remoção dos restos celulares, o DNA é digerido com uma enzima de restrição e submetido a uma eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Diferentemente de uma eletroforese convencional, a PFGE separa os fragmentos de restrição de tamanhos grandes, através de um campo elétrico que muda de direção e intensidade dos pulsos elétricos em diferentes espaços de tempo, gerando um padrão de bandas que será o padrão cromossômico daquela amostra, ou uma espécie de impressão digital do microorganismo (CANTOR, SMITH, MATHEW, 1988; CDC, 2015).

3- OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Investigar a ocorrência de genes β -lactamases e analisar a similaridade genética de espécimes clínicos de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de pacientes em um hospital de cuidados terciários na região norte do Estado do Ceará, Brasil.

3.2 Objetivos específicos

1. Reidentificar os isolados clínicos de *K. pneumoniae* por espectrometria de massa (MALTI-TOF);
2. Investigar o perfil de sensibilidade aos antimicrobianos das cepas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL pelo sistema automatizado Vitek 2;
3. Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos isolados resistentes a tigeciclina pelo método da microdiluição em caldo Muller-Hinton cátion ajustado;
4. Investigar a ocorrência dos genes *bla*_{CTX-M-1/2}, *bla*_{SHV-like}, e *bla*_{TEM-like} que codificam resistência as cefalosporinas de espectro estendido por PCR;
5. Investigar a ocorrência dos genes *bla*_{KPC-like} e *bla*_{GES-like} que codificam resistência aos carbapenêmicos por PCR;
6. Analisar a similaridade genética dos isolados clínicos de *K. pneumoniae* por *Pulsed-Field Gel Eletrophoresis* (PFGE).

4. ARTIGO I

Alta prevalência dos genes beta-lactamases *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} em *Klebsiella pneumoniae* isoladas de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar em um Hospital de Cuidados Terciários no Ceará, Brasil.

Introdução

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo, membro da família *Enterobacteriaceae*. É uma importante causa de infecções relacionadas à assistência à saúde tais como pneumonias, bacteremias e infecções em outros órgãos, tanto no ambiente comunitário quanto no hospitalar (SCARPATE & COSSATIS, 2009; TRABULSI & ALTERTHUM, 2008).

Sua importância tem aumentado ao longo dos últimos anos devido o surgimento de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL). Estas enzimas são produzidas por alguns bacilos Gram-negativos e medeiam resistência aos oxymino- β -lactâmicos tais como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam (BUSH & JACOBY, 2010). Em *K. pneumoniae*, a maioria das ESBL identificadas em isolados clínicos são dos tipos TEM, SHV e CTX-M (BRADFORD, 2001; BONNET, 2004). Além disto, β -lactamases que hidrolisam carbapenêmicos, tais como KPC e GES tem sido detectadas em *K. pneumoniae* associadas com infecções nosocomiais (CHEN *et al.*, 2014; NAAS, POIREL & NORDMANN, 2008).

Assim, a identificação de elementos genéticos envolvidos na resistência aos antimicrobianos em cepas de *K. pneumoniae* e a determinação de sua prevalência é um ferramenta útil na geração de informações epidemiológicas que poderão auxiliar aos profissionais de saúde na prevenção da disseminação destes patógenos e na escolha de uma terapia mais adequada. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar geneticamente cepas clínicas de *K. pneumoniae* isoladas de pacientes em um hospital de cuidados terciários na região norte do Estado do Ceará, Brasil, através da investigação dos genes *bla*_{CTX-M}, *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} por PCR e de tipagem molecular por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE).

Métodos

Cepas bacterianas

Um total de 42 isolados clínicos de *K. pneumoniae* produtores de ESBL coletados de Novembro de 2013 a Agosto de 2014 em um hospital de cuidados terciários na região norte do Estado do Ceará, Brasil, foram objeto deste estudo. A identificação bacteriana foi realizada pelo sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). A confirmação da identificação inicial dos isolados foi realizada por espectrometria de massa no Microflex LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram obtidas de pacientes internados em unidades de cuidados intensivos e enfermarias clínicas (Figura 1). As cepas

produtoras de ESBL foram coletadas principalmente de sangue, secreções de ferida cirúrgica, urina e aspirado traqueal.

Detecção fenotípica de ESBL e teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A detecção fenotípica de ESBL e os testes de sensibilidade aos antimicrobianos foram realizados pelo sistema automatizado Vitek 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, France). Adicionalmente, os isolados resistentes ao ertapenem tiveram sua concentração inibitória mínima (CIM) confirmada pelo método da diluição em ágar Muller-Hinton (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) de acordo com as recomendações do CLSI, 2014. Em adição, a CIM dos isolados não sensíveis a tigeciclina foram confirmadas pelo método da microdiluição em caldo Muller-Hinton cátion ajustado (Oxoid, Basingstoke, Inglaterra) de acordo com o CLSI, 2014. No entanto, a sensibilidade à tigeciclina foi interpretada de acordo com recomendações do EUCAST (2015), uma vez que os pontos de cortes pelo CLSI para tigeciclina ainda não estão disponíveis. A CIM obtida pelos métodos da diluição em ágar e microdiluição em caldo foram considerados o padrão de referência em relação aos resultados obtidos pelo Vitek 2. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* ATCC 25922 e *S. aureus* ATCC 29213 foram usados como controle de qualidade dos testes de sensibilidade.

Extração do DNA e detecção dos genes *bla* por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram inicialmente reativadas em caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) por 24 horas a 37°C. Após, uma alíquota de 1,0 mL, contendo aproximadamente 10⁹ células/ml de suspensão bacteriana foi utilizada para extração do DNA genômico, utilizando o Kit “Easy DNA”™ (Invitrogen, Carlsbad, EUA) conforme recomendações do fabricante. Os genes β -lactamases foram investigados por PCR usando primers previamente descritos (Tabela 1). As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25 μ l, contendo aproximadamente 300 ng de DNA, 0,05 U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 2 mM de MgCl₂, 0,5 μ M de cada primer e tampão de reação 1X (concentração final). As amplificações foram realizadas no termiclador da eppendorf com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 10 minutos, seguidos de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto, 56°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto e uma etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Para cada reação, o DNA de uma bactéria caracterizada geneticamente pelo Laboratório ALERTA (Universidade Federal de São Paulo - Disciplina de Infectologia - UNIFESP) como produtora do gene alvo foi usada como controle

positivo da reação. Os produtos amplificados foram revelados em gel de agarose a 1% em tampão TBE 0,5X.

Análise da relação genética por *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE)

A similaridade genética entre os isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL foi avaliada por PFGE (Pfaller *et al.* 1992) no Laboratório Alerta (Universidade Federal de São Paulo-Disciplina de Infectologia-UNIFESP). O DNA cromossômico foi incorporado em blocos de gel de agarose a 2% (Invitrogen, Carlsbad, EUA) e digerido com a enzima de restrição *Spe* I (New England Biolabs, Ipswich, EUA) a 37°C por 18 horas. A eletroforese foi realizada no sistema CHEF DRII (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, EUA) com as seguintes condições: *Switch time* inicial-final 5,0-60, a 6 V/cm por 23 h a 13°C. O marcador de peso molecular de 48,5 Kb (New England Biolab, EUA) foi aplicado no gel para mensurar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os padrões de bandas obtidos foram avaliados pelo software BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, Belgium). O coeficiente de similaridade utilizado foi o de Dice com padronização de $\geq 80\%$ para que os isolados fossem considerados como pertencente ao mesmo grupo clonal. O dendograma foi construído pelo método da média aritmética não-ponderada (UPGMA). Os valores utilizados para otimização e tolerância para todos os isolados foram 0,8 e 1,0%, respectivamente.

Considerações éticas

A aprovação ética foi obtida pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual Vale do Acaraú (Parecer 528.783-CEP-UVA) em consonância com a resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e pelo Subcomitê de Pesquisa da Santa Casa de Misericórdia de Sobral - CE.

Resultados

Cepas bacterianas

Um total de 42 amostras clínicas obtidas de pacientes com diagnóstico de infecção nosocomial foram identificadas como *K. pneumoniae* pelo sistema Vitek 2. No entanto, 14,3% dos isolados produziram resultados discordantes na identificação pelo MALDI-TOF e foram excluídos do estudo (Tabela 2). Os demais isolados (n=36) foram confirmados em nível de gênero e espécie como *K. pneumoniae* pelo MALDI-TOF e foram incluídos no estudo.

Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

A maioria dos isolados foram classificados como não sensíveis ou resistentes às cefalosporinas de amplo espectro, tais como: ceftriaxona (100%), ceftazidima (72,2%) e cefepima (69,4%). Altos índices de resistência à ampicilina (100%), ampicilina/sulbactam (69,4%), gentamicina (72,2%) e ciprofloxacina (61,1%) foram também observados, porém todos os isolados foram sensíveis à amicacina, imipenem e meropenem (Tabela 3). Os isolados resistentes ao ertapenem (11,1%) e não sensíveis à tigeciclina (36,1%) pelo sistema Vitek 2 foram classificados como sensíveis pelo método da diluição em ágar e microdiluição em caldo Muller-Hinton cátion ajustado, respectivamente (Tabela 4 e 5).

Prevalência de genes β -lactamases e genotipagem

Os genes *bla*_{CTX-M-1/2} e *bla*_{SHV-like} foram detectados em 100% dos isolados (Figura 2 e 3) e o gene *bla*_{TEM-like} em 55,6% (Figura 4). Em adição, 55,6% das cepas produtoras de CTX-M também produziram SHV e TEM (Tabela 6). Nenhum gene *bla*_{KPC-like} e *bla*_{GES-like} foi detectado (Figura 5 e 6). A tipagem molecular por PFGE revelou uma grande diversidade de padrões genéticos distribuídos entre 25 *clusters*, designados de I a XXV (Figura 1). No entanto, nove *clusters* incluindo de dois a três isolados com o coeficiente de similaridade variando entre 81,6% a 100% foram observados. Destes, dois isolados (KP01 e KP06) apresentaram o mesmo padrão de bandas (*cluster* IX) e o mesmo conteúdo de genes *bla* e foram considerados clones.

Discussão

Das 42 amostras clínicas de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL identificadas pelo Vitek 2, 14,3% foram identificadas de modo diferente pelo MALDI-TOF (Tabela 2). Vários estudos têm avaliado o MALDI-TOF como uma ferramenta mais precisa na identificação bacteriana quando comparado ao Vitek 2 (DUBOIS *et al.*, 2012, DENG *et al.*, 2014, GUO *et al.*, 2014). No entanto, somente a análise genética poderá solucionar as discrepâncias entre estes dois métodos de identificação de espécies bacterianas (DENG *et al.*, 2014).

A detecção do gene *bla*_{CTX-M-1/2} em 100% das amostras analisadas sugere que a enzima CTX-M é a principal ESBL responsável pelo fenótipo de resistência aos antibióticos β -lactâmicos nos isolados estudados e suporta o reconhecimento de CTX-M como a ESBL mais prevalente em todo o mundo (CANTÓN & COQUE, 2006), inclusive no Brasil (CLÍMACO, MINARINI & DARINI, 2010; ABREU *et al.*, 2011; TOLENTINO *et al.*, 2011). Não o bastante, 55,6% dos produtores de CTX-M também produziram SHV e TEM (Tabela 6). Isto pode ser

explicado pelo contexto genético dos genes *bla*_{CTX-M} que são comumente localizados em plasmídeos conjugativos que podem abrigar outros genes de resistência (CANTÓN, GONZÁLEZ-ALBA & GALÁN, 2012; ZHAO & HU, 2013). A associação destes mecanismos de resistência pode limitar ainda mais as opções terapêuticas disponíveis para tratar infecções por *K. pneumoniae* ESBL positivas no hospital pesquisado. Adicionalmente, foi possível estabelecer uma co-relação entre o perfil de sensibilidade e a presença do gene *bla*_{CTX-M-1/2} uma vez que a maioria dos isolados foram não sensíveis ou resistentes à ceftriaxona (100%), ceftazidima (72,2%) e cefepima (69,4%).

Apesar da alta incidência dos genes das famílias SHV e TEM neste estudo, não foi possível presumir se eles foram responsáveis pela produção de ESBL, uma vez que algumas variantes destas famílias tais como *bla*_{SHV-1}, *bla*_{SHV-11}, *bla*_{TEM-1} e *bla*_{TEM-2} são β -lactamases de espectro restrito e, portanto, não possuem atividade contra cefalosporinas de espectro estendido (BUSH & JABOBY, 2010). Em ambos os casos, o sequenciamento é, portanto, necessário para identificação e classificação da variante alélica. A alta prevalência do gene *bla*_{SHV} pode ser justificada pelo relato de que a maioria das cepas de *K. pneumoniae* possuem o gene cromossomal *bla*_{SHV-1} (BABINI & LIVERMORE, 2000).

Neste estudo, a maioria dos isolados de *K. pneumoniae* foram resistentes às penicilinas, cefalosporinas, fluoroquinolonas e aminoglicosídeos (Tabela 3). Os altos índices de resistência à ampicilina (100%), ceftriaxona (100%), ceftazidima (72,2%) e cefepima (69,4%) são característicos de cepas produtoras de ESBL (PATERSON, 2006; TOLLENTINO *et al.*, 2011). Em relação a sensibilidade ao ertapenem, 11,1% dos isolados foram classificados como resistentes a este fármaco pelo Vitek 2, no entanto este perfil não foi confirmado pela técnica da diluição em ágar Muller-Hinton (Tabela 4). Assim, nenhum isolado foi classificado como resistente aos carbapenêmicos avaliados que são considerados o tratamento de escolha contra infecções associadas com a produção de ESBL (PITOUT & LAUPLAND, 2008). Estes dados são apoiados pela ausência dos genes *bla*_{KPC} e *bla*_{GES} nas amostras analisadas.

Adicionalmente, 36,1% dos isolados analisados foram classificados como não sensíveis ou resistentes à tigeciclina pelo Vitek 2, contudo nenhuma amostra teve CIM na faixa de intermediário ou resistente quando testadas pelo método da microdiluição em caldo Muller-Hinton cátion ajustado (Tabela 5). Em outro estudo, 22,6% dos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram classificados como resistentes à tigeciclina pelo Vitek 2, porém apenas 7,5% foram confirmados quando avaliadas pela microdiluição em caldo (HUANG *et al.*, 2012). As discordâncias entre estes dois métodos é preocupante, uma vez que muitos

laboratórios de microbiologia utilizam apenas o Vitek 2 para determinar a CIM de tigeciclina, fato que pode subestimar a importância deste fármaco na vivência clínica.

A análise da similaridade genética dos 36 isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL demonstrou a presença de 25 *clusters* designados de I a XXV que é típico de disseminação multiclonal (Figura 1). No entanto, nove *clusters* incluindo de dois a três isolados com o coeficiente de similaridade variando entre 81,6% a 100% foram observados. O padrão I compartilhando 82,2% de similaridade e o padrão II compartilhando 92,3% de similaridade foram encontrados exclusivamente em Unidades de Cuidados Intensivos (UCI) Neonatais, sendo sugestivo de uma estreita relação genética entre os isolados dentro de cada *cluster*. Essas clínicas abrigam pacientes com sistema de defesa frágil que recebem excessiva manipulação e ingestão de antimicrobianos que podem representar fatores de risco para infecção e propagação de genes de resistência (BRADFORD, 2001, GUPTA *et al.*, 2003). Em complemento, estes isolados apresentaram o mesmo conteúdo de genes *bla*. Assim, acreditamos que estes genes possam ter sido adquiridos mediante eventos de conjugação via plasmidial, uma vez que as ESBL codificadas por plasmídeos são eficientemente mobilizadas entre espécies de *Klebsiella* (SALADIN *et al.*, 2002).

A propagação clonal pode ser inferida apenas para as cepas KP01 e KP06 que apresentaram 100% de similaridade (*cluster* IX), mesma diversidade de genes *bla* e, praticamente o mesmo perfil de resistência. No entanto, estes isolados foram obtidos de pacientes em enfermarias distintas, UTI adulta e neurologia, respectivamente. Assim, acreditamos que a disseminação deste clone possa ter ocorrido pelo contato com profissionais de saúde colonizados ou pela transferência de pacientes colonizados para outras enfermarias do hospital. Este dado, reforça a importância do aprimoramento de medidas de prevenção de contato, tais como: o uso de luvas e aventais, limpeza e desinfecção apropriada de materiais e equipamentos, lavagem eficiente das mãos, isolamento de contato de pacientes colonizados e monitoramento dos pacientes transferidos entre as clínicas hospitalares (WOLLHEIM *et al.*, 2011).

Neste estudo, observou-se diversos isolados de *K. pneumoniae* obtidos de várias clínicas, incluindo UTI adulta, neonatal e pediátrica com padrões genéticos não relacionados (Figura 1). De acordo com outros estudos, quando os genótipos são distintos, a presença de micro-organismos resistentes pode ocorrer devido a pressão exercida pelo uso indiscriminado de antimicrobianos, que pode favorecer fenótipos de resistência dentro de um grupo de isolados não relacionadas, criando um problema de resistência endêmico no âmbito hospitalar (TOSIN *et al.* 2003; DROPA *et al.*, 2009; WOLLHEIM *et al.*, 2011). Esta constatação, deverá servir de

alerta para que esforços possam ser direcionados no sentido de que as políticas de prescrição de antimicrobianos possam ser reavaliadas no hospital pesquisado.

Conclusão

A detecção do gene *bla*_{CTX-M-1/2} em 100% das amostras analisadas sugere que a enzima CTX-M seja a principal ESBL responsável pelo fenótipo de resistência aos beta-lactâmicos nos isolados estudados. Dados apresentados neste estudo chamam atenção para um problema de resistência endêmica causada por cepas multiclonais de *K. pneumoniae* multirresistentes que pode ser atribuído a pressão exercida pelo uso indiscriminado de antibióticos, e cujo controle passa essencialmente pelo aprimoramento das políticas de prescrição de antimicrobianos. Em complementação, a ocorrência de um clone isolado de dois pacientes internados em enfermarias distintas realça a necessidade de revisão e/ou implantação de programas de prevenção e controle da disseminação destes patógenos no hospital pesquisado.

Referências

- ABREU, A.G.; MARQUES, S.G.; MONTEIRO-NETO, V.; CARVALHO, R.M.; GONÇALVES, A.G. Nosocomial infection and characterization of extended-spectrum β -lactamases producing *Enterobacteriaceae* in Northeast Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.4, p.441-446, 2011.
- BABINI, G.S.; LIVERMORE, D.M. Are SHV β -lactamases universal in *Klebsiella pneumoniae*? **Antimicrob. Agents Chemother**, v.44, n.8, p.2230, 2000.
- BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTXM enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, p.1-14, 2004.
- BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev**, v.14, n.4, p.933-951, 2001.
- BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.
- CAMPANA, Eloiza Helena. Resistência aos carbapenems e sensibilidade às cefalosporinas de amplo espectro em isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*: Estudo dos mecanismos de resistência envolvidos. Tese (Doutorado) - Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2013.
- CANTON, R.; COQUE, T.M.; The CTX-M beta-lactamase pandemic. **Curr Opin Microbiol**, v.9, n.5, p.466-75, 2006.
- CANTÓN, R.; GONZÁLEZ-ALBA, J.M.; GALÁN, J.C. CTX-M enzymes: origin and diffusion. **Front. Microbio.** v.3, n.110, p.1-19, 2012.
- CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K.D.; FRANK, R.; DELEO, F.R.; BONOMO, R.A.; KREISWIRTH, B.N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, v.22, n.12, p.686-696, 2014.
- CLÍMACO, E.C.; MINARINI, L.A.R.; DARINI, A.L.C. CTX-M producing *Klebsiella* spp. in a Brazilian hospital: what has changed in 6 years? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.68, n. 2, p.186-189, 2010.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.** Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; twenty-four informational supplement. Document M100-S24. Wayne, PA, 2014.
- DENG, J.; FU, L.; WANG, R.; YU, N.; DING, X.; JIANG, L.; FANG, Y.; JIANG, C.; LIN, L.; WANG, Y.; CHE, X. Comparison of MALDITOF MS, gene sequencing and the VITEK 2 for identification of seventy-three clinical isolates of enteropathogens. **J Thorac Dis**, v.6, n.5, p.539-544, 2014.

DROPA, M.; BALSALOBRE, L.C.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; MURAKAMI, T.; CASSETTARI, V.C.; FRANCO, F.; GUIDA, S.M.; BALABAKIS, A.J.; PASSADORE, L.F.; SANTOS, S.R.; MATTÉ, G.R.; MATTÉ, M.H. - Extended-spectrum beta-lactamases among *Enterobacteriaceae* isolated in a public hospital in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, v.51, n.4, p.203-209, 2009.

DUBOIS, D.; GRARE, M.; PRERE, M.F.; SEGONDS, C.; MARTY, N.; OSWALD, E. Performances of the Vitek MS matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for rapid identification of bacteria in routine clinical microbiology. **J Clin Microbiol**, v.50, n.8, p.2568-76, 2012.

GUO, L.; YE, L.; ZHAO, Q.; MA, Y.; YANG, J.; LUO, Y. Comparative study of MALDI-TOF MS and VITEK 2 in bacteria identification. **J Thorac Dis**, v.6, n.5, p.534-538, 2014.

GUPTA, A.; AMPOFO, K.; RUBENSTEIN, D.; SAIMAN, L. Extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* infections: a review of the literature. **J. Perinatol**, v.23, n.6, p.439-443, 2003.

HUANG, T.D.; BERHIN, C.; BOGAERTS, P.; GLUPCZYNSKI, Y. In vitro susceptibility of multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* clinical isolates to tigecycline. **J Antimicrob Chemother**, v.67, n.11, p.2696-2699, 2012.

MONTEIRO, Jussimara. Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos β -lactâmicos em *Klebsiella* spp. isoladas de infecções de corrente sanguínea do Projeto SCOPE Brasil. Tese (Doutorado)- Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, 2009.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Infect**, v.14, n.1, p.42-52, 2008.

PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: *Enterobacteriaceae*. **Am. J. Infect. Control**, v.34, p. 20-28, 2006.

PFALLER, M.A.; HOLLIS, R.J.; SADER, H.S. 1992. Molecular biology - PFGE analysis of chromosomal restriction fragments. In: ISENBERG, H. D. **Clinical microbiology procedures handbook**. Washington: ASM Press, p.10.5.c.1-10.5.c.11.

PITOUT, J.D.; LAUPLAND, K.B. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public health concern. **Lancet Infect Dis**, v.8, n.3, p.159-166, 2008.

SALADIN, M.; CAO, V.T.; LAMBERT, T.; DONAY, J.L.; HERRMANN, J.L.; OULD-HOCINE, Z.; VERDET, C.; DELISLE, F.; PHILIPPON, A.; ARLET, G. Diversity of CTX-M beta-lactamases and their promoter regions from *Enterobacteriaceae* isolated in three Parisian hospitals. **FEMS Microbiol. Lett**, v.209, n2, p.161-168, 2002.

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

THE EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING.

Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 5.0, 2015.

<http://www.eucast.org>. " Acesso em 04/03/2015

TOLLENTINO, F.M.; POLOTTO, M.; NOGUEIRA, M.L.; LINCOPAN, N.; NEVES, P.; MAMIZUKA, E.M.; REMELI, G.A.; DE ALMEIDA, M.T.; RUBIO, F.G.; NOGUEIRA, M.C. High prevalence of *bla*_{CTX-M} extended spectrum β -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*_{SHV-12}, *bla*_{SHV-31}, *bla*_{SHV-38}, and *bla*_{CTX-M-15} in Brazil. **Microb. Drug Resist**, v.17, n.1, p.7–16, 2011.

TOSIN, I.; SILBERT, S.; SADER, H.S. The use of molecular typing to evaluate the dissemination of antimicrobial resistance among Gram-negative rods in Brazilian Hospitals. **Braz. J. infect. Dis**, v.7, n. p.360-369, 2003.

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 5.ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

WOLLHEIM, C.; GUERRA, I.M.F.; CONTE, V.D.; HOFFMAN, S.P.; SCHREINER, F.J.; DELAMARE, A.P.L.; BARTH, A.L.; ECHEVERRIGARAY, S.; DA COSTA, S.O.P. Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum β -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in southern Brazil. **Braz J Infect Dis** v.15, n.2 p.138–143, 2011.

ZHAO, W.H.; HU, Z.Q.; Epidemiology and genetics of CTX-M extended-spectrum β -lactamases in Gram-negative bacteria. **Crit. Rev. Microbiol**, v.39, n.1, p79–101, 2013.

Tabela 1- Sequência dos primers utilizados para amplificação dos genes de resistência aos β -lactâmicos.

| Primer | Sequência de Nucleotídeos (5' →3') | Alvo | Tamanho do Amplicon (pb) | Referência |
|---------------|---|--------------------------------|---------------------------------|-------------------|
| TEM F | CCC TTA TTC CCT TTY TTG CGG | <i>bla</i> _{TEM-like} | 650 pb | CAMPANA, 2013 |
| TEM R | AAC CAG CCA GCC WGA AGG | | | |
| SHV F | ATGCGTTATTAGTTTCGCCTGTGTATTATC | <i>bla</i> _{SHV-like} | 861 pb | MONTEIRO, 2009 |
| SHV R | TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC | | | |
| CTX- 1/2-F | ATG TGC AGY ACC AGT AA | Clusters <i>M1/2</i> | 512 pb | CAMPANA, 2013 |
| CTX- 1/2-R | CGC TGC CGG TTT TAT CSC CC | | | |
| GES F | AGC AGC TCA GAT CGG TGT TG | <i>bla</i> _{GES-like} | 750 pb | CAMPANA, 2013 |
| GES R | CCG TGC TCA GGA TGA GTT G | | | |
| KPC F | TCG CTA AAC TCG AAC AGG | <i>bla</i> _{KPC-like} | 762 pb | CAMPANA, 2013 |
| KPC R | TTA CTG CCC GTT GAC GCC CAA TCC | | | |

pb= pares de base

Tabela 2 - Discordância na identificação das cepas bacterianas usando o sistema Vitek 2 e MALDI-TOF

| Nº da cepa | Vitek 2 | MALDI-TOF |
|-------------------|----------------------|-----------------------------|
| Kp02 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| Kp34 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Kp42 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Kp51 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| Kp71 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> |
| Kp78 | <i>K. pneumoniae</i> | <i>Escherichia coli</i> |

Tabela 3 - Perfil de sensibilidade antimicrobiana de isolados clínicos de *K. pneumoniae* ESBL positivos

| | Cepas ESBL (+) | | | |
|------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------|
| | N=36 (100%) | | | |
| Antibióticos | *S N (%) | *I N (%) | *R N (%) | Ñ avaliado |
| Amicacina | 36 (100%) | - | - | - |
| Ampicilina | - | - | 36 (100%) | - |
| Ampicilina/sulbactam | 7(19,5%) | 4(11,1%) | 21(58,3%) | 4(11,1%) |
| Cefepima | 11(30,6%) | 8(22,2%) | 17(47,2%) | - |
| Cefoxitina | 25(69,5%) | 3(8,3%) | 4(11,1%) | 4(11,1%) |
| Ceftazidima | 6(16,7%) | 2(5,5%) | 24(66,7%) | 4(11,1%) |
| Ceftriaxona | - | - | 36(100%) | - |
| Cefuroxima | - | - | 36(100%) | - |
| Cefuroxima/axetil | - | - | 36(100%) | - |
| Ciprofloxacina | 14(38,9%) | 1(2,8%) | 21(58,3%) | - |
| Colistina | 31(86,1%) | - | 1(2,8%) | 4(11,1%) |
| Ertapenem | 32(88,9%) | - | 4(11,1%) | - |
| Gentamicina | 10(27,8%) | - | 26(72,2%) | - |
| Imipenem | 32(88,9%) | - | - | 4(11,1%) |
| Meropenem | 36(100%) | - | - | - |
| Piperacilin/tazobactam | 16(44,4%) | 5(13,9%) | 15(41,7%) | - |
| Tigeciclina | 19(52,8%) | 10(27,8%) | 3(8,3%) | 4(11,1%) |

Fonte: Análise dos laudos da concentração inibitória mínima (CIM) gerados pelo sistema automatizado (Vitek 2, bioMérieux, França). *S= sensível; I= intermediário; R= resistente.

Tabela 4 - Comparação entre as técnicas Vitek 2 e ágar diluição na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de ertapenem dos isolados de *K. pneumoniae* avaliados neste estudo.

| Nº da cepa | Vitek®2 CIM (µg/ml) | | | Ágar diluição CIM (µg/ml) | | |
|-------------|------------------------|----------------|------------------|------------------------------|----------------|------------------|
| | MER S*≤1/*R≥4 | IMP S≤1/R≥4 | ERT S≤0.5/R≥2 | MER S≤1/R≥4 | IMP S≤1/R≥4 | ERT S≤0.5/R≥2 |
| Kp01 | ≤0,25 | ≤0,25 | 4 | 0,015 | 0,125 | 0,25 |
| Kp38 | 1 | 0,5 | 4 | 0,015 | 0,125 | 0,25 |
| Kp68 | ≤0,25 | ≤0,25 | 2 | 0,008 | 0,125 | 0,008 |
| Kp74 | 0,5 | ≤0,25 | 4 | 0,008 | 0,125 | 0,06 |

MER, Meropenem; IMP, Imipenem; ERT, Ertapenem; *S= sensível; R= resistente.

Pontos de corte estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)* documento M100-S14.

Tabela 5. Comparação entre as técnicas Vitek2 e microdiluição em caldo cátion ajustado na determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de tigeciclina dos isolados de *K. pneumoniae* avaliados neste estudo.

| Nº da cepa | Vitek [®] 2 CIM ^a (µg/ml) | Microdiluição em caldo CIM ^b (µg/ml) |
|-------------|--|---|
| | TIG *S:≤1; *I:2; *R≥4 | TIG S≤1 / R>2 |
| Kp01 | 2 | 0,25 |
| Kp04 | 2 | 0,25 |
| Kp06 | 2 | 0,25 |
| Kp12 | 2 | 0,25 |
| Kp13 | 2 | 0,25 |
| Kp15 | ≥8 | 1 |
| Kp27 | ≥8 | 0,5 |
| Kp32 | 2 | 0,5 |
| Kp38 | 2 | 0,125 |
| Kp41 | 4 | 0,5 |
| Kp48 | 2 | 0,25 |
| Kp74 | 2 | 0,125 |
| Kp75 | 2 | 0,5 |

TIG, Tigeciclina; *S= sensível; *I=intermediário; R= resistente.

^aPontos de corte de acordo com a Norma Técnica ANVISA nº01/2013.

^bPontos de corte estabelecidos pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST), versão 5.0, 2015.

Tabela 6. Frequência de genes β-lactamases nos isolados de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL (n=36)

| Genes β-lactamases | Número de isolados (%) |
|--|------------------------|
| <i>bla</i> CTX-M; <i>bla</i> TEM; <i>bla</i> SHV | 20 (55,6) |
| <i>bla</i> CTX-M; <i>bla</i> SHV | 16 (44,4) |
| Total | 36 (100) |

Figure 1 - Dendrograma demonstrando o coeficiente de similaridade entre os 36 isolados de *K. pneumoniae* produtores de ESBL gerado pelo programa *BioNumerics*. Os padrões da PFGE das 36 amostras de *K. pneumoniae* produtoras de ESBL, a identificação dos isolados, a clínica hospitalar, o conteúdo de genes β -lactamases e diversidade dos *clusters* são também mostrados. A linha vermelha delimita os isolados com coeficiente de similaridade de Dice $\geq 80\%$.

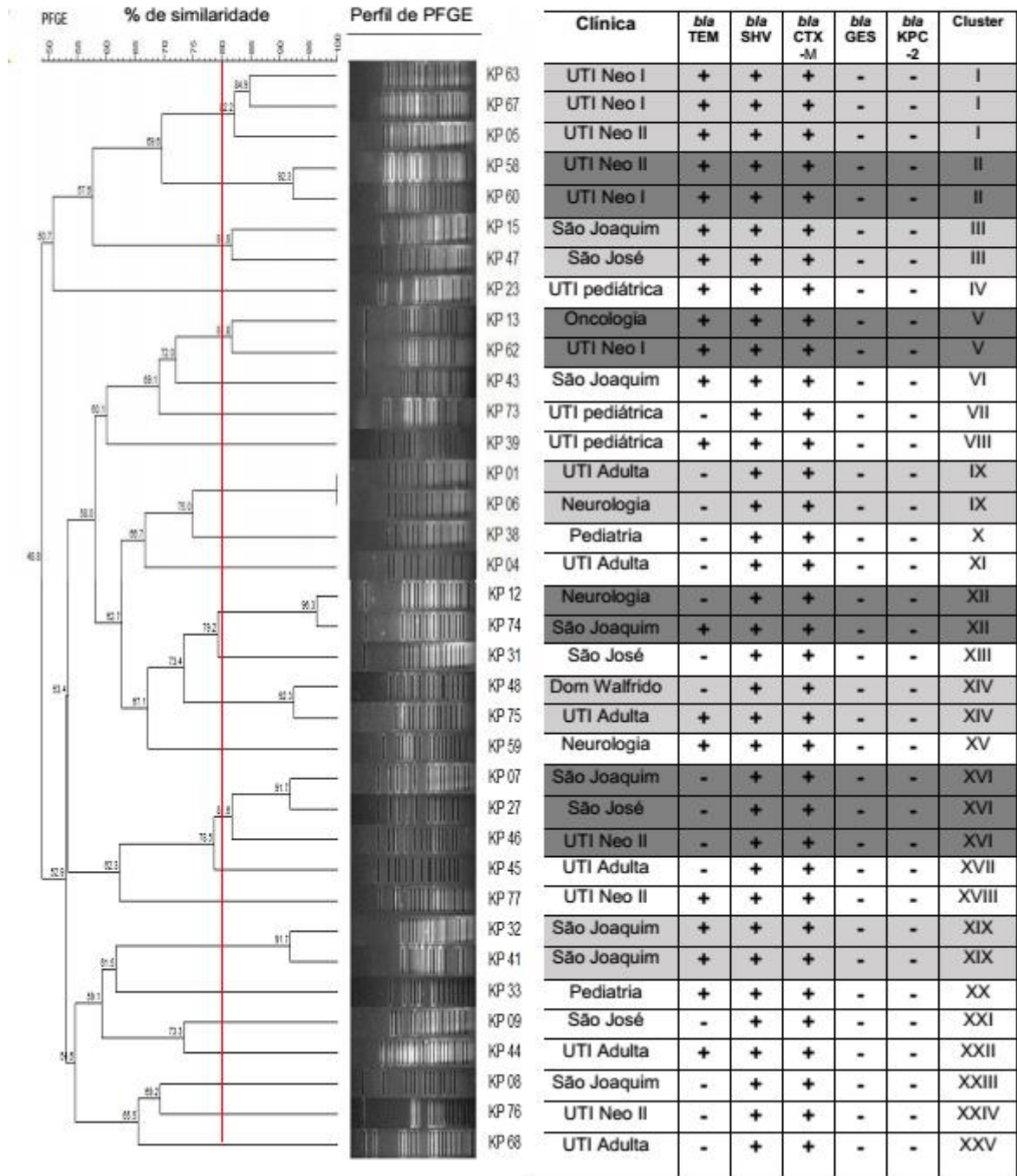
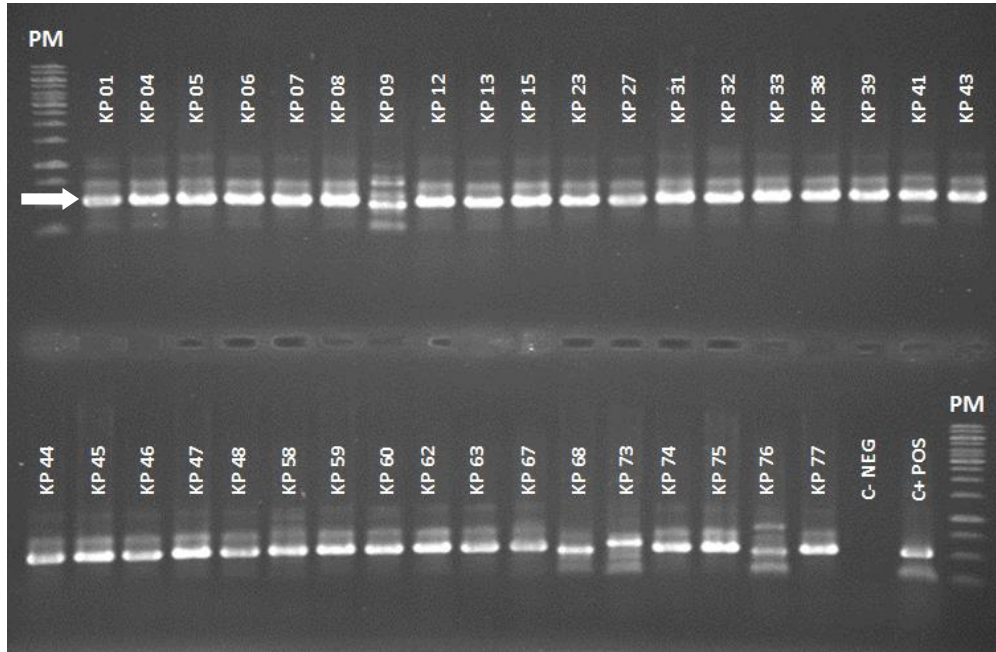
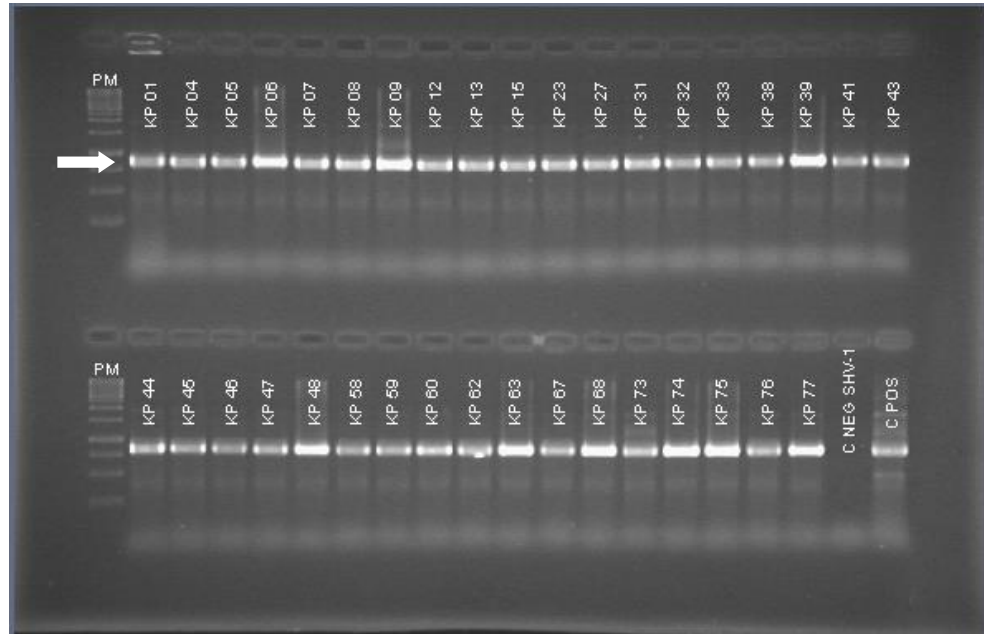


Figura 2 – Gel de agarose a 1% contendo fragmentos dos genes *bla*_{CTX-M-1/2} amplificados por PCR das amostras de *K. pneumoniae*. PM – Marcador (Ladder 1kb); Amostras de *K. pneumoniae*; C-NEG – Controle negativo; C+POS – Controle positivo. A seta indica fragmentos de 512 pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{CTX-M-1/2}.



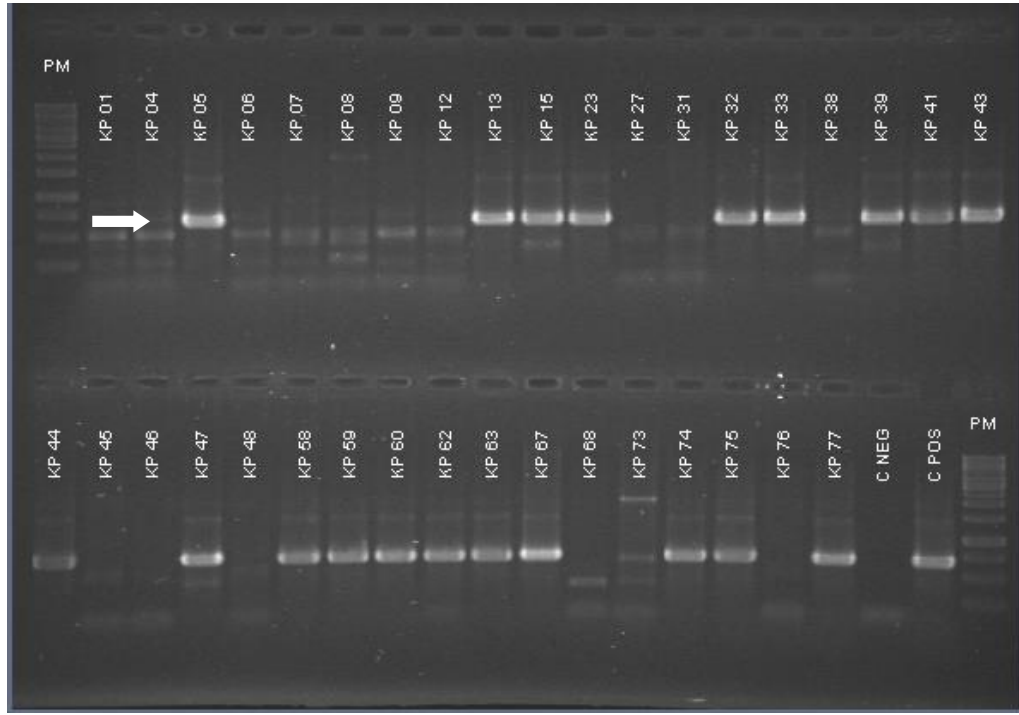
kb: KiloBase

Figura 3 – Gel de agarose a 1% contendo fragmentos dos genes *bla*_{SHV-like} amplificados por PCR das amostras de *K. pneumoniae*. PM – Marcador (Ladder 1kb); Amostras de *K. pneumoniae*; C NEG – Controle negativo; C POS – Controle positivo. A seta indica fragmentos de 861 pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{SHV-like}.



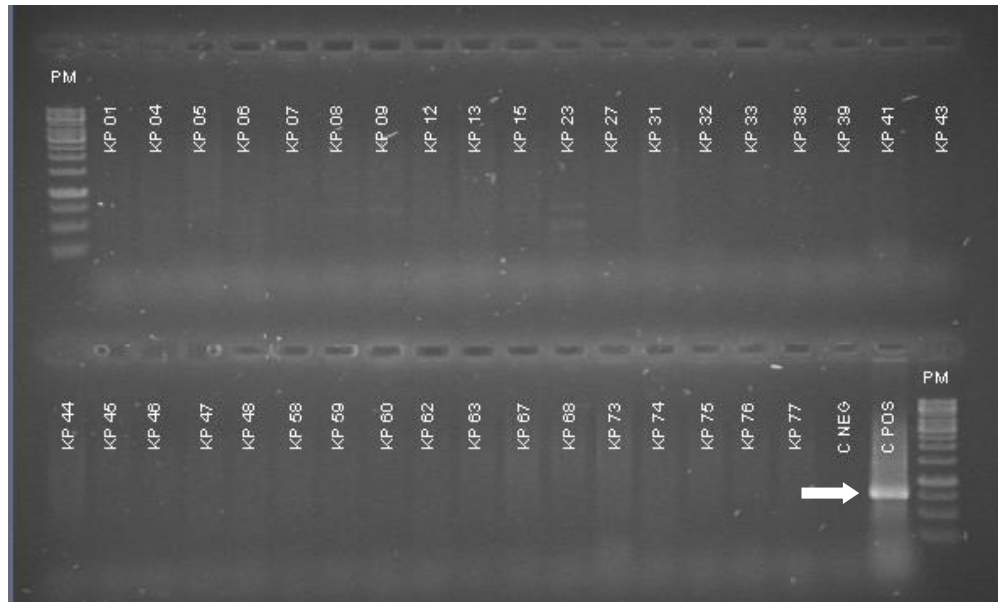
kb: KiloBase

Figura 4 – Gel de agarose a 1% contendo fragmentos dos genes *bla*_{TEM-like} amplificados por PCR das amostras de *K. pneumoniae*. PM – Marcador (Ladder 1kb); Amostras de *K. pneumoniae*; C NEG – Controle negativo; C POS – Controle positivo. A seta indica fragmentos de 650 pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{TEM-like}.



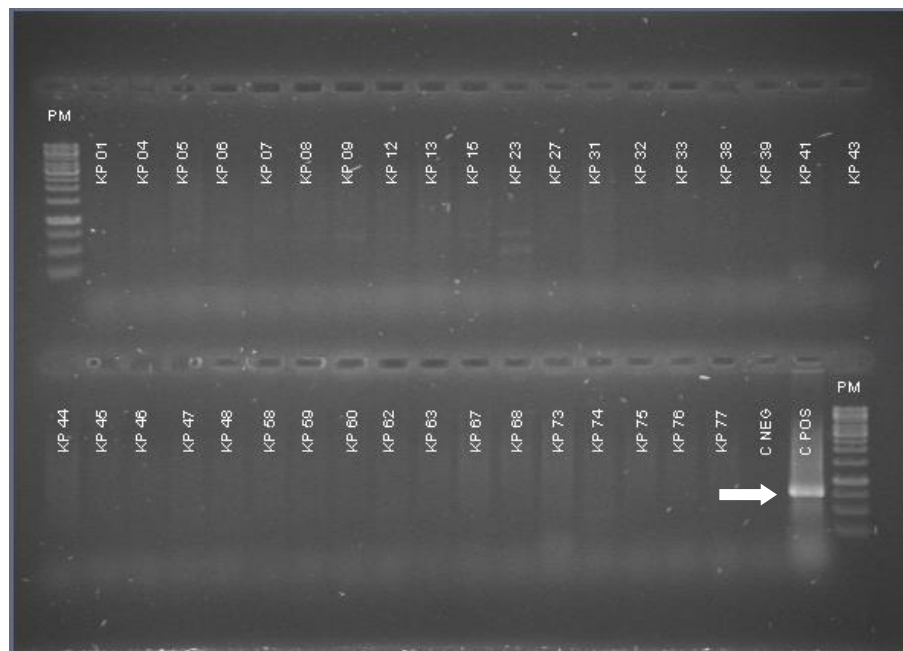
kb: KiloBase

Figura 5 – Gel de agarose a 1% mostrando a ausência de fragmentos do gene *bla*_{KPC-like} nas amostras *K. pneumoniae*. PM – Marcador (Ladder 1kb); Amostras de *K. pneumoniae*; C NEG – Controle negativo; C POS – Controle positivo. A seta indica um fragmento de 762 pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{KPC-like} amplificado do controle positivo.



kb: KiloBase

Figura 6 – Gel de agarose a 1% mostrando a ausência de fragmentos do gene *bla*_{GES-like} nas amostras *K. pneumoniae*. PM – Marcador (Ladder 1kb); Amostras de *K. pneumoniae*; C NEG – Controle negativo; C POS – Controle positivo. A seta indica um fragmento de 750 pb, correspondente à região codificadora do gene *bla*_{GES-like} amplificado do controle positivo.



kb: KiloBase

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBLER, R.P. The structure of β -lactamases. **Philos Trans R Soc Lon B Biol Sci**, v.289, n.1036, p.321-331, 1980.

ANDRADE, L.N.; VITALI, L.; GASPAR, G.G.; BELLISSIMO-RODRIGUES, F.; MARTINEZ, R.; DARINI, A.L.C. Expansion and evolution of a virulent, extensively drug-resistant (polymyxin B-resistant), QnrS1-, CTX-M-2-, and KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* ST11 international high-risk clone. **Journal of Clinical Microbiology**, v.52, n.7, p.2530-2535, 2014.

BARTHÉLÉMY, M.; PÉDUZZI, J.; LABIA, R. Distinction entre les structures primaires des β -lactamases TEM-1 et TEM-2. **Ann. Inst. Pasteur Microbiol**, v.136, n.3, p.311–321, 1985.

BAUERNFEIND, A.; GRIMM, H.; SCHWEIGHART, S. A new plasmidic cefotaximase in a clinical isolate of *Escherichia coli*. **Infection**, v.18, n.5, p.294-298, 1990.

BAUERNFEIND, A.; STEMLINGER, I.; JUNGWIRTH, R.; ERNST, S.; CASELLAS, J. M. Sequences of beta-lactamase genes encoding CTX-M-1 (MEN-1) and CTX-M-2 and relationship of their amino acid sequences with those of other beta-lactamases. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.40, n.2, p.509–513, 1996.

BEBRONE, C.; BOGAERTS, P.; DELBRUCK, H.; BENNINK, S.; KUPPER, M.B.; DE CASTRO, R.R.; GLUPCZYNSKI, Y.; HOFFMANN, K.M. GES-18, a new carbapenem-hydrolyzing GES-type β -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.396-401, 2013.

BIOMÉRIEUX. **VITEK® 2** Disponível em:

http://www.biomerieux.com.br/servlet/srt/bio/brazil/dynPage?doc=BRZ_CLN_PRD_G_PRD_CLN_73. Acesso em: 27 nov. 2014.

BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTXM enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, p.1-14, 2004.

BONNET, R.; SAMPAIO, J.L.; LABIA, R.; DE CHAMPS, C.; SIROT, D.; CHANAL, C.; SIROT, J. A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M-8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.44, n.7, p.1936–1942, 2000.

BRADFORD, P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev**, v.14, n.4, p.933–951, 2001.

BRANGER, C.; LESIMPLE, A.L.; BRUNEAU, B.; BERRY, P.; LAMBERT-ZECHOVSKY, N. Long-term investigation of the clonal dissemination of *Klebsiella pneumoniae* isolates producing extended-spectrum beta-lactamases in a university hospital. **J Med Microbiol**. v. 47, n. 3, p. 201-209, 1998.

BURÉ, A.; LEGRAND, P.; ARLET, G.; JARLIER, V.; PAUL, G.; PHILIPPON, A. 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, v.7, n.6, p.780-782, 1988.

BUSH, K. Excitement in the beta-lactamase arena. **J Antimicrob Chemother**, v.24, n.6, p.831-836, 1989.

BUSH, K. New β -lactamases in Gram-negative bacteria: diversity and impact on the selection of antimicrobial therapy. **Clin Infect Dis**, v.32, n.7, p.1085-1089, 2001.

BUSH, K. Proliferation and significance of clinically relevant β -lactamases. **Ann N Y Acad Sci**, v.1277, p.84-89, 2013.

BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of betalactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.

BUSH, K.; JACOBY, G.A.; MEDEIROS, A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. **Antimicrob Agents Chemother**, v.39, n. 6, p.1211-1233, 1995.

CANTOR, C.R., SMITH, C.L.; MATHEW, M.K. Pulsed-Field Gel Electrophoresis of very large DNA molecules. **Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry**, v.17, p.287-304, 1988.

CASSELLI, E.; POWERS, R.A.; BLASCZCAK, L.C.; WU, C.Y.E.; PRATI, F.; SHOICHET, B.K. Energetic, structural, and antimicrobial analyses of β -lactam side chain recognition by β -lactamases. **Chem Biol**, v.8, n.1, p. 17-31, 2001.

CASSETTARI, V.C.; DA SILVEIRA, I.R.; DROPA, M.; LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E.M.; MATTÉ, M.H.; MATTÉ, G.R.; MENEZES, P.R. Risk factors for colonisation of newborn infants during an outbreak of extended -spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae* in an intermediate-risk neonatal unit. **J Hosp Infect**, v.71, n.4, p.340-347, 2009.

CDC, CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Pulsed-field Gel Electrophoresis (PFGE)**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/pulsenet/pathogens/pfge.html>>. Acesso em: 16 fev. 2015.

CHAMBERS, H.F. Antibióticos betalactâmicos e outros antibióticos ativos na parede celular e membrana celular. In: KATZUNG (Ed.). **Farmacologia Básica e Clínica**. 10. ed. São Paulo: Amgh, 2010. 654-670 p.

ROSE, W.E.; RYBAK. M.J. Tigecycline: first of a new class of antimicrobial agents. **Pharmacotherapy**, n.26, v8, p.1099-1110, 2006.

CHEN, L.; MATHEMA, B.; CHAVDA, K.D.; FRANK, R.; DELEO, F.R.; BONOMO, R.A.; KREISWIRTH, B.N. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: molecular and genetic decoding. **Trends in Microbiology**, v.22, n.12, p.686-696, 2014.

COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Euro Surveill**, v.13, n.47, 2008.

- CROXATTO, A.; PROD'HOM, G.; GREUB, G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. **FEMS Microbiol Rev**, v.36, n.2, p.380-407, 2012.
- D'ANDREA, M.M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G.M. CTX-M- type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **Int. J. Med, Microbiol**, v.303, n.6-7, p.305-317, 2013.
- DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-41, 1965.
- DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three decades of β -lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev**, v.23, n.1, p.160-201, 2010.
- EVANS, H.L.; LEFRAK, S.N.; LYMAN, J.; SMITH, R.L.; CHONG, T.W.; MCELEARNEY, S.T.; SCHULMAN, A.R.; HUGHES, M.G.; RAYMOND, D.P.; PRUETT, T.L.; SAWYER, R.G. Cost of Gram-negative resistance. **Crit Care Med**, v.35, n.1, p.89-95, 2007.
- GALES, A.C.; CASTANHEIRA, M.; JONES, R.N.; SADER, H.S. Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008-2010). **Diagn Microbiol Infect Dis**, v.73, n.4, p.354-360, 2012.
- GIEBEL, R.; WORDEN, C.; RUST, S.M.; KLEINHEINZ, G.T.; ROBBINS, M.; SANDRIN, T.R. Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. **Adv Appl Microbiol**, v.71, p.149-184, 2010.
- JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, L.S. The new beta-lactamases. **N Engl J Med**, v.352, n.4, p.380-391, 2005.
- JARLIER, V.; NICOLAS, M.H.; FOURNIER, G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum beta-lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in *Enterobacteriaceae*: hospital prevalence and susceptibility patterns. **Rev. Infect. Dis**, v.10, n.4, p.867-878, 1988.
- JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A. Characterization and sequence analysis of extended spectrum β -lactamase encoding genes from *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* isolates collected during tigecycline phase 3 clinical trials. **Antimicrob Agents Chemother**, v.53, n.2, p.465-475, 2009.
- KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRUMERY, V.; ANTAL, M.; MITSUHASHI, S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**, v.11, n.6, p.315-7, 1983.
- KONEMAN, E.W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M.; SCHRECKENBERGER, P. C.; WINN, J.W.C. Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. In: _____. **Diagnóstico microbiológico**. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001. p.263-330.

LCF, LAHEY CLINIC FOUNDATION. **β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes.** Disponível em: <<http://www.lahey.org/Studies/>>. Acesso em: 19 mar. 2015.

LENVINSON, W.; JAWETZ, E. **Microbiologia Médica e Imunologia**. 10.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 140 p.

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

LIVERMORE, D.M. Current Epidemiology and Growing Resistance of Gram-Negative Pathogens. **Korean J Intern Med**, v.27, n.2, p.128-142, 2012.

LIVERMORE, D.M.; CANTON. R.; GNIADKOWSKI, M.; NORDMANN, P.; ROSSOLINI, G.M.; ARLET, G.; AYALA, J.; COQUE, T.M.; KERN-ZDANOWICZ, I.; LUZZARRO, F.; POIREL, L.; WOODFORD, N. CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe. **J Antimicrob Chemother**, v.59, n.2, p.165-174, 2007.

LIVERMORE, M.D.; MUSHTAQ, S.; WARNER, M.; MIOSSEC, C.; WOODFORD, N. NXL 104 combinations versus *Enterobacteriaceae* with CTX-M extended spectrum β -lactamases and carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.62, n.5, p.1053-1056, 2008.

MAGALHÃES, V.B.; FERREIRA, J.C.; BARELLI, C.; DARINI, A.L.C. Eletroforese em campo pulsante em bacteriologia—uma revisão técnica. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v.64, n.2, p.155-161, 2005.

MARRA, A.R.; CAMARGO, L.F.; PIGNATARI, A.C.; SUKIENNIK, T.; BEHAR, P.R.; MEDEIROS, E.A.; RIBEIRO, J.; GIRÃO, E.; CORREA, L.; GUERRA, C.; BRITES, C.; PEREIRA, C.A.; CARNEIRO, I., REIS, M.; DE SOUZA, M.A.; TRANCHESI, R.; BARATA, C.U.; EDMOND, M.B. Nosocomial bloodstream infections in Brazilian hospitals: analysis of 2,563 cases from a prospective nationwide surveillance study. **J Clin Microbiol**, v.49, n.5, p.1866–1871, 2011.

MARRA, Alexandre Rodrigues. Análise dos fatores de risco relacionados à letalidade das infecções da corrente sanguínea hospitalares por *Klebsiella pneumoniae*. Dissertação (Mestrado)- Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, 2002.

MARVIN, L.F.; ROBERTS, M.A.; FAY, L.B. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. **Clinica Chimica Acta**, v.337, n.1–2, p.11-21, 2003.

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

MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, RA.; SCHWABER, M.J.; DAIKOS, G.L., CORMICAN, M.; CORNAGLIA, G.; GARAU, J.; GNIADKOWSKI, M.; HAYDEN, M.K.; KUMARASAMY, K.; LIVERMORE, D.M.; MAYA, J.J.; NORDMANN, P.; PATEL, J.B.; PATERSON, D.L.; PITOUT, J.; VILLEGAS, M.V.; WANG, H.; WOODFORD, N.; QUINN,

J.P.; Clinical epidemiology of the global expansion of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemases. **Lancet Infect. Dis**, v.13, n.9, p.785–796, 2013.

NAAS, T.; POIREL, L.; NORDMANN, P. Minor extended-spectrum beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Infect**, v.14, n.1, p.42–52, 2008.

NASEER, U.; SUNDSFJORD, A. The CTX-M conundrum: dissemination of plasmids and *Escherichia coli* clones. **Microb Drug Resist**;; v.17, n. 1, p.83–97, 2011.

NORDMANN, P.; POIREL, L. The difficult-to-control spread of carbapenemase producers in *Enterobacteriaceae* worldwide. **Clin. Microbiol. Infect**, v.20, n.9, p.821-830, 2014.

PAPP-WALLACE, K.M.; BETHEL, C.R.; DISTLER, A.M.; KASUBOSKI, C.; TARACILA, M.; BONOMO, R.A. Inhibitor resistance in the KPC-2 beta-lactamase, a preeminent property of this class A beta-lactamase. **Antimicrob. Agents Chemother**, v.54, n.2, p.890–897, 2010.

PATEL, G.; BONOMO, R.A. Status report on carbapenemases: challenges and prospects. **Expert Rev Anti Infect. Ther**, v.9, n.5, p.555–570, 2011.

PATEL, R. MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. **Clinical Chemistry**, v. 61, n.1, p.100-111, 2014.

PATEL, R. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry in clinical microbiology. **Clin Infect Dis**, v.57, n.4, p.564–72, 2013.

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

PATERSON, L.D.; DOY, Y. A step closer to extreme drug resistance (XDR) in Gram Negative Bacilli. **Clin Infect Dis**, v.45, n.9, p.1179-1181, 2007.

PEIRANO, G.; SEKI, L.M.; VAL PASSOS, V. L.; PINTO, M.C.; GUERRA, L.R.; ASENSI, M.D. Carbapenem-hydrolysing beta-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.2, p.265-268, 2009.

PETRI, W.A. Antimicrobianos: Penicilinas, Cefalosporinas e outros antibióticos β-lactâmicos. In: GILMAN, GOODMAN & (Ed.) **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw-hill, 2005. 891-912 p.

PFALLER, M.A.; ACAR, J.; JONES, R.N.; VERHOEF, J.; TURNIDGE, J.; SADER H.S. Integration of molecular characterization of microorganisms in a global antimicrobial resistance surveillance program. **Clin Infect Dis**. v.32, n. 2, p.156-167, 2001.

PINCUS, D.H. Encyclopedia of rapid microbiological methods: **Microbial Identification Using the Biomérieux VITEK 2 System Biomérieux**, v.1. p. 1-32, 2005.

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

POIREL, L.; BONNIN, R.A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum β -lactamases. **Infection, Genetics and Evolution**, v.12, n.5, p.883–893, 2012.

POIREL, L.; THOMAS, I.L.E.; NAAS, T.; KARIM, A.; NORDMANN, P. 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.** v.44, n.3, p.622–632, 2000.

POLLACK M., CHARACHE P., NIEMAN R.E., JETT M.P., REIMHARDT J.A., HARDY P.H. JR. Factors influencing colonisation and antibiotic-resistance patterns of gram-negative bacteria in hospital patients. **Lancet**. v. 2, n. 7779, p. 668-71. 1972.

REINERT, R.R.; LOW, D.E.; ROSSI, F.; ZHANG, X.; WATTAL, C.; DOWZICKY, M.J. Antimicrobial susceptibility among organisms from the Asia/Pacific Rim, Europe and Latin and North America collected as part of TEST and the in vitro activity of tigecycline. **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.5, p.1018-1029, 2007.

ROSSI, A.; LOPARDO, H.; WOLOJ, M.; PICANDET, A. M.; MARÍÑO, M.; GALDS, M.; RADICE, M.; GUTKIND, G. Non-typhoid *Salmonella* spp. resistant to cefotaxime. **J. Antimicrob. Chemother.** v.36, n.4, p.697–702, 1995.

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

SCHWARTZ, D.C.; CANTOR, C. R. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. **Cell**, v.37, n.1, p.67-75, 1984.

SHAH, A.A.; HASAN, F.; AHMED, S.; HAMEED, A. Characteristics, epidemiology and clinical importance of emerging strains of Gram-negative bacilli producing extended-spectrum beta-lactamases. **Res Microbiol**, v.155, n.6, p.409-421, 2004.

SOUGAKOFF, W.; GOUSSARD, S.; COURVALIN, P. The TEM-3 β -lactamase, which hydrolyzes broad-spectrum cephalosporins, is derived from the TEM-2 penicillinase by two amino acid substitutions. **FEMS Microbiol. Lett**, v.56, n.3 p.343–348, 1988.

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

TOLENTINO, Fernanda Modesto. **Deteção e Identificação dos genes de beta-lactamases *blaSHV*, *blaTEM* e *blaCTX-M* em *Klebsiella pneumoniae* isoladas em um Hospital Terciário do Estado de São Paulo**. Dissertação (Mestrado em Microbiologia) -Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, 2009.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R. E CASE, C.L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 934 p.

TZOUVELEKIS, L. S.; BONOMO, R. A. SHV-type beta-lactamases. **Curr Pharm Des**, v.5, n.11, p. 847–864, 1999.

WILLIAMS, J.D. β -lactamases and β -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v.12, p. 3-7, 1999.

YIGIT, H.; QUEENAN, A.M.; ANDERSON, G.J.; DOMENECH-SÁNCHEZ, A.; BIDDLE, J.W.; STEWARD, C.D.; ALBERTI, S.; BUSH, K.; TENOVER, F.C. Novel carbapenem-hydrolyzing beta-lactamase, KPC-1, from a carbapenem-resistant strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrob Agents Chemother**, v.45, n.4, p.1151-1161, 2001.

ZAMPARETTE, Caetana Paes. DETERMINAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE BETALACTAMASES DE ESPETRO ESTENDIDO EM *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter* spp. DE PACIENTES INTERNADOS NO HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROFESSOR POLYDORO ERNANI DE SÃO THIAGO (HU/UFSC). Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós-Graduação em Farmácia – Área de Concentração em Análises Clínicas – da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

APÊNDICICE A

PROTOCO DE EXTRAÇÃO DO DNA PELO Kit “Easy DNA”

- Reativação das cepas em caldo BHI (18-24h) a 35°C;
- Coletar uma alíquota de 1,0ml contendo ($\sim 1 \times 10^9$) cells/ml;
- Centrifugar a alíquota (3000 rpm /10 min), descarta o sobrenadante;
- Adiciona 350µl da solução A (solução de lise), vortexar;
- Incubar a 65°C/10 min;
- Adicionar 150µl da solução precipitante (solução B) e agitar vigorosamente até ficar uniformemente viscosa; (10s a 1 min);
- Adicionar 500µl de clorofórmio em cada tubo e agitar até a obtenção de uma solução homogênea; (10s a 1 min);
- Centrifugar (13.000rpm/ 10 min a 4°C) para separação das fases;
- Transferir a fase superior para novos tubos.

Precipitação do DNA

- Adicionar em cada tudo 1ml de etanol absoluto gelado (-20°C) e homogeneizar;
- Incubar em gelo por 30 minutos;
- Após incubação, centrifugar (13.000rpm/ 10 min a 4°C);
- Remover o etanol e lavar o DNA precipitado com 500 µl de etanol 80% gelado (-20°C) e homogeneizar;
- Centrifugar (13.000rpm/ 10 min a 4°C);
- Descartar o sobrenadante e após completa evaporação do etanol deve-se ressuspender o “pellet” em 100µl de solução tamponante, adicionado de 2µl de RNase (2mg/ml); Deixar secar ao ar por 5 min;
- Incubar os tubos a 37°C por 30 minutos;
- Armazenar o DNA obtido em freezer (-20°C) para posterior utilização.

Materiais

- Tubos BHI para reativação das cepas;
- Pipetas (10, 100 e 1000µl);
- Eppendorfs (20 tubos);
- Etanol (100% e 80% gelado);
- Clorofórmio;
- Gelo triturado.

OBS: Caso sejam formados precipitados na solução devido ao processo de armazenamento em temperatura de refrigeração, aqueça-a a 45 °C para dissolvê-los, mas deixe-a esfriar antes de usá-la.

APÊNDICICE B

TIPAGEM MOLECULAR – Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

A avaliação da similaridade genética dos trinta e seis três isolados clínicos de *K. pneumoniae* incluídos neste estudo foi avaliada pela técnica da eletroforese em campo pulsado (PFGE).

Procedimento 1: Preparação dos plugs com DNA bacteriano

As amostras selecionadas foram cultivadas em MacConkey para o isolamento de colônias puras, das quais, duas a quatro colônias foram incubadas em 3 mL de caldo TSB à 37°C por 18 a 24 horas. Após este tempo, as culturas foram centrifugadas, por 15 minutos, a 3.000 rpm, e os sobrenadantes desprezados. O sedimento foi então ressuspensão em 1 mL de solução salina, homogeneizado e transferido para um tubo de microcentrífuga previamente pesado. Os tubos foram centrifugados, por 1 minutos, a 12.000 rpm, e todo o sobrenadante foi removido e o tubo novamente pesado. O sedimento foi ressuspensão em solução salina, na proporção 1:1 entre o volume de diluente e o peso do material obtido pela centrifugação.

Desta suspensão de células, 5 µL foi transferido para outro tubo de microcentrífuga, ao qual foi adicionado 300 µL de tampão TEN (TRIS 100 mM pH 7.5, EDTA 100 mM e NaCl 150 mM), e posteriormente, 340 µL de agarose 2% (Ultrapure™ Low Melting Point Agarose, Invitrogen, Carlsbad, EUA). Esta mistura foi homogeneizada com o auxílio de uma pipeta, e então colocada em moldes, com cuidado para não haver a formação de bolhas, para a formação de blocos de gel. Depois de solidificados, os blocos foram transferidos para uma placa de microdiluição com 24 poços e incubados a 37°C por 5 horas em tampão EC (TRIS 6 mM pH 6,5, NaCl 1 M, EDTA 0,01 M, Brij 58 0,5%, Sarcosil 0,5% e Deoxiglicolato 0,2%). Após a remoção do tampão EC, os blocos foram lavados, por 2 vezes, com 2 mL de CHEF-TE (Tris 0,1 M pH 7,5, EDTA 0,1 M), sendo que a última lavagem durou entre 10 e 30 minutos. Os blocos de gel foram então cobertos com 2 mL de tampão ES (EDTA 0,4 M pH 9,3 e Sarcosil 10%) contendo 20 mg/mL de proteinase K (USB Corporation, Cleveland, EUA), e, então, incubados por 12 horas a 50°C. Posteriormente ao tratamento com proteinase K, foram realizadas quatro lavagens com 2 mL de CHEF-TE, com uma hora de intervalo entre cada lavagem. Os blocos de gel foram armazenados em CHEF-TE, a 5°C, até o momento da digestão do DNA bacteriano.

Procedimento 2: Digestão do DNA bacteriano com enzima de restrição

Para a digestão do DNA bacteriano, os blocos de gel foram cortados em 3 partes iguais, e somente um pedaço deste bloco foi transferido para uma placa de microdiluição de 96 poços, onde estavam contidos 200 μ L da solução DNS (TRIS 20 mM pH 8,0 e cloreto de magnésio 1 mM). Esta solução foi imediatamente substituída assim que o último bloco foi colocado na placa, ficando então em temperatura ambiente por uma hora. Esta lavagem foi repetida por 4 vezes. Após a última lavagem e a remoção do tampão DNS, os blocos foram incubados por 1 hora a 5°C com o tampão de enzima de restrição (5 μ L do tampão 10X da enzima, 0,5 μ L de BSA e 44,5 μ L de água destilada). O DNA bacteriano contido nos blocos de agarose foi então submetido à clivagem com a enzima *Spe* I (New England Biolabs, Ipswich, EUA), a 37°C por 12 a 20 horas.

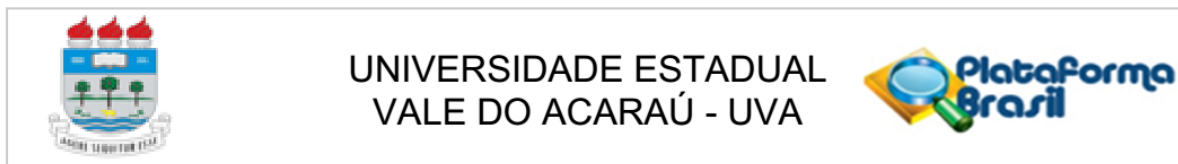
Procedimento 3: Eletroforese em campo pulsado (PFGE)

A eletroforese foi em gel de agarose 1%, em TBE 0,5X (TRIS 0,089 M, Ácido Bórico 0,089 M e EDTA 0,002 M) no sistema CHEF DR II (BioRad Laboratories, Inc., Hercules, EUA) com as seguintes condições: *Switch time* inicial-final 5,0-60, a 6 V/cm por 23 h a 13°C. O marcador de peso molecular de 48,5 Kb (New England Biolab, EUA) foi aplicado no gel para mensurar o tamanho dos fragmentos obtidos. Os géis foram corados com brometo de etídio (0,08 μ L/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, EUA) por uma hora, descorados em água destilada por mais uma hora e a diferenciação das bandas visualizada sob a luz ultravioleta - 320nm (GelDoc Quantity One; BioRad Laboratories, EUA).

Procedimento 4: Construção do Dendograma para avaliação da similaridade genética

Os padrões das bandas foram avaliados pelo software BioNumerics versão 6.0 (Applied Maths, Belgium). O coeficiente de similaridade utilizado foi o coeficiente de Dice com padronização de $\geq 80\%$ para os isolados serem considerados como pertencente ao mesmo grupo clonal. O dendograma foi construído pelo método da média aritmética não-ponderada (UPGMA). Os valores utilizados para otimização e tolerância para todos os isolados foram 0,8 e 1,0%, respectivamente.

ANEXO

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE β -LACTAMASES DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) EM BACILOS ENTÉRICOS NOSOCOMIAIS ISOLADOS DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SOBRAL E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO COMPOSTO β -CITRONELLOL

Pesquisador: FRANCISCO CESAR BARROSO BARBOSA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 24851313.3.0000.5053

Instituição Proponente: Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

Patrocinador Principal: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 528.783

Data da Relatoria: 12/02/2014

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após apresentação e discussão do projeto, o colegiado acatou a relatoria que classifica o projeto como aprovado.