



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE MEDICINA – CAMPUS DE SOBRAL**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JISBAQUE MELO BRAGA**

**PREVALÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E  
*Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS NO HOSPITAL  
REGIONAL NORTE EM SOBRAL/CE E DETECÇÃO GENÉTICA DE *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>  
*bla*<sub>CTX-M</sub> E *bla*<sub>GES</sub> EM ESPÉCIMES PRODUTORES DE BETALACTAMASE DE  
ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

**SOBRAL**

**2016**

**JISBAQUE MELO BRAGA**

**PREVALÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E  
*Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS NO HOSPITAL  
REGIONAL NORTE EM SOBRAL/CE E DETECÇÃO GENÉTICA DE *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>  
*bla*<sub>CTX-M</sub> E *bla*<sub>GES</sub> EM ESPÉCIMES PRODUTORES DE BETALACTAMASE DE  
ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Orientador: Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa

**SOBRAL**

**2016**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

B794p Braga, Jisbaque Melo.  
PREVALÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS NO HOSPITAL REGIONAL NORTE EM SOBRAL/CE E DETECÇÃO GENÉTICA DE blaTEM, blaSHV blaCTX-M E blaGES EM ESPÉCIMES PRODUTORES DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL) / Jisbaque Melo  
Braga. – 2017.  
100 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Francisco César Barroso Barbosa.

1. Infecção hospitalar. 2. *Escherichia coli*. 3. *Klebsiella pneumoniae*. 4. ESBL. 5. Tipagem molecular. I.  
Título.

---

CDD 610

**JISBAQUE MELO BRAGA**

**PREVALÊNCIA E SENSIBILIDADE ANTIMICROBIANA DE *Escherichia coli* E  
*Klebsiella pneumoniae* ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS NO HOSPITAL  
REGIONAL NORTE EM SOBRAL/CE E DETECÇÃO GENÉTICA DE *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>  
*bla*<sub>CTX-M</sub> E *bla*<sub>GES</sub> EM ESPÉCIMES PRODUTORES DE BETALACTAMASE DE  
ESPECTRO ESTENDIDO (ESBL)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Microbiologia aplicada.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Camila Gomes Virgínio Coelho (Examinadora)  
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

---

Prof. Dr. Daniel Hardy Melo (Examinador externo)  
Universidade Federal do Ceará - *Campus* de Sobral

---

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

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, por sua imensa misericórdia e amor, por ter me salvado, um pobre pecador.  
A Ele toda a glória para todo o sempre!

Aos meus pais, Arimatea e Júlia, que se alegram com o meu sucesso e que me ensinaram valores que estão se perdendo na sociedade de hoje.

Aos meus irmãos, Isaque e Jocsã, pelo incentivo incondicional.

Aos meus irmãos da Igreja Batista em Salgado dos Mendes, pela amizade e orações.

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Francisco César Barroso Barbosa, meu orientador, por sua paciência, confiança e orientações e por ter acreditado nesse fisioterapeuta microbiologista.

Ao Mestre e doutorando Francisco Ruliglésio Rocha, que foi meu orientador informal, mas que com paciência e insistência muito me ensinou sobre rotina laboratorial e práticas em microbiologia.

Ao professor Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, inicialmente meu orientador, por sua confiança e, sobretudo, exemplo.

Aos meus colegas da vida acadêmica que tanto colaboraram para concretização dessa pesquisa: Jéssica Moraes, Izabelly Linhares, Jordânia Magalhães, Xhaulla Fonseca, Weveley Ferreira, Marcela Paiva, Rosineida Rodrigues e especialmente Paulo de Tarso.

Aos parceiros do laboratório Pasteur, Dra. Tereza Bandeira, Ms. Milton Ventura e Elayne Tavares, pela gentileza com a triagem e estoque de amostras.

À minha parceira no Hospital Regional Norte, Rejane Pacheco, por sua presteza e disponibilidade.

À minha amiga e incentivadora Maria Xavier, pelo companheirismo e cumplicidade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará, pela oportunidade que tive de aprender e por poder colaborar com produção científica para o bem da sociedade.

**A todos vocês, minha gratidão!**

## RESUMO

*Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são bacilos Gram-negativos responsáveis por uma parcela significativa de infecções em ambiente hospitalar. Sua importância aumentou devido ao surgimento de espécimes produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Essas enzimas são produzidas por alguns bacilos Gram-negativos e conferem resistência aos betalactâmicos, como cefalosporinas e aztreonam. Nesses patógenos, a maioria das ESBL identificadas é do tipo TEM, SHV e CTX-M. Este estudo teve como objetivo analisar a prevalência e a sensibilidade antimicrobiana de *E.coli* e *K. pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais do Hospital Regional Norte, Sobral/CE, Brasil no período de março de 2015 a março de 2016, assim como realizar a detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>GES</sub> nos isolados que exibiram fenótipo ESBL. No total, 245 isolados (132 *E. coli* e 113 *K. pneumoniae*) foram analisados. Destes, 145 (59,1%) apresentaram fenótipo ESBL e 44 foram caracterizados geneticamente quanto à detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> e *bla*<sub>GES</sub>. As taxas de produção de ESBL por *E.coli* e *K. pneumoniae* foram 49,2% e 70,8%, respectivamente. Essa pesquisa revelou que *E.coli* produtoras de ESBL foram mais sensíveis ao meropenem (100%), amicacina (96,9%), colistina (90,8%) e tigeciclina (90,8%), e mais resistentes à ampicilina (100%), ceftriaxona (100%) e cefepima (96,9%). Já *K. pneumoniae* produtoras de ESBL foram mais sensíveis à colistina (100%), amicacina (96,2%) e meropenem (93,7%), e mais resistentes à ceftriaxona (100%), ceftazidima (100%), cefepima (98,7%) e ampicilina (98,7%). O gene *bla*<sub>CTX-M</sub> foi detectado em 12 (27,2%) isolados, os genes *bla*<sub>TEM</sub> e *bla*<sub>SHV</sub> foram detectados em 3 espécimes cada um (6,8%), o gene *bla*<sub>GES</sub> foi detectado em apenas um isolado (2,2%), enquanto os genes *bla*<sub>KPC</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> não foram detectados. Nossos achados revelam altos índices de resistência aos betalactâmicos, assim como tendência linear crescente para produção de ESBL pelas espécies estudadas. O gene com maiores taxas de detecção entre os isolados foi o gene *bla*<sub>CTX-M</sub> que, certamente, é o gene ESBL mais importante clinicamente na atualidade. Nós detectamos um isolado de *Klebsiella pneumoniae* contendo o gene *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>CTX-M</sub>, sendo do nosso conhecimento o primeiro relato no Brasil, o que demonstra o grande potencial de disseminação mundial de genes de resistência entre bacilos Gram-negativos.

**Palavras-chave:** Infecção hospitalar; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; ESBL; Tipagem molecular.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are Gram-negative bacilli account for a significant portion of infections in hospitals. Its importance has increased due to increased production of beta-lactamases of extended spectrum (ESBL). These enzymes are produced by some Gram-negative bacilli and mediate resistance to beta-lactams, such as cephalosporins and aztreonam. In these pathogens, the majority of the ESBL identified are TEM, SHV and CTX-M types. This study aimed to analyze the prevalence and antimicrobial susceptibility of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from nosocomial infections in North Regional Hospital in Sobral/CE, Brazil, from March 2015 to March 2016, and to detect *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes of isolates which exhibited ESBL phenotype. A total of 245 isolates (132 *E. coli* and 113 *K. pneumoniae*) were analyzed. Of these, 145 (59.1%) had ESBL phenotype and 44 were characterized genetically by presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes. The rates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* ESBL producers were 49.2% and 70.8%, respectively. This research revealed that ESBL-producing *E. coli* strains were more sensitive to meropenem (100%), amikacin (96.9%), colistin (90.8%) and tigecycline (90.8%), and more resistant to ampicillin (100%), ceftriaxone (100%) and cefepime (96.9%). On the other hand, *K. pneumoniae* ESBL producers were more sensitive to colistin (100%), amikacin (96.2%) and meropenem (93.7%), and more resistant to ceftriaxone (100%), ceftazidime (100%), cefepime (98.7%) and ampicillin (98.7%). The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in 14 (31.8%) isolates, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes were detected both in 3 specimens (6.8%), the *bla*<sub>GES</sub> gene was detected in only one isolate (2.2%), while *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> genes were not detected. Our findings show high levels of resistance to beta-lactam antibiotics, as well as increasing linear trend for ESBL production by the studied species. The gene with the highest detection rates among the isolates was *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, which is certainly the most important ESBL gene today. We detected one strain of *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, being of our knowledge the first report in Brazil, which demonstrates the great potential for worldwide spread of resistance genes between Gram-negative bacillus.

**Keywords:** Nosocomial infection; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; ESBL; Molecular typing.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Representação esquemática do Meio IAL.....	23
Figura 2 -	Método de Disco-difusão.....	25
Figura 3 -	Cartões reagentes para identificação fenotípica dos microorganismos.....	26
Figura 4 -	Estrutura química dos antibióticos $\beta$ -lactâmicos.....	28
Figura 5 -	Mecanismo de ação de uma serino- $\beta$ -lactamase.....	30
Figura 6 -	Percurso metodológico do estudo <i>in vitro</i> .....	43

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características estruturais e funcionais dos principais grupos de betalactamases.....	
...	31
Tabela 2 - <i>Primers</i> utilizados para amplificação dos genes de resistência aos $\beta$ -lactâmicos	deste
estudo.....	45

## ARTIGO 1:

### GRÁFICOS

Graph 01 - Incidence of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> for total number of the positive cultures.....	51
Graph 02 - Percentual incidence of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> for total number of the positive cultures.....	52
Graph 03 - Monthly count variation of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates of patients with nosocomial infection from HRN.....	52
Graph 04 - Distribution by sector of <i>Escherichia coli</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	53
Graph 05 - Distribution by sector of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	53
Graph 06 - Distribution, by gender of the patient, of <i>Escherichia coli</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	54
Graph 07 - Distribution, by gender of the patient, of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	54
Graph 08 - Distribution, by age of the patient, of <i>Escherichia coli</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	55
Graph 09 - Distribution, by age of the patient, of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	55
Graph 10 - Distribution, by site of infection, of <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	56

Graph 11 - Distribution, by site of infection, of <i>Escherichia coli</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	56
Graph 12 - Distribution, by site of infection, of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	57
Graph 13 - Number of isolates of <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> identified between March 2015 and March 2016 from HRN.....	57
Graph 14 - ESBL production percentage by <i>Klebsiella pneumoniae</i> and <i>Escherichia coli</i> identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	58
Graph 15 - Susceptibility to antimicrobials of <i>Escherichia coli</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	59
Graph 16 - Susceptibility to antimicrobials of <i>Escherichia coli</i> ESBL-producers isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	59
Graph 17 - Susceptibility to antimicrobials of <i>Klebsiella pneumoniae</i> isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	60
Graph 18 - Susceptibility to antimicrobials of <i>Klebsiella pneumoniae</i> ESBL-producers isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.....	60

## FIGURAS

Figure 1 - Agarose gel 1% containing fragments of the <i>bla</i> <sub>CTX-M-1/2</sub> gene amplified by conventional PCR.....	61
Figure 2 - Agarose gel 1% containing fragments of the <i>bla</i> <sub>TEM-Like</sub> gene amplified by conventional PCR.....	62
Figure 3 - Agarose gel 1% containing fragments of the <i>bla</i> <sub>SHV</sub> gene amplified by conventional PCR.....	62

## TABELAS

Table 1 - Primers used in this study for amplification of genes conferring resistance to $\beta$ -lactams.....	50
Table 2 - Isolates harboring <i>bla</i> <sub>CTX-M-1/2</sub> , <i>bla</i> <sub>TEM-Like</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV-Like</sub> and <i>bla</i> <sub>GES-Like</sub> genes.	63

## **ARTIGO 2**

### **FIGURA**

Figure 1 - Agarose gel 1% containing fragments of *bla*<sub>GES</sub> gene amplified by PCR..... 75

### **TABELA**

Table 1 - Antimicrobial susceptibility profile of isolated J.KP15..... 74

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC -	Ácido Clavulânico
BC-2	$\beta$ -lactamase II of <i>Bacillus cereus</i>
BEL -	Belgium extended $\beta$ -lactamase
BES -	Brazil extended spectrum
BHI -	Brain Heart Infusion
BlaB -	$\beta$ -Lactamase class B
CA-SFM -	Committé Antibiogramme - Société Française de Microbiologie
CcrA -	Cefoxitin and imipenem resistant
CEP -	Comit� de Ética em Pesquisa
CIM -	Concentração Inibitória Mínima
CIP -	Comissão Interna de Pesquisa
CLED -	�gar de cistina lactose deficiente em electrólitos
CLSI -	Clinical and Laboratory Standards Institute
CphA -	Carbapenem hydrolyzing and first (A) from <i>Aeromonas hydrophila</i>
CTX-M -	Cefotaximase
DIN -	Deutsches Institut für Normung (alemão)
DNA -	�cido desoxirribonucleico
DNAse -	Enzima que degrada ácido desoxirribonucleico
dNTP -	Desoxirribonucle�tidos trifosfato
EDTA -	�cido etilenodiamino tetra-acético
EMB -	Eosina azul de metileno
EPM -	Escola Paulista de Medicina (�gar)
ESBL -	Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase
GES -	Guiana Extended Spectrum
GN -	Gram-negative
HRN -	Hospital Regional Norte – Sobral/CE
IBC -	Integron-borne cephalosporinase
IMP -	Imipenemase
IND -	From <i>Chryseobacterium</i> ( <i>Flavobacterium</i> ) <i>indologenes</i>
KCN -	Cianeto de potássio
kDa -	KiloDaltons

KPC -	Klebsiella pneumoniae Carbapenemase
L-1	Labile enzyme from Stenotrophomonas maltophilia
MBL -	Metallo- $\beta$ -lactamases
MILI -	Motilidade, Indol e Lisina (Ágar)
NAG -	N-acetilglicosamina
NAM -	N-acetilmurâmico
ONPG -	Orto-nitrofenilgalactose
OXA -	Active on oxacillin
PBP -	Penicillin-Binding Protein
PCR	Reação em cadeia da polimerase / Polymerase Chain Reaction
RNA -	Ácido ribonucleico
rpoB -	RNA polymerase subunit beta
rRNA -	Ácido ribonucleico ribossomal
SFO -	Also from Serratia fonticola
SHV -	Sulfhydryl-Variable $\beta$ -Lactamase
TBE	Tris/Borato/EDTA
TEM -	Temoniera $\beta$ -Lactamase
TLA -	Named after the Tlahuicas Indians
TZB -	Tazobactam
UFC -	Universidade Federal do Ceará
UNIFESP -	Universidade Federal de São Paulo
UTI -	Unidade de Terapia Intensiva
VEB -	Vietnam extended-spectrum $\beta$ -lactamase
VIM -	Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase



## LISTA DE SÍMBOLOS

% -	Porcentagem
> -	Maior que
$\geq$ -	Maior ou igual
® -	Marca registrada
$\mu$ l-	Microlitro
$\mu$ m -	Micrômetro
$\mu$ M -	Micromolar
CO <sub>2</sub> -	Gás carbônico
H <sub>2</sub> S -	Sulfeto de hidrogênio
mAh -	Miliampere-hora
MgCl <sub>2</sub> -	Cloreto de magnésio
ml -	Mililitro
mM -	Milimolar
ng -	Nanograma
nm -	Nanômetro
°C -	Grau Celsius
TM	<i>Trademark</i> (Marca comercial registrada)
U -	Unidades
Zn	Zinco
$\beta$ -	Beta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>1.1</b>	<b>Infecções hospitalares.....</b>	<b>18</b>
<b>1.2</b>	<b>Resistência bacteriana e betalactamases de espectro estendido.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3</b>	<b>Relevância clínica do estudo.....</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<i>Escherichia coli</i> e <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	<b>21</b>
<b>2.2</b>	Identificação laboratorial de enterobactérias.....	<b>22</b>
<b>2.3</b>	Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	<b>24</b>
<b>2.4</b>	O sistema automatizado VITEK® 2.....	<b>25</b>
<b>2.5</b>	Antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos.....	<b>27</b>
<b>2.6</b>	Betalactamases.....	<b>28</b>
<b>2.6.1</b>	<i>Mecanismo de ação das betalactamases</i> .....	<b>29</b>
<b>2.6.2</b>	<i>Classificação das betalactamases</i> .....	<b>30</b>
<b>2.7</b>	Betalactamases de espectro estendido (ESBL).....	<b>32</b>
<b>2.7.1</b>	<i>ESBL do tipo TEM</i> .....	<b>32</b>
<b>2.7.2</b>	<i>ESBL do tipo SHV</i> .....	<b>33</b>
<b>2.7.3</b>	<i>ESBL do tipo CTX-M</i> .....	<b>33</b>
<b>2.8</b>	Betalactamases que hidrolisam carbapenêmicos.....	<b>34</b>
<b>2.8.1</b>	<i>Família KPC</i> .....	<b>35</b>
<b>2.8.2</b>	<i>Família GES</i> .....	<b>36</b>
<b>2.8.3</b>	<i>Família VIM</i> .....	<b>37</b>
<b>2.9</b>	Diagnóstico molecular de ESBL .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>41</b>
<b>3.1</b>	Objetivo geral.....	<b>41</b>
<b>3.2</b>	Objetivos específicos.....	<b>41</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>42</b>
<b>4.1</b>	Tipo de estudo.....	<b>42</b>
<b>4.2</b>	Coleta de dados e considerações éticas.....	<b>42</b>
<b>4.3</b>	Critérios de inclusão e exclusão.....	<b>43</b>
<b>4.4</b>	Reativação dos isolados e extração de DNA genômico.....	<b>44</b>

4.5	Detecção dos genes <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> , <i>bla</i> <sub>KPC</sub> , <i>bla</i> <sub>GES</sub> e <i>bla</i> <sub>VIM</sub> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	45
5	ARTIGO I – Antimicrobial susceptibility and detection of <i>bla</i> <sub>TEM</sub> , <i>bla</i> <sub>SHV</sub> , <i>bla</i> <sub>CTX-M</sub> and <i>bla</i> <sub>GES</sub> genes in clinical <i>Escherichia coli</i> and <i>Klebsiella pneumoniae</i> extended-spectrum betalactamase-producing isolates from a teaching hospital in the North of the State of Ceará, Brazil.....	47
6	ARTIGO 2 – First report of a <i>bla</i> <sub>GES</sub> gene in a nosocomial isolate of <i>Klebsiella pneumoniae</i> in Northeast of Brazil.....	71
	REFERÊNCIAS GERAIS.....	79
	APÊNDICE.....	93
	ANEXO 1.....	94
	ANEXO 2.....	95
	ANEXO 3.....	96
	ANEXO 4.....	97

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Infecções hospitalares

Conforme a Portaria n.º 2.616 de 12 de maio de 1998 do Ministério da Saúde, a infecção hospitalar no Brasil é definida como toda aquela adquirida após a admissão do paciente em um hospital, podendo se manifestar durante a internação ou após a alta, desde que relacionado à permanência do paciente na instituição ou a procedimentos hospitalares. Também são consideradas infecções hospitalares as que se manifestam antes de 72 horas da internação, quando associadas a procedimentos diagnósticos e ou terapêuticos realizados durante este período. As infecções no recém-nascido são hospitalares, exceto as transmitidas de forma transplacentária e as associadas à bolsa rota superior a 24 horas (BRASIL, 1998; GARCIA *et al.*, 2013).

Grande parte destas infecções é causada por enterobactérias Gram-negativas e os gêneros mais frequentemente associados são *Escherichia sp.* e *Klebsiella sp.* (MARTINS, PICOLI, 2011). Infecção nosocomial é um problema grave em hospitais em todo o mundo e sua prevalência é duas a três vezes maior nos países em desenvolvimento em relação à Europa ou aos Estados Unidos da América. A incidência é particularmente elevada em unidades de terapia intensiva (UTI) em comparação com outros setores hospitalares (NAIDU *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016).

### 1.2 Resistência bacteriana e betalactamases de espectro estendido

Segundo Brooks *et al.* (2012), são cinco os mecanismos de resistência bacteriana a quimioterapia antimicrobiana: (1) produção de enzimas que destroem os fármacos, (2) modificação de sua permeabilidade ao fármaco, (3) desenvolvimento de um alvo estrutural alterado para o fármaco, (4) desenvolvimento de uma via metabólica alterada que omite a reação inibida pelo fármaco ou (5) elaboração de uma enzima alterada que ainda tem a capacidade de desempenhar sua função metabólica, mas é bem menos afetada pelo fármaco. Neste sentido, Resende (2009) relata que dentre estes mecanismos citados, a produção de enzimas é considerado o de maior relevância.

Segundo Oliveira (2009), betalactamases de espectro estendido (ESBL) são enzimas capazes de hidrolisar penicilinas, cefalosporinas de todas as gerações e monobactâmicos. As ESBL não conferem resistência às cefamicinas e carbapenêmicos e são

inibidas pela ação de inibidores de betalactamase, como o ácido clavulânico, tazobactam ou sulbactam. Como produtores de ESBL podemos citar *Enterobacter spp.*, *Salmonella spp.*, *Morganella*, *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens* e *Pseudomonas aeruginosa*. Porém, a maioria dos organismos produtores de ESBL são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (DIAS *et al.*, 2011; SHARMA, PATHAK, SRIVASTAVA, 2013; WOLLHEIM *et al.*, 2011).

Oliveira (2009) e Silva e Lincopan (2012) relataram que no Brasil foram detectadas variantes de ESBL do tipo TEM, SHV, CTX-M, OXA, BES, GES e VEB. Contudo, as variantes do tipo CTX-M são predominantes no país em comparação às enzimas do tipo TEM e SHV, prevalentes na América do Norte e no Oeste Europeu, respectivamente. Rocha, Pinto e Barbosa (2016) demonstraram que, no Brasil, os espécimes com maiores taxas de produção de ESBL são *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, e que as variantes do tipo CTX-M-2 e CTX-M-15 são as ESBL mais prevalentes no país.

### 1.3 Relevância clínica do estudo

Atualmente, a infecção hospitalar é considerada um dos grandes problemas de saúde pública, com impacto na morbimortalidade, tempo de internação e gastos com procedimentos diagnósticos e terapêuticos. Acrescenta-se a isso as repercussões para o paciente, sua família e a comunidade em geral, tal como o afastamento da vida social e do trabalho, com conseqüente comprometimento social, psicológico e econômico (KOBAYASHI, SADOYAMA, VIEIRA, 2009; SILVA, LINCOPAN, 2012; MOREIRA; GARCIA *et al.*, 2013).

As falhas no tratamento antimicrobiano se dão principalmente por infecções por bactérias multirresistentes (MOREIRA, 2013). Tem sido grande o impacto clínico e econômico da presença de microrganismos resistentes, particularmente no ambiente hospitalar. Nesse sentido, o surgimento contínuo de ESBL representa um desafio estratégico para a saúde humana no mundo inteiro (DEMIREL, 2013).

Dados coletados junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do Hospital Regional Norte mostram que de julho de 2014 a março de 2016 houve 2.079 culturas positivas de diferentes amostras clínicas. Deste total, foram identificadas 443 culturas positivas para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, o que representa 21,3% de infecções apenas por estas duas espécies. Além disso, observando o intervalo entre março de 2015 e março de 2016, *E. coli* e *K. pneumoniae* foram produtoras de ESBL em 60,0% das culturas (*E. coli* 49,2% e *K. pneumoniae* 70,8%).

Segundo a Assessoria de Comunicação da Secretaria da Saúde do Estado do Ceará, o Hospital Regional Norte (HRN) é o maior hospital público do Nordeste, excluindo-se os hospitais localizados nas capitais. Com um total de 382 leitos, o HRN realiza atendimentos em diferentes especialidades a todas as faixas etárias e dispõe de exames laboratoriais e de imagem, como radiografia, ultrassonografia, ressonância magnética e tomografia. O hospital que é situado em Sobral foi planejado para atender a 1,5 milhão de habitantes dos 55 municípios da Região Norte do Ceará (SESA, 2013).

No HRN há atendimentos em várias especialidades, dentre elas cirurgia geral, cirurgia vascular, cirurgia torácica, traumatologia, medicina interna, neurologia, neurocirurgia, nutrologia, mastologia, ginecologia, obstetrícia, psiquiatria, gastroenterologia, otorrinolaringologia, oftalmologia, reumatologia, pneumologia, hematologia, nefrologia, infectologia, cardiologia e radiologia. O HRN tem capacidade para realizar até 1.300 internações por mês. Do total de leitos, 40 leitos são de UTI (20 adultos, 10 neonatal e 10 pediátricos), e mais 30 leitos berçários de médio risco. Por dia, podem ser realizadas 60 cirurgias (SESA, 2013).

Vale ressaltar que o HRN é uma instituição planejada para ser um hospital de ensino, onde atualmente já são desenvolvidas atividades de ensino, pesquisa e extensão de instituições públicas da esfera federal (curso de medicina – Universidade Federal do Ceará), estadual (curso de enfermagem – Universidade Estadual Vale do Acaraú) e municipal (curso técnico em enfermagem – Escolas Profissionalizantes – Secretaria de Educação de Sobral). Além disso, há estágios para os alunos do curso de enfermagem, farmácia, fisioterapia, medicina, nutrição e serviço social do Instituto Superior de Teologia Aplicada – INTA.

Tendo em vista este panorama, o HRN figura como um hospital de referência e de suma importância para a saúde de toda a população da zona norte do Estado do Ceará. Dado o fluxo de pacientes advindos de outras unidades hospitalares (incluindo da capital, nos casos de neurocirurgia) e de várias outras cidades da zona norte do estado do Ceará, é essencial o acompanhamento e controle das infecções hospitalares visando à contenção da disseminação de genes de resistência entre espécimes nosocomiais. Nesse sentido, ressaltamos a importância de pesquisar a prevalência e detectar genes que conferem resistência às cefalosporinas e/ou aos carbapenêmicos em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de infecções nosocomiais no HRN. Certamente algumas ESBL podem não atingir um nível detectável por meio de testes de difusão em disco, só sendo possível sua identificação definitiva por métodos de detecção molecular (SHARMA, PATHAK, SRIVASTAVA, 2013).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*

Descobertas pelo cientista alemão-austríaco Theodor Escherich, em 1885, a *Escherichia coli* é uma bactéria bacilar Gram-negativa, anaeróbica facultativa e que não produz esporos. Pertence ao gênero *Escherichia*, que possui ainda mais quatro componentes: *Escherichia blattae*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia hermanni* e *Escherichia vulneris*. Todas são da família *Enterobacteriaceae*. São bactérias encapsuladas com 0,5 a 2,0 µm de diâmetro e 2,0 a 4,0 µm de comprimento e não esporuladas. São consideradas fermentadoras da glicose. Mostram bom crescimento em ágar MacConkey, mas não são capazes de crescer em meios contendo cianeto de potássio. São comumente encontradas em humanos, fazendo parte da microbiota intestinal de indivíduos saudáveis e imunodeprimidos. As síndromes clínicas mais comuns provocadas por esta enterobactéria são as infecções do trato urinário, bacteremia, meningites em neonatos e doenças diarreicas (DASHTI *et al.*, 2014; MANSOURI *et al.*, 2014; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012). Bioquimicamente, *Escherichia coli* tem as seguintes características: H<sub>2</sub>S negativo, fenilalanina negativo, indol positivo, motilidade positiva, citrato negativo, urease negativo, lisina positivo, lactose positivo e formação de gás positivo (BROOKS *et al.*, 2012; LEVY, 2004).

O gênero *Klebsiella* foi assim nomeado em homenagem ao trabalho do bacteriologista e médico teuto-suíço Theodor Albrecht Edwin Klebs, que se dedicou ao estudo de doenças infecciosas. Assim como o gênero *Escherichia*, o gênero *Klebsiella* faz parte da família *Enterobacteriaceae*. Após a análise filogenética de 16S rRNA e sequências genéticas *rpoB*, Drancourt *et al.* (2001) confirmaram que o gênero *Klebsiella* é heterogêneo e composto por espécies que formam três grupos: grupo I, que contém *K. granulomatis* e as três subespécies de *K. pneumoniae*; grupo II, contendo *K. ornithinolytica*, *K. planticola* e *K. terrigena*; e o grupo III, contendo *K. oxytoca*. Assim, *Klebsiella pneumoniae* é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, sendo esta última subespécie a mais importante do ponto de vista epidemiológico. *Klebsiella pneumoniae* é um bacilo Gram-negativo, encapsulado, em forma de bastonete, não esporulado, anaeróbio facultativo com melhor crescimento em condições aeróbias. Seu tamanho varia de 0,3 a 1,0 µm de diâmetro e 0,6 a 6,0 µm de comprimento, sendo imóvel. Pode causar pneumonia embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (trato urinário e feridas), em

particular em doentes imunologicamente deprimidos (LIMA *et al.*, 2014; MANSOURI *et al.*, 2014). Bioquimicamente, *Klebsiella pneumoniae* tem as seguintes características: H<sub>2</sub>S negativo, fenilalanina negativo, indol negativo, motilidade negativa, citrato positivo, urease positivo, lisina positivo, lactose positivo e formação de gás positivo (BROOKS *et al.*, 2012; LEVY, 2004).

## 2.2 Identificação laboratorial de enterobactérias

As enterobactérias formam a maior e mais heterogênea família de bactérias Gram-negativas de importância médica. São bacilos Gram-negativos, não esporulados, com motilidade variável, oxidase negativos, e que crescem em meios básicos (p. ex. caldo peptona), meios ricos (p. ex. ágar sangue, ágar chocolate e CLED), meios seletivos (Ágar MacConkey, EMB). São anaeróbios facultativos, já que crescem em aerobiose e anaerobiose, fermentam a glicose com ou sem produção de gás, são catalase positivos e reduzem nitrato a nitrito (BROOKS *et al.*, 2012; LEVY, 2004).

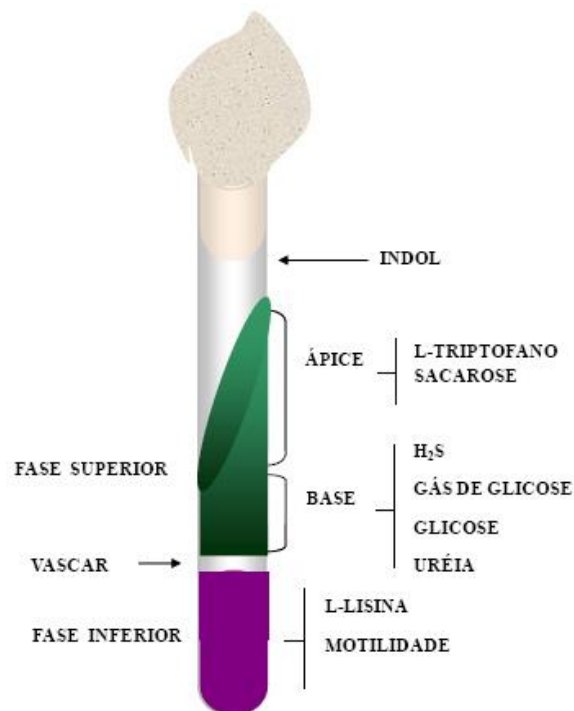
As principais provas para a identificação das enterobactérias de importância clínica são: fermentação de glicose e/ou lactose, motilidade, utilização de citrato, descarboxilação da lisina, oxidase, produção de sulfeto de hidrogênio (H<sub>2</sub>S), gás (CO<sub>2</sub>), indol, urease, fenilalanina desaminase ou triptofanase, de gelatinase ou DNase. Como provas complementares de identificação temos a (i) fermentação de outros carboidratos, como sacarose, maltose, arabinose, salicina, dulcitol, manitol, etc; (ii) utilização de aminoácidos: arginina e ornitina; (iii) hidrólise da esculina; (iv) ONPG; (v) utilização de acetato; (vi) vermelho de metila; (vii) teste de Voges-Proskauer; (viii) crescimento em KCN; (ix) Ágar Tartarato de Jordan e (x) lipase (BROOKS *et al.*, 2012; LEVY, 2004).

Os esquemas de identificação baseiam-se na determinação dos gêneros e espécies mais isolados na clínica, e nas provas mais características de cada gênero e espécie, baseado em alguns critérios como: facilidade de execução e interpretação, custo, rapidez para leitura, etc. Na rotina bacteriológica, existem várias alternativas e, com base em conjuntos ou sistemas simplificados de provas bioquímicas, é possível realizar a triagem e identificação presuntiva dos principais gêneros de interesse clínico. Desse modo, das enterobactérias isoladas de amostras clínicas, cerca de 90%, podem ser perfeitamente identificadas através desses esquemas, podendo o resultado ser entregue dentro de um espaço de tempo relativamente curto, geralmente, entre 48 a 72 horas. Exemplificando, podemos citar (BROOKS *et al.*, 2012; LEVY, 2004; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012):



- **Meio IAL (Instituto Adolfo Lutz):** Este meio foi elaborado para triagem de enterobactérias e consiste de nove provas em apenas um tubo de ensaio, que consistem em: indol, fermentação da sacarose e glicose e produção de gás, fenilalanina, uréia, H<sub>2</sub>S, lisina e motilidade (**Figura 01**);
- **Conjunto EPM / MILI / Citrato:** Trata-se praticamente da mesma combinação de reações do meio IAL ou Rugai & Araújo (modificado por Pessoa & Silva), separados em 2 tubos, passando a verificação do indol da tampa do IAL, para o meio MILi após adição do reativo de Kovacs;
- **Meio Tríplice Açúcar Ferro (TSI):** Considerado o mais clássico dos sistemas de identificação e também o mais utilizado no mundo, necessita de provas adicionais, mas tem a vantagem de ser de mais fácil interpretação. Baseia-se em provas de fermentação da glicose, lactose, sacarose, produção de gás e H<sub>2</sub>S.

**Figura 01** – Representação esquemática do Meio IAL



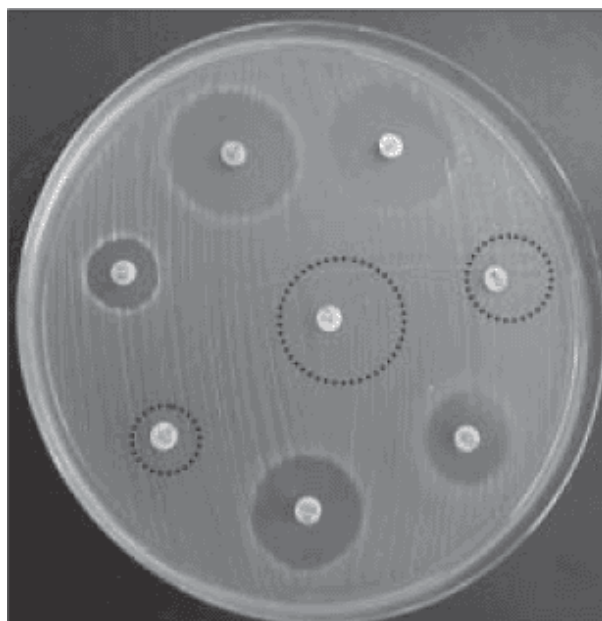
Fonte: <http://www.biomedicinabrasil.com>

A identificação de uma enterobactéria começa com a análise do material semeado através do crescimento em meios ricos e seletivos que, em geral, utiliza-se (i) para secreções: ágar sangue e MacConkey; (ii) para líquidos nobres e biópsias: Ágar Chocolate e MacConkey;

(iii) para fezes: MacConkey e Salmonella-Shigella e (iv) para urina: CLED ou ágar sangue e MacConkey. Devemos considerar que as enterobactérias sempre crescem em meios ricos (ágar sangue, chocolate e CLED), bem como nos meios seletivos: ágar MacConkey e Salmonella-Shigella. Os Gram-positivos como regra não crescem em ágar MacConkey e Salmonella-Shigella, exceto os enterococos. No ágar MacConkey e Salmonella-Shigella, além das enterobactérias e dos enterococos, podem crescer bactérias não fermentadoras e fungos do gênero *Candida*. Portanto, caracteriza-se uma enterobactéria quando ela está presente em todos os meios semeados, mas ainda é necessário diferenciar de outros microrganismos não muito exigentes como não fermentadores, enterococos e *Candida spp.* Portanto, recomenda-se realizar: (i) Gram da colônia isolada: sempre fazer o Gram para evitar enganos de interpretação (diferenciar cocos de bacilos, Gram positivos de Gram negativos e leveduras); (ii) prova da oxidase: indicada para detectar e/ou diferenciar o grupo *Aeromonas*, *Plesiomonas* e *Vibrio* que também são fermentadores; (iii) prova do metabolismo fermentador: triagem utilizando os meios de Hugh-Leifson com glicose (quando suspeitar de não fermentador), TSI (Tríplice Açúcar Ferro) ou EPM (Rugai sem sacarose), para enterobactérias; (iv) série bioquímica complementar: sempre necessária para caracterizar gênero e espécie, já que o número de provas vai permitir maior ou menor discriminação (LEVY, 2004; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

### 2.3 Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Os testes de disco-difusão, também conhecidos como testes de Kirby-Bauer provavelmente sejam os mais utilizados, embora não necessariamente os melhores. Uma placa de Petri contendo um meio de ágar sólido tem toda sua superfície uniformemente inoculada com uma quantidade padronizada do organismo a ser testado. Em seguida, discos de filtro de papel impregnados com agentes terapêuticos (antimicrobianos) em concentrações conhecidas são colocados na superfície do meio de cultura. Durante a incubação, os agentes quimioterápicos se difundem dos discos para o ágar. Quanto mais distante do disco o agente se difundir, menor será sua concentração. Se o agente quimioterápico for efetivo contra o organismo testado, uma zona de inibição se formará ao redor do disco após um período de incubação padronizado. O diâmetro da zona de inibição pode ser medido e, em geral, quanto maior a zona, maior a sensibilidade do micro-organismo ao antibiótico (**Figura 2**). O diâmetro da zona de inibição é comparado aos valores em uma tabela padronizada para a droga e a concentração, e o organismo pode ser classificado como sensível, intermediário ou resistente (BROOKS *et al.*, 2012; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

**Figura 2 – Método de Disco-difusão**

Fonte: Adaptado de SEJAS *et al*, 2003.

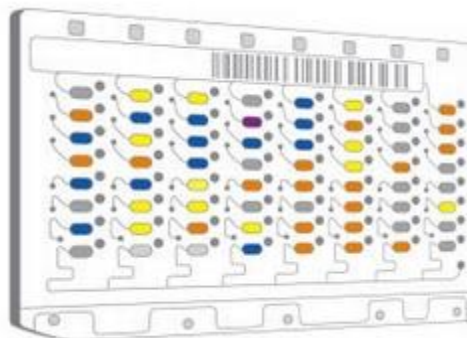
Para uma droga que apresenta baixa solubilidade, no entanto, a zona de inibição indicando que o micro-organismo é sensível será menor do que a zona gerada por uma droga que é mais solúvel e se difunde melhor no ágar. Resultados obtidos pelo método de disco-difusão frequentemente são inadequados para muitos objetivos clínicos. Entretanto, o teste é simples e barato, sendo mais utilizado quando instalações laboratoriais sofisticadas não estão disponíveis. Um método de difusão mais avançado, denominado teste E, permite ao técnico laboratorial estimar a CIM, ou seja, a menor concentração do antibiótico que previne o crescimento bacteriano visível. Uma tira plástica é coberta com um gradiente de concentração do antibiótico, e a CIM pode ser avaliada por uma escala impressa na tira plástica (RELLER, 2009; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

#### **2.4 O sistema automatizado VITEK® 2**

Vitek® 2 (BioMérieux, Marcy-l'Etoile, França) é um sistema de testes de sensibilidade antimicrobiana automatizado que permite determinação de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em 4 a 7 horas. O Vitek® 2 fornece leitura interpretativa padronizada da CIM através de cartões contendo substratos liofilizados que reagem bioquimicamente com a amostra biológica, gerando um perfil fenotípico específico

(BIOMÉRIEUX, 2014) (**Figura 3**). O seu desempenho superior, quando comparado a outros sistemas automatizados de detecção rápida, é devido ao maior número de poços em cada placa, sistemas óticos otimizados e algoritmos baseados em análises cinéticas de crescimento (FUNKE *et al.*, 1998; SANDERS *et al.*, 2000; WINSTANLEY, COURVALIN, 2011).

**Figura 3** – Cartões reagentes para identificação fenotípica dos microrganismos



Fonte: [www.biomerieux.com.br](http://www.biomerieux.com.br)

Os substratos presentes nos cartões mensuram as diversas atividades metabólicas do organismo, tais como acidificação, alcalinização, hidrólise enzimática e crescimento na presença de substâncias inibidoras (PINCUS, 2005).

Ao contrário de outros sistemas automatizados, o Vitek<sup>®</sup> 2 é baseado em uma extensa base de dados que compreende mais de 2.000 fenótipos e 20.000 espectros da CIM obtidos a partir de relatórios publicados por especialistas com as suas próprias bases de dados sobre fenótipos microbiológicos, além de dados da empresa fabricante, BioMérieux. Para cada um dos fenótipos reconhecidos, uma gama de dados sobre CIMs é avaliada para que uma CIM seja definida (FUNKE *et al.*, 1998; JOSSART, COURCOL, 1999; WINSTANLEY, COURVALIN, 2011).

Na fase de validação biológica, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 examina os dados de sensibilidade antimicrobiana e determina se as CIMs obtidas são consistentes com a identificação da espécie. Se um único erro for encontrado, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 realiza (i) uma mudança na identificação microbiológica para uma CIM condizente ou (ii) uma mudança numérica na CIM que irá torná-la coerente com a identificação. Nesses casos, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 presume que (i) ocorreu um erro nos dados gerados pelo próprio sistema, ou (ii) os resultados foram atípicos devido à cepa, ou (iii) um "falso" resultado negativo ocorreu (por exemplo, betalactamase não produzida), ou (iv) um resultado incorreto foi inserido manualmente. Uma correção na identificação é recomendado pelo sistema Vitek<sup>®</sup> 2 se for detectada apenas uma

única inconsistência na CIM. O sistema recomenda a reanálise do isolado se mais do que uma correção for necessária para alinhar a sensibilidade antimicrobiana com a identificação ou para coincidir com os fenótipos esperados. O sistema pode também recomendar correção biológica com base no fenótipo do organismo (WINSTANLEY, COURVALIN, 2011).

Durante a validação biológica, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 examina os dados de CIM para cada classe de antibiótico e determina um fenótipo para o isolado, comparando-os com CIMs armazenadas no banco de dados. Se as CIMs estiverem dentro da gama esperada para um fenótipo específico, é designado o fenótipo; se as CIMs estiverem dentro dos limites esperados para mais do que um fenótipo, o sistema lista todos os fenótipos e sugere a mais provável. Na etapa de interpretação terapêutica, o sistema atribui uma categoria clínica interpretativa (suscetível, intermediária ou resistente), utilizando uma das cinco diretrizes padrão de interpretação: CLSI, DIN, CA-SFM, resistência fenotípica ou resistência natural (PINCUS, 2005; SPANU *et al.*, 2006).

Com certos fenótipos, o sistema também pode sugerir uma correção terapêutica. Sendo assim, o nome da espécie e valor numérico da CIM não são alterados, mas a interpretação é. Desde que correções terapêuticas não impliquem em erros nos dados, o sistema pode sugerir múltiplas correções terapêuticas para um único isolado. Isolados para as quais as correções biológicas ou terapêuticas são sugeridas exigem intervenção humana para decidir se as correções devem ser aceitas. O sistema também deduz sensibilidade aos antibióticos não testados com base no fenótipo e sensibilidade a antibióticos que foram testados. Em todos os casos, o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 imprime um relatório indicando a CIM real, categorização sem alterações e a categorização após a interpretação. As razões para qualquer correção são apresentadas, permitindo avaliação de tal correção (PINCUS, 2005; SPANU *et al.*, 2006; WINSTANLEY, COURVALIN, 2011).

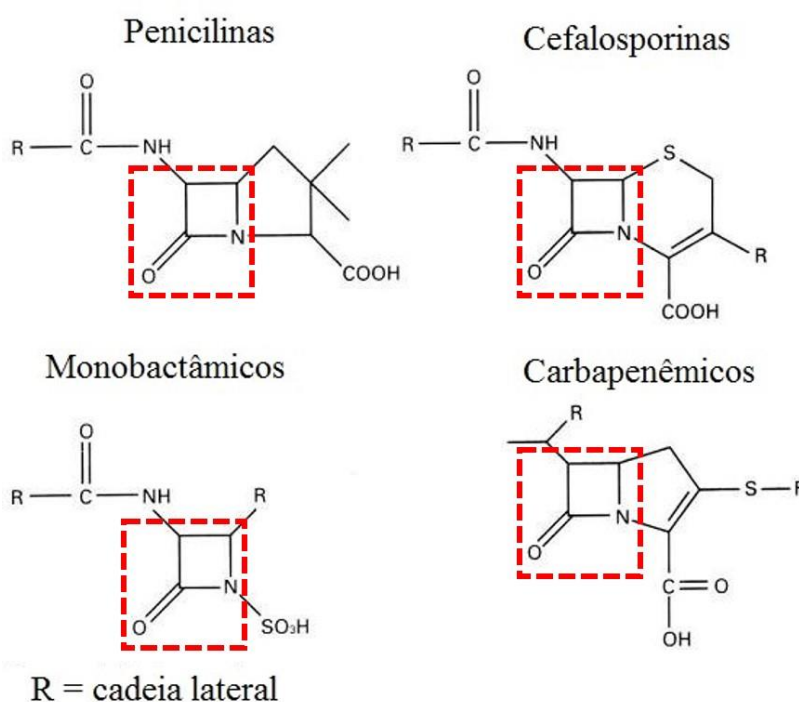
O sistema Vitek<sup>®</sup> 2 tem, pelo menos, uma atualização de software anual, que inclui modificações do sistema pericial. Dependendo do número de modificações e de quando as novas orientações são publicadas, a BioMérieux pode levar de um a dois anos, a partir da publicação das modificações, antes de liberar a atualização para o sistema Vitek<sup>®</sup> 2 (WINSTANLEY, COURVALIN, 2011).

## **2.5 Antimicrobianos $\beta$ -lactâmicos**

Os antibióticos  $\beta$ -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  $\beta$ -lactâmico, que é quem determina o mecanismo de ação dessas fármacos. A associação desse anel com um radical específico (radicais do carbono 6 do anel  $\beta$ -lactâmico) dá origem a diferentes grupos de antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenêmicos) (**Figura 4**). Vale ressaltar que, as diferentes cadeias laterais, proporcionam diversos perfis farmacodinâmicos, distintos espectros de ação antibacteriana e diferentes níveis de resistência as betalactamases (CASSELI *et al.*, 2001; SUÁREZ, GUDIOL, 2009).

**Figura 4** – Estrutura química dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos



Fonte: Adaptado de Williams *et al.*, 1999

Os antimicrobianos  $\beta$ -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).

## 2.6 Betalactamases

A produção de betalactamases é o mecanismo de resistência mais comum aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em bactérias Gram-negativas clinicamente importantes (BUSH,

JACOBY, 2010). Essas enzimas podem ser divididas com base em seu espectro hidrolítico em: betalactamases, betalactamases de espectro estendido (ESBL) e betalactamases que hidrolisam carbapenêmicos, também conhecidas como carbapenemases.

As betalactamases são enzimas capazes de hidrolisar o anel  $\beta$ -lactâmico das penicilinas, cefalosporinas de primeira e segunda geração, inativando sua ação antimicrobiana (LIVERMORE, 1995; BUSH, 2001). Exemplos desse grupo incluem as betalactamases 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).

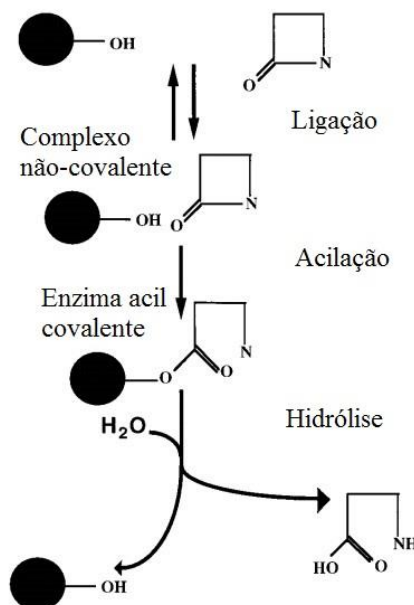
No entanto, com a introdução das cefalosporinas de espectro estendido na prática médica em meados dos anos de 1980, tais como ceftazidima e cefotaxima, betalactamases de espectro estendido (ESBL–*Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase*) começaram a ser identificadas em amostras clínicas resistentes a esses novos fármacos (BRADFORD, 2001). Essas enzimas são capazes de hidrolisar antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de terceira e quarta geração, restando como opção terapêutica apenas os carbapenêmicos (PATERSON, DOI, 2007). São importantes representantes desse 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 betalactamases mais estudadas atualmente (BUSH, JACOBY, 2010).

Os carbapenêmicos que são os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos de espectro mais potente e amplo não ficaram ilesos. A produção de carbapenemases, que são betalactamases que podem inativar os carbapenêmicos e todos os outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, tem sido constantemente detectadas em patógenos Gram-negativos (PATEL, BONOMO, 2011). Nessa categoria encontram-se as carbapenemases da classe A, tais como GES-2, KPC-2 e KPC-10 (BUSH, JACOBY, 2010).

### **2.6.1 Mecanismo de ação das betalactamases**

O mecanismo de ação dessas enzimas se dá inicialmente por meio de uma ligação não-covalente com o anel  $\beta$ -lactâmico (**Figura 5**). 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 5** – Mecanismo de ação de uma serino- $\beta$ -lactamase



Fonte: Adaptado de Livermore *et al.*, 1995.

### 2.6.2 Classificação das betalactamases

Devido à grande importância das betalactamases e a sua grande variedade, foram propostos métodos de classificação, a fim de facilitar os estudos com essas enzimas. Tradicionalmente, as betalactamases apresentam dois esquemas de classificação em razão da sua diversidade estrutural e preferência de substrato. O esquema proposto por Ambler (AMBLER, 1980) classifica as betalactamases em quatro classes moleculares: A) betalactamases de espectro estendido (ESBL), penicilinases e carbenicilinases; B) metalo- $\beta$ -lactamases (MBL); C) cefalosporinas cromossomais (AmpC); e D) oxacilinases. As enzimas das classes A, C e D são serino- $\beta$ -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- $\beta$ -lactamases (MBL). Nesta classificação, as enzimas do tipo ESBL pertencem à classe A.

O método proposto por Bush-Jacoby-Medeiros baseia-se na preferência de substrato da enzima e na inativação por inibidores de betalactamases. Nesta classificação as ESBLs pertencem ao subgrupo 2be que inclui as enzimas que hidrolisam penicilinas e os oximino- $\beta$ -lactâmicos tais como cefotaxima, ceftazidima e aztreonam a uma taxa geralmente maior que 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, essa 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 betalactamases.

**Tabela 1** – Características estruturais e funcionais dos principais grupos de betalactamases (adaptado de BUSH *et al.*, 1995).

<b>Bush-Jacoby (2010)</b>	<b>Ambler, 1980</b>	<b>Substrato(s) Distintivo</b>	<b>Inibição AC ou TZB</b>	<b>Características funcionais</b>
<b>Grupo Funcional</b>	<b>Classe Molecular</b>			
1	C	Cefalosporinas	Não	Maior hidrólise de cefalosporinas que benzilpenicilinas; hidrolisa cefamicinas
1e	C	Cefalosporinas	Não	Aumento da hidrólise de ceftazidima e frequentemente outros oximino- $\beta$ -lactâmicos
2a	A	Penicilinas	Sim	Maior hidrólise de benzilpenicilinas que cefalosporinas
2b	A	Penicilinas, cefalosporinas de primeira geração	Sim	Hidrólise similar de benzilpenicilinas e cefalosporinas. Nesse grupo temos as betalactamases 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 oximino- $\beta$ -lactâmicos (cefotaxima, ceftazidima, ceftriaxona, cefepima, aztreonam). Nesse grupo temos as betalactamases 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 oximino- $\beta$ -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 cefpirome
2d	D	Cloxacilina	Variável	Aumento da hidrólise de cloxacilina ou oxacilina
2de	D	Cefalosporinas de espectro estendido	Variável	Hidrolisa cloxacilina ou oxacilina e oximino- $\beta$ -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, oximino- $\beta$ -lactâmicos e cefamicinas. Nesse grupo temos as betalactamases que hidrolisam carbapenêmicos ou carbapenemases GES-2, KPC-2 e KPC-10

3a	B	Carbapenêmicos	Não	Hidrólise de espectro amplo incluindo carbapenêmicos, mas não monobactâmicos
3b	B	Carbapenêmicos	Não	Hidrólise preferencial de carbapenêmicos

AC, ácido clavulânico; TZB, tazobactam (Fonte: BUSH, JACOBY, 2010).

## 2.7 Betalactamases de espectro estendido (ESBL)

As ESBL começaram a ser identificadas a partir dos anos de 1980, originadas a partir de mutações pontuais em betalactamases 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* (JONES *et al.*, 2009; LIVERMORE *et al.*, 2007).

Em *K. pneumoniae*, a maioria das ESBL identificadas em isolados clínicos são do tipo 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 (JACOBY, 2006).

### 2.7.1 ESBL do tipo TEM

Em 1960, foi descrita a primeira betalactamase do tipo TEM. Ela foi identificada em uma amostra clínica de *E. coli* isolada da corrente sanguínea de uma paciente grega chamada Temoniera (origem da sigla 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 betalactamase mais comumente encontrada em bactérias Gram-negativas (BRADFORD, 2001). A betalactamase TEM-2 sofreu uma única mutação em relação a enzima precursora TEM-1, porém não foi suficiente para modificar seu espectro hidrolítico e são consideradas betalactamases 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, 223 variantes TEM já foram identificados, sendo que muitas delas (n=103) exibem um fenótipo ESBL (<http://www.lahey.org/Studies/>).

### **2.7.2 ESBL do tipo SHV**

SHV (*sulphydryl variable*) é uma betalactamase comumente encontrada em *K. pneumoniae*, sendo responsável por até 20% da resistência à 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 conferiu a esta enzima propriedades de espectro estendido, diferenciando-a da sua variante anterior 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, 193 variantes SHV já foram identificados, sendo que muitas delas (n=47) exibem um fenótipo ESBL (<http://www.lahey.org/Studies/>).

### **2.7.3 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 substrato preferencial. Além disso, são codificadas por genes *bla*<sub>CTX-M</sub>, localizados em plasmídios, os quais podem abrigar outros genes que codificam 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). No mesmo período, observou-se um surto de cepas de *Salmonella* resistentes à cefotaxima na América do Sul,

inicialmente em único hospital em La Plata, disseminando-se depois para unidades neonatais de hospitais pediátricos em Buenos Aires, Norte da Argentina e Uruguai (ROSSI *et al.*, 1995). Posteriormente, o sequenciamento da estrutura do gene identificou a enzima CTX-M-2 como responsável por este surto (BAUERNFEIND *et al.*, 1996).

No Brasil, os primeiros relatos de uma enzima pertencente à família CTX-M foram observados em amostras clínicas de enterobactérias coletadas em vários hospitais do 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 betalactamases conhecidas entre 2000 e 2012, respectivamente (BUSH, 2013).

A propagação mundial dessas 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 168 variantes CTX-M em todo o mundo (<http://www.lahey.org/Studies/>). Essas 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).

## 2.8 Betalactamases que hidrolisam carbapenêmicos

Os carbapenêmicos representam os fármacos de escolha para o tratamento de infecções causadas por bacilos Gram-negativos multirresistentes produtores de ESBL. No entanto, a resistência aos carbapenêmicos está sendo cada vez mais detectada, estando principalmente relacionada à ação de enzimas carbapenemases (PEIRANO *et al.*, 2009). Essas 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 *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase (KPC) são as carbapenemases mais frequentemente encontradas, principalmente entre enterobactérias (PEIRANO *et al.*, 2009). Essas enzimas eram poucos 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  $\beta$ -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). Outra betalactamase com capacidade de hidrolisar carbapenêmicos é a enzima VIM (*Verona integron-encoded metallo-β-lactamase*), que pertence a classe B de Ambler.

### 2.8.1 Família KPC

A primeira descrição de uma KPC (KPC-1) ocorreu em 1996 em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* no estado da Carolina do Norte, Estados Unidos. Novos surtos de bactérias produtoras de KPC eram infreqüentes até 2001, quando então foram relatados diversos casos em hospitais de Nova Iorque e a partir desse período disseminou-se para diversos outros países (YIGIT *et al.*, 2001).

Na América do Sul, o primeiro relato de detecção de uma KPC (KPC-2) ocorreu em 2006, em dois espécimes de *Klebsiella pneumoniae* isolados em 2005 na Colômbia (VILLEGAS *et al.*, 2006). No Brasil, supostamente, o primeiro relato de uma KPC (KPC-2) também ocorreu em 2006, referente a espécimes de *Klebsiella pneumoniae* isolados a partir de quatro pacientes internados em unidade de terapia intensiva de um hospital da cidade de Recife, nordeste do Brasil (MONTEIRO *et al.*, 2009). Apenas um mês após (entre setembro de 2007 e maio de 2008), a detecção de KPC-2 também foi relatada em seis isolados de *Klebsiella pneumoniae* provenientes de dois hospitais no Rio de Janeiro, sudeste do Brasil (PEIRANO *et al.*, 2009).

Sobre a incidência de casos de KPC no Brasil, os dados de Pavez, Mamizuka e Lincopan (2009) revelam que já em 2005 haviam espécimes produtores de KPC-2 no Brasil. Os autores realizaram um estudo junto a oito centros médicos para analisar espécimes resistentes ao imipenem. Além dos testes de Concentração Inibitória Mínima, foi realizada detecção do gene *bla*<sub>KPC</sub> por PCR. Foram encontrados dois espécimes não clones de *Klebsiella pneumoniae* carreando o gene *bla*<sub>KPC-2</sub>, isolados em maio de 2005 e novembro de 2007 a partir de culturas de sangue de dois pacientes em dois centros médicos distintos de São Paulo. Desta forma, compreende-se que, na verdade, os primeiros casos de KPC-2 no Brasil datam de 2005.

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).

As enzimas do tipo KPC são frequentemente encontradas em *Klebsiella 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 betalactamases do tipo KPC podem hidrolisar todos os antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo carbapenêmicos, cefalosporinas, cefamicinas, monobactâmicos e ácido clavulânico (YIGIT *et al.*, 2001; PAPP-WALLACE *et al.*, 2010). Desde o seu primeiro registro, 24 variantes do gene *bla*<sub>KPC</sub> foram identificadas (<http://www.lahey.org/Studies/>).

### 2.8.2 Família GES

A betalactamase GES (*Guiana Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase*) foi detectada pela primeira vez na França, em 1998, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae* em uma criança transferida de Cayenne, capital da Guiana Francesa. Essa enzima, GES-1, conferia resistência às cefalosporinas de espectro estendido, além de ácido clavulânico, tazobactam e imipenem (POIREL *et al.*, 2001).

Subsequentemente, o gene *bla*<sub>GES-1</sub> foi mais uma vez detectado na França, em 1999, em um isolado de *Pseudomonas aeruginosa* proveniente de uma amostra de secreção de trato respiratório de uma paciente internada em Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Pellegrin, na cidade de Bordeaux (DUBOIS *et al.*, 2002). O gene *bla*<sub>GES</sub> foi identificado por Duarte *et al.* (2003) em isolados clínicos de *K. pneumoniae*, coletadas entre fevereiro de 1999 e fevereiro de 2001, no Hospital de Santa Maria, Lisboa, Portugal. Uma nova variante, GES-2, foi descrita na África do Sul em 2000, a partir de um isolado de *P. aeruginosa* com resistência intermediária ao imipenem (PELLEGRINO *et al.*, 2006; POIREL *et al.*, 2001).

Em relato de 2004, a betalactamase GES-1 também foi detectada pelo Programa de Vigilância Antimicrobiana Sentinela – SENTRY, em São Paulo, Brasil. O gene *bla*<sub>GES-1</sub> foi encontrado em um espécime de *P. aeruginosa* (hemocultura), que infectou uma mulher de 63 anos que foi submetida a uma histerectomia e desenvolveu uma infecção da ferida enquanto recebia ceftriaxona, amicacina e metronidazol. Apesar da infecção ter sido erradicada com uso empírico de polimixina B mais vancomicina, a paciente morreu depois de um internamento de três meses em unidade de terapia intensiva (CASTANHEIRA *et al.*, 2004; PELLEGRINO *et al.*, 2006).

Dois outros tipos de enzima GES (GES-3 e GES-4), também codificadas por cassetes de genes inseridos em integrons classe 1, foram descritos em isolados de *Klebsiella*

*pneumoniae* no Japão (VOURLI *et al.*, 2004; WACHINO *et al.*, 2004). Foram incluídas no grupo das betalactamases da família GES duas outras ESBL, a IBC-1 e IBC-2, devido similaridade na sequência de aminoácidos. A enzima IBC-1 (GES-7) foi descrita em um isolado clínico de *Enterobacter cloacae* e IBC-2 (GES-8) em um isolado clínico de *P. aeruginosa*, ambos identificados na Grécia entre 1998 e 2000, respectivamente. Os genes *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>IBC</sub> foram encontrados associados a integrons classe 1 localizados em plasmídeos (GIAKKOUPÍ *et al.*, 2000; MAVROIDÍ *et al.*, 2001; PELLEGRINO *et al.*, 2006).

A enzima 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; PELLEGRINO *et al.*, 2006). Atualmente existem 27 variantes da enzima GES conhecidas (<http://www.lahey.org/Studies/>). Embora GES-1, GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 e GES-18 inicialmente não fossem classificadas como carbapenemases, seu espectro hidrolítico inclui carbapenêmicos e, por isso, são atualmente classificadas como carbapenemases (BEBRONE *et al.*, 2013).

### 2.8.3 Família VIM

Relatada em 1999 por Lauretti *et al.*, a produção de uma nova metalo- $\beta$ -lactamase foi detectada em um isolado clínico de *Pseudomonas aeruginosa* resistente aos carbapenêmicos. O espécime foi isolado a partir de um paciente italiano que estava em uma Unidade de Terapia Intensiva no Hospital Universitário de Verona no ano 1997. Os autores determinaram a presença do gene que codifica a metalo- $\beta$ -lactamase no isolado VR-143/97 observando a transferência do referido gene, via plasmídeo, para uma *Escherichia coli*, e rastreio de clones com reduzida sensibilidade ao imipenem. O sequenciamento do gene revelou que ele codificava uma nova betalactamase classe B de Ambler, que foi nomeada *Verona integron-encoded metallo- $\beta$ -lactamase* (VIM). Sendo a primeira, recebeu ainda um sufixo, chamando-se VIM-1.

A sequência de aminoácidos do gene *bla*<sub>VIM-1</sub> é bastante divergente de outras enzimas da classe B de Ambler (de 16,4% a 38,7% de similaridade), e em geral, é mais semelhante às enzimas da subclasse B1, incluindo a betalactamase II do *Bacillus cereus* (BC-2), a enzima CcrA do *Bacteroides fragilis*, a enzima Blab de *Chryseobacterium meningosepticum* e as enzimas IMP-1. Entre estes, VIM-1 mostrou o maior grau de similaridade com BC-2 (38,7%). O gene *bla*<sub>VIM</sub> foi encontrado inserido para um integron classe 1, assim como o gene *bla*<sub>IMP</sub>. A expressão do gene *bla*<sub>VIM</sub> em *E. coli* resultou em uma significativa

diminuição na sensibilidade para uma ampla variedade de  $\beta$ -lactâmicos (ampicilina, carbenicilina, piperacilina, mezlocilina, cefotaxima, ceftazidima, ceftazidima, cefoperazona, cefepime e carbapenêmicos), revelando uma grande especificidade da enzima VIM-1 por seus substratos (LAURETTI *et al.*, 1999).

Poirel *et al.* (2000) relataram o surgimento da metalo- $\beta$ -lactamase VIM-2. A enzima foi detectada em Marselha, França, em 1996, em um espécime de *Pseudomonas aeruginosa* (identificação COL-1). O espécime era proveniente de uma amostra de sangue de uma mulher de 39 anos de idade que sofria de leucemia mieloide crônica. Mesmo sendo tratada com imipenem e amicacina, foi a óbito por choque séptico cinco dias após sua internação. Este isolado foi resistente aos  $\beta$ -lactâmicos, incluindo ureidopenicilinas, ticarcilina mais ácido clavulânico, cefepima, ceftazidima, imipenem e meropenem, mas manteve-se suscetível ao monobactâmico aztreonam. A betalactamase codificada pelo gene encontrado no isolado COL-1 foi clonado, sequenciado e expresso em *Escherichia coli* DH10B. A sequência de 266 aminoácidos da enzima revela uma betalactamase classe B de Ambler, com similaridade de aminoácidos em 32% com a enzima BC-2 de *Bacillus cereus*; 31% com a enzima IMP-1 isoladas em várias bactérias Gram-negativas no Japão, incluindo *P. aeruginosa*; 27% com a enzima CcrA de *Bacteroides fragilis*; 24% com Blab de *Chryseobacterium meningosepticum*; 24% com IND-1 a partir *Chryseobacterium indologenes*; 21% com CPhA-1 a partir de *Aeromonas hydrophila*; e 11% com L-1 de *Stenotrophomonas maltophilia*. Contudo, VIM-2 foi mais estreitamente relacionada com VIM-1 (90% de similaridade de aminoácidos). Purificada, VIM-2 apresenta uma relação molecular de massa de 29,7 kDa e uma ampla gama de substrato de hidrólise, incluindo penicilinas, cefalosporinas, cefamicinas, oxacephamicinas, e carbapenêmicos, mas não monobactâmicos. Como uma metalo- $\beta$ -lactamase, a sua atividade foi zinco-dependente e inibida por EDTA (concentração inibitória de 50% a 50  $\mu$ M) (POIREL *et al.*, 2000).

No Brasil, Martins *et al.* (2014) detectaram uma alta prevalência do gene *bl*<sub>VIM-1</sub> (92,1%) em isolados de *Acinetobacter baumannii* recuperados de hemoculturas em cinco diferentes hospitais brasileiros. Esse gene também foi encontrado por Inacio *et al.* (2014) em 87,5% dos isolados clínicos de *P. aeruginosa* de cinco hospitais de Belo Horizonte, Minas Gerais. Além disso, Pitondo-Silva *et al.* (2016) detectaram alta prevalência (47,5%) do gene *bl*<sub>VIM</sub> entre bactérias Gram-negativas encontradas no solo de plantações. Atualmente existem 46 variantes da enzima VIM conhecidas (<http://www.lahey.org/Studies/>). *Enterobacteriaceae* que produzem VIM têm sido relatados na Itália, Espanha, França, Alemanha, Dinamarca,



Irlanda, Colômbia, EUA, Argélia, Grécia, Brasil, Turquia, Japão e África do Sul (IRAZ, *et al.*, 2014; PEIRANO, *et al.*, 2012; YATSUYANAGI, *et al.*, 2004).

## 2.9 Diagnóstico molecular de ESBL

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. Esses iniciadores geralmente são escolhidos por se ligar em regiões que não sofreram mutações pontuais, contudo não discriminam 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).

A reação em cadeia da polimerase (PCR, de *Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica em que pequenas amostras de DNA podem ser rapidamente amplificadas, isto é, aumentadas em quantidades suficientes para que a análise seja feita. Iniciando com somente um fragmento de DNA do tamanho de um gene, a PCR pode ser utilizada para produzir literalmente bilhões de cópias em poucas horas. Cada fita do DNA-alvo servirá como molde para a síntese do DNA. Acrescenta-se a este DNA uma provisão dos quatro nucleotídeos (para serem montados dentro do novo DNA) e a enzima para catalisar a síntese, a DNA-polimerase. Pequenos fragmentos de ácido nucleico, denominados iniciadores (ou *primers*), são complementares às extremidades do DNA-alvo e irão se anelar aos fragmentos a serem amplificados. A polimerase, então, sintetiza novos fragmentos complementares. Depois de cada ciclo, o DNA é aquecido para converter todo o novo DNA em fitas simples. Cada fita de DNA recém-sintetizada funciona, por sua vez, como molde para novos DNAs. Como resultado, o processo continua exponencialmente. Todos os reagentes necessários são adicionados em um tubo, que é então colocado em um termociclador. O termociclador pode ser ajustado para a temperatura, o tempo e o número de ciclos desejados. O uso de termociclador automatizado é possível devido à utilização da DNA-polimerase retirada da bactéria termofílica *Thermus aquaticus*; a DNA-polimerase desses organismos pode sobreviver à fase do aquecimento sem ser destruída. Trinta ciclos, completados em apenas algumas horas, irão aumentar a quantidade de DNA-alvo em mais de um bilhão de vezes (BROOKS *et al.*, 2012; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

O DNA amplificado pode ser visualizado por eletroforese em gel com um corante fluorescente e uso de luz ultravioleta. Na PCR em tempo real, o DNA recém-formado também é marcado com um corante fluorescente, porém os níveis de fluorescência podem ser medidos após cada ciclo de PCR (por isso a designação tempo real). Outra modalidade da PCR, denominada transcrição reversa, utiliza RNA viral ou mRNA como molde. Nesse caso, a enzima transcriptase reversa sintetiza uma molécula de DNA a partir do RNA molde, e a seguir o DNA é amplificado. Observe que a PCR só pode ser usada para amplificar sequências de DNA relativamente pequenas, como determinado pela escolha dos *primers*; não pode ser utilizada para amplificar um genoma inteiro. A técnica atualmente é uma importante ferramenta para o diagnóstico de agentes infecciosos, como as enterobactérias, podendo ser utilizada especialmente em situações onde tais agentes não são detectados por outras técnicas (BROOKS *et al.*, 2012; TORTORA, FUNKE, CASE, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral:

Pesquisar a prevalência e a sensibilidade antimicrobiana de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* isoladas de infecções nosocomiais no Hospital Regional Norte (HRN) em Sobral/CE e realizar a detecção genética de genes *bla* nos isolados nosocomiais produtores de ESBL.

#### 3.2 Objetivos Específicos:

- Analisar a ocorrência e o perfil de sensibilidade antimicrobiana de *E. coli* e *K. pneumoniae* isoladas de pacientes internados no HRN com diagnóstico de infecção hospitalar;
- Investigar o perfil epidemiológico de pacientes do HRN com infecção hospitalar por *E. coli* e *K. pneumoniae*;
- Verificar a presença dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> nos isolados de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtores de ESBL.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Tipo de estudo

Trata-se de um estudo primário, observacional e transversal, onde foram coletados dados epidemiológicos de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* provenientes de pacientes com diagnóstico de infecção hospitalar internados no Hospital Regional Norte (HRN), em Sobral/CE durante os meses de março de 2015 a março de 2016. Além disso, foi realizada pesquisa experimental *in vitro* para investigação da presença dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> nos espécimes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL através de técnicas laboratoriais, como extração de DNA, PCR convencional e eletroforese.

### 4.2 Coleta de dados e considerações éticas

Após aprovação desta pesquisa pela Comissão Interna de Pesquisa do Hospital Regional Norte – HRN (**Parecer 010/2014 – Anexo 2**) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da Universidade Estadual Vale do Acaraú (**Parecer 975.071 – Anexo 3**), foi acertado junto ao Laboratório Pasteur, laboratório responsável pela demanda do HRN, através de sua coordenadora técnica Dra. Tereza Bandeira, assim como com os responsáveis administrativos, Ms. Milton Ventura e Elayne Tavares, a coleta dos isolados de interesse, resguardadas as orientações da ANVISA, RDC nº 20, de 10 de abril de 2014, que dispõe sobre regulamento sanitário para o transporte de material biológico humano (ANVISA, 2014).

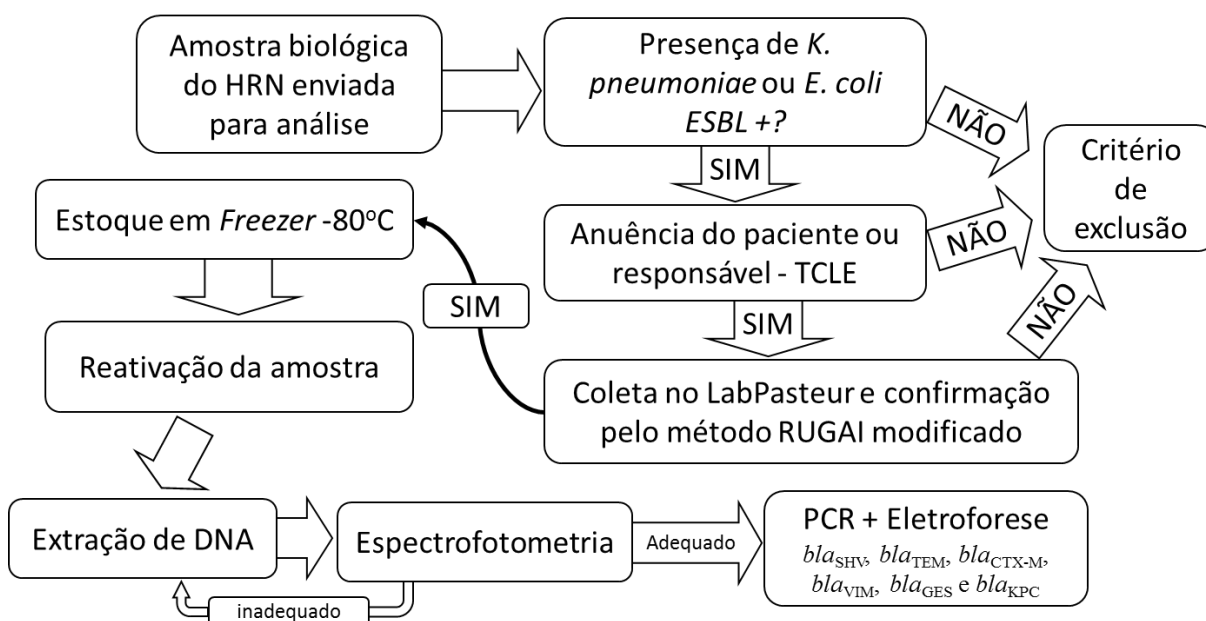
O fluxo de coleta de dados se deu da seguinte forma (**Figura 6**): (i) As amostras clínicas dos pacientes do HRN foram enviadas para identificação microbiológica e análise do perfil de sensibilidade antimicrobiana no Laboratório Pasteur, em Fortaleza/CE, através de método automatizado Vitek<sup>®</sup> 2; (ii) Os resultados foram disponibilizados *online* no sítio <http://medicos.danet.com.br/sislu/home.do> mediante acesso com *login* e senha restritos aos funcionários do Laboratório Central e do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar (SCIH) do HRN; (iii) O pesquisador principal recebeu, diariamente, via *e-mail*, mensagem da funcionária responsável por remeter os laudos parciais e definitivos de todas as amostras para os médicos assistentes do HRN; (iv) Tomado conhecimento de uma cultura positiva para *K. pneumoniae* e/ou *E. coli* produtoras de ESBL, o pesquisador principal solicitava autorização ao paciente e/ou responsável para análise genética do isolado presente na cultura mediante

assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Consentimento Pós-Informado (TCLE) (**Anexo 1**); (v) Recebimento do isolado no laboratório Pasteur.

Vale salientar que os isolados foram armazenados pelos técnicos do Laboratório Pasteur em tubos contendo BHI - *Brain Heart Infusion* (Himedia®, Mumbai, Índia) e glicerol a 20%. Assim, a cada 30 dias o pesquisador principal recebeu, em Fortaleza, um lote com os espécimes de interesse armazenados, e trazia em temperaturas negativas por um tempo de viagem não superior a cinco horas para o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia (LAMP) da Universidade Federal do Ceará (UFC) *Campus Sobral*, onde foram conservados em freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Revco, EUA) para posterior processamento (**Apêndice**).

Os dados epidemiológicos foram coletados pelo pesquisador principal junto ao Serviço de Controle de Infecção Hospitalar – SCIH do HRN, através das planilhas geradas diariamente acerca das culturas de amostras biológicas de pacientes internados, que incluem identificação microbiológica e respectivo perfil de sensibilidade antimicrobiana.

**Figura 6** – Percurso metodológico do estudo *in vitro*



Fonte: o autor (2016).

### 4.3 Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios para inclusão na pesquisa foram:

- Culturas provenientes do HRN positivas para *E. coli* e/ou *K. pneumoniae*;

- Isolados de *E. coli* e/ou *K. pneumoniae* produtores de ESBL processados adequadamente que mantenham a viabilidade apropriada para os estudos genéticos propostos;
- Culturas de pacientes com diagnóstico de infecção nosocomial que aceitem participar do estudo, mediante TCLE assinado pelo próprio ou seu responsável.

Os critérios para exclusão na pesquisa são todos os que não estivessem previstos como critérios de inclusão.

#### 4.4 Reativação dos isolados e extração de DNA genômico

Todas as etapas laboratoriais desta pesquisa foram realizadas no Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS, em estação de trabalho com fluxo laminar, grau de segurança classe II, mediante desinfecção prévia. As amostras foram submetidas aos testes bioquímicos confirmatórios, utilizando-se o meio RUGAI modificado (Indol, glicose, sacarose, produção de gás, lisina, motilidade, uréia e H<sub>2</sub>S) (KONEMAN *et al.*, 1997).

A reativação dos espécimes armazenados em *freezer* a -80°C era realizada (i) acrescentando-se uma alíquota de 50µl em um tubo de ensaio contendo 5,0ml de caldo BHI (Himedia®, Mumbai, Índia) e mantido em estufa bacteriológica por 18 horas a 37°C, um tubo para cada amostra e mais um tubo de controle negativo; (ii) Após crescimento, o inóculo era semeado em placa com Ágar MacConkey (Sigma-Aldrich Brasil Ltda., São Paulo, Brasil) utilizando-se uma agulha bacteriológica estéril e colocado em estufa novamente a 37°C, por 24h, juntamente com uma placa sem estriagem como controle negativo de contaminação dos meios ou da própria estufa; (iii) Depois, utilizando-se de uma agulha bacteriológica estéril foi transferida uma colônia isolada da placa de Ágar MacConkey para novos tubos de ensaio contendo 5,0 ml de BHI caldo, um tubo para cada amostra, mais um tubo de controle negativo, e colocados na estufa a 37°C, durante 18 horas; (iv) finalmente, após esse tempo, os tubos eram centrifugados a 3.000 rotações por minuto durante cinco minutos e descartados 3,5ml de sobrenadante e, após isto, uma alíquota de 1,0ml, contendo aproximadamente 10<sup>9</sup> células/ml de suspensão bacteriana, foi utilizada para extração do DNA genômico, através do Kit Easy DNA™ (Invitrogen, USA), conforme orientações do fabricante (**anexo 1**).

Caso fossem formados precipitados na solução devido à temperatura de armazenamento (-20°C), os tubos deveriam ser aquecidos em banho-maria a 45°C. O DNA extraído de cada amostra foi submetido à espectrofotometria (Espectrômetro Gene Quant Pro -

GE Healthcare Life Sciences, Amersham Biosciences do Brasil Ltda, São Paulo/SP) para avaliação da quantidade (ng/μl) e pureza (relação 260/280 ~ 1.8 a 2.1) do DNA extraído. Caso os resultados de quantidade fosse inferiores a 60 ng/μl e/ou a relação 260/280 estivesse fora do intervalo 1.8 a 2.1, uma nova extração de DNA era realizada, para garantir resultados precisos e confiáveis durante a PCR.

Em todas as fases desta pesquisa o descarte de material contaminado se deu conforme as regras do Núcleo de Biotecnologia de Sobral – NUBIS.

#### 4.5 Detecção dos genes *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>VIM</sub> por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Os espécimes de *E. coli* e *K. pneumoniae* produtores de ESBL foram analisados para a detecção dos genes *bla* por PCR. Os protocolos previamente descritos por Tollentino *et al.*, (2011) foram usados para amplificar os genes *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>VIM</sub>, *bla*<sub>GES</sub> e *bla*<sub>KPC</sub>. A sequência dos fragmentos a serem amplificados e o tamanho dos amplicons estão descritos na tabela 2:

**Tabela 2** – *Primers* utilizados para amplificação dos genes de resistência aos β-lactâmicos deste estudo.

<i>Primer</i>	Sequência de Nucleotídeos (5' → 3')	Alvo	Tamanho do Amplicon	Referência
CTX-M 1/2-F	ATGTGCAGYACCAAGTAA	Clusters <i>M1/2</i>	512 pb	CAMPANA, 2013
CTX-M 1/2-R	CGCTGCCGGTTTTATCSCCC			
SHV F	ATGCGTTATTAGTTTCGCCCTGTGTATTATC	<i>bla</i> <sub>SHV-like</sub>	1018 pb	MONTEIRO, 2009
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC			
TEM F	CCCTTATTCCTTTYTTGCGG	<i>bla</i> <sub>TEM-like</sub>	650 pb	CAMPANA, 2013
TEM R	AACCAGCCAGCCWGAAGG			
KPC F	TCGCTAAACTCGAACAGG	<i>bla</i> <sub>KPC-like</sub>	785 pb	MONTEIRO, 2009
KPC R	TTACTGCCCGTTGACGCCAATCC			
VIM F	GATGGTGTGGTTCGCATA	<i>bla</i> <sub>VIM-like</sub>	390 pb	ELLINGTON, <i>et al.</i> , 2007
VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG			
GES F	AGCAGCTCAGATCGGTGTTG	<i>bla</i> <sub>GES-like</sub>	750 pb	NICOLETTI, 2015
GES R	CCGTGCTCAGGATGAGTTG			

pb: pares de base

As reações de amplificação foram preparadas em um volume total de 25μl, contendo aproximadamente 300 ng de DNA, 0,05U de *Taq* DNA polimerase (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 0,2 mM de cada dNTP (Invitrogen, Carlsbad, EUA), 2 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 μM de cada primer e tampão de reação 1X (concentração final). As amplificações foram realizadas no termociclador da marca *Eppendorf* com as seguintes condições de ciclagem: uma

desnaturação inicial (95°C por 10 min); seguido por 40 ciclos de três passos: (i) 95°C por 45 segundos; (ii) 56°C por 45 segundos e (iii) 72°C por 45 segundos; e uma extensão final a 72°C por 10 min. Para todas as PCR's, uma reação sem adição de DNA foi utilizada como controle negativo de contaminação e como controle positivo foram utilizadas amostras pré-caracterizadas pelo Laboratório ALERTA (Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP) por sequenciamento de DNA para presença de *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>GES</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>*, respectivamente.

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,0%, previamente adicionado de brometo de etídio (1,25 µl/100 ml). A eletroforese foi realizada a 110 volts, 80mAh, por 40 minutos. A aplicação no gel de agarose foi feita com 10µl da reação, adicionados de 2µl de solução de azul de bromofenol. O marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, EUA) foi aplicado no gel para determinar o tamanho dos fragmentos obtidos.

Finalmente, em uma câmara com luz ultravioleta as imagens do gel de agarose, após a corrida eletroforética, foram obtidas a partir de uma câmera digital (Casio Computer Co. Ltda) com capacidade de 7.0 megapixel's conectada a um computador via cabo USB.



## 5 ARTIGO 1

**Antimicrobial susceptibility and detection of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes in clinical *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* extended-spectrum betalactamase-producing isolates from a teaching hospital in the North of the State of Ceará, Brazil**

Jisbaque Melo Braga<sup>a</sup>; Ana Jéssica Alves Morais<sup>b</sup>; Izabelly Linhares Ponte Brito<sup>a</sup>; Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão<sup>c</sup>; Jordânia Magalhães do Nascimento<sup>c</sup>; Francisco Ruliglésio Rocha<sup>b,d</sup>; Vicente de Paulo Teixeira Pinto<sup>a,b</sup>; Francisco Cesar Barroso Barbosa<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Posgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

<sup>b</sup> Postgraduate Program in Biotechnology, Federal University of Ceará, Sobral, CE, Brazil.

<sup>c</sup> Graduation student in Biological Sciences, State University of Acaraú Valley, Sobral, CE, Brazil.

<sup>d</sup> Postgraduate Program in Medical Microbiology, Federal University of Ceará, Fortaleza, CE, Brazil.

Running title: Antimicrobial susceptibility and detection of bla genes in clinical *E. coli* and *K. pneumoniae* ESBL producers

Corresponding author: Francisco Cesar Barroso Barbosa

Adress: Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100, Sobral, CE, 62042-280, Brazil

Telephone: + 55 88 3613.2603; Fax number: +55 88 3611.8000

E-mail: [fcbarbosa@yahoo.com.br](mailto:fcbarbosa@yahoo.com.br)

**Artigo será submetido a revista: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*.**

## ABSTRACT

*Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* are Gram-negative bacilli account for a significant portion of infections in hospitals, especially due to increased production of beta-lactamases of extended spectrum (ESBL). This study aimed to analyze the prevalence and antimicrobial susceptibility of *E. coli* and *K. pneumoniae* isolated from nosocomial infections in North Regional Hospital in Sobral/CE, Brazil, from March 2015 to March 2016, and to detect *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes of isolates which exhibited ESBL phenotype. A total of 245 isolates were analyzed. Of these, 145 (59.1%) had ESBL phenotype and 44 were characterized genetically by presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes. The rates of *E. coli* and *Klebsiella pneumoniae* ESBL producers were 49.2% and 70.8%, respectively. Our data revealed that all ESBL-producing *E. coli* strains were sensitive to meropenem and resistant to ampicillin. On the other hand, all *K. pneumoniae* ESBL producers were sensitive to colistin and resistant to ceftriaxone. The *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in 14 (31.8%) isolates, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes were detected both in 3 specimens (6.8%), the *bla*<sub>GES</sub> gene was detected in only one isolate (2.2%), while *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> genes were not detected. The findings demonstrated high levels of resistance to beta-lactam antibiotics, as well as increasing linear trend for ESBL production by the studied specimens. The *bla*<sub>GES</sub> gene was detected in one strain of *Klebsiella pneumoniae*, being the first report of this gene in this species in Brazil, which demonstrates the great potential for worldwide spread of resistance genes between Gram-negative bacillus.

**Keywords:** Nosocomial infection; *Escherichia coli*; *Klebsiella pneumoniae*; ESBL; Molecular typing; *bla* genes.

## INTRODUCTION

*Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* are Gram-negative bacilli, members of the *Enterobacteriaceae*. They represent a major cause of health care-related infections such as pneumonia, bacteremia and infections in other organs in the community and in the hospital (1-5).

Over the past few years, *K. pneumoniae* and *E. coli* have attracted attention due to increased production rates of extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL). These enzymes are capable of inactivating various antibiotics, conferring bacterial resistance to penicillins, cephalosporins of all generations and aztreonam (6-9). In these bacterial species, ESBL most identified are TEM, SHV and CTX-M type (10-12).

*Enterobacteriaceae* ESBL-producers generally exhibit a multidrug resistance phenotype, including resistance to aminoglycosides and fluoroquinolones, limiting the therapeutic options available. These microorganisms have a worldwide distribution and isolation rate varies widely around the world and within specific geographic areas. Furthermore, resistance rates have increased rapidly over time (13).

The increasing number of resistant pathogens to antimicrobials, which are increasingly associated with nosocomial infection, sets in a significant problem for health systems and have significant global economic costs. As result, we have high rates of mortality and morbidity, increased treatment costs and difficulty of diagnostics of the common infections, whereas the response to antimicrobial therapy may be different than expected (5).

Thus, the identification of genetic factors involved in antimicrobial resistance in isolates of *K. pneumoniae* and *E. coli* and determination of its prevalence is a useful tool in generating epidemiological information, that can assist health professionals in preventing the spread of these pathogens and in choosing an appropriate therapy. The objective of this study was to analyze the antimicrobial susceptibility profile and investigate the presence of *bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>SHV</sub>, *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>KPC</sub>, *bla*<sub>VIM</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes between nosocomial *K. pneumoniae* and *E. coli* isolates in a teaching hospital in the Northern of the State of Ceará, Brazil.

## MATERIAL AND METHODS

The present study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Acaraú Valley, Sobral, Ceará, Brazil (n° 975.071) and Internal Commission of Research of the

Northern Regional Hospital (n° 010/2014 C.E.). All of the patients gave their written informed consent.

### Bacterial isolates and data collect

From March 2015 to March 2016 it was detected a total of 1,203 positive cultures of various nosocomial samples in the Northern Regional Hospital (HRN) in the Northern region of the State of Ceará, Brazil. Of this total, 245 samples were positive for *E. coli* and *K. pneumoniae*, of which 145 exhibited ESBL phenotype. The samples were obtained from patients admitted in various sectors, such as Emergency, Surgical Centers, Intensive Care Units, Special Care Unit and Medical and Surgical Wards. The ESBL producers were collected mainly from urine, blood, tracheal aspirate, wound infections, catheter tip and bronchoalveolar lavage. Bacterial identification and phenotypic detection of ESBL, as well as antimicrobial susceptibility tests were performed by Vitek<sup>®</sup>2 system (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France) (12,14), in the Pasteur Laboratory (privative laboratory), in Fortaleza, Ceará, Brazil.

The analysis of epidemiological data collected from the Hospital Infection Control Service - HRN was performed using descriptive statistics, through tables and graphs (3,12,14), structured in software Microsoft Office Excel, 2013 version.

### DNA extraction and detection of *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>*, *bla<sub>KPC</sub>* and *bla<sub>GES</sub>* genes by Polymerase Chain Reaction (PCR)

Of the 145 clinical *Klebsiella pneumoniae* and *E. coli* isolates ESBL producers, 51 were randomly selected for molecular characterization of *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>*, *bla<sub>VIM</sub>* e *bla<sub>KPC</sub>* genes. For genomic DNA extraction, was used the Kit Easy DNA<sup>™</sup> (Invitrogen, Carlsbad, EUA) according to manufacturer's recommendations. The  $\beta$ -lactamase gene were investigated by PCR using primers and protocols previously described (12,14) (**Table 1**).

**Table 1** – Primers used in this study for amplification of genes conferring resistance to  $\beta$ -lactams.

Primer	Nucleotide sequence (5'→3')	Target	Amplicon size	Reference
CTX-M 1/2-F	ATGTGCAGYACCAGTAA	Clusters <i>M1/2</i>	512 pb	(15)
CTX-M 1/2-R	CGCTGCCGGTTTATCSCCC			
SHV F	ATGCGTTATTAGTTTCGCCCTGTGTATTATC	<i>bla<sub>SHV</sub></i> -like	1018 pb	(17)
SHV R	TTAGCGTTGCCAGTGAGTCGATC			
TEM F	CCCTTATTCCCTTTYTTGCGG	<i>bla<sub>TEM</sub></i> -like	650 pb	(15)

TEM R	AACCAGCCAGCCWGAAGG			
KPC F	TCGCTAAACTCGAACAGG	<i>bla</i> <sub>KPC-like</sub>	785 pb	(17)
KPC R	TTACTGCCCGTTGACGCCCAATCC			
VIM F	GATGGTGTGTTGGTTCGCATA	<i>bla</i> <sub>VIM-like</sub>	390 pb	(16)
VIM R	CGAATGCGCAGCACCAG			
GES F	AGCAGCTCAGATCGGTGTTG	<i>bla</i> <sub>GES-like</sub>	750 pb	(18)
GES R	CCGTGCTCAGGATGAGTTG			

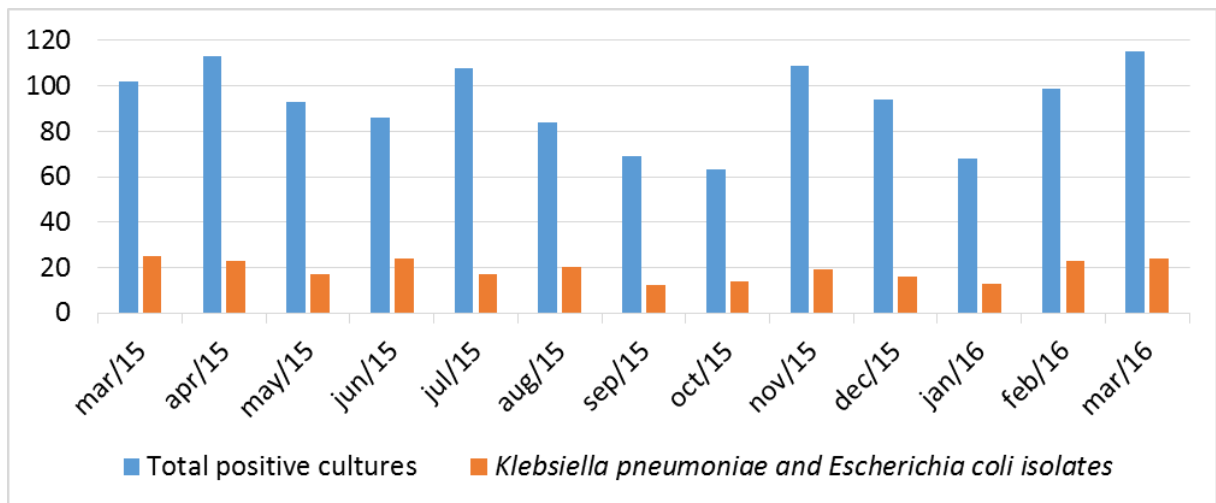
pb: base pairs

## RESULTS

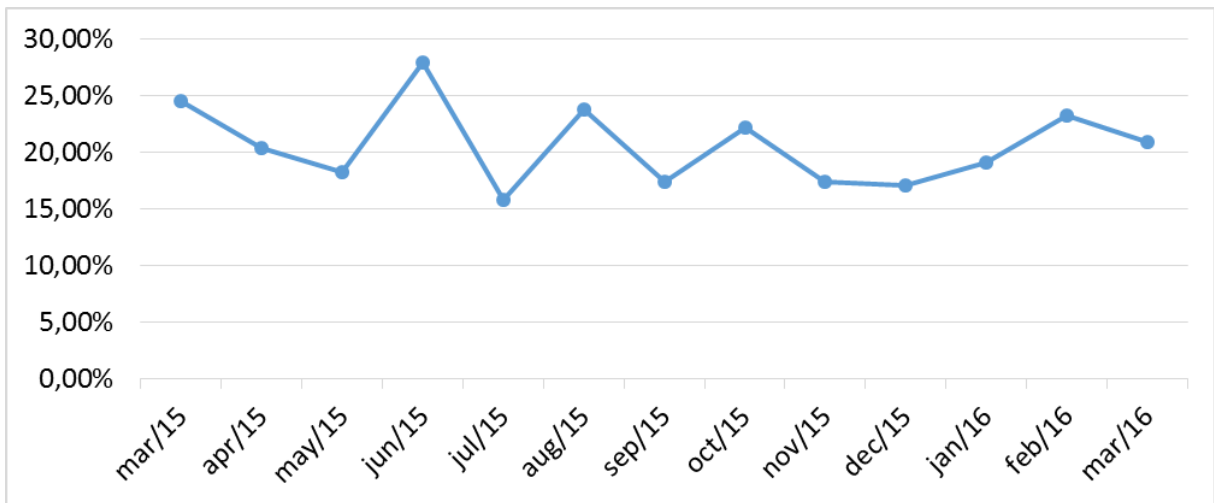
### Prevalence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*

During the sample period, *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* were detected in 20.6% of all positive cultures (**Graph 1 and 2**). In eight of the 13 analyzed months, the total number of *E. coli* was upper to *K. pneumoniae* (**Graph 3**).

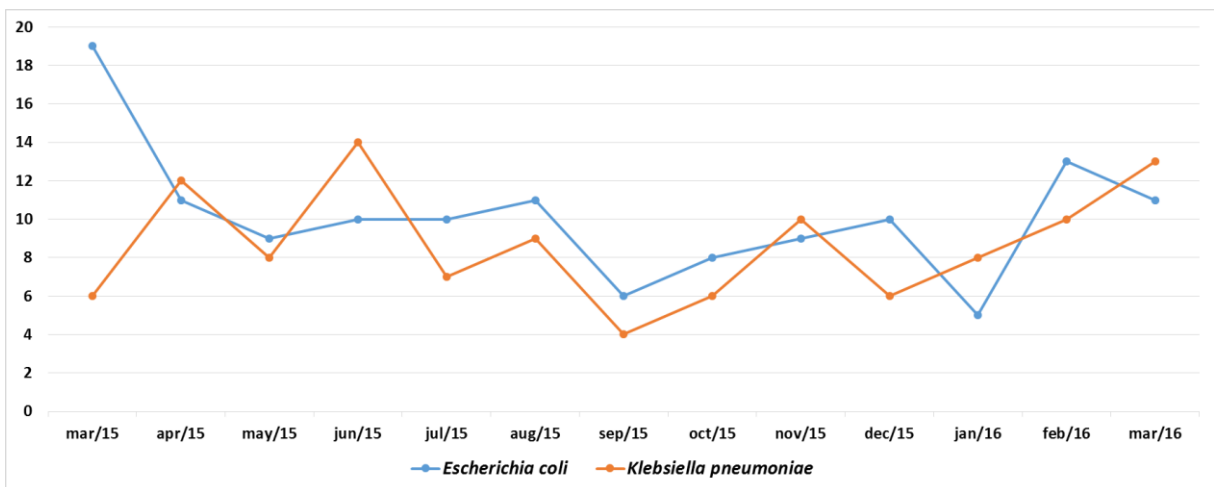
**Graph 01** – Incidence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for total number of the positive cultures.



**Graph 02** – Percentual incidence of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* for total number of the positive cultures.

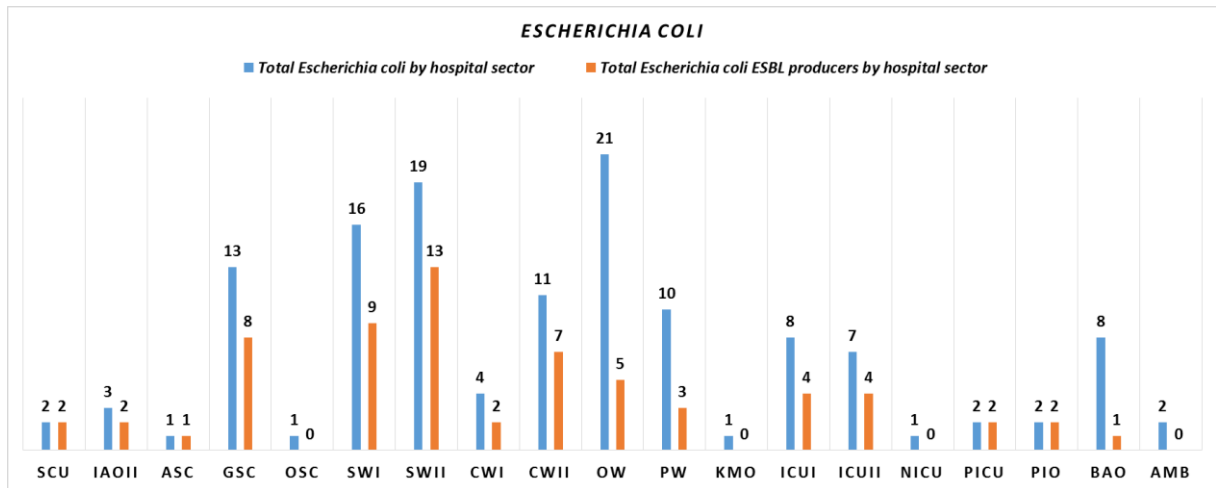


**Graph 03** – Monthly count variation of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates of patients with nosocomial infection from HRN.



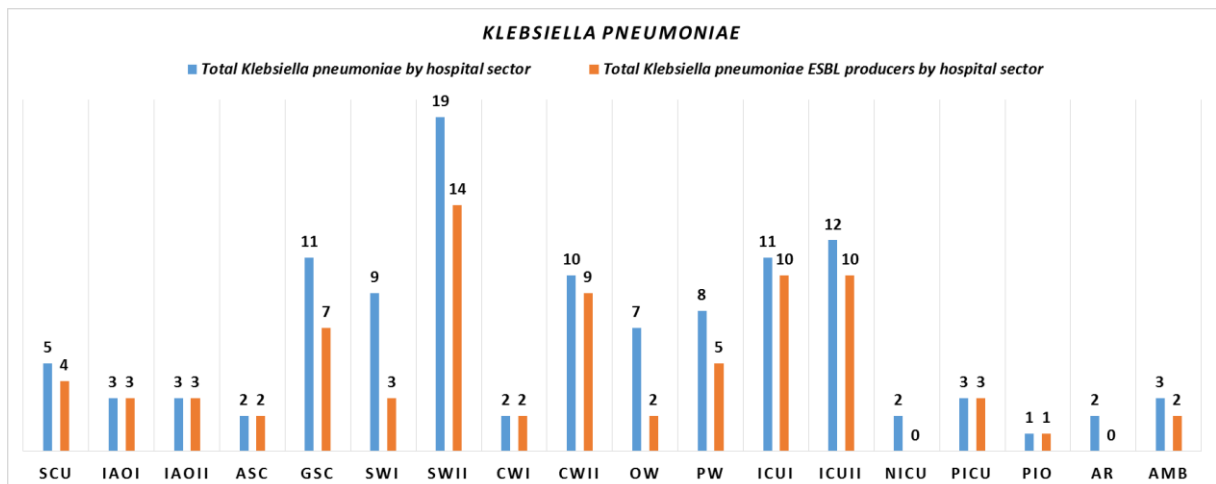
Considering the distribution of *E. coli* by hospital sector of the infected patient internment in the analyzed period, the highest incidence was in obstetric ward (n = 21), followed by surgical ward 2 (n = 19). But, when we observe only the *E. coli* count with ESBL phenotype, the highest incidence was in the surgical ward 2 (n = 13), followed by surgical ward 1 (n = 9) (**Graph 4**). Furthermore, considering the distribution by hospital sector of the infected patient internment in the analyzed period, the highest incidence of *K. pneumoniae* was in the surgical ward 2 (n = 19), followed by the Adult ICU 2 (n = 12). But, when only observe the *K. pneumoniae* count with ESBL phenotype, the highest incidence was in the surgical ward 2 (n = 14), followed by the Adult ICU 1 (n = 10) and Adult ICU 2 (n = 10) (**Graph 5**).

**Graph 04** – Distribution by sector of *Escherichia coli* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



SCU: Special Care Unit; IAOII: Intermediate Adult Observation 2; ASC: Ambulatory Surgical Center; GSC: General Surgery Center; OSC: Obstetric Surgical Center; SWI: Surgical Ward 1; SWII: Surgical Ward 2; CWI: Clinical Ward 1; CWII: Clinical Ward 2; OW: Obstetric Ward; PW: Pediatric Ward; KMO: Kangaroo Mother Unit - Obstetrics; ICUI: Adult Intensive Care Unit 1; ICUII: Adult Intensive Care Unit 2; NICU: Neonatal Intensive Care Unit; PICU: Pediatric Intensive Care Unit; PIO: Pediatric Intermediate Observation; BAO: Brief Adult Observation; AMB: Ambulatory.

**Graph 05** – Distribution by sector of *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.

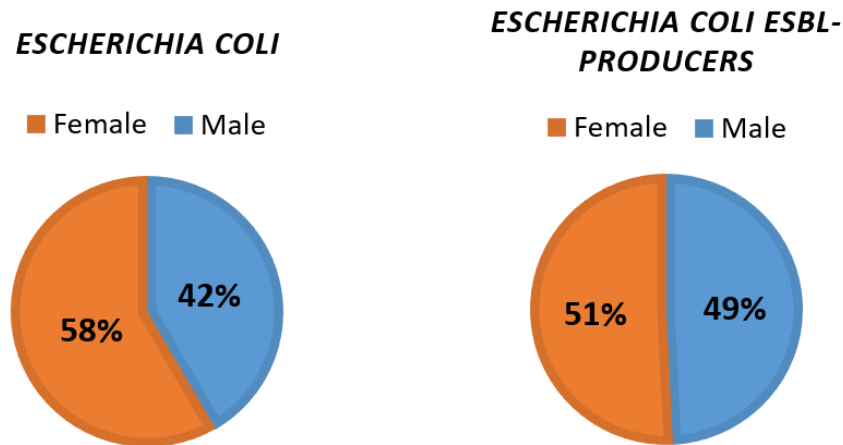


SCU: Special Care Unit; IAOI: Intermediate Adult Observation 1; IAOII: Intermediate Adult Observation 2; ASC: Ambulatory Surgical Center; GSC: General Surgery Center; SWI: Surgical Ward 1; SWII: Surgical Ward 2; CWI: Clinical Ward 1; CWII: Clinical Ward 2; OW: Obstetric Ward; PW: Pediatric Ward; ICUI: Adult Intensive Care Unit 1; ICUII: Adult Intensive Care Unit 2; NICU: Neonatal Intensive Care Unit; PICU: Pediatric Intensive Care Unit; PIO: Pediatric Intermediate Observation; AR: Anesthetic Recovery; AMB: Ambulatory.

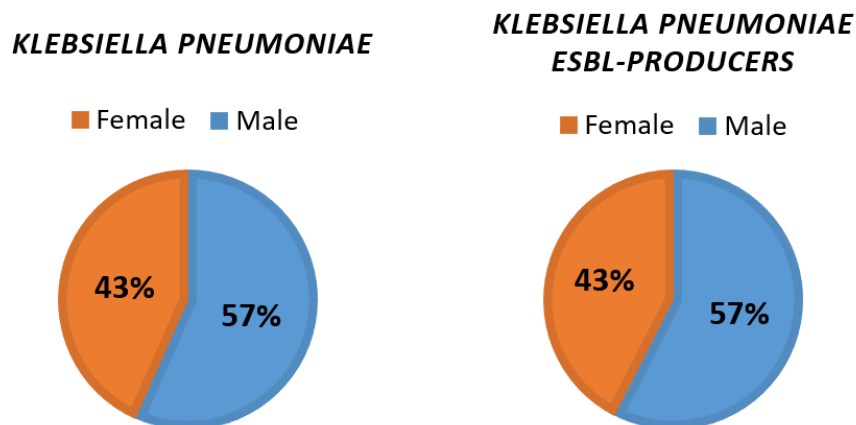
Observing the incidence of *E. coli* by gender of the infected patient in the period analyzed, there was 58% of infected women. When was observed only *E. coli* ESBL phenotype,

the female / male ratio was more balanced, with infected women in 51% of cases (**Graph 6**). In this sense, observing the incidence of *K. pneumoniae* by gender of the infected patient in the period analyzed, there is a similar percentage between the total of *K. pneumoniae* and *K. pneumoniae* ESBL producers, since the women were infected in 43% of both cases (**Graph 7**).

**Graph 06** – Distribution, by gender of the patient, of *Escherichia coli* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



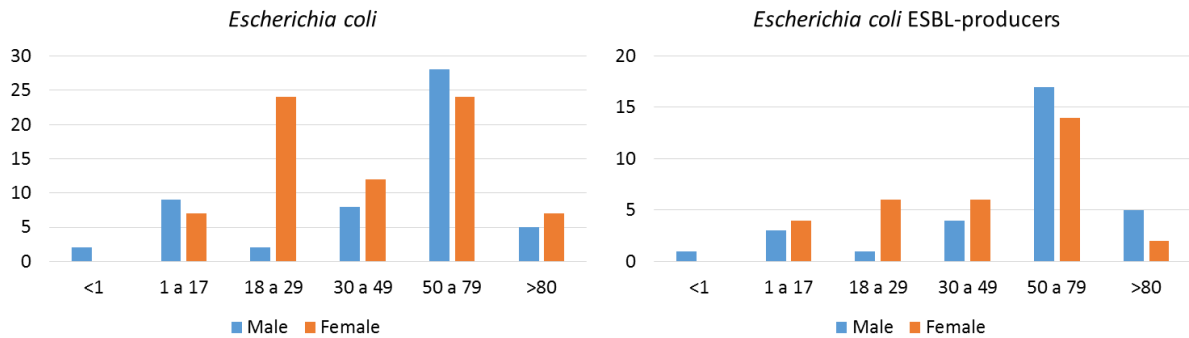
**Graph 07** – Distribution, by gender of the patient, of *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



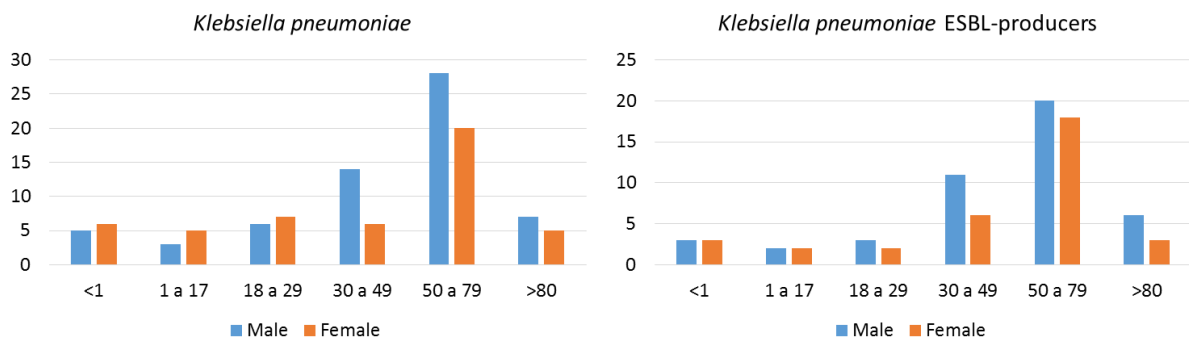
It is possible to infer from the data analyzed, that patients aged 50 to 79 years were the most affected infections by *E. coli* and *K. pneumoniae*, regardless of ESBL phenotype. However, it is noteworthy that there is a high incidence of *E. coli* infection among female patients aged 18-29 years (**Graph 8 and 9**).



**Graph 08** – Distribution, by age of the patient, of *Escherichia coli* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.

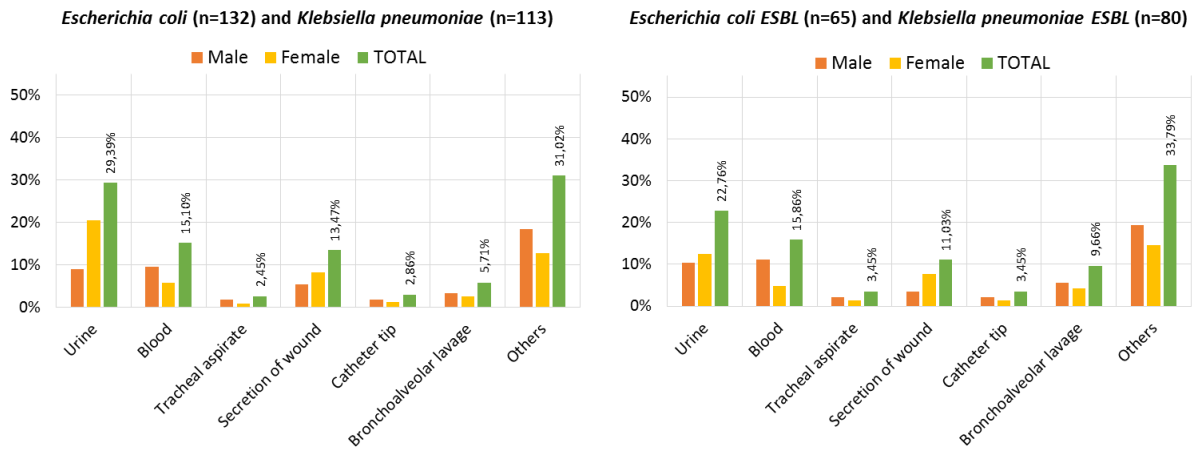


**Graph 09** – Distribution, by age of the patient, of *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



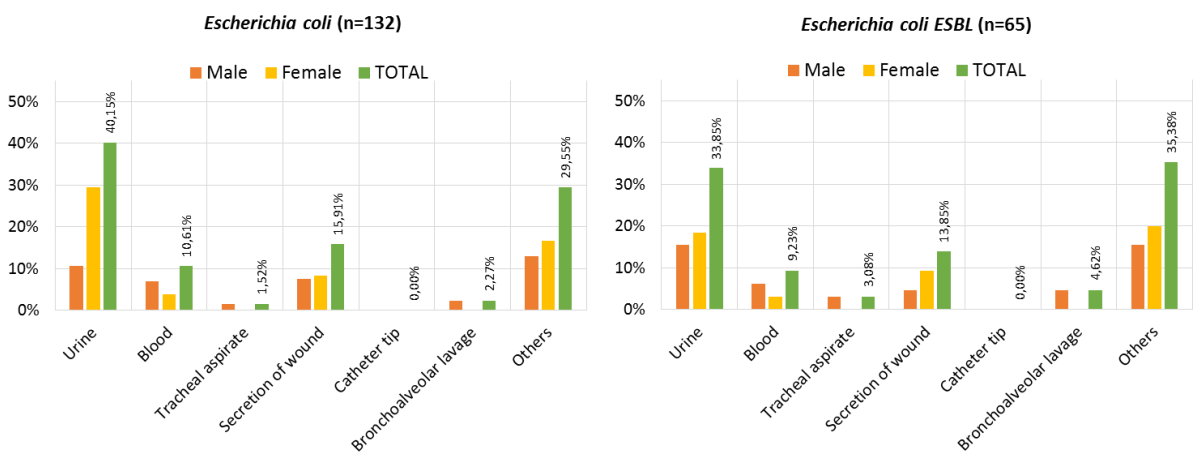
Biological samples with a higher incidence of infections by *E. coli* or *K. pneumoniae* were urine and blood, respectively, when considering the total number of infections by these enteric rods (**Graph 10**). But analysing only clinical samples of *E. coli* infection with or without ESBL phenotype, urine was the site most frequent followed by secretion of wound (**Graph 11**). In relation *K. pneumoniae* infections, regardless of ESBL phenotype, samples with highest incidence were blood and urine, respectively. However, in *K. pneumoniae* ESBL producers, the lower respiratory tract infections (bronchoalveolar lavage) had similar incidence to urine infections (**Graph 12**).

**Graph 10** – Distribution, by site of infection, of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



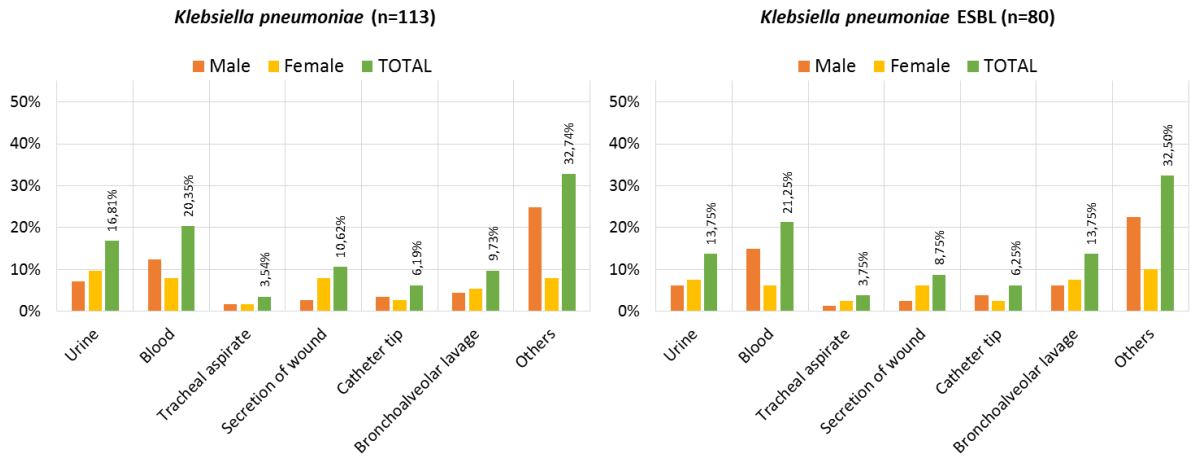
Others: stool, cerebrospinal fluid, ascite fluid, synovial fluid, conjunctival swab, oropharyngeal swab, rectal swab and tendon.

**Graph 11** – Distribution, by site of infection, of *Escherichia coli* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



Others: stool, cerebrospinal fluid, ascite fluid, synovial fluid, conjunctival swab, oropharyngeal swab, rectal swab and tendon.

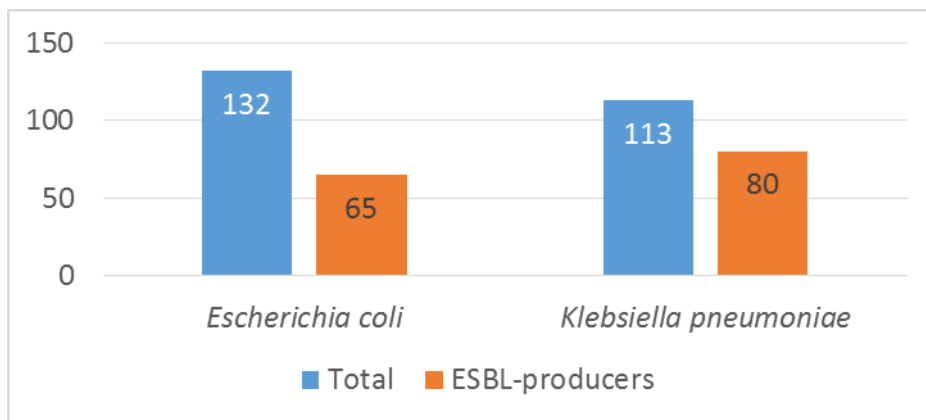
**Graph 12** – Distribution, by site of infection, of *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



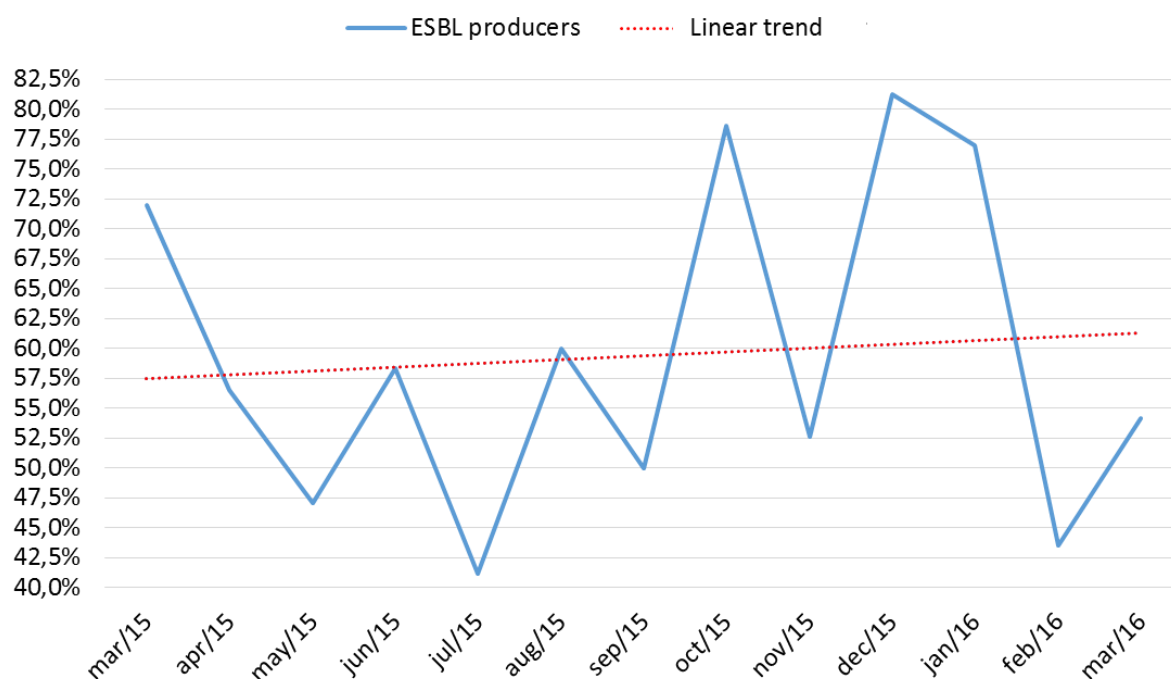
Others: stool, cerebrospinal fluid, ascite fluid, synovial fluid, conjunctival swab, oropharyngeal swab, rectal swab and tendon.

A total of 145 clinical samples were identified as *K. pneumoniae* or *E. coli* ESBL producers by Vitek®2 system (**Graph 13**). Of these, 12 samples were collected from patients at a time equal to or less than 48 hours of hospital admission. However, according to criteria specified in Decree No. 2616 of May 12, 1998 the Ministry of Health of Brazil and the criteria adopted by Freeman *et al.* (2014) and Wollheim *et al.* (2011), none of the 12 specimens could be classified as community infection. Thus, during this period, all infections were considered as nosocomial. It is noteworthy that there was a positive linear trend of ESBL producing by *K. pneumoniae* and *E. coli*, from 57.5% to 61.25% in the analysed period (**Graph 14**).

**Graph 13** – Number of isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* identified between March 2015 and March 2016 from HRN.



**Graph 14** – ESBL production percentage by *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.

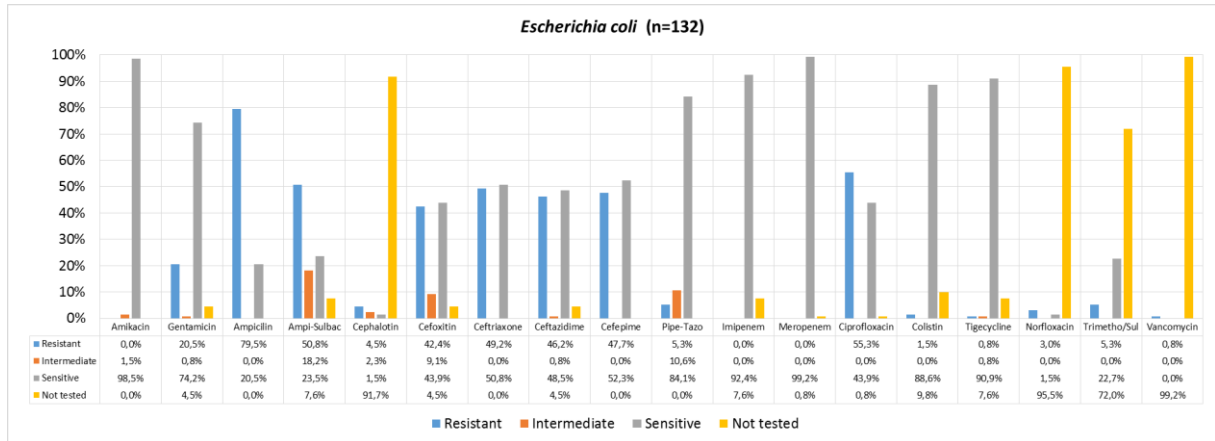


### Antimicrobial susceptibility

The highest rates of resistance observed in *E. coli* isolates were to ampicillin (79.5%), ciprofloxacin (55.3%) and ampicillin with sulbactam (50.8%), while no resistance was found to meropenem or imipenem (**Graph 15**). Analyzing exclusively the *E. coli* ESBL producers, the highest resistance rates were to ampicillin (100%), ceftriaxone (100%) and cefepime (96.9%). It is noteworthy that there were not specimens sensitive to ceftazidime and ceftazidime. However, no resistance to meropenem or imipenem was found between analysed strains (**Graph 16**).

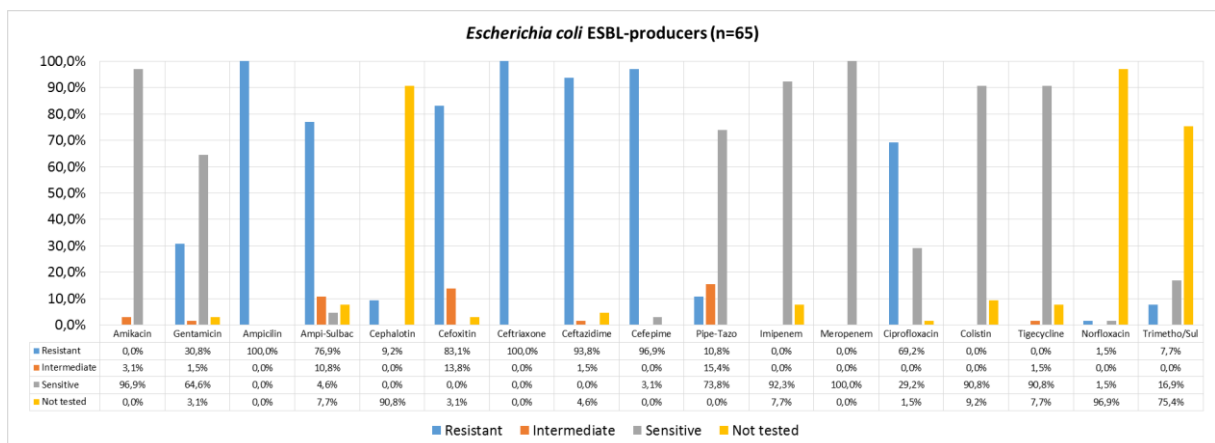
The highest rates of resistance observed in *K. pneumoniae* isolates were to ampicillin (99.1%), ampicillin with sulbactam (74.3%), ceftriaxone (70.8%) and ceftazidime (70.8%), whereas five specimens (4.4%) were resistant to imipenem and meropenem. Only one isolate (0.8%) were resistant to amikacin and none was resistant to colistin (**Graph 17**). Analyzing exclusively isolates of *Klebsiella pneumoniae* ESBL producers, the highest resistance rates were to ceftriaxone (100%), ceftazidime (100%) and ampicillin (98.7%). It is noteworthy that none sample was sensitive to ampicillin with sulbactam, ceftazidime and cefepime. However, five specimens (6.2%) expressed resistance to meropenem and imipenem (**Graph 18**).

**Graph 15** – Susceptibility to antimicrobials of *Escherichia coli* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



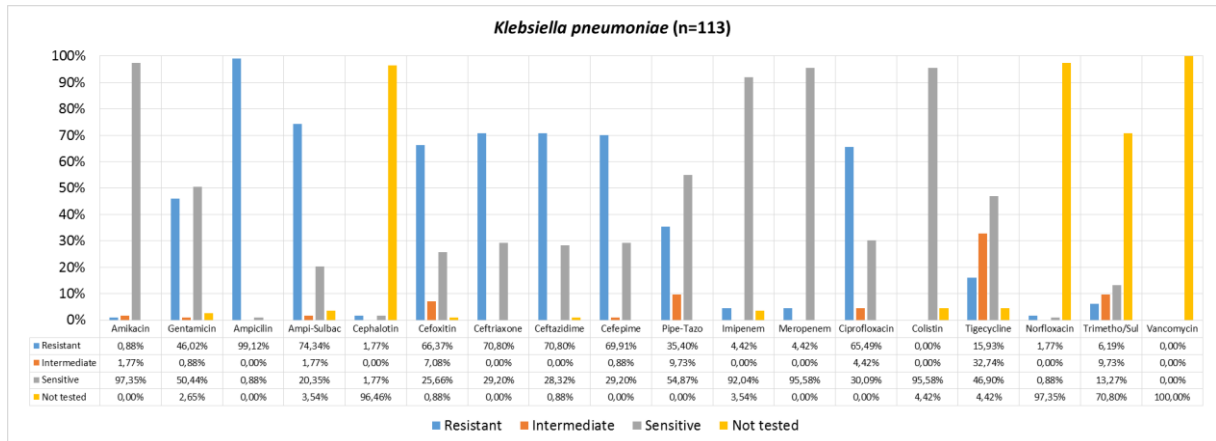
Ampi-Sulbac: ampicilin e sulbactan; Pipe-Tazo: piperacilin e tazobactan; Trimetho/Sul: trimethoprim and sulfamethoxazole

**Graph 16** – Susceptibility to antimicrobials of *Escherichia coli* ESBL-producers isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



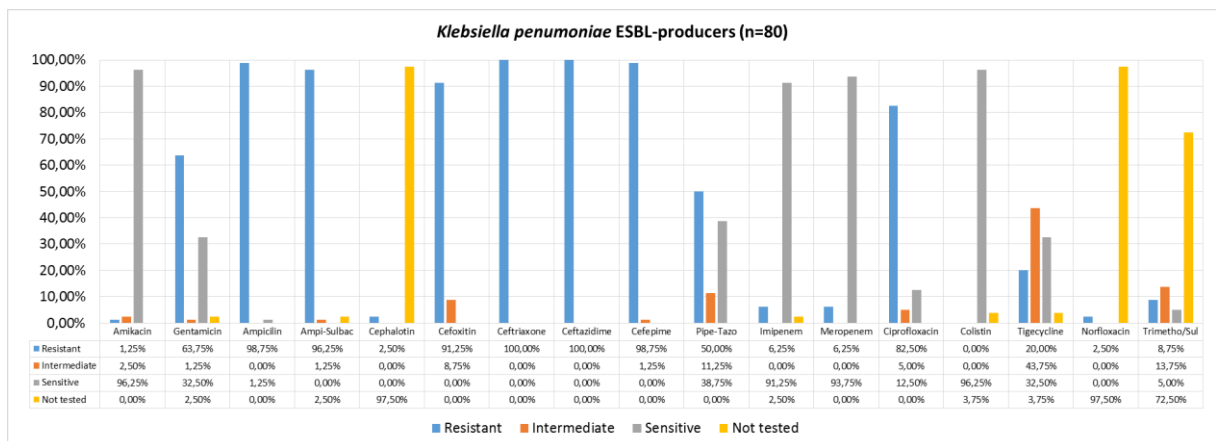
Ampi-Sulbac: ampicilin e sulbactan; Pipe-Tazo: piperacilin e tazobactan; Trimetho/Sul: trimethoprim and sulfamethoxazole.

**Graph 17** – Susceptibility to antimicrobials of *Klebsiella pneumoniae* isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



Ampi-Sulbac: ampicilin e sulbactan; Pipe-Tazo: piperacilin e tazobactan; Trimetho/Sul: trimethoprim and sulfamethoxazole.

**Graph 18** – Susceptibility to antimicrobials of *Klebsiella pneumoniae* ESBL-producers isolates identified between March 2015 and March 2016 in patients with nosocomial infection from HRN.



Ampi-Sulbac: ampicilin e sulbactan; Pipe-Tazo: piperacilin e tazobactan; Trimetho/Sul: trimethoprim and sulfamethoxazole.

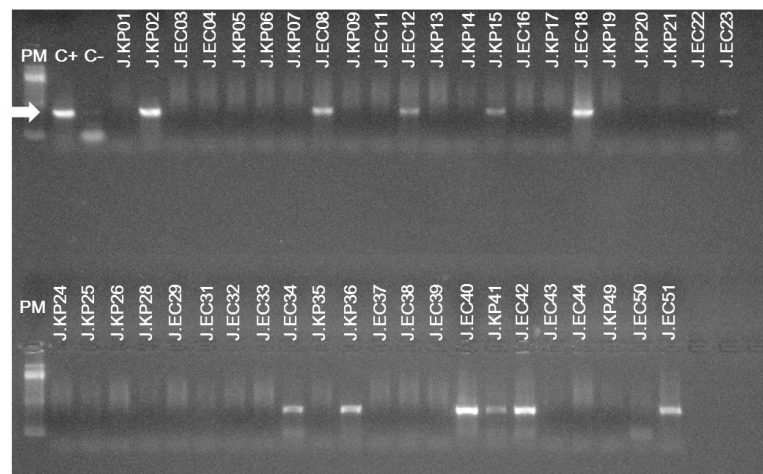
## Detection of $\beta$ -lactamase genes

Of the 145 isolates of *E. coli* or *K. pneumoniae* ESBL producers, 51 were randomly selected for molecular analysis. However, 7 (16.6%) isolates were excluded from the study because they showed divergence identification of biochemical Rugai modified Test and the automated Vitek<sup>®</sup>2 system or not showed bacterial growth at reactivation in BHI broth. The remaining isolates (n=44) were confirmed by identification methods used and included in the molecular study by conventional PCR.

Of the 44 isolates, the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was detected in 14 (31.8%) (**Figure 1**). Both the *bla*<sub>TEM</sub> gene and the *bla*<sub>SHV</sub> gene were detected in 3 samples each (6.8%) (**Figure 2 and 3**). It is noteworthy that 21.4% of the isolates harbored *bla*<sub>CTX-M</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> gene, concomitantly. Furthermore, in 14.2% of the specimens were detected *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes. The *bla*<sub>GES</sub> gene was detected in only one isolate, associated with *bla*<sub>CTX-M</sub>. The *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>VIM</sub> genes were not detected (**Table 2**).

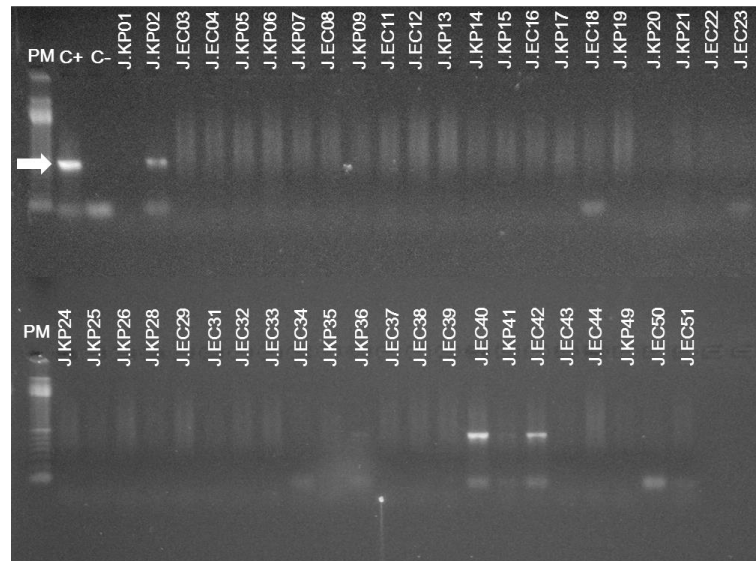
It was observed that 69.2% of the strains with resistance genes were isolated from surgical sectors (Ambulatory Surgical Center, General Surgical Center, Surgery 1 and Surgery 2 wards). Furthermore, of the 13 isolates that harbored resistance genes, 9 (69.2%) of them were *E. coli* (**Table 3**).

**Figure 1** – Agarose gel 1% containing fragments of the *bla*<sub>CTX-M-1/2</sub> gene amplified by conventional PCR.



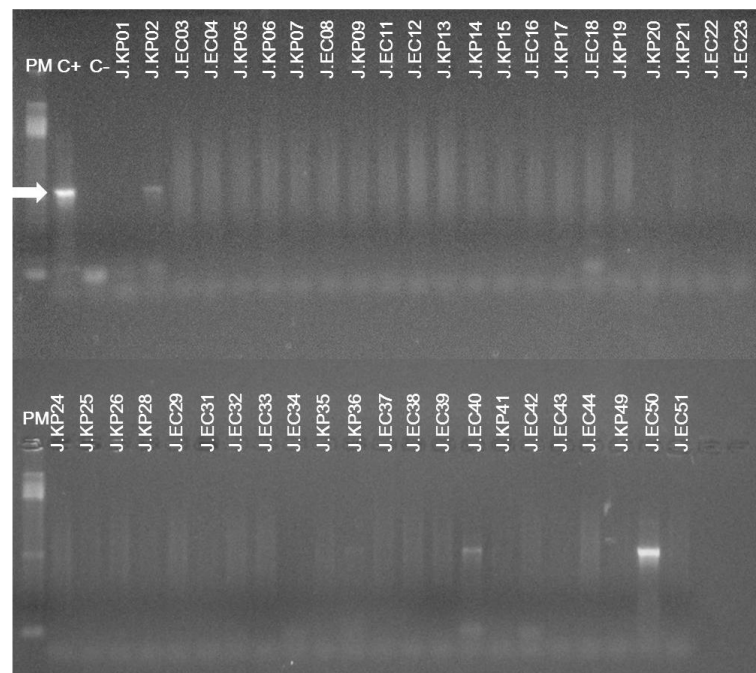
Arrow indicates 512 bp fragments corresponding to the coding region of *bla*<sub>CTX-M-1/2</sub> gene. PM - molecular weight marker (1kb Ladder); C+: positive control; C-: negative control.

**Figure 2** – Agarose gel 1% containing fragments of the *bla*<sub>TEM-Like</sub> gene amplified by conventional PCR.



Arrow indicates 650 bp fragments corresponding to the coding region of *bla<sub>TEM</sub>* gene. PM - molecular weight marker (1kb Ladder); C+: positive control; C-: negative control.

**Figure 3** – Agarose gel 1% containing fragments of the *bla<sub>SHV</sub>* gene amplified by conventional PCR.



Arrow indicates 1018 bp fragments corresponding to the coding region of *bla<sub>SHV</sub>* gene. PM - molecular weight marker (1kb Ladder); C+: positive control; C-: negative control.

**Table 2** – Isolates harboring *bla<sub>CTX-M-1/2</sub>*, *bla<sub>TEM</sub>*-Like, *bla<sub>SHV</sub>*-Like and *bla<sub>GES</sub>*-Like genes.



Isolate	Specimen	Biological sample	Age / Gender	Sector	<i>bla</i> CTX-M-1/2	<i>bla</i> TEM-Like	<i>bla</i> SHV-Like	<i>bla</i> GES-Like
J.KP02	<i>K. pneumoniae</i>	Blood	64/F	SW2	■	■	■	
J.EC08	<i>E. coli</i>	Fragment of tissue	74/F	SW2	■			
J.EC12	<i>E. coli</i>	Fragment of tissue	78/M	GSC	■			
J.KP15	<i>K. pneumoniae</i>	Blood	0*/M	NICU	■			■
J.EC18	<i>E. coli</i>	Liquid ascites	27/F	SW2	■			
J.EC23	<i>E. coli</i>	Blood	89/M	BAO	■			
J.KP34	<i>E. coli</i>	Bone fragment	61/M	GSC	■			
J.EC36	<i>K. pneumoniae</i>	Blood	2m**/M	PW	■			
J.EC40	<i>E. coli</i>	Secretion of wound	38/F	SW1	■	■	■	
J.KP41	<i>K. pneumoniae</i>	Fragment of tissue	41/M	SW1	■			
J.EC42	<i>E. coli</i>	Secretion of wound	48/F	SW1	■	■		
J.EC50	<i>E. coli</i>	Fragment of tissue	61/F	ICU1			■	
J.EC51	<i>E. coli</i>	Fragment of tissue	58/M	ASC	■			

ASC: Ambulatory Surgical Center; BAO: Brief Adult Observation; GSC: General Surgical Center; NICU: Neonatal Intensive Care Unit; PW: Pediatric Ward; SW1: Surgery ward 1; SW2: Surgery Ward 2; \* Newborn, two days of life; \*\*Two months; F: Female; M: Male.

## DISCUSSION

During the 1990s outbreaks of *E. coli* and *K. pneumoniae* ESBL producers were cause of approximately 7% of all infections occurring in hospitals. These rates grew rapidly, in 2003, over 20% of pathogenic *K. pneumoniae* isolates in USA intensive care units were resistant to third-generation cephalosporins (19).

Our data corroborate this growth trend, once it was observed high rates of *E. coli* (49.2%) and *K. pneumoniae* (70.8%) ESBL producers. These data are worrisome, especially as we observe an increasing linear trend of ESBL production rates in the hospital searched. On the other hand, it was reported lower rates of resistance in these bacterial species isolated from a public teaching hospital in the Midwest of the Brazil, *E. coli* (5.8%) and *K. pneumoniae* (45.6%) (20). Based on data from throughout Latin America (3), was also reported lower rates being 32% of the isolates of *E. coli* and 58% of isolates of *Klebsiella pneumoniae* ESBL producers. However, in other brazillian study (21), was observed similar rate of ESBL-producing *E. coli* (54.5%), but higher rate of ESBL-producing *K. pneumoniae* (95.1%) than the data reported in this study.

The results of this search showed that isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* ESBL producers were more frequent in urine (22.7%), blood (19.3%) and respiratory tract (13.1%) samples, similar to the data found by other Brazilian researchers (20,21,23). Recently Costabeber *et al.* (2016) (22), also identified these three sites as the most prevalent of ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae* strains, although the rate found in the respiratory tract (22.8%) had been almost twice as large than the rate found in our study.

In this study the most common sites for the isolation of *K. pneumoniae* was blood and urine, followed by bronchoalveolar lavage, these data corroborate other Brazilian study (24). On the other hand, a study conducted in France (25) showed a high incidence of *K. pneumoniae* in urine samples, followed by blood samples. Interestingly, according with European Centre for Disease Prevention and Control (26), *K. pneumoniae* occurs in highest rates mainly in bloodstream infections, followed by urine tract infections.

Our findings demonstrated that *E. coli* was detected more frequently in urine cultures (40.1%), although these rates are lower than those found by other researchers in Brazil and other countries, as Bartoloni *et al.* (2016) (27) 79,8%; Carvalho *et al.* (2016) (28) 68%; Vaish *et al.* (2016) (29) 65%; Cho *et al.* (2015) (30) 78,3%; Ferreira (2015) (21) 83,3%; Prestes-Carneiro *et al.*(2015) (24) 63,4%; Miranda *et al.* (2014) (31) 70,2%; Silva *et al.* (2014) (32) 67,9% e Zamparete (2014) (23) 73%. It is noteworthy that the majority (73.5%) of the *E. coli* positive urine cultures was detected in women. This condition was also found by Carvalho *et al.* (2016) (28) and Faria *et al.* (2016) (33). These results are expected, since women are more affected by urinary tract infections than men (28,31,33,34,35). We note that the highest rates of infection by *E. coli* and *K. pneumoniae* were observed in patients from surgical wards, clinical wards and intensive care units, as well as reported by other authors (21,23,36).

We also observed that the middle age of infected patients by *E. coli* or *K. pneumoniae*, regardless of ESBL phenotype, was 47.5 years, while the modal age was from 50 to 79 years. A recent research (36) showed that the middle age of infected patients with ESBL-producing enterobacteria is 53.7 years, similar to the data mentioned by Ferreira (2015) (21) (middle age 60.6 years). These findings can be attributed to the fact that patients in this age group accumulate more comorbidities, such as diabetes mellitus, furthermore the hospital environment require more invasive devices, such as central and/or peripheral venous access, urinary catheter, nasogastric probe and/or tracheostomy.

In relation to antimicrobial profile, our research revealed that *E. coli* was more sensitive to imipenem and amikacin and more resistant to ampicillin and ciprofloxacin, according to the findings of other researchers (29,26). Considering only the ESBL-producing isolates, the more effective antimicrobials agents against *K. pneumoniae* and *E. coli* were carbapenems, such as imipenem and meropenem, similar results were found in other studies (30,36).

Our results indicated that *bla*<sub>CTX-M</sub> was the gene most prevalent of ESBL, followed by *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes. A study conducted in Iran with *E. coli* isolates showed a higher prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub> gene (94.6%), followed by *bla*<sub>TEM</sub> gene (56.8%) (37) than our findings.

In a search conducted in Bolivia, all *E. coli* ESBL producers isolated harbored genes encoding enzymes CTX-M type (27). Recently, a published systematic review showed that the  $\beta$ -lactamase CTX-M is the predominant type of ESBL in Brazil (38). It is known that this family of ESBL enzymes has become one of the most important worldwide (3,27,39,40,41,42,43).

The highest rate of strains harboring genes of resistance was found in surgical sectors (69.2%, 9 of 13 isolates), including general surgical center, outpatient surgical center and surgical wards, as well as observed by other Brazilian study (24), although most studies report the highest rates of detection of resistance genes and/or multidrug resistance in intensive care units and clinical wards (21,31,36,62).

Data on the prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes in this study showed lower rates than the findings of other authors, especially for the *bla*<sub>SHV</sub> gene (3,12,14). This fact can be explained because despite the strong correlation between the presence of *bla* genes and ESBL phenotype, the presence of these genes does not assure the production of ESBL, because the genes can be silenced, or there may be the production of some other enzyme, such as AmpC (11,40).

Anago *et al.* (2015) (44) reported that the genotype TEM was predominant in ESBL and non ESBL producing *E. coli* with respectively 72.4% and 80.0%, furthermore the *bla*<sub>SHV</sub> gene occurred in 24.1% of ESBL producing isolates and in 18.1% of the isolates without ESBL phenotype. In *Klebsiella spp.*, Dexheimer *et al.* (2015) (40) found the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene in most isolates, but not all had the ESBL phenotype. Thus, the production of ESBL may be an aggravating factor in conjunction with other types of resistance mechanisms (11,40). Despite the low prevalence of *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>TEM</sub> and *bla*<sub>SHV</sub> genes found in our study, it is possible that other ESBL genes are present, conferring resistance to multiple antibiotics.

In only one isolated (J.KP15) of *K. pneumoniae* was detected the *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> gene, concomitantly. The specimen was recovered from a blood culture of a newborn, who came to death in the neonatal ICU. The *bla*<sub>GES</sub> gene had been reported in Brazil in clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa* (45,46,47,48,49,50,51). In environmental samples, the presence of *bla*<sub>GES</sub> gene was reported in *K. pneumoniae* (52,53). However, considering *K. pneumoniae* isolated from human infections in Brazil, there are two detection reports, one in Southeast (54) and another in South (55) of the country. Thus, according to a literature, this is the first report of *Klebsiella pneumoniae* harboring *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes in Brazil and the first report of this specie harboring *bla*<sub>GES</sub> gene in the Northeast of the country.

The *bla*<sub>VIM</sub> gene wasn't detected in the samples analysed in this study, although others researchs demonstrated the presence of this gene in Brazil's Southeast (56,57,58). In

relation to the *bla*<sub>KPC</sub> gene, it had been detected in Brazil (59,60), including in the northeast (18), but it was not found among the isolates of the searched hospital.

## CONCLUSION

Our findings demonstrated high levels of resistance to beta-lactams, fluoroquinolones, as well as increasing linear trend for ESBL production by the studied specimens. Among the isolates analyzed in this study, the *bla*<sub>CTX-M</sub> gene was the most prevalent.

Furthermore, it was detected one clinical strain of *K. pneumoniae* harboring *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, being of our knowledge the first report in Brazil, which demonstrates the great potential for worldwide spread of resistance genes between Gram-negative bacillus.

## REFERENCES

1. DAVIS, Gregg S.; PRICE, Lance B. Recent Research Examining Links Among *Klebsiella pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 128-135, 2016.
2. DASHTI, Ali A. *et al.* The characterization and antibiotic resistance profiles of clinical *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates in Kuwait. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 1, 2014.
3. GUZMÁN-BLANCO, Manuel *et al.* Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 421-433, 2014.
4. MANSOURI, Shahla *et al.* Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases in Kerman, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, 2014.
5. SANTAJIT, Sirijan; INDRAWATTANA, Nitaya. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
6. BUSH, K.; JACOBY, G.A. Updated functional classification of beta-lactamases. **Antimicrob Agents Chemother**, v.54, n.3, p.969-976, 2010.
7. DIAS, Andrea *et al.* Bacilos gram negativos produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido num hospital pediátrico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 197-206, 2011.
8. SHARMA, M; PATHAK, S; SRIVASTAVA, P. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 10, p. 2173, 2013.
9. WOLLHEIM, Claudia *et al.* Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 15, n. 2, Abr. 2011

10. BONNET, R. Growing group of extended-spectrum beta-lactamases: the CTX-M enzymes. **Antimicrob Agents Chemother**, v.48, n.1, p.1-14, 2004.
11. BRADFORD, P.A. Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. **Clin. Microbiol. Rev.**, v.14, n.4, p.933–951, 2001.
12. 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*<sub>CTX-M</sub> extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-31</sub>, *bla*<sub>SHV-38</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in Brazil. **Microb. Drug Resist**, v.17, n.1, p.7–16, 2011.
13. ADEYANKINNU, Folasoge A. *et al.* A Multicenter Study of Beta-Lactamase Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Reveals High Level Chromosome Mediated Extended Spectrum  $\beta$  Lactamase Resistance in Ogun State, Nigeria. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, 2014.
14. CABRAL, A.B. *et al.* Multidrug resistance genes, including *bla*<sub>KPC</sub> and *bla*<sub>CTX-M-2</sub>, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.
15. CAMPANA, E. H.; XAVIER, D. E.; PETROLINI, FERNANDA V.B.; CORDEIRO-MOURA, J. R.; ARAUJO, M. R. E.; GALES, A. C.. Carbapenem-resistant and cephalosporin-susceptible: a worrisome phenotype among *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates in Brazil. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases (Impresso)**, 2016.
16. ELLINGTON, M.J. *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321-322, 2007.
17. 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.
18. NICOLETTI, A.G. *et al.* Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.
19. SCHWABER, Mitchell J.; CARMELI, Yehuda. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 913-920, 2007.
20. NÓBREGA, G. D. **Investigação de beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* isoladas de amostras clínicas obtidas em um hospital público de ensino de Campo Grande, MS. Campo Grande-MS.** 52p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2013.
21. FERREIRA, Kalinca Miranda. **Investigação de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* de um Hospital Terciário de Campo Grande-MS.** **AC&T CIENTÍFICA**, 2015.
22. COSTABEBER, Ane Micheli; MATTOS, Angelo Alves de; SUKIENNIK, Teresa Cristina Teixeira. Prevalence of bacterial resistance in hospitalized cirrhotic patients in

- southern Brazil: a new challenge. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.
23. ZAMPARETTE, Caetana Paes. **Determinação fenotípica e genotípica de beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* em pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago**. 128p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014
  24. PRESTES-CARNEIRO, Luiz Euribel *et al.* Frequency and antimicrobial susceptibility of pathogens at tertiary public hospital, São Paulo, Brazil. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 46, p. 276-284, 2015.
  25. ABAT, Cédric; RAOULT, Didier; ROLAIN, Jean-Marc. Decreasing level of resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Marseille, January 2012–July 2015. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1, 2016.
  26. ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control (2013). **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013**. Disponível em: <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Access in Apr 20, 2016.
  27. BARTOLONI, Alessandro *et al.* Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (*bla*<sub>CTX-M</sub>, *rmtB*, *fosA3*) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 43, p. 1-6, 2016.
  28. CARVALHO, Fernanda Aguirre *et al.* Prevalência e perfil de sensibilidade de uropatógenos gram negativos em consultas ambulatoriais em hospital terciário. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.
  29. VAISH, Ritu *et al.* Evaluation of Virulence Factors and Antibiotic Sensitivity Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Extraintestinal Infections. **Cureus**, v. 8, n. 5, 2016.
  30. CHO, Yang Hyun *et al.* Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in health care-associated urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomycin. **International urology and nephrology**, v. 47, n. 7, p. 1059-1066, 2015.
  31. MIRANDA, E.J.P. *et al.* Susceptibility to antibiotics in urinary tract infections in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in São Paulo, Brazil: data from 11,943 urine cultures. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 313-324, 2014.
  32. SILVA, L. M. *et al.* *Escherichia coli* isolados de infecção urinária em gestantes: Perfil de resistência aos antimicrobianos. **Enciclopédia Biosfera**, 10, 231-239, 2014.
  33. FARIA, Ronaldo José; BAZONI, Patrícia Silva; FERREIRA, Carlos Eduardo Faria. Prevalência e sensibilidade de microorganismos isolados em uroculturas no Espírito Santo, Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 1, p. 05-09, 2016.
  34. DA SILVA, Nayara Messias; DE OLIVEIRA, Ellen Synthia Fernandes; DE OLIVEIRA, Luciana Alves. Caracterização das infecções do trato urinário em mulheres atendidas em Hospital Universitário da Região Centro Oeste, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 1.1, 2016.
  35. FREITAS, Rodrigo Barros *et al.* Infecções do trato urinário de origem hospitalar e comunitária: revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade. **Revista Científica FAGOC-Saúde**, v. 1, n. 1, 2016.

36. RUGINI, Cristina Letícia; SOBOTTKA, Andréa Michel; FUENTEFRIA, Daiane Bopp. Occurrence and sensitivity profile of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* at a tertiary hospital in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 692-698, 2015.
37. MOGHADDAM, Mahboobeh Nakhaei; FORGHANIFARD, Mohammad Mahdi; MOSHREFI, Sheila. Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes (*bla*<sub>TEM</sub>, *bla*<sub>CTX</sub> and *bla*<sub>SHV</sub>) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 833-839, 2012.
38. ROCHA, Francisco Ruliglésio; PINTO, Vicente Paulo Teixeira; BARBOSA, Francisco Cesar Barroso. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016.
39. CANTÓN, Rafael; COQUE, Teresa M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.
40. DEXHEIMER, Georgia Muccillo *et al.* Prevalence of resistance and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated in a hospital in Southern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 5, p. 294-300, 2015.
41. GALES, Ana C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.
42. HAWSER, Stephen P. *et al.* Low frequency of ertapenem-resistant intra-abdominal isolates of *Escherichia coli* from Latin America: susceptibility, ESBL-occurrence, and molecular characterisation (SMART 2008–2009). **Journal of Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 6-11, 2012.
43. TISSERA, S.; LEE, S.M. Isolation of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia. **Malays. J. Med. Sci.** v. 20, n. 3, p. 14-22, 2013.
44. ANAGO, Eugénie *et al.* Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.
45. CASTANHEIRA, M. *et al.* Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004.
46. DA FONSECA, E.L. *et al.* Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576-577, 2007.
47. PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* blaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251-253, 2006.
48. FEHLBERG, L.C.C. *et al.* Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.

49. XAVIER, Danilo E. *et al.* Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.
50. POLOTTO, M. *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.
51. CAVALCANTI, F.L.S. *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, 2015.
52. RUIZ, Leonardo Guizilini Plazas. Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes *blashv*, *blatem*, *blactx-m* e *blages* em *Enterobacteriaceae* isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual “Júlio de Mesquita Filho”, São José do Rio Preto. (2010): 74-f.
53. DE ARAUJO, C.F.M. *et al.* Detection of carbapenemases genes on aquatic environment in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02753-15, 2016.
54. DROPA, M. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene variants blaSHV-40, blaTEM-116 and the class 1 integron-associated blaGES-7 in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 630-632, 2010.
55. RIBEIRO, V.B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 231-232, 2014.
56. MARTINS, H.S.I., BOMFIM, M.R.Q., FRANÇA, R.O., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., SERUFO, J.C., SANTOS, S.G. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 11, n. 2, p. 1465–1478, 2014.
57. INACIO, H.S.M., BOMFIM, M.R.Q., FRANÇA, R.O., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., SERUFO, J.C., SANTOS, S.G. Phenotypic and genotypic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections recovered in the hospitals of Belo Horizonte, Brazil. **Chemotherapy**, v. 60, p. 54–62, 2014.
58. PITONDO-SILVA, A.A. *et al.* High prevalence of bla VIM-1 gene in bacteria from Brazilian soil. **Canadian Journal of Microbiology**, 2016.
59. PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702-2702, 2009.
60. 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.
61. DAVIS, G.S.; PRICE, L.B. Recent Research Examining Links Among *Klebsiella pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 128-135, 2016.



## 6 ARTIGO 2

Letter to the Editor

### **First report of a *bla*<sub>GES</sub> gene in a nosocomial isolate of *Klebsiella pneumoniae* in Northeast of Brazil**

Jisbaque Melo Braga<sup>1</sup>; Ana Jéssica Alves Morais<sup>2</sup>; Izabelly Linhares Ponte Brito<sup>1</sup>; Paulo de Tarso Teles Dourado de Aragão<sup>3</sup>; Ana Cristina Gales<sup>4</sup>; Vicente de Paulo Teixeira Pinto<sup>1,2</sup>; Francisco Cesar Barroso Barbosa<sup>1</sup>

**1** Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Ceará – UFC, Sobral, Brazil.

**2** Postgraduate Program in Biotechnology, UFC, Sobral, Brazil.

**3** Graduate Program in Biological Sciences from the State University of Vale do Acaraú, Sobral, Brazil.

**4** Laboratory Alerta, Division of Infectious Diseases, Federal University of São Paulo, São Paulo, Brazil.

Corresponding author: Francisco Cesar Barroso Barbosa

Adress: Av. Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 100, Sobral, CE, 62042-280, Brazil

Telephone: + 55 88 3613.2603; Fax number: +55 88 3611.8000

E-mail: fcbbarbosa@yahoo.com.br

Running Title: *K. pneumoniae* harboring *bla*<sub>GES</sub> gene in the Brazil's Northeast.

#### **ABSTRACT**

A clinical *Klebsiella pneumoniae* isolate carrying the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene variant *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> was recovered from a blood culture of a newborn in the neonatal ICU in a teaching hospital in Brazil's Northeast. Amikacin, ceftriaxone and cefuroxime activity was most affected by the presence of these genes and an additional resistance to ampicillin / sulbactam was observed. These results show the emergence of *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> in clinical *K. pneumoniae* strain in Brazil, suggesting a great potential for dissemination of *bla* genes into nosocomial pathogens.

Keywords: *Klebsiella pneumoniae*; ESBL; *bla*<sub>GES</sub> gene; nosocomial infection; antimicrobial resistance.

**Artigo sera submetido a revista: *Journal of Clinical Microbiology*.**

## INTRODUCTION

In 1998, a *Klebsiella pneumoniae* isolate was recovered in a French hospital from an infant that previously had been hospitalized in French Guiana. The  $\beta$ -lactamase characterized from this clinical strain was accordingly named GES-1 (Guiana extended-spectrum). This enzyme conferred resistance to extended-spectrum cephalosporins, clavulanic acid, tazobactam and imipenem (1).

At present, the GES family enzymes comprise 27 different members (<http://www.lahey.org/Studies/>) of which only eight, GES-1, GES-2, GES-4, GES-5, GES-6, GES-11, GES-14 and GES-18, show a measurable enzymatic activity against carbapenems. However, the carbapenemase activity of GES-1 is so low that it seems reasonable to consider the enzyme as an ESBL rather than a carbapenemase (2,3).

The enzymes of the GES family differ from each other by one to four amino acid substitutions. Currently, the phylogenetically closest related  $\beta$ -lactamase to the GES family enzymes is BEL-1 from *P. aeruginosa* with identities ranging from 50% to 51%. The GES enzymes have mainly been found in *P. aeruginosa*, but the enzymes have also been observed in members of *Enterobacteriaceae*. Isolates producing GES enzymes with carbapenemase activity have been collected predominantly in Europe, South Africa and the Far East (2).

The aim of the current study was to report the presence of the *bla*<sub>GES</sub> gene in clinical *K. pneumoniae* ESBL producer isolated from a newborn with nosocomial infection admitted in a teaching hospital in Sobral, Ceará, Northeast of Brazil.

## METHODOLOGY

A total of 44 non-duplicate ESBL-producing clinical isolates were collected from March 2015 to March 2016 in the North Regional hospital at Sobral (HRN), Ceará, Northeast of Brazil. The isolates were identified by the Vitek<sup>®</sup> 2 compact automated system (BioMerieux, Marcy L'Etoile, France) as *K. pneumoniae* (21 isolates) and *E. coli* (23 isolates) using GN cards, as well as the antimicrobial susceptibility profile.

The minimum inhibitory concentrations (MICs), resistance patterns, and phenotypic detection of ESBL production were determined using the Vitek<sup>®</sup> 2 compact automated system. Polymerase chain reaction (PCR) amplification was used to detect the presence of gene encoding GES enzyme. For amplification of *bla*<sub>GES</sub>, as previously described

(4), the following primers were used: 3'-AGCAGCTCAGATCGGTGTTG-5' and 3'-CCGTGCTCAGGATGAGTTG-5'.

The present study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the protocol was approved by the Institutional Ethics Committee of the State University of Acaraú Valley, Sobral, Ceará, Brazil (n° 975.071). All of the patients gave their written informed consent.

## RESULTS

The *bla<sub>GES</sub>* gene was detected in only one *Klebsiella pneumoniae*. Isolate J.KP15 was recovered from a blood culture of a newborn preterm, with nine days of life, gestational age fixed 33 weeks and five days, weighing 1,742 grams. The child was born at Santa Casa de Misericórdia hospital at Sobral – CE and was transferred to the HRN under invasive mechanical ventilation and vasoactive drugs.

The child was diagnosed with necrotizing enterocolitis and suspected perforation of intestinal loop. It underwent an exploratory laparotomy, where it was found that there was no intestinal loop drilling. During hospitalization at the HRN, the patient was treated with meropenem and vancomycin. The newborn remained in the HRN Intensive Care Unit for nine days, when he died. The antimicrobial susceptibility profile of isolated J.KP15 is shown in table 1, and figure 1 show agarose gel containing fragments of *bla<sub>GES</sub>* gene amplified by conventional PCR.

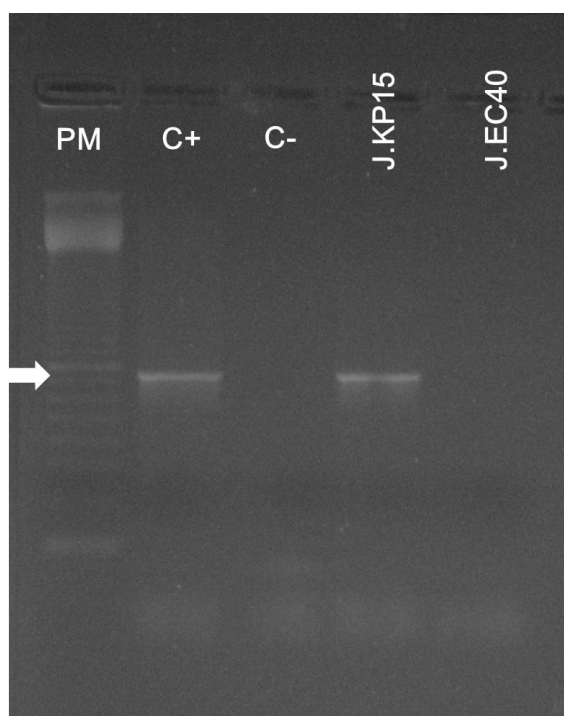
**Table 1** – Antimicrobial susceptibility profile of isolated J.KP15.

<b>Hemoculture for aerobic</b>		
Specimen: <i>Klebsiella pneumoniae</i>		
<b>Antibiogram</b>	<b>Result</b>	<b>MIC (µg/ml)</b>
Amikacin	R	≥64
Ampicillin	R	≥32
Ampicillin/Sulbactam	R	≥32
Cefepime	R	16
Cefoxitin	R	≤4
Ceftazidime	R	16
Ceftriaxone	R	≥64
Cefuroxime	R	≥64
Ciprofloxacin	S	≤0,25
Colistine	S	≤0,50
Ertapenem	S	≤0,50

Gentamicin	R	$\geq 16$
Imipenem	S	$\leq 0,25$
Meropenem	S	$\leq 0,25$
Piperacillin/Tazobactam	I	32
Tigecycline	S	$\leq 0,50$
ESBL:	Positive	

R: resistant; I: intermediate; S: sensitive; ESBL: Extended Spectrum Betalactamase; following CLSI/2014 recommendations

**Figure 1** – Agarose gel 1% containing fragments of *bla<sub>GES</sub>* gene amplified by PCR.



Arrow indicates 750 bp fragments corresponding to the coding region of *bla<sub>GES</sub>* gene. PM - molecular weight marker (1kb Ladder); C+: positive control; C-: negative control; J.EC40: negative control.

## DISCUSSION

Despite a diverse arsenal of antimicrobials, bacterial infections still represent a major cause of morbidity and mortality worldwide, especially due to the emergence and spread of multidrug-resistant isolates. Infections caused by carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* are very worrisome, because they have been associated with high mortality rates<sup>4</sup>. Here, we report the identification of a *bla<sub>GES</sub>* gene, in clinical *K. pneumoniae* isolate from a newborn, similar to the first report of the enzyme GES in the year 2000, which was also isolated from a child (1).

Since its emergence, the enzyme GES has extended its worldwide distribution. The GES enzyme has been identified in Argentina (5), Belgium (6), Brazil (7), Canada (8), China (9), Egypt (10), Germany (11), France (1,12), Iran (13), Japan (14), Korea (15), Kuwait (16), Lebanon (17), Mexico (18), Netherlands (19), Portugal (20), Spain (21), South Africa (22), Tunisian (23) and Turkey (24) in clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens*. Recently, in a study with *K. pneumoniae* conducted in Iran for Zibaei *et al.* (2016) (13), 23.2% of the isolates harbored the gene *bla*<sub>GES</sub>. In the same year, in a China study (9), was reported the emergence of the *K. pneumoniae* isolate carrying *bla*<sub>CTX-M</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>GES</sub> genes, concomitantly. In Turkey, a group of researchers (24) detected the *bla*<sub>GES</sub> gene in a *P. aeruginosa* isolate, the third reported in this Asiatic country since 2013.

In Brazil, the *bla*<sub>GES</sub> gene had been reported in clinical samples of *Pseudomonas aeruginosa* (25-31). In environmental samples, the presence of *bla*<sub>GES</sub> gene was reported in *K. pneumoniae* (32,33). However, considering *K. pneumoniae* isolated from human infections in Brazil, there are two reports, the first was Dropa *et al.* (2010) (34), in São Paulo, Brazil's Southeast, the researchers detected one clinical *K. pneumoniae* isolate harboring *bla*<sub>GES</sub>, *bla*<sub>SHV</sub> and *bla*<sub>TEM</sub> genes, concomitantly, and the other one was Ribeiro *et al.* (2014) (35), in Porto Alegre, Brazil's South, that reported *K. pneumoniae* harboring *bla*<sub>GES</sub>. In the Northeast of Brazil there are only two reports of detection of the *bla*<sub>GES</sub> gene at moment, but both in *P. aeruginosa* (26,31).

To our knowledge, the clinical *K. pneumoniae* isolate (J.KP15), reported in this study, harboring *bla*<sub>GES</sub> and *bla*<sub>CTX-M</sub> genes, is the first report of this ESBL genes in nosocomial *K. pneumoniae* isolated from Brazil.

## CONCLUSION

The data presented in this study draw attention to the increasing resistance of *K. pneumoniae*, which can be attributed to the pressure exerted by the widespread use of antibiotics and demonstrates the great potential for worldwide spread of resistance genes between Gram-negative bacillus.

Moreover, it is important to step up and standardize laboratory monitoring of antimicrobial susceptibility to assist in the identification of multiresistant clones outbreaks and help better understand the epidemiological evolution of these pathogenic species. More

researches for detection of genes conferring multidrug resistance in the *Enterobacteriaceae* are required for mapping and monitoring of increasing of the resistance.

## REFERENCES

1. POIREL, L.; *et al.*, 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.
2. WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. Class A carbapenemases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 470-482, 2007.
3. 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  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.396-401, 2013.
4. NICOLETTI, A.G. *et al.* Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.
5. PASTERAN, F. *et al.* Novel variant (blaVIM-11) of the metallo- $\beta$ -lactamase blaVIM family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 474-475, 2005.
6. BOGAERTS, P. *et al.* GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872-4878, 2010.
7. PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* blaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251-253, 2006.
8. BOYD, David *et al.* Complete sequence of four multidrug-resistant MOBQ1 plasmids harboring bla GES-5 isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* persisting in a hospital in Canada. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 3, p. 253-260, 2015.
9. CHEN, Ding-Qiang *et al.* Emergence and Plasmid Analysis of *Klebsiella pneumoniae* KP01 Carrying blaGES-5 from Guangzhou, China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 6362-6364, 2016.
10. AZAB, M.M.; SHEHATA, A.; MOHAMED, M. OXA-10 and GES-1 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases Play A Major Role in Causing Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Nosocomial Infections in Ismailia, Egypt. **The Egyptian Journal of Medical Microbiology (EJMM)**, v. 24, n. 4, 2015.
11. BOTELHO, João *et al.* Characterization of a new genetic environment associated with GES-6 carbapenemase from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 615-617, 2015.
12. DUBOIS, V. *et al.* Molecular characterization of a novel class 1 integron containing blaGES-1 and a fused product of aac (3)-Ib/aac (6)-Ib" gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 638-645, 2002.

13. ZIBAEI, M. *et al.* Detection of blaKPC and blaGES carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients in Kashan, Iran. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, [Epub ahead of print], 2016.
14. WACHINO, Jun-ichi *et al.* Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A  $\beta$ -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1960-1967, 2004.
15. JEONG, Seok Hoon *et al.* First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4809-4810, 2005.
16. BONNIN, R.A. *et al.* Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in Kuwait. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01384-12, 2012.
17. HAMMOUDI, D. *et al.* Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 56-61, 2015.
18. BARRIOS, H. *et al.* A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Mexico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 4032-4034, 2012.
19. VOETS, G.M. *et al.* Population distribution of beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical *Enterobacteriaceae* in the Netherlands. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52102, 2012.
20. DUARTE, A. *et al.* Outbreak of GES-1  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1481-1482, 2003.
21. VIEDMA, E. *et al.* Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4930-4933, 2009.
22. LABUSCHAGNE, Christiaan De J. *et al.* Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 6, p. 527-530, 2008.
23. CHARFI-KESSIS, K. *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the bla OXA-23 and the bla GES-11 genes in a neonatology center in Tunisia. **Microbial pathogenesis**, v. 74, p. 20-24, 2014.
24. MALKOÇOĞLU, G. *et al.* VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. **Microbial Drug Resistance**, 2016.
25. CASTANHEIRA, M. *et al.* Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004.

26. DA FONSECA, E.L. *et al.* Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576-577, 2007.
27. PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* blaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251-253, 2006.
28. FEHLBERG, L.C.C. *et al.* Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.
29. XAVIER, Danilo E. *et al.* Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.
30. POLOTTO, M. *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.
31. CAVALCANTI, F.L.S. *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, 2015.
32. RUIZ, Leonardo Guizilini Plazas. Resistência aos beta-lactâmicos e detecção dos genes *blashv*, *blatem*, *blactx-m* e *blages* em *Enterobacteriaceae* isoladas de efluentes hospitalar e comunitário em um município do noroeste paulista. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Microbiologia. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual "Júlio de Mesquita Filho", São José do Rio Preto. (2010): 74-f.
33. DE ARAUJO, C.F.M. *et al.* Detection of carbapenemases genes on aquatic environment in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02753-15, 2016.
34. DROPA, M. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene variants blaSHV-40, blaTEM-116 and the class 1 integron-associated blaGES-7 in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 630-632, 2010.
35. RIBEIRO, V.B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 231-232, 2014.



## REFERÊNCIAS GERAIS

ABAT, C.; RAOULT, D.; ROLAIN, J.M. Decreasing level of resistance in invasive *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in Marseille, January 2012–July 2015. **SpringerPlus**, v. 5, n. 1, p. 1, 2016.

ADEYANKINNU, F.A. *et al.* A Multicenter Study of Beta-Lactamase Resistant *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Reveals High Level Chromosome Mediated Extended Spectrum  $\beta$  Lactamase Resistance in Ogun State, Nigeria. **Interdisciplinary perspectives on infectious diseases**, v. 2014, 2014.

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

ANAGO, E. *et al.* Antibiotic resistance and genotype of beta-lactamase producing *Escherichia coli* in nosocomial infections in Cotonou, Benin. **Annals of clinical microbiology and antimicrobials**, v. 14, n. 1, p. 1, 2015.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - **RDC Nº 20**, de 10 de abril de 2014. Dispõe sobre regulamento sanitário para o transporte de material biológico humano. D.O.U. - Diário Oficial da União; Poder Executivo, de 11 de abril de 2014.

AZAB, M.M.; SHEHATA, A.; MOHAMED, M. OXA-10 and GES-1 Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases Play A Major Role in Causing Antibiotic Resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Isolated from Nosocomial Infections in Ismailia, Egypt. **The Egyptian Journal of Medical Microbiology (EJMM)**, v. 24, n. 4, 2015.

BARRIOS, H. *et al.* A plasmid-encoded class 1 integron contains GES-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae* clinical isolates in Mexico. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 7, p. 4032-4034, 2012.

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

BARTOLONI, A. *et al.* Antimicrobial susceptibility and emerging resistance determinants (bla CTX-M, rmtB, fosA3) in clinical isolates from urinary tract infections in the Bolivian Chaco. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 43, p. 1-6, 2016.

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.; STEPLINGER, 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  $\beta$ -lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* that contains Ile80 and Ser170 residues. **Antimicrob Agents Chemother**, v.57, n.1, p.396-401, 2013.

BEIRÃO, E.M. *et al.* Clinical and microbiological characterization of KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* infections in Brazil. **braz j infect dis**, v. 15, n. 1, p. 69-73, 2011.

BIOMÉRIEUX. **VITEK<sup>®</sup> 2** Disponível em: <http://www.biomerieux.com.br/produto/vitek-2>. Acesso em: 01 jul. 2016.

BOGAERTS, P. *et al.* GES extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in *Acinetobacter baumannii* isolates in Belgium. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 54, n. 11, p. 4872-4878, 2010.

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.

BOTELHO, João *et al.* Characterization of a new genetic environment associated with GES-6 carbapenemase from a *Pseudomonas aeruginosa* isolate belonging to the high-risk clone ST235. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, n. 2, p. 615-617, 2015.

BOYD, David *et al.* Complete sequence of four multidrug-resistant MOBQ1 plasmids harboring bla GES-5 isolated from *Escherichia coli* and *Serratia marcescens* persisting in a hospital in Canada. **Microbial Drug Resistance**, v. 21, n. 3, p. 253-260, 2015.

CABRAL, Adriane Borges *et al.* Multidrug resistance genes, including blaKPC and blaCTX-M-2, among *Klebsiella pneumoniae* isolated in Recife, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 5, p. 572-578, 2012.

BONNIN, R.A. *et al.* Wide dissemination of GES-type carbapenemases in *Acinetobacter baumannii* in Kuwait. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 01384-12, 2012.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2616, **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de maio de 1998. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616\\_12\\_05\\_1998.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/1998/prt2616_12_05_1998.html)> Acesso em set. 2014.

BROOKS, G.F. *et al.* **Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg**. McGraw Hill Brasil, 2012.

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  $\beta$ -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  $\beta$ -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.

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**. 150p. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Básicas em Infectologia - Escola Paulista de Medicina. Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, 2013.

CANTÓN, R.; COQUE, T.M. The CTX-M  $\beta$ -lactamase pandemic. **Current opinion in microbiology**, v. 9, n. 5, p. 466-475, 2006.

CARVALHO, F.A. *et al.* Prevalência e perfil de sensibilidade de uropatógenos gram negativos em consultas ambulatoriais em hospital terciário. **Anais do Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão**, v. 7, n. 2, 2016.

CASTANHEIRA, M. *et al.* Emergence of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase GES-1 in a *Pseudomonas aeruginosa* strain from Brazil: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 2344-2345, 2004.

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

CAVALCANTI, F.L.S. *et al.* Mutational and acquired carbapenem resistance mechanisms in multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates from Recife, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1003-1009, 2015.

CHAMBERS, H.F. Antibióticos beta-lactâmicos 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.

- CHARFI-KESSIS, K. *et al.* Multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains carrying the bla OXA-23 and the bla GES-11 genes in a neonatology center in Tunisia. **Microbial pathogenesis**, v. 74, p. 20-24, 2014.
- 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.
- CHO, Y.H. *et al.* Antimicrobial susceptibilities of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in health care-associated urinary tract infection: focus on susceptibility to fosfomycin. **International urology and nephrology**, v. 47, n. 7, p. 1059-1066, 2015.
- COQUE, T.M.; BAQUERO, F.; CANTON, R. Increasing prevalence of ESBL producing *Enterobacteriaceae* in Europe. **Euro Surveill**, v.13, n.47, 2008.
- COSTABEBER, A.M.; MATTOS, A.A.; SUKIENNIK, T.C.T. Prevalence of bacterial resistance in hospitalized cirrhotic patients in Southern Brazil: a new challenge. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.
- D'ANDREA, M.M.; ARENA, F.; PALLECCHI, L.; ROSSOLINI, G.M. CTX-M- type  $\beta$ -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. **Int. J. Med, Microbiol**, v.303, n.6-7, p.305-317, 2013.
- DA FONSECA, E.L. *et al.* Emergence of blaGES-5 in clinical colistin-only-sensitive (COS) *Pseudomonas aeruginosa* strain in Brazil. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 59, n. 3, p. 576-577, 2007.
- DASHTI, A.A. *et al.* The characterization and antibiotic resistance profiles of clinical *Escherichia coli* O25b-B2-ST131 isolates in Kuwait. **BMC microbiology**, v. 14, n. 1, p. 214, 2014.
- DA SILVA, N.M.; DE OLIVEIRA, E.S.F.; DE OLIVEIRA, L.A. Caracterização das infecções do trato urinário em mulheres atendidas em Hospital Universitário da Região Centro Oeste, Brasil. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 13, n. 1.1, 2016.
- DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R factors in *Enterobacteriaceae*. **Nature**, v. 208, n. 5007, p. 239-41, 1965.
- DAVIS, G.S.; PRICE, L.B. Recent Research Examining Links Among *Klebsiella pneumoniae* from Food, Food Animals, and Human Extraintestinal Infections. **Current environmental health reports**, v. 3, n. 2, p. 128-135, 2016.
- DE ARAUJO, C.F.M. *et al.* Detection of carbapenemases genes on aquatic environment in Rio de Janeiro, Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. AAC. 02753-15, 2016.
- DEMIREL, I. *et al.* Comparison of host response mechanisms evoked by extended spectrum beta lactamase (ESBL)-and non-ESBL-producing uropathogenic E. coli. **BMC microbiology**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2013.

DIAS, A. *et al.* Bacilos gram negativos produtores de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido num hospital pediátrico. **Acta Médica Portuguesa**, v. 24, p. 197-206, 2011.

DEXHEIMER, G.M. *et al.* Prevalence of resistance and molecular characterization of extended spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing bacteria isolated in a hospital in Southern Brazil. **African Journal of Microbiology Research**, v. 9, n. 5, p. 294-300, 2015.

DRANCOURT, M. *et al.* Phylogenetic analyses of *Klebsiella* species delineate *Klebsiella* and *Raoultella* gen. nov., with description of *Raoultella ornithinolytica* comb. nov., *Raoultella terrigena* comb. nov. and *Raoultella planticola* comb. nov. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 3, p. 925-932, 2001.

DRAWZ, S.M.; BONOMO, R.A. Three decades of  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Clin Microbiol Rev**, v.23, n.1, p.160-201, 2010.

DROPA, M. *et al.* Emergence of *Klebsiella pneumoniae* carrying the novel extended-spectrum  $\beta$ -lactamase gene variants blaSHV-40, blaTEM-116 and the class 1 integron-associated blaGES-7 in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 630-632, 2010.

DUARTE, A. *et al.* Outbreak of GES-1  $\beta$ -lactamase-producing multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a university hospital in Lisbon, Portugal. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 47, n. 4, p. 1481-1482, 2003.

DUBOIS, V. *et al.* Molecular characterization of a novel class 1 integron containing blaGES-1 and a fused product of aac (3)-Ib/aac (6'')-Ib" gene cassettes in *Pseudomonas aeruginosa*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 3, p. 638-645, 2002.

ECDC. European Centre for Disease Prevention and Control (2013) **Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2013**.  
<http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/antimicrobial-resistance-surveillance-europe-2013.pdf>. Acesso em 20 Abr 2016.

ELLINGTON, M.J. *et al.* Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding acquired metallo- $\beta$ -lactamases. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 321-322, 2007.

FARIA, R.J.; BAZONI, P.S.; FERREIRA, C.E.F. Prevalência e sensibilidade de microorganismos isolados em uroculturas no Espírito Santo, Brasil. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 1, p. 05-09, 2016.

FEHLBERG, Lorena CC *et al.* Beta-lactam resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing bloodstream infections: comparative results between Brazilian and American isolates. **Microbial Drug Resistance**, v. 18, n. 4, p. 402-407, 2012.

FERREIRA, K.M.. Investigação de beta-lactamases em *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* de um Hospital Terciário de Campo Grande-MS. **AC&T CIENTÍFICA**, 2015.  
Disponível em:  
[http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Noticias\\_ACET/noticia1-investigacao\\_laboratorial.pdf](http://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/Noticias_ACET/noticia1-investigacao_laboratorial.pdf), Acesso em 02 jul 2016.

- FREITAS, R.B. *et al.* Infecções do trato urinário de origem hospitalar e comunitária: revisão dos principais micro-organismos causadores e perfil de susceptibilidade. **Revista Científica FAGOC-Saúde**, v. 1, n. 1, 2016.
- FUNKE, G. *et al.* Evaluation of the VITEK<sup>®</sup> 2 system for rapid identification of medically relevant Gram-negative rods. **Journal of clinical Microbiology**, v. 36, n. 7, p. 1948-1952, 1998.
- GALES, A.C. *et al.* Antimicrobial resistance among Gram-negative bacilli isolated from Latin America: results from SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (Latin America, 2008–2010). **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 73, n. 4, p. 354-360, 2012.
- GARCIA, L.M. *et al.* Perfil epidemiológico das infecções hospitalares por bactérias multidrogarresistentes em um hospital do norte de Minas Gerais. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 3, n. 2, p. 45-49, 2013.
- GIAKKOUPI, P. *et al.* IBC-1, a Novel Integron-Associated Class A  $\beta$ -Lactamase with Extended-Spectrum Properties Produced by an *Enterobacter cloacae* Clinical Strain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 44, n. 9, p. 2247-2253, 2000.
- GUZMÁN-BLANCO, M. *et al.* Extended spectrum  $\beta$ -lactamase producers among nosocomial *Enterobacteriaceae* in Latin America. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 4, p. 421-433, 2014.
- HAMMOUDI, D. *et al.* Spread of imipenem-resistant *Acinetobacter baumannii* co-expressing OXA-23 and GES-11 carbapenemases in Lebanon. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 36, p. 56-61, 2015.
- HARRIS, P.N.A.; TAMBYAH, P.A.; PATERSON, D.L.  $\beta$ -lactam and  $\beta$ -lactamase inhibitor combinations in the treatment of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*: time for a reappraisal in the era of few antibiotic options? **The Lancet Infectious Diseases**, v. 15, n. 4, p. 475-485, 2015.
- HAWSER, S.P. *et al.* Low frequency of ertapenem-resistant intra-abdominal isolates of *Escherichia coli* from Latin America: susceptibility, ESBL-occurrence, and molecular characterisation (SMART 2008–2009). **Journal of Chemotherapy**, v. 24, n. 1, p. 6-11, 2012.
- INACIO, H.S.M., BOMFIM, M.R.Q., FRANÇA, R.O., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., SERUFO, J.C., SANTOS, S.G. Phenotypic and genotypic diversity of multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolates from bloodstream infections recovered in the hospitals of Belo Horizonte, Brazil. **Chemotherapy**, v. 60, p. 54–62, 2014.
- IRAZ, M. *et al.* Characterization of novel VIM carbapenemase, VIM-38, and first detection of GES-5 carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases in *Pseudomonas aeruginosa* in Turkey. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, v. 78, n. 3, p. 292-294, 2014.
- JACOBY, G.A.  $\beta$ -Lactamase nomenclature. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 4, p. 1123-1129, 2006.

JACOBY, G.A.; MUNOZ-PRICE, L.S. The new beta-lactamases. **N Engl J Med**, v.532, 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.

JEONG, Seok Hoon *et al.* First outbreak of *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates producing GES-5 and SHV-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in Korea. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 11, p. 4809-4810, 2005.

JONES, C.H.; TUCKMAN, M.; KEENEY, D.; RUZIN, A.; BRADFORD, P.A. Characterization and sequence analysis of extended spectrum b-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.

JOSSART, M.-F.; COURCOL, R. J. Evaluation of an automated system for identification of *Enterobacteriaceae* and nonfermenting bacilli. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 18, n. 12, p. 902-907, 1999.

KNOTHE, H.; SHAH, P.; KRCMERY, 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.

KOBAYASHI, C.C.B.A.; SADOYAMA, G.; VIEIRA, J.D.G. Avaliação da resistência antimicrobiana associada em isolados clínicos de *Klebsiella spp*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp* em um hospital público de Goiânia, GO-Brasil. **Revista de Patologia Tropical**, [S.l.], v. 38, n. 3, p. 165-178, nov. 2009.

KONEMAN, E. W. *et al.* **Color atlas and textbook microbiology**. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Company, 1997.

LABUSCHAGNE, Christiaan De J. *et al.* Emergence of class 1 integron-associated GES-5 and GES-5-like extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in South Africa. **International journal of antimicrobial agents**, v. 31, n. 6, p. 527-530, 2008.

LAURETTI, L. *et al.* Cloning and characterization of *bla<sub>VIM</sub>*, a new integron-borne metallo- $\beta$ -lactamase gene from a *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 43, n. 7, p. 1584-1590, 1999.

LEVY, C. E. Módulo V - Detecção e identificação de bactérias de importância médica. Levy CE. Manual de Microbiologia Clínica para o controle de infecção de serviços de saúde. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, p. 1-93, 2004.

LIMA, M.R.S. *et al.* Intervenção em surto de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro expandido (ESBL) em unidade de terapia intensiva neonatal em Teresina, Piauí, 2010-2011. **Epidemiol. serv. saúde**, v. 23, n. 1, p. 177-182, 2014.

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  $\beta$ -lactamases and carbapenemases. **J Antimicrob Chemother**, v.62, n.5, p.1053-1056, 2008.

MALKOÇOĞLU, G. *et al.* VIM-1, VIM-2, and GES-5 carbapenemases among *Pseudomonas aeruginosa* isolates at a Tertiary Hospital in Istanbul, Turkey. **Microbial Drug Resistance**, 2016.

MANSOURI, S. *et al.* Characterization of AmpC, CTX-M and MBLs types of  $\beta$ -lactamases in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* producing Extended Spectrum  $\beta$ -lactamases in Kerman, Iran. **Jundishapur Journal of Microbiology**, v. 7, n. 2, 2014.

MARTINS, A.C.; PICOLI, S.U. Métodos alternativos para detecção de betalactamase de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, v. 47, n. 4, p. 421-426, 2011.

MARTINS, H.S.I., BOMFIM, M.R.Q., FRANÇA, R.O., FARIAS, L.M., CARVALHO, M.A.R., SERUFO, J.C., SANTOS, S.G. Resistance markers and genetic diversity in *Acinetobacter baumannii* strains recovered from nosocomial bloodstream infections. **Int. J. Environ. Res. Public Health**. v. 11, n. 2, p. 1465–1478, 2014.

MAVROIDI, A. *et al.* An integron-associated  $\beta$ -lactamase (IBC-2) from *Pseudomonas aeruginosa* is a variant of the extended-spectrum  $\beta$ -lactamase IBC-1. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 48, n. 5, p. 627-630, 2001.

MIRANDA, E.J.P. *et al.* Susceptibility to antibiotics in urinary tract infections in a secondary care setting from 2005-2006 and 2010-2011, in São Paulo, Brazil: data from 11,943 urine cultures. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 4, p. 313-324, 2014.

MOGHADDAM, M.N.; FORGHANIFARD, M.M.; MOSHREFI, S. Prevalence and Molecular Characterization of Plasmid-mediated Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase Genes (blaTEM, blaCTX and blaSHV) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 833-839, 2012.

MONTEIRO, Jussimara. **Caracterização molecular dos mecanismos de resistência aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos em *Klebsiella spp.* isoladas de infecções de corrente sanguínea**



**do Projeto SCOPE Brasil.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Infectologia – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. 2009.

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.

MOREIRA, V.A.M. **Isolamento, perfil de sensibilidade e investigação da produção de beta-lactamases em amostras de *Escherichia coli* isoladas de pacientes com infecções do trato urinário em Jundiá, SP.** In: 13º Congresso Nacional de Iniciação Científica. Anais do Conic-Semesp. Volume 1, 2013 - Faculdade Anhanguera de Campinas - Unidade 3. 2013.

MUNOZ-PRICE, L.S.; POIREL, L.; BONOMO, R.A.; 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.

NAIDU, K. *et al.* A descriptive study of nosocomial infections in an adult Intensive Care Unit in Fiji: 2011-12. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2014, 2014.

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.

NICOLETTI, A.G. *et al.* Characterization of BKC-1 class A carbapenemase from *Klebsiella pneumoniae* clinical isolates in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 59, n. 9, p. 5159-5164, 2015.

NÓBREGA, G. D. **Investigação de beta-lactamases em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* isoladas de amostras clínicas obtidas em um hospital público de ensino de Campo Grande, MS. Campo Grande-MS.** 52p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro Oeste. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2013.

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.

OLIVEIRA, C.F. *et al.* Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de  $\beta$ -lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli* e *Klebsiella spp* no Hospital Universitário de Santa Maria, Estado do Rio Grande do Sul. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, Uberaba, v. 42, n. 5, Oct. 2009.

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.

PASTERAN, F. *et al.* Novel variant (blaVIM-11) of the metallo- $\beta$ -lactamase blaVIM family in a GES-1 extended-spectrum- $\beta$ -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolate in Argentina. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 474-475, 2005.

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.

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.

PAVEZ, M.; MAMIZUKA, E.M.; LINCOPAN, N. Early dissemination of KPC-2-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in Brazil. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 6, p. 2702-2702, 2009.

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.

PEIRANO, G. *et al.* The characteristics of VIM-1-producing *Klebsiella pneumoniae* from South Africa. **Scandinavian journal of infectious diseases**, v. 44, n. 1, p. 74-78, 2012.

PELLEGRINO, F.L.P.C. *et al.* blaGES carrying *Pseudomonas aeruginosa* isolates from a public hospital in Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 10, n. 4, p. 251-253, 2006.

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

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

PITONDO-SILVA, A.A. *et al.* High prevalence of bla VIM-1 gene in bacteria from Brazilian soil. **Canadian Journal of Microbiology**, 2016.

POIREL, L. *et al.* GES-2, a Class A  $\beta$ -Lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* with Increased Hydrolysis of Imipenem. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 9, p. 2598-2603, 2001.

POIREL, L.; BONNIN, R.A.; NORDMANN, P. Genetic support and diversity of acquired extended-spectrum  $\beta$ -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.

- POLOTTO, Milena *et al.* Detection of *P. aeruginosa* harboring bla CTX-M-2, bla GES-1 and bla GES-5, bla IMP-1 and bla SPM-1 causing infections in Brazilian tertiary-care hospital. **BMC infectious diseases**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.
- PRESTES-CARNEIRO, L.E. *et al.* Frequency and antimicrobial susceptibility of pathogens at tertiary public hospital, São Paulo, Brazil. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v. 46, p. 276-284, 2015.
- RELLER, L.B. *et al.* Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. **Clinical infectious diseases**, v. 49, n. 11, p. 1749-1755, 2009.
- RESENDE, A. **Detecção de microrganismos presentes no efluente hospitalar e na estação de tratamento de esgoto de Goiânia: presença de bactérias Gram-negativas resistentes aos antimicrobianos.** 134f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde. Universidade Católica de Goiás. Goiás, 2009.
- RIBEIRO, V.B. *et al.* Carbapenem-resistant GES-5-producing *Klebsiella pneumoniae* in Southern Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 231-232, 2014.
- ROCHA, F.R.; PINTO, V.P.T.; BARBOSA, F.C.B. The Spread of CTX-M-Type Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in Brazil: A Systematic Review. **Microbial Drug Resistance**, v. 22, n. 4, p. 301-311, 2016.
- ROSSI, A.; LOPARDO, H.; WOLOJ, M.; PICANDET, A. M.; MARIÑO, 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.
- RUGINI, C.L.; SOBOTTKA, A.M.; FUENTEFRIA, D.B. Occurrence and sensitivity profile of extended spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* at a tertiary hospital in Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 6, p. 692-698, 2015.
- SANDERS, C.C. *et al.* Ability of the VITEK<sup>®</sup> 2 Advanced Expert System To Identify  $\beta$ -Lactam Phenotypes in Isolates of *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of clinical Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 570-574, 2000.
- SANTAJIT, S.; INDRAWATTANA, N. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. **BioMed research international**, v. 2016, 2016.
- SANTOS, A.V. *et al.* Perfil das infecções hospitalares nas unidades de terapia intensiva de um hospital de urgência. **Journal of Nursing UFPE/Revista de Enfermagem UFPE**, 2016.
- SCHWABER, M.J.; CARMELI, Y. Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum  $\beta$ -lactamase production in *Enterobacteriaceae* bacteraemia: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 913-920, 2007.
- 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.

SHARMA, M.; PATHAK, S.; SRIVASTAVA, P. Prevalence and antibiogram of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) producing Gram negative bacilli and further molecular characterization of ESBL producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 7, n. 10, p. 2173, 2013.

SEJAS, Lilian M. *et al.* Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 1, p. 27-35, 2003.

SESA, Assessoria de Comunicação da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará. **Governador inaugura dia 18 o maior hospital do interior do Ceará**. 2013. Disponível em: <http://www.lacen.ce.gov.br/index.php/noticias/43509-governador-inaugura-dia-18-o-maior-hospital-do-interior-do-ceara-> Acesso em 01 out 2014.

SILVA, K. C.; LINCOPAN, N. Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. **Jornal brasileiro de patologia med lab**. abril, v. 48, n. 2, p. 91-99, 2012.

SILVA, L. M. *et al.* *Escherichia coli* isolados de infecção urinária em gestantes: Perfil de resistência aos antimicrobianos. **Enciclopédia Biosfera**, 10, 231-239, 2014.

SOUGAKOFF, W.; GOUSSARD, S.; COURVALIN, P. The TEM-3  $\beta$ -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.

SPANU, T. *et al.* Evaluation of the new VITEK 2 extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) test for rapid detection of ESBL production in *Enterobacteriaceae* isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 9, p. 3257-3262, 2006.

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

TISSERA, S.; LEE, S.M. Isolation of Extended Spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) Producing Bacteria from Urban Surface Waters in Malaysia. **Malays. J. Med. Sci.** v. 20, n. 3, p. 14-22, 2013.

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*<sub>CTX-M</sub> extended spectrum  $\beta$ -lactamase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolates from a tertiary care hospital: first report of *bla*<sub>SHV-12</sub>, *bla*<sub>SHV-31</sub>, *bla*<sub>SHV-38</sub>, and *bla*<sub>CTX-M-15</sub> in Brazil. **Microb. Drug Resist**, v.17, n.1, p.7–16, 2011.

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

VAISH, R. *et al.* Evaluation of Virulence Factors and Antibiotic Sensitivity Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Extraintestinal Infections. **Cureus**, v. 8, n. 5, 2016.

- VIEDMA, E. *et al.* Nosocomial spread of colistin-only-sensitive sequence type 235 *Pseudomonas aeruginosa* isolates producing the extended-spectrum  $\beta$ -lactamases GES-1 and GES-5 in Spain. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 53, n. 11, p. 4930-4933, 2009.
- VILLEGAS, M.V. *et al.* First detection of the plasmid-mediated class A carbapenemase KPC-2 in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* from South America. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, n. 8, p. 2880-2882, 2006.
- VOETS, G.M. *et al.* Population distribution of beta-lactamase conferring resistance to third-generation cephalosporins in human clinical *Enterobacteriaceae* in the Netherlands. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52102, 2012.
- VOURLI, S. *et al.* Novel GES/IBC extended-spectrum  $\beta$ -lactamase variants with carbapenemase activity in clinical enterobacteria. **FEMS microbiology letters**, v. 234, n. 2, p. 209-213, 2004.
- WACHINO, J. *et al.* Nosocomial spread of ceftazidime-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains producing a novel class A  $\beta$ -lactamase, GES-3, in a neonatal intensive care unit in Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 6, p. 1960-1967, 2004.
- WALTHER-RASMUSSEN, Jan; HØIBY, Niels. Class A carbapenemases. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 470-482, 2007
- WILLIAMS, J.D.  $\beta$ -lactamases and  $\beta$ -lactamase inhibitors. **Inter. J. Antimicrob. Agents**, v.12, p. 3-7, 1999.
- WINSTANLEY, T.; COURVALIN, P. Expert systems in clinical Microbiology. **Clinical Microbiology reviews**, v. 24, n. 3, p. 515-556, 2011.
- WOLLHEIM, C. *et al.* Nosocomial and community infections due to class A extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBLA)-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella spp.* in southern Brazil. **Braz J Infect Dis**, Salvador, v. 15, n. 2, Abr. 2011
- XAVIER, Danilo E. *et al.* Efflux pumps expression and its association with porin down-regulation and  $\beta$ -lactamase production among *Pseudomonas aeruginosa* causing bloodstream infections in Brazil. **BMC microbiology**, v. 10, n. 1, p. 1, 2010.
- YATSUYANAGI, J. *et al.* Class 1 integron containing metallo- $\beta$ -lactamase gene blaVIM-2 in *Pseudomonas aeruginosa* clinical strains isolated in Japan. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 48, n. 2, p. 626-628, 2004.
- 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 beta-lactamases de espectro estendido em *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter spp.* em pacientes internados no Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São**

**Thiago.** 128p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

ZIBAEI, M. *et al.* Detection of blaKPC and blaGES carbapenemase genes in *Klebsiella pneumoniae* isolated from hospitalized patients in Kashan, Iran. **Recent patents on anti-infective drug discovery**, [Epub ahead of print], 2016.

ZOWAWI, H.M. *et al.* Molecular characterization of carbapenemase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in the countries of the Gulf cooperation council: dominance of OXA-48 and NDM producers. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 6, p. 3085-3090, 2014.

## APÊNDICE

### CONTROLE DE ISOLADOS NOS QUAIS FORAM IDENTIFICADOS OS GENES DE RESISTÊNCIA PESQUISADOS

Período: março de 2015 a março de 2016  
Local: Hospital Regional Norte – Sobral/CE  
Pesquisador responsável: Jisbaque Melo Braga

Isolado	Sexo	Id	Material	Espécime	Setor	Origem
J.KP02	F	64	Sangue periférico MSE	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CC2	IPU
J.EC08	F	74	Fragmento de Tecido	<i>Escherichia coli</i>	CC2	COREAÚ
J.EC12	M	78	Fragmento de Tecido	<i>Escherichia coli</i>	CCG	SOBRAL
J.KP15	M	0	Sangue periférico MSD	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	UTIN	SOBRAL
J.EC18	F	27	Líquido Cavitário	<i>Escherichia coli</i>	CC2	GRANJA
J.EC23	M	89	Sangue periférico MSE	<i>Escherichia coli</i>	OBA	SOBRAL
J.EC34	M	61	Fragmento de osso	<i>Escherichia coli</i>	CCG	CROATÁ
J.KP36	M	2M	Sangue periférico MID	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CP	MORRINHOS
J.EC40	F	38	Secreção purulenta	<i>Escherichia coli</i>	CC1	SOBRAL
J.KP41	M	41	Fragmento de Tecido	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	CC1	GRANJA
J.EC42	F	48	Secreção purulenta	<i>Escherichia coli</i>	CC1	SOBRAL
J.EC50	F	61	Fragmento de Tecido	<i>Escherichia coli</i>	UT11	SANTANA DO ACARAÚ
J.EC51	M	58	Fragmento de Tecido	<i>Escherichia coli</i>	CCA	HIDROLÂNDIA

CC1: Clínica Cirúrgica 1; CC2: Clínica Cirúrgica 2; CCA: Centro Cirúrgico Ambulatorial; CCG: Centro Cirúrgico Geral; CP: Clínica Pediátrica; UTIN: Unidade de Terapia Intensiva Neonatal; UTI 1: Unidade de Terapia Intensiva Adulto 1; OBA: Observação Breve Adulto;

## ANEXO 1

### Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Caro participante:

Sou fisioterapeuta, funcionário do Hospital Regional Norte – Sobral e estou desenvolvendo uma pesquisa científica sobre a ocorrência de bactérias que causam infecções hospitalares e que são resistentes a muitos antibióticos. Por isso solicito sua colaboração em participar da pesquisa, aceitando que estudemos as culturas bacterianas coletadas.

Os dados serão apresentados na Universidade Federal do Ceará - Sobral e divulgados junto à comunidade acadêmica, respeitando o caráter confidencial das identidades. Garanto-lhe que sua participação ficará no anonimato, não será divulgado seu nome. Pretendemos com esta pesquisa verificar as características genéticas destas bactérias para que no futuro tenhamos condições de tratar com mais eficiência aqueles pacientes que eventualmente possam ser infectados com este mesmo tipo de bactéria resistente.

Você tem o direito de não participar dessa pesquisa se assim o desejar, mas seria importante sua participação. Aceitando participar, se por qualquer motivo, durante o andamento da pesquisa, resolver desistir, tem toda liberdade para retirar seu consentimento a qualquer momento. Reforço que sua colaboração e participação poderão trazer benefícios para o desenvolvimento científico. Participar da coleta não lhe trará riscos para sua saúde, nem mesmo risco de receber advertência por ter participado ou não. Tudo ocorrerá em sigilo. Além disto, se alguma informação importante for encontrada que possa melhorar o seu tratamento, esta informação será imediatamente comunicada a equipe médica.

Para possíveis esclarecimentos entrar em contato comigo no endereço: Avenida Comandante Maurocelio Rocha Pontes, 100 - Derby - 62042-280 – Sobral – CE, telefone (88) 3611.8000 Ramal 231 ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da UVA, Avenida Comandante Maurocelio Rocha Pontes, 150 - Derby - 62042-280- Sobral – CE, telefone (88) 3677-4255.

Atenciosamente,

\_\_\_\_\_  
Jisbaque Melo Braga  
Pesquisador UFC – Sobral

### Consentimento Pós-Informado

Declaro que tomei conhecimento do estudo que pretende verificar as características genéticas de bactérias resistentes a alguns antibióticos, cujo título é “Prevalência e caracterização genética de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de betalactamase de espectro ampliado (ESBL) isoladas de infecções nosocomiais e comunitárias no Hospital Regional Norte – Sobral/CE”, realizado pelo pesquisador Jisbaque Melo Braga e sua equipe, compreendi seus propósitos e, concordo em participar da pesquisa, não me oponho à análise da amostra biológica, e também sei que em qualquer momento posso retirar meu consentimento em participar da mesma.

Sobral, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015.

Ciente, Assinatura do Sujeito, responsável ou testemunha: \_\_\_\_\_

Documento de identificação do participante: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador

Polegar Direito





## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

#### (EASY DNA – INVITROGEN)

- 1) Reativação das cepas em BHI caldo (de 18h a 24h, à 35°C);
- 2) Coletar uma alíquota de 1,0ml (~10<sup>9</sup> de células por ml);
- 3) Centrifugar a alíquota a 3.000rpm por 10min a 4°C;
- 4) Descartar o sobrenadante;
- 5) Adicionar 350µl da solução A (solução de lise) e vortexar;
- 6) Incubar a 65°C por 10min;
- 7) Adicionar 150µl da solução B (solução precipitante) e vortexar até obtenção de uma solução homogênea (de 10s a 60s);
- 8) Adicionar 500µl de clorofórmio e vortexar até obtenção de uma solução homogênea (de 10s a 60s);
- 9) Centrifugar a alíquota a 13.000rpm por 10min a 4°C (separação de fases);
- 10) Transferir o sobrenadante para novos tubos;
- 11) Adicionar 1,0ml de etanol absoluto gelado (-20°C) e vortexar;
- 12) Incubar em gelo por 30min;
- 13) Centrifugar a alíquota a 13.000rpm por 10min a 4°C;
- 14) Descartar o sobrenadante (etanol);
- 15) Adicionar 500µl de etanol a 80% gelado (-20°C) e vortexar;
- 16) Centrifugar a alíquota a 13.000rpm por 10min a 4°C;
- 17) Descartar o sobrenadante (etanol) totalmente, deixando evaporar por 5 min;
- 18) Ressuspender o “*pellet*” em 100µl de solução tamponante;
- 19) Adicionar 2µl de RNase (2mg/ml);
- 20) Incubar os tubos a 37°C por 30min;
- 21) Armazenar em freezer (-20°C) para posterior utilização;

#### **Materiais:**

- ✓ Pipetas (10, 200 e 1000µl);
- ✓ Ponteiras brancas (0,5 – 10µl), amarelas (1 – 200µl) e azuis (200 – 1.000µl);
- ✓ Eppendorfs (tubos → 2x o número de amostras);
- ✓ Etanol gelado (100% e 80%);
- ✓ Clorofórmio P.A.;
- ✓ Gelo triturado;
- ✓ Banho-maria a 65°C e a 37°C;
- ✓ Centrífuga;

OBS: Caso sejam formados precipitados na solução devido a temperatura de armazenamento (-20°C), aqueça a 45°C para dissolver e aguarde esfriar para utilização.

**ANEXO 3****MEMORANDO**

Nº 010 / 2014 C.E.

Sobral (CE), 25 de novembro de 2014.

**DE:** Comissão Interna de Pesquisa - Centro de Estudos**PARA:** Orientador Responsável – Vicente de Paulo Teixeira Pinto

Pesquisador – Jisbaque Melo Braga

**REF.:** PROJETO DE PESQUISA

Prezado(a) Pesquisador(a)

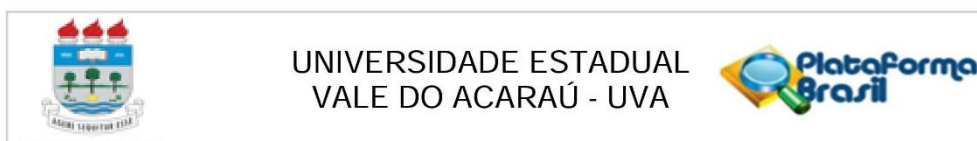
O projeto intitulado “PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS E COMUNITÁRIAS NO HOSPITAL REGIONAL NORTE – SOBRAL/CE” foi aprovado pela Coordenação da Comissão Interna de Pesquisa - CIP para submissão na Plataforma Brasil. Aguardamos o retorno com o parecer do Comitê de Ética em Pesquisa, para liberação de coleta de dados.

**Cordialmente,**

ISGH-HOSPITAL REGIONAL NORTE  
Fca. Brunna de C. Costa Vasconcelos  
Coordenadora  
Centro de Estudos

**Francisca Brunna de Carvalho Costa**  
Enfermeira Educação Permanente  
Centro de Estudos - HRN  
Comissão Interna de Pesquisa  
Tel: (88) 36779516  
e-mail: centrodeestudoshrn@gmail.com

## ANEXO 4



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** PREVALÊNCIA E CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE *Escherichia coli* E *Klebsiella pneumoniae* PRODUTORAS DE BETALACTAMASE DE ESPECTRO AMPLIADO (ESBL) ISOLADAS DE INFECÇÕES NOSOCOMIAIS E COMUNITÁRIAS NO HOSPITAL REGIONAL NORTE 2 SOBRAL/CE

**Pesquisador:** JISBAQUE MELO BRAGA

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 39307314.0.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 975.071

**Data da Relatoria:** 11/02/2015

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de projeto de dissertação de mestrado em ciências da saúde da Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral.

**Objetivo da Pesquisa:**

A pesquisa tem como principal objetivo pesquisar a prevalência de *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL isoladas de infecções nosocomiais e comunitárias no Hospital Regional Norte – Sobral/CE, assim como realizar a caracterização genética destas bactérias.

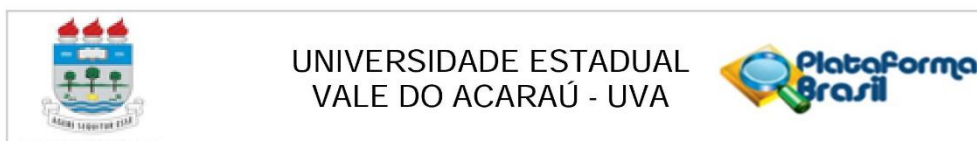
**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Envolve riscos mínimos, pertinentes ao manejo de dados procedentes de amostras clínicas de pacientes internados no Hospital Regional Norte. Além disto, se alguma informação relevante para o tratamento do indivíduo for encontrada, esta será imediatamente comunicada a equipe médica.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de uma pesquisa quantitativa e qualitativa de cunho investigativo, que será realizada em ambiente hospitalar (coleta de dados) e laboratorial (análise genética das bactérias). A pesquisa será realizada no Hospital Regional Norte (coleta de dados) e nos laboratórios da UFC -Sobral

**Endereço:** Av Comandante Maurocelio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 975.071

(análise genética das bactérias). O período total do estudo é de novembro de 2014 a dezembro de 2015, sendo a coleta de dados prevista para fevereiro a julho de 2015. A população será composta por todas as culturas de amostras clínicas do referido hospital (comunitárias ou nosocomiais) coletadas no período anteriormente mencionado e a amostra compreenderá as culturas de *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* produtoras de betalactamases de espectro estendido (ESBL). Portanto, utilizará amostras clínicas de sangue, urina, lesão cutânea infectada, líquido pleural, líquido cefalorraquidiano, lavado bronco-alveolar, aspirado traqueal, ponta de cateter percutâneo, secreção de abscessos, ferida cirúrgica e ocular de pacientes internados no HRN de Sobral. Assim, após o laudo das amostras ser liberado pelo Laboratório Pasteur de determinada cultura como sendo positivo para *K. pneumoniae* e/ou *E. coli* produtoras de ESBL, serão realizados os seguintes procedimentos: (1) solicitação de autorização ao paciente e/ou responsável para utilização da cultura para análise genética mediante assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Consentimento Pós-Informado (TCLE), e, sendo autorizado; (2) realização de agendamento junto ao Laboratório Pasteur para recebimento do espécime bacteriano em questão. A análise estatística para a avaliação quantitativa sobre as proporções encontradas de genes *blaSHV*, *blaTEM* e *blaCTX-M* (detecção genotípica de ESBL) será realizada através do teste do Qui-Quadrado (Software GraphPad, San Diego California USA).

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

A proposta apresenta adequadamente os Termos obrigatórios: Carta de Anuência da instituição em que a pesquisa será realizada; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Pós-Informado.

**Recomendações:**

O projeto de pesquisa encontra-se adequado. Entretanto, recomendamos rever o desenho do estudo no que tange a abordagem qualitativa, uma vez que não há nenhum indício desta dimensão no projeto. Recomendamos ainda a devolutiva ao Comitê de Ética em Pesquisa, por meio do envio do Relatório Final de Pesquisa na aba Notificações da Plataforma Brasil. Recomenda-se ainda que o termo "sujeito da pesquisa" seja substituído por "participante da pesquisa".

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências mas sendo necessário atentar para as recomendações listadas neste parecer.

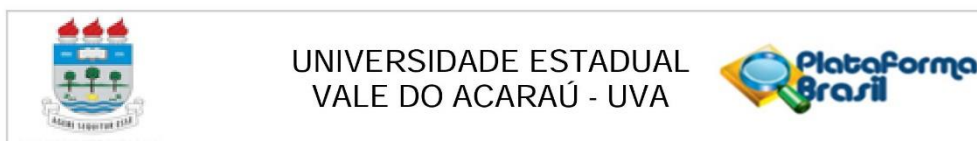
**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Endereço:** Av Comandante Maurocécio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com



Continuação do Parecer: 975.071

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após apresentação e discussão do projeto, o colegiado decidiu por classificá-lo como Aprovado, devendo o pesquisador atentar para as recomendações registradas neste parecer.

SOBRAL, 05 de Março de 2015

---

**Assinado por:**  
**Maristela Ines Osawa Chagas**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Av Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** uva\_comitedeetica@hotmail.com