



CENTRO UNIVERSITÁRIO UNIVATES

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E EXTENSÃO

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS e
Pseudomonas spp. PRODUTORAS DE ESBL, ISOLADAS EM UM
HOSPITAL DO INTERIOR RIO GRANDE DO SUL**

Johan Prediger

Lajeado, abril de 2014.

Johan Prediger

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE ENTEROBACTÉRIAS e
Pseudomonas spp. PRODUTORAS DE ESBL, ISOLADAS EM UM
HOSPITAL DO INTERIOR RIO GRANDE DO SUL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, do Centro Universitário UNIVATES, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, na linha de pesquisa Aspectos Moleculares em Processos Fisiopatológicos.

Orientadora: Prof. Dra. Adriane Pozzobon

Lajeado, abril de 2014.

Agradecimentos

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da UNIVATES pela oportunidade de aprendizagem através deste curso com docentes muito bem qualificados.

À UNIVATES e ao Prof. Me. Jairo Luís Hoerlle pela oportunidade de trabalhar como monitor docente durante o curso.

Ao setor de Biologia Molecular e seus funcionários, principalmente aos mestrandos e bolsistas Henrique Sulzbach de Oliveira e Bruna Cristina Jordon, o bolsista de iniciação científica João Pedro Kipper. E a também mestranda Geórgia Murccillo Dexheimer.

Ao setor de Análises Clínicas e seus funcionários.

Aos responsáveis pelo acervo de amostras de microrganismos da FIOCRUZ do Rio de Janeiro, e do Hospital de Clínicas de Porto Alegre por terem cedido amostras contendo os genes estudados nesta pesquisa.

À Dra. Luciana Weidlich pelo auxílio no projeto.

À minha orientadora Prof. Dra. Adriane Pozzobon pelo empenho, dedicação e paciência neste trabalho.

À toda minha família, principalmente meus pais, que me incentivaram a todos os momentos durante o curso.

À minha namorada Gabriela, pelo apoio nos momentos difíceis.

À minha filha Manuela, que me inspirou nos momentos finais do curso.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2.OBJETIVOS.....	14
2.1Objetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Específicos.....	14
3 JUSTIFICATIVA	15
4 REFERENCIAL TEÓRICO	17
4.1 Infecções hospitalares	17
4.2 Resistência bacteriana e antimicrobianos	18
4.3 Mecanismos de Resistência Bacteriana	20
4.4 Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)	22
4.5 Epidemiologia de produção de ESBL no Brasil	24
4.6 Análise dos mecanismos de resistência bacteriana.....	25
4.7 Bactérias multirresistentes	26
4.7.1 <i>Escherichia coli</i>	26
4.7.2 <i>Klebsiella spp.</i>	27
4.7.3 <i>Pseudomonas spp.</i>	27
4.8. Diversidade de enzimas beta-lactamases e ESBL	29
4.8.1 Beta-lactamase tipo TEM.....	29
4.8.2 Beta-lactamase tipo SHV	30
4.8.3 Beta-lactamase tipo CTX-M.....	31
4.8.4 Beta-lactamase tipo AmpC	32
4.9 Métodos para a identificação de bactérias ESBL.....	32
5. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
5.1 Tipo de Pesquisa	35
5.2 População do Estudo	35
5.3 Ambiente de Pesquisa	35
5.4 Aspectos Éticos.....	36
5.5 Critérios de Inclusão.....	36
5.6 Identificação, antibiograma e método de aproximação de discos das bactérias	36
5.7 Análise da presença dos genes TEM, SHV, CTX-M e dos genes pertencentes às famílias CTX-M1, CTX-M2 e CTX-M9.....	37

5.8 Controles Positivos.....	38
5.9 Análise estatística.....	39
6. RESULTADOS.....	40
7. DISCUSSÃO.....	44
8. CONCLUSÃO.....	50
REFERÊNCIAS.....	52
APÊNDICES.....	70



RESUMO

Doenças infecciosas são uma das principais causas de morbidade no mundo inteiro, sendo que o uso indiscriminado de antibióticos favorece o desenvolvimento de mecanismos de resistência bacteriana, dificultando o combate às infecções. O número de pacientes infectados por microrganismos resistentes vem aumentando consideravelmente e por isso tem chamado atenção dos serviços de saúde. A presente pesquisa teve como objetivo de verificar a infecção bacteriana e sua resistência aos antibióticos, além da presença de genes produtores de beta-lactamases em um hospital do interior do Rio Grande do Sul. Realizou-se a análise retrospectiva das infecções por bactérias multirresistentes durante o período de janeiro de 2011 a junho de 2012. O isolamento e a identificação das bactérias foram realizados por laboratório terceirizado, e para a avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o método de difusão de disco, padronizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). A análise retrospectiva de 374 amostras mostrou que diferentes bactérias apresentaram resistência a um grande número de antibióticos. Dentre as mais prevalentes no estudo e que também apresentaram maior percentual de resistência estavam: *Klebsiella spp.*, *Enterobacter spp.*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas spp.* Foram coletadas 62 amostras para análise pelo método de triagem para detecção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL), por aproximação de discos, onde 45% foram classificadas com produtoras de ESBL. A caracterização molecular feita nestes mesmos isolados, realizada pela técnica de Reação em cadeia da polimerase (PCR) identificou o gene TEM em 70,96% dos isolados, o gene SHV em 56,45% e, o gene CTX-M em 91,93%, dos quais 24,19% confirmaram a presença de gene pertencente ao grupo CTX-M1, 14,51% ao grupo CTX-M2 e 22,58% ao grupo CTX-M9. Com o presente estudo conclui-se que os genes CTX-M e TEM foram os mais prevalentes entre os genes dos isolados avaliados. Além disso, também se observa a presença de outros genes produtores de ESBL nas amostras analisadas fato que pode estar relacionado ao alto nível de resistência a antimicrobianos das bactérias estudadas.

Palavras-chave: Resistência a antimicrobianos, Antibióticos, Infecção Bacteriana, Infecção Nosocomial, Hospitais, Beta-Lactamases, Enterobactérias, Genes de resistências.

ABSTRACT

Infectious diseases are a major cause of morbidity worldwide, and the indiscriminate use of antibiotics promotes the development of mechanisms of bacterial resistance, making it difficult to fight infection. The number of patients infected by resistant microorganisms has increased considerably, drawing the attention from health services. The present study aimed to verify the bacterial infection and its resistance to antibiotics, and the presence of genes producing the enzyme beta-lactamase in a hospital from Rio Grande do Sul's inland city. A retrospective analysis of infections with multidrug-resistant bacteria was conducted during the period from January 2011 to June 2012. The isolation and identification of bacteria were performed by an outsourced laboratory, through the method standardized by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) and for the evaluation of the antimicrobial susceptibility was used the disc diffusion method. The retrospective analysis of 374 bacterial samples showed that different bacteria presented resistance to a large number of antibiotics. Among the more prevalent were: *Klebsiella spp*, *Enterobacter spp*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas spp*. with a higher percentage of resistance. 62 samples were collected for molecular analysis by the disc diffusion method, where 45 % were classified as producing beta-lactamase (ESBL). The molecular characterization of these same isolated genes, made through the technique of polymerase chain reaction (PCR) identified TEM gene in 70.96 % of the samples, the gene SHV in 56.45 %, CTX-M1 gene in 24.19%, CTX-M2 gene in 14.51 %, CTX -M9 gene in 22.58%, CTX -M gene in 91.93 %. With the present study it was concluded that the CTX -M and TEM genes were the most prevalent genes among the ESBL of the evaluated sample. Besides, it was also observed the presence of other producers of ESBL genes in the samples and this may be related to the high level of antibiotic resistance of the studied bacteria.

Keywords: Antimicrobial Resistance, Antibiotics, Bacterial Infection, Nosocomial Infection, Hospitals, Beta-Lactamases, Enterobacteria, Resistance Genes.



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CCIH	Centro de Controle de Infecção Hospitalar
CESP	<i>Citrobacter, Enterobacter, Serratia providencia</i>
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CTX-M	β -lactamase tipo Cefotaximase
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos fosfatados
EMB	<i>Eosin Methylene Blue</i>
ESBL	<i>extended spectrum β-lactamase</i>
KCI	Cloreto de potássio
MYSTIC	<i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
mm	Milímetro
mM	Milimolar
OMS	Organização mundial de saúde
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Fragment Leng Polymorphism</i>
PCR-SSCP	<i>Single-Strand Conformational Polymorphism</i>
PFGE	<i>Pulsed Field Gel Electrophoresis</i>
SENTRY	Programa de monitoramento de patógenos e resistência em infecções hospitalares e adquiridas na comunidade
SHV	<i>β-lactamase tipo Sulphydryl reagent variable</i>
TEM	β -lactamase tipo Temoniera
UTI	Unidade de terapia intensiva
X²	Qui-quadrado
°C	Graus Celsius
μL	Microlitro
μM	Micromolar

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Sequência dos primers utilizados no presente estudo.....	37
TABELA 2 - Programas utilizados para amplificação dos genes analisados....	38
TABELA 3: Prevalência dos genes e teste de aproximação de discos em <i>Klebsiella spp.</i> e <i>Escherichia coli</i>	42
TABELA 4: Resultados de sensibilidade e especificidade da comparação da técnica de PCR e a técnica de aproximação de discos.....	43

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Gráfico com o percentual de distribuição dos genes TEM, SHV, CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 e CTX-M nos isolados analisados41



1 INTRODUÇÃO

As bactérias são as principais causadoras de infecções hospitalares. A infecção hospitalar é definida como aquela patologia infecciosa adquirida após a internação do paciente e que se manifesta com sintomas clínicos durante a internação ou mesmo após a alta quando puder ser relacionada com a internação ou procedimentos hospitalares (PEREIRA *et al.*, 2005).

No século XIX, com o surgimento dos hospitais, surgiu a infecção hospitalar, que na época, estava relacionada às condições de higiene e saneamento básico precários nos quais a população se encontrava (MOURA *et al.*, 2008). Com a ascensão da bacteriologia por Pasteur, os ambientes insalubres dos hospitais começaram a ser modificados. Outra mudança importante foi imposta por Semmelweis, em 1847, o qual sugeriu a lavagem das mãos com água clorada a todos os profissionais de saúde (ANDRADE *et al.*, 1999). Nos últimos anos, o número de pacientes infectados por microrganismos resistentes tem chamado atenção dos serviços de saúde, destacando-se pela diversidade clínica de cada paciente e pelas diferentes condutas dos profissionais de saúde (FERRAREZE *et al.*, 2007; MASTERTON *et al.* 2003).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2000), os fatores que contribuem para o aumento da multirresistência microbiana são: pobreza, acesso de forma inadequada aos agentes antimicrobianos, prescrição errônea e falha terapêutica, falsificação de medicamentos, maior utilização de medicamentos de amplo espectro, profissionais sem conhecimento técnico, alimentos contaminados e ainda, deficiência na vigilância epidemiológica dentro e fora dos hospitais.

As doenças infecciosas são uma importante causa de óbito, provocando a morte de cerca de 20 milhões de pessoas por ano no mundo. Destas, cerca de 10 milhões adquirem infecção hospitalar, e 300 mil vão a óbito. Com a introdução de antibióticos nos tratamentos, as bactérias passaram a adquirir mecanismos de defesa contra os mesmos, o que pode ser chamado de multirresistência bacteriana (FERRAREZE *et al.*, 2007, AHLUWALIA, 2007).

Os riscos de infecção hospitalar podem aumentar pelos seguintes fatores: tempo de permanência do paciente no hospital, condições imunológicas por doenças (AIDS, câncer) ou por utilização de imunossupressores, utilização de antibióticos, procedimentos invasivos como entubação traqueal, cateterização venosa ou urinária, endoscopia, traqueostomia, sondagem entre outros, condições nutricionais do paciente, idade, e demais aspectos (FERRAREZE, 2007; SANTOS, 2004).

O isolamento de bactérias Gram-negativas resistentes aos antibióticos carbapenêmicos vem sendo descrito em diversas partes do mundo. No Brasil, em 2003, o primeiro isolado de metalo-beta-lactamase produzida por *Klebsiella pneumoniae* foi identificado, o qual foi o precursor de várias outras infecções similares, mudando o padrão de resistência a antibióticos das bactérias no país (LINCOPAN *et al.*, 2006; PAVEZ *et al.*, 2008; PEIRANO *et al.*, 2008 ZAVAZCKI, *et al.*, 2009).

Um dos mais eficazes mecanismos de defesa das Enterobactérias é a produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBL, do inglês *extended spectrum beta-lactamase*), as quais obtiveram maior destaque a partir da década de 80, quando as cefalosporinas de amplo espectro, como ceftazidima, cefotaxima e ceftriaxona foram usadas exaustivamente no tratamento de infecções causadas por bactérias Gram-negativas. A partir disto as Enterobactérias adquiriram resistência aos antibióticos que antes eram usados como primeira opção no tratamento das mesmas (BONNET, 2004). No Brasil, pesquisas apontam *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* como as espécies bacterianas produtoras de ESBL mais frequentes. Contudo, outras bactérias como *Pseudomonas spp.*, *Enterobacter spp.*, *Proteus spp.* e *Providencia spp.*

também são amplamente diagnosticadas como produtoras de ESBL (AMARANTE, 2002; TOFTELAND *et al.*, 2007).

Considerando que estes microrganismos são tão hábeis na aquisição de novas resistências e estando cada vez mais presentes no meio hospitalar, a presente pesquisa foca na análise de genes que possam estar envolvidos com a produção de ESBL e, conseqüentemente com os mecanismos de resistência. Estudos nessa área podem contribuir para o conhecimento aprofundado da epidemiologia local, com a identificação de mecanismos de defesa bacteriana e conseqüentemente com a escolha do melhor tratamento.

2.OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Verificar a prevalência dos genes TEM, SHV e família CTX-M em isolados clínicos em enterobactérias e *Pseudomonas* spp. provenientes de um hospital do interior do Rio Grande do Sul.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os materiais clínicos mais prevalentes relacionados às infecções bacterianas em um hospital de médio porte do interior do Rio Grande do Sul.
- Avaliar a presença dos genes TEM, SHV e família CTX-M em enterobactérias e *Pseudomonas* spp. resistentes a antimicrobianos.
- Relacionar a presença dos genes codificadores de enzimas beta-lactamase de espectro estendido com o resultado obtido no teste de aproximação de discos.

3 JUSTIFICATIVA

A luta contra infecções bacterianas surge nos tempos da Segunda Guerra Mundial e até hoje continua. A resistência bacteriana continua emergindo e se tornando cada vez mais grave, pois a indústria farmacêutica não segue no mesmo ritmo para a criação de novos fármacos capazes de controlar infecções bacterianas resistentes. Juntamente com o uso excessivo de antimicrobianos, automedicação e prescrições equivocadas de profissionais da saúde, a resistência bacteriana despontou ainda mais.

O uso de antibióticos vem merecendo atenção no mundo inteiro. Autoridades, inclusive do Brasil, desenvolveram políticas para a racionalização do uso destes medicamentos. Cautela essa adotada uma vez que antimicrobianos são os medicamentos mais utilizados na atenção primária e, por se tratar do medicamento mais prescrito erroneamente. Além de aumentar a resistência antimicrobiana através do método de seleção microbiana de antibióticos, o uso indiscriminado eleva os custos para a sociedade (ABRANTES *et al*, 2008).

O Ministério da Saúde (MS) elaborou um documento em 2001 denominado de Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos, o qual visa orientar o diagnóstico de uma infecção, avaliar a necessidade da terapia antimicrobiana, escolher o fármaco correto e como fazer associações entre antimicrobianos (BRASIL, 2001).

Além de conter o uso equivocado de antibióticos, é importante monitorar as diferentes resistências bacterianas, para que seja possível adotar estratégias de prevenção e controle de infecções, já que este é considerado um problema de saúde pública mundial. A partir da tecnologia de análise

genética, é possível determinar qual é o mecanismo de resistência a antimicrobianos que determinado isolado bacteriano possui, além do perfil fenotípico que é realizado rotineiramente em todos os hospitais. A genotipagem de bactérias que apresentam multirresistência a antimicrobianos pode ser muito útil para o monitoramento da resistência em determinado serviço hospitalar, determinação de relação epidemiológica entre os casos, caracterização de surtos hospitalares e desenvolvimento de estratégias e medidas para aperfeiçoar o controle destas infecções a nível institucional (BONNET, 2004).

Nos últimos anos as bactérias Gram-negativas têm adquirido um papel importante nas infecções hospitalares. Bactérias produtoras de ESBL são classificadas como urgências hospitalares, principalmente em Unidades de terapias intensiva, onde *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.* e *Enterobacter spp.* são os principais motivos de preocupação dos serviços de combate de infecções (BELL *et al.*, 2007; DESHPANDE *et al.*, 2006). A *Klebsiella spp.* é uma das bactérias mais frequentes em infecções hospitalares, muito associada a pneumonias e infecções urinárias. Está entre os cinco patógenos mais frequentes na América Latina (SADER *et al.*, 2004).

A região da América Latina é um dos principais focos de prevalência de bactérias produtoras de ESBL. Essa porcentagem pode chegar a 40% dos isolados, por outro lado 5% das bactérias são diagnosticadas como produtoras de ESBL em outros locais do mundo (FEDLER *et al.*, 2006). O tratamento de infecções causadas por bactérias produtoras de ESBL é através de carbapenêmicos, que por sua vez é considerada a última alternativa terapêutica se tratando de antibióticos (WOODFORD *et al.*, 2000).

Diante do exposto destaca-se que estudos moleculares para avaliação de genes relacionados à produção de ESBL são de extrema importância epidemiológica, pois fornecem dados que indicam quais genes são mais prevalentes e desta forma podem contribuir para o conhecimento da evolução da multirresistência e auxiliar no seu controle e tratamento.

4 REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 Infecções hospitalares

As infecções hospitalares desenvolvem-se normalmente em 48 a 72 horas após a internação hospitalar, não estando presentes, nem em incubação, no momento da admissão (TIERNEY *et al.*, 2006).

A infecção hospitalar é uma das complicações mais frequentes que ocorrem nos doentes internados nas Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo que a ocorrência destas infecções pode levar a um aumento do risco de mortalidade, principalmente em pacientes em estado grave e em casos de internações de tempo prolongado. Deste modo, aumentam também o tempo de permanência do paciente na UTI e os custos hospitalares (FLOROS e ROUSSOS, 2001; COUTO *et al.*, 2003).

Pacientes internados nas UTI adquirem infecções hospitalares com uma frequência muito superior aos demais pacientes do hospital, sendo o risco de 5 a 10 vezes maior do que os internados em enfermarias e centros cirúrgicos (WEBER *et al.*, 1999). Os pacientes internados em UTI abrangem um pequeno grupo dos pacientes hospitalizados, representando cerca de 5 a 10% do total, mas contam com mais de 20% dos episódios de infecções hospitalares (LIMA *et al.*, 2007).

O aumento do risco está intimamente relacionado com o estado e a gravidade da condição clínica do doente, com o tempo de exposição aos procedimentos e dispositivos invasivos, com o tempo de permanência na UTI e também com as características físicas do local, tais como as limitações de espaço. Ainda assim, estima-se que cerca de um terço das infecções

hospitalares possam ser evitadas através de programas de prevenção (RICHARDS *et al.*, 2003; FLOROS e ROUSSOS, 2001).

Dentre as principais causas de infecção nos hospitais, temos o paciente susceptível, ou seja, com algum grau de imunodepressão, métodos diagnósticos e terapêuticos não utilizados ou equivocadamente utilizados, e a má utilização de métodos de assepsia realizados pelo serviço de saúde (CAETANO *et al.*, 2011).

As infecções hospitalares representam um dos maiores problemas de saúde pública, sendo responsáveis por diversos óbitos ou prolongamento de internações e com isso aumentando os gastos com a saúde (JACOBY, 2008; BORGES, 2009).

Os avanços na área microbiológica têm favorecido a identificação de bactérias e ajudado a relacionar casos com: infecções, contaminação ambiental e mudança do padrão de sensibilidade de antibióticos (ANDRADE *et al.*, 2006).

4.2 Resistência bacteriana e antimicrobianos

Com a introdução dos antibióticos para o tratamento de infecções bacterianas, as bactérias desenvolveram formas de resistência a estes fármacos. Além disso, algumas espécies bacterianas são consideradas naturalmente resistentes aos antimicrobianos, que é chamada resistência intrínseca, como por exemplo, a *Klebsiella* spp. que é considerada resistente ao antibiótico Ampicilina. Já outras podem adquirir esta resistência com uma exposição prolongada, através dos seus mecanismos de defesa. Estes mecanismos adquiridos resultam em alterações na fisiologia celular e na estrutura microbiana devido a alterações genéticas (O'BRIEN, 2002).

Entre as principais bactérias que adquirem resistências a antimicrobianos atualmente, estão as enterobactérias, as quais se tornaram um dos principais grupos de patógenos em se tratando de Infecções Hospitalares,

além de estarem frequentemente associadas à mortalidade, graças aos altos índices de resistência. Estudos realizados pelo SENTRY (Programa de monitoramento de patógenos e resistência em infecções hospitalares e adquiridas na comunidade) ou MYSTIC (*Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection*) têm destacado a participação de alguns gêneros da família *Enterobacteriaceae*, definindo assim os grupos CESP (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Serratia providencia*) produtores de ESBL como uma urgência clínica e epidemiológica (KIFFER *et al.*, 2005; BELL *et al.*, 2007).

Além do crescente aumento de casos de ESBL, a presença da enzima AmpC veio a dificultar ainda mais os tratamentos e diminuir as opções de antimicrobianos possíveis de serem utilizados. O *Enterobacter spp.* é um exemplo clássico de hiperprodutor de AmpC cromossomoal (SEREFHANOGLU *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2009).

Os beta-lactâmicos representam a classe de antimicrobianos mais variada e mais amplamente utilizada na rotina médica (BERTONCHELI e HÖRNER, 2008). Sua baixa toxicidade e a atividade modulada de acordo com as características moleculares do anel beta-lactâmico, justificam a sua utilização (KUBOYAMA, 2009).

No tratamento de infecções causadas por enterobactérias produtoras de ESBL e AmpC, estão entre as poucas alternativas de antibióticos úteis os carbapenêmicos, os quais se tornaram a última alternativa de terapia para essas bactérias, uma vez que resistem à degradação da maioria das enzimas beta-lactamases. Além disso, apresentam elevada afinidade pelas proteínas ligadoras de penicilina e uma excelente permeabilidade na membrana externa (SADER, *et al.*, 2004; DESHPANDE *et al.* 2006; SEREFHANOGLU *et al.*, 2009).

Os carbapenêmicos são antibióticos beta-lactâmicos com amplo espectro de atividade. Assim como todo beta-lactâmico, esses agem inibindo a síntese da parede bacteriana pela sua ligação e inativação das proteínas ligadoras de penicilinas. Os beta-lactâmicos atuam na fase extracitoplasmática da síntese da parede bloqueando a transpeptidação, ligação covalente das

cadeias lineares de fragmentos precursores do peptidoglicano catalisada pelas transpeptidases. O fármaco é um análogo estereoquímico do segmento ativo das proteínas ligadoras de penicilina, o que torna essas enzimas indisponíveis para o funcionamento, desestruturando a camada de peptidoglicano da célula bacteriana e predispondo a bactéria à lise celular (SAMPAIO, 2007; NETO *et al.*, 2007; SHIJU *et al.*, 2010).

Os carbapenêmicos como meropenem e imipenem possuem um amplo espectro de ação *in vitro*, com atividade inibitória a cocos Gram-positivos, bacilos Gram-negativos e bactérias anaeróbias, com exceção de *Enterococcus spp.*, *Staphylococcus* metilina resistentes e *Stenotrophomonas maltophilia* (MOHR, 2008; SHIJU *et al.*, 2010).

4.3 Mecanismos de Resistência Bacteriana

A resistência bacteriana aos antimicrobianos e outros compostos podem se apresentar sob diferentes fenômenos bioquímicos. Geneticamente, a resistência pode ser adquirida por mutações ou pela aquisição de genes, situados em elementos extracromossomais, tais como plasmídeos ou, ainda, como os transposons e os íntegrans (RANG *et al.*, 2012; SERRANO, 2005).

Os plasmídeos são elementos extracromossomais de DNA circulares, encontradas livremente no citoplasma, que podem se replicar. A sua origem não é conhecida, porém grande parte da resistência a fármacos se deve a presença desses plasmídeos. A presença destes elementos pode conferir vantagens genéticas, como resistência a um metal tóxico ou antibiótico ou degradação de alguns substratos. Em situações adversas como, altas temperaturas ou falta de nutrientes, os plasmídeos podem ser eliminados das células (RANG *et al.*, 2012).

Nas enterobactérias, a permeabilidade de membrana é a chave na sensibilidade aos antibióticos. A primeira linha de defesa contra compostos tóxicos é a membrana externa, na qual substâncias ingressam, sendo

controladas pelas porinas, as quais são proteínas que formam canais constituídos de água no seu interior, permitindo a difusão passiva de solutos hidrofílicos através da membrana externa (NIKAIDO, 2003).

Mecanismos de impermeabilidade também estão presentes na membrana da bactéria. Mecanismos de impermeabilidade também estão presentes na membrana da bactéria. Nas bactérias Gram negativas, a membrana externa é constituída por lipídios e a membrana interna por fosfolipídios. Esta constituição atribui uma lenta penetração do fármaco e a passagem pela membrana externa é realizada através das porinas, as quais formam canais hidrofílicos. Os fármacos podem penetrar através da membrana celular de três diferentes formas: Através da difusão pela porinas, por difusão na bicamada fosfolipídica ou por *self promoted uptake*. A penetração na bactéria depende das características intrínsecas das moléculas de antibiótico. Desta forma os compostos hidrofílicos penetram através das porinas. Os antibióticos como os beta-lactâmicos e tetraciclina penetram no interior da célula através de porinas presentes na membrana externa. Qualquer diminuição na função ou quantidade de porinas levará à resistência da bactéria ao antibiótico, baixando o nível de antibiótico no interior da bactéria (DECLOUR, 2009).

Outro mecanismo são as bombas de efluxo, que são responsáveis por expulsar as drogas de dentro do citoplasma, produzindo uma hiperexpressão de sistemas de bombas de efluxo. Este mecanismo de efluxo contribui para a resistência intrínseca e adquirida em Enterobactérias (PIDDOCK, 2006, DAVIN-REGLI *et al.*, 2008). Os sistemas de efluxo são normalmente formados por três proteínas de membrana: a bomba de efluxo presente na membrana citoplasmática, canal expulsador presente na membrana externa e a proteína de fusão que liga os outros dois componentes (PIDDOCK, 2006). Em *Pseudomonas aeruginosa*, o sistema Mex tem sido descrito como mecanismo de resistência a diversos antimicrobianos, entre eles, ao meropenem. Porém, em enterobactérias, nenhum sistema de efluxo descrito contribui com a expulsão dos antibióticos beta-lactâmicos (PATTERSON, 2006).

A resistência de Enterobactérias a carbapenêmicos vem crescendo nos últimos anos. As Enterobactérias têm desenvolvido sofisticados mecanismos de resistência contra os antibióticos beta-lactâmicos, como: limitação do acesso intracelular do fármaco através da sua membrana externa, por meio da impermeabilidade ao antibiótico associada a uma produção de enzimas de tipo AmpC e ou ESBL. A degradação do antibiótico por meio de enzimas hidrolisadoras como a produção de carbapenemases do tipo serina e metalo-beta-lactamases. E também há proteção dos alvos por meio da alteração das proteínas ligadoras de penicilina (DAVIN-REGLI et al., 2008).

As beta-lactamases são enzimas que catalisam a hidrólise do anel beta-lactâmico, impossibilitando, desta maneira, a sua atividade antimicrobiana através de dois possíveis mecanismos de ação que são: a utilização de zinco como cofator para a atividade enzimática e a via éster de serina. A maioria apresenta a via serina como o mecanismo de ação, poucas beta-lactamases possuem o mecanismo de utilização do zinco. As metalo beta-lactamases atacam o anel beta-lactâmico pela hidroxila livre da cadeia lateral do resíduo de zinco localizado no sítio ativo da enzima, produzindo um éster acil covalente, que sofre uma hidrólise e libera a enzima ativa e o hidrolizado resultante. Este último é a droga inativada (WALEY, 1987).

4.4 Beta-lactamase de espectro estendido (ESBL)

Beta-lactamases de espectro estendido, também conhecidas como ESBL (*extended-spectrum beta-lactamase*), são enzimas capazes de hidrolisar cefalosporinas de terceira geração (oximino-cefalosporinas) 10% a mais do que hidrolisam as benzilpenicilinas. Possuem sítio de ação contendo o aminoácido serina como resíduo catalítico principal, e normalmente são inibidas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam, presentes em antibióticos (BRADFORD 2001; STÜRENBURG e MACK 2003; PFALLER & SEGRETI 2006).

A primeira bactéria produtora de ESBL foi diagnosticada em 1982 na cidade de Liverpool na Inglaterra, em uma cepa de *Klebsiella oxytoca* (PAYNE et al. 1990). Hoje em dia mais de 200 tipos de ESBL são conhecidas e a alta prevalência dessa enzima é refletida na expansão clonal, localizando-se no plasmídeo ela tem uma característica de ser amplamente disseminável (LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Este primeiro relato de beta-lactamases capazes de hidrolisar as cefalosporinas de espectro estendido mediada por plasmídeos, foi de um gene que codifica a beta-lactamase, o qual mostrou uma mutação de um único nucleotídeo comparado com o gene que codifica SHV-1. Outras beta-lactamase foram logo descobrindo que estavam intimamente relacionados com TEM-1 e TEM-2, mas que tinham a capacidade de conferir resistência às cefalosporinas de espectro estendido. Portanto, essas novas beta-lactamases foram cunhados de espectro estendido beta-lactamase (SIROT *et al.*, 1987; BRUN-BUISSON *et al.*, 1987).

O esquema de Ambler divide beta-lactamases em quatro classes principais (A a D). A base deste esquema de classificação repousa sobre homologia de proteínas (similaridade de aminoácidos), e não as características fenotípicas. No esquema de classificação Ambler, beta-lactamases das classes A, C, e D são serina beta-lactamase. Em contraste, as enzimas da Classe B são metalo-beta-lactamases. Os Bush-Jacoby-Medeiros grupos esquema de classificação beta-lactamases de acordo com semelhanças funcionais (substrato e perfil inibidor). Existem quatro grupos principais e vários subgrupos neste sistema. Este sistema de classificação é de relevância muito mais imediata ao médico ou microbiologista em um laboratório de diagnóstico, pois considera inibidores beta-lactamase e substratos beta-lactâmicos que são clinicamente relevantes (AMBLER *et al.*, 2003; BUSH *et al.*, 1995).

A definição de ESBL mais utilizada é que são beta-lactamases capazes de conferir resistência bacteriana às penicilinas, primeiro, cefalosporinas de segunda e terceira geração, e aztreonam (mas não cefamicinas ou carbapenemos) por hidrólise destes antibióticos, e que são inibidos pelos

inibidores da beta-lactamase tais como ácido clavulânico. O termo ESBL se aplica nas beta-lactamases do grupo 2be de Bush-Jacoby-Medeiros e as beta-lactamases do grupo 2d que compartilham a maioria das propriedades fundamentais de enzimas do grupo 2be. O grupo 2be mostra que estas enzimas são derivadas de grupo 2b beta-lactamase (por exemplo, TEM-1, TEM-2, e SHV-1). A letra “e” de 2be indica que as beta-lactamases tem um espectro alargado. Enzimas do grupo 2b hidrolisam penicilina e ampicilina, e a um menor grau carbenicilina ou cefalotina. Eles não são capazes de hidrolisar cefalosporinas de espectro estendido ou aztreonam em qualquer grau significativo (BUSH *et al.*, 1995).

A facilidade de mutação leva ao desenvolvimento de novas beta-lactamases. Muitas das enzimas hoje conhecidas pertencem a famílias com graus de relacionamento e semelhanças funcionais. O diagnóstico correto dessas bactérias é importante, pois está relacionado ao uso indiscriminado de antibióticos pela população. Entretanto, a importância clínica das beta-lactamases está relacionada a uma combinação de fatores que, em especial, leva a aspectos funcionais e não estruturais, tendo importância a especificidade de hidrólise e o nível de expressão da atividade enzimática (BUSH, 2001).

A grande maioria das enzimas beta-lactamases é derivada dos genes: TEM (150 variedades) e SHV (88 variedades). Outros tipos de beta-lactamases são: CTX-M, OXA, PER, VEB, CME, TLA, SFO, GES e BES. (BRADFORD 2001).

4.5 Epidemiologia de produção de ESBL no Brasil

A primeira enzima do tipo CTX-M identificada foi em 1990 (BONNET *et al.*, 2000). Apesar disto, existem poucos dados epidemiológicos sobre infecções de bactérias produtoras de ESBL no Brasil. A maioria destes estudos avaliam a presença destas multirresistências em Unidades de terapia intensiva.(UTIs) (SUPERTI *et al.*, 2009).

As principais pesquisas se realizam nas regiões sul e sudeste do Brasil. As beta-lactamases mais frequentemente isoladas no país incluem os grupos CTX-M2, CTX-M8 e CTX-M9 (SILVA & LICOPAN, 2012).

O isolamento de enterobactérias produtoras de ESBL é realizado em diversos sítios de infecções, e diversas espécies são isoladas com a presença do gene, como: *Klebsiella spp.*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Citobacter spp.*, *Proteus mirabilis* e *Serratia marcescens*. Mas as cepas que levam maior urgência do ponto de vista clínico são a *Klebsiella spp.* e a *Escherichia coli* devido a maior prevalência dos genes encontrados nestas espécies (SILVA & LICOPAN, 2012).

A identificação de isolados produtores de enzimas ESBL varia muito de região para região, sendo mais alta na América Latina (KIFFER *et al.*, 2005; FEDLER *et al.*, 2006). Nos Estados Unidos a prevalência de amostras de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de enzimas ESBL não ultrapassa 5%. Na Europa varia entre 20 e 25 % e na América Latina a prevalência varia entre 35 e 40% (FEDLER *et al.*, 2006). Na África cepas produtoras de ESBL chegam a prevalências de 15% (TANSARLI *et al.*, 2014). No Brasil tem sido relatado que 12,1% a 16,9% das infecções em UTI's são causadas por *Klebsiella pneumoniae* (OPLUSTIL *et al.*, 2005).

4.6 Análise dos mecanismos de resistência bacteriana

Ensaio moleculares/genotípicos para a detecção de resistência bacteriana podem oferecer vantagens em relação a ensaios fenotípicos, como ocorre para a detecção da resistência à metilina *mecA* para *Staphylococcus spp.*, resistência a rifampina para *Mycobacterium tuberculosis*. Porém, estes ensaios moleculares também apresentam algumas limitações, pois além de ter um valor elevado para sua realização, novos mecanismos de resistência bacteriana podem ser perdidos. Para diagnóstico de rotina, o método de escolha ainda é o ensaio fenotípico. Desta forma, a determinação da resistência antimicrobiana de um isolado clínico é de extrema importância para

um tratamento adequado para os pacientes infectados (FLUIT *et al.*, 2000; LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

Os genes CTX-M estão geralmente associados à plasmídeos, de tamanhos que variam de 7kb a 160kb, e estão inseridos em transposons ou em integrons. Genes como o TEM, OXA e SHV, que conferem resistência a antibióticos beta-lactâmicos, são frequentemente encontrados no mesmo plasmídeo. Esses plasmídeos podem carrear junto com eles outros genes de resistência a antibióticos como: aminoglicosídeos, cloranfenicol, sulfonamidas, trimetoprim e tetraciclina. Fato que diminui a chance de inibição por diversos antibióticos e leva a um processo de seleção natural, onde estas bactérias levam vantagem (CANTÓN *et al.*, 2006; LIVERMORE & WOODFORD, 2006).

4.7 Bactérias multirresistentes

4.7.1 *Escherichia coli*

Pertencente ao grupo de enterobactérias, a bactéria *Escherichia coli* é um agente patogênico muito comum, tanto no ambiente em geral quanto no ambiente hospitalar. É a principal bactéria do gênero *Escherichia*, sendo descoberta em 1895, pelo pediatra alemão Theodor Escherich (EISENSTEIN & ZALEZNIK, 2000). Possui grande importância microbiológica e médica devido a infecções causadas e principalmente ao surgimento de cepas multirresistentes aos antibióticos utilizados na terapêutica (MURRAY *et al.*, 2007).

Sempre presente no trato intestinal, a *Escherichia coli* é muitas vezes responsável por infecções intra e extra intestinais (PROCOP & COCKERILL III, 2004). Em casos de infecção do trato urinário, a *Escherichia coli* é a causa mais frequente da patologia, chegando a ser identificada em 85% dos casos (RONALD *et al.*, 2001).

Em crescimento nos meios de cultura seletivos, a *Escherichia coli* apresenta diferentes características, produzindo colônias negras esverdeadas com brilho metálico em ágar EMB (do inglês, *Eosin Methylene Blue*) ou

colônias rosadas (lactose positivas) em Agar MacConkey. As cepas de *Escherichia coli* são associadas pelas propriedades bioquímicas entre elas: fermenta a lactose, produz indol a partir do triptofano, fermenta a glicose pela via de ácidos mistos e Voges-Proskauer negativo. Não produz ácido sulfídrico (H₂S), DNase, urease ou fenilalanina desaminase e não utiliza citrato como fonte de carbono (BOPP *et al.*, 2003).

4.7.2 *Klebsiella spp.*

O gênero *Klebsiella* se divide em três espécies: *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* e *K. granulomatis*. A mais comumente identificada é a *Klebsiella pneumoniae* e seus principais sítios de infecção são: trato urinário, pulmão, trato biliar e ferida operatória (ZAOUTIS *et al.*, 2005).

A *Klebsiella spp.* tem uma alta virulência graças a sua cápsula de polissacarídeos, a qual tem mais de 70 antígenos diferentes. Essa cápsula confere à bactéria a característica mucóide quando isolada no laboratório (SCWABER *et al.*, 2006). A *Klebsiella spp.*, como todas as enterobactérias, pode se tornar multirresistente a antibióticos, tornando-se um microrganismo constantemente combatido no ambiente hospitalar (ARCHIBALD, 2004).

Isolados de *Klebsiella spp.* são as espécies mais identificadas como produtoras de ESBL, sendo que 2 a 5% das infecções hospitalares, principalmente respiratórias e urinárias, estão associadas a esta espécie. Dados mostram uma prevalência de aproximadamente 50% de identificação de produção de ESBL em *Klebsiella pneumoniae* (MARTINS-LOUREIRO *et al.*, 2001; PFALLER & SEGRETTI, 2006)

4.7.3 *Pseudomonas spp.*

Surtos de infecções hospitalares têm sido provocados por *Pseudomonas aeruginosa*. No Brasil, é comum a multirresistência destes isolados

principalmente em ambientes hospitalares. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente, por exemplo, é uma das principais causas de pneumonia relacionadas à infecção hospitalar em diversas UTI do país (GALES *et al.*, 2003; ROSSI, 2011).

Pseudomonas aeruginosa possui diversas resistências intrínsecas como: sistemas de bombas de efluxo, impermeabilidade da membrana externa e produção de enzimas AmpC cromossomal (FLAHERTY & STOTON, 2004). Também se destacando como produtoras de Metalo-beta-lactamases (JACOBY *et al.*, 2005)

A *Pseudomas spp.* é um bacilo Gram-negativo não fermentador da glicose, e é isolado nos mais diversos materiais. Atualmente é um dos principais agentes de infecção hospitalar e um dos microrganismos mais isolados nos laboratórios de microbiologia. Devido a sua grande versatilidade nas necessidades nutricionais, pode ser encontrado em praticamente todos os meios de cultura em temperaturas de 4°C a 42°C (MURRAY *et al.*, 2003). Dificilmente causa infecção em indivíduo imunocompetente, porém é um dos principais agentes infecciosos em casos de imunodepressão (TRABULSI *et al.*, 2003, HOSOGLU *et al.*, 2011).

4.7.4 *Enterobacter spp.*

O gênero *Enterobacter* ocupa o terceiro lugar de prevalência na família *Enterobacteriaceae* no mundo. Os membros do gênero *Enterobacter* são o quinto patógeno mais isolado em pacientes pediátricos (FEDLER *et al.*, 2006; TURNER, 2009). *Enterobacter spp.*, também são amplamente identificados em ambientes hospitalares e como a *Pseudomonas spp.*, estão relacionado a um aumento de casos de produção de ESBL (SCHWABER *et al.*, 2003).

A produção de ESBL em *Enterobacter spp.* e *Pseudomonas spp.* não são identificados pelo método de aproximação de discos, pois são produtores de enzimas AmpC. Já em organismos que produzem ESBL, mas não

produzem AmpC, o clavulanato irá inibir a actividade de ESBL, levando ao aumento da zona de inibição na área entre o disco de amoxicilina / clavulanato e qualquer um dos discos de cefalosporina de terceira geração. No entanto, em ambos os organismos que produzem ESBL e AmpC, clavulanato podem induzir a produção de beta-lactamase AmpC, levando à hidrólise de cefalosporina de terceira geração, mascarando qualquer sinergia resultante da inibição da ESBL.

4.8. Diversidade de enzimas beta-lactamases e ESBL

4.8.1 Beta-lactamase tipo TEM

A enzima TEM, foi assim denominada em homenagem ao primeiro isolado bacteriano ter sido obtido de uma menina grega chamada Temoniera. O gene TEM-1 é capaz de hidrolisar a ampicilina a uma taxa maior do que a carbenicilina, a oxacilina, ou cefalotina, e tem uma baixa atividade contra as cefalosporinas de largo espectro. É inibido pelo ácido clavulânico. TEM-2 tem o mesmo perfil hidrolítico como TEM-1, mas difere do mesmo por ter um promotor nativo mais ativo e por uma diferença em ponto isoeléctrico (5,6 comparado com 5,4). TEM-13 também tem um perfil semelhante ao hidrolítica TEM-1 e ao TEM-2. (JACOBY *et al.*, 1991). Portanto os genes TEM-1, TEM-2 e TEM-13 não são considerados produtores de ESBL (SIROT *et al.*, 1987).

O gene TEM-1 localiza-se no transposon Tn3, que é pouco específico e permite diversos tipos de rearranjos, além de facilitar sua disseminação para outras espécies bacterianas. Este é o gene mais comumente presente em isolados produtores de enzima beta-lactamase e bactérias como *Escherichia coli*, *Klebsiella spp.* e *Proteus mirabilis* (CAO *et al.*, 2002; PAGANI *et al.*, 2002).

A substituição de aminoácidos que ocorreram nas enzimas do tipo TEM1 causaram diversas alterações nos fenótipos de enzimas beta-lactamases e formaram a enzima tipo TEM2, como a habilidade de hidrolisar oximino-

cefalosporinas ou alterar seus pontos isoelétricos de 5,2 para 6,5, mas continuando não sendo produtora de ESBL (PFALLER & SEGRETI, 2006).

Em 1987, em um isolado de *Klebsiella pneumoniae*, foi relatada a primeira enzima tipo TEM3, a qual teve a modificação de dois aminoácidos a partir de uma enzima tipo TEM2, característica que possibilitou o isolado a expressão o fenótipo ESBL (DU BOIS *et al.*, 1995). Mais de 150 tipos de enzimas TEM já foram descritas, algumas delas resistentes aos inibidores de beta-lactamase, mas, a maioria apresenta o fenótipo ESBL (BRADFORD, 2001)

4.8.2 Beta-lactamase tipo SHV

SHV é uma enzima encontrada principalmente em *Klebsiella pneumoniae* e torna as bactérias mais resistentes aos antibióticos ampicilina, amoxicilina e às carboxipenicilinas. Assim denominada em virtude da estrutura química sulfidírl variável em seu sítio ativo. Ocorre em diversas enterobactérias também em outras bactérias como *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter spp.* É uma enzima codificada por um gene plasmidial (ROSSI & ANDREAZZI, 2005).

A SHV tem ponto isoelétrico entre 7,0 e 8,2, e não é capaz de hidrolisar as cefamicinas e carbapenêmicos, mas hidrolisa as oximinocefalosporinas e é inibida pelos inibidores de beta-lactamase. As formas mais prevalentes são a SHV-1 e a SHV-2, caracterizados pela substituição de serina por glicina na posição 238. (BRADFORD, 2001).

Atualmente há mais de 90 variantes da enzima SHV, sendo que a maioria possui o fenótipo ESBL. O gene SHV-1 não é considerado produtor de ESBL (KNOTHE *et al.*, 1983; PATERSON & BONOMO, 2005).

4.8.3 Beta-lactamase tipo CTX-M

Embora as enzimas SHV e TEM sejam as mais frequentemente encontradas, outra família vem se destacando e sendo cada vez mais identificadas, as CTX-M. Estas se diferenciam bastante das demais, compartilhando menos 40% do TEM e SHV e possuem uma tendência a hidrolizarem melhor a ceftriaxona e a cefotaxima. Em testes, observa-se muitas vezes uma sensibilidade à ceftazidima, ao contrário da maioria dos outros isolados que possuem o gene CTX-M (BONNET, 2004; LIVERMORE *et al.*, 2007).

A sua incidência é muito ligada a Ásia e América do Sul, mas já vem sendo amplamente descrita no restante do mundo. E são encontradas em uma variedade maior de espécies de enterobactérias, como: *Salmonella enterica*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter aerogenes*, *Citrobacter spp.*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (BONNET, 2004; BRADFORD, 2001).

Os genes CTX-M estão normalmente localizados em plasmídeos e inseridos em transposons ou em integrons. Estes genes frequentemente carregam outros genes característicos de ESBL, o que aumenta a resistência ainda mais e dá uma capacidade maior de sobrevivência por meio da seleção natural dos antibióticos (CANTÓN *et al.*, 2006).

Os genes CTX-M são formados por cerca de 60 enzimas, as quais são separadas em cinco grupos, de acordo com a similaridade das sequências de aminoácidos CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-8, CTX-M-9 e CTX-M-25. As enzimas de mesmo grupo contêm uma alta similaridade genética, enquanto que enzimas de grupo genético diferentes contêm uma similaridade abaixo de 10% (BONNET, 2004).

4.8.4 Beta-lactamase tipo AmpC

O grupo AmpC é relacionado a classe de beta-lactamases de classe C e pode ser codificado em genes presentes em plasmídeos e cromossomos. Possuem a característica de resistência às cefamicinas, penicilinas, cefalosporinas de 1ª e 2ª geração e associação de antibióticos com inibidores da beta-lactamase. É uma das enzimas responsáveis pelo erro de diagnóstico do método de aproximação de discos, pois marcaram a produção de ESBL (LIVERMORE & WOODFORD, 2006; YUM *et al.*, 2005).

4.9 Métodos para a identificação de bactérias ESBL

O CLSI (*Clinical Laboratory Standards International*) é uma organização sem fins lucrativos que reúne diversos laboratórios criando normas utilizadas para promover a excelência de processos, como a avaliação e identificação de bactérias. A identificação é realizada através de provas bioquímicas. A técnica de aproximação de discos, a qual identificará a produção de ESBL no isolado, preconiza a medição dos halos dos antibióticos: aztreonam, cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima e ceftriaxona. O diâmetro destes halos tem valores determinados pelo CLSI (2013), sendo esses menores, ou seja, mais resistentes. A bactéria analisada é considerada produtora de ESBL. Esse teste pode ser introduzido junto com o antibiograma, assim economizando tempo e custos. Mas é indicado fazer testes confirmatórios, como os citados a seguir.

O teste de aproximação dos discos é um dos métodos confirmatórios mais utilizados para a caracterização fenotípica de linhagens produtoras de ESBL. É um teste prático e acessível aos laboratórios (JUNIOR *et al.*, 2004).

Este teste consiste em inocular uma placa de ágar Mueller Hinton e acrescentar discos de aztreonam e de cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftazidima, cefpodoxima e cefepime, dispostos 20 mm (centro a centro) de um disco de amoxicilina-clavulanato, colocado no centro da placa. Quando se observa uma ampliação ou deformação do halo de

inibição em alguma das cefalosporinas ou do aztreonam ou o aparecimento de halo entre os demais, conhecida como zona fantasma ou buraco de fechadura, é caracterizada a sinergia entre os discos, e então é confirmada a identificação de ESBL no isolado (DRIEUX *et al.*, 2008; JARLIER, 1988).

Outro teste utilizado é o teste de Discos Combinados. Esta técnica adiciona discos como ácido clavulânico ou sulbactam, a discos de antimicrobianos como cefuroxima, ceftazidima, cefotaxima ou aztreonam. Havendo um aumento do diâmetro dos halos de inibição superior ou igual a 5mm, em comparação aos halos dos discos não adicionados de ácido clavulânico, esta amostra deve ser identificada como produtora de ESBL (CLSI, 2013; CARTER *et al.*, 2000).

O E-test® consiste na utilização de uma fita plástica contendo concentrações crescentes do antibiótico em pesquisa, neste caso a cefalosporina e a cefalosporina associada com ácido clavulânico do outro lado da fita. Esta fita é depositada sobre uma placa de ágar Mueller Hinton com o inóculo bacteriano concentrado a uma escala de 0,5 MacFarland. O método consiste no aumento da sensibilidade na presença do ácido clavulânico, em relação a cefalosporina isolada. Sendo assim, leituras que apresentem diminuição de pelo menos duas diluições logarítmicas ou quando a razão entre dois breakpoints for igual ou maior a 8 mm, da cefalosporina e ácido clavulânico em relação a cefalosporina isolada, é evidência presuntiva de produção de ESBL (DRIEUX *et al.*, 2008; MOHANTY *et al.*, 2009).

Existem ainda técnicas automatizadas, as quais utilizam equipamentos como o Phoenix (Becton-Dickinson Biosciences, Sparks, MD), o Vitek (BioMérieux, Marcy L'Etoile, France) e o MicroScan Walkaway-96 (Dade Behring, Inc., West Sacramento, CA). Uma comparação destes equipamentos foi realizada, comparando a habilidade da identificação de ESBL frente a testes fenotípicos convencionais. O equipamento com maior sensibilidade foi o Phoenix (99%), seguido pelo Vitek 2 (86%) e MicroScan (84%). Por outro lado a especificidade foi mais variável, oscilando de 52% (Phoenix) a 70% (Vitek 2) (BONOMO *et al.*, 2007).

O teste tridimensional consiste numa modificação do teste de disco difusão, onde é inoculado o microrganismo em uma fenda circular no ágar, localizado a 3 mm do local da aplicação dos discos. A identificação de produção de ESBL é feita atrás da distorção dos halos. A vantagem dessa técnica é a possibilidade da determinação simultânea da suscetibilidade aos antimicrobianos (THOMSON & SANDERS, 1992).

Além destas técnicas que avaliam a presença de produção de ESBL, existem técnicas moleculares, que detectam a presença da enzima através de suas características genotípicas. Algumas vezes as enzimas conferem baixa resistência e não são identificadas por testes fenotípicos ou também, algumas vezes, o gene está presente, mas a proteína não está sendo expressa, as quais não são detectadas pelos testes fenotípicos. O indicado nesses casos é utilizar técnicas que identificam especificamente as enzimas responsáveis ou genes responsáveis pela produção de ESBL (BRADFORD, 2001; PITOUT *et al.*, 2008).

O método utilizado para a identificação direta de enzimas é a Eletroforese de Ponto Isoelétrico. Já a técnica de PCR é o método molecular mais simples utilizado para identificação dos genes de ESBL. Outras técnicas utilizadas são PCR-RFLP (*Fragment Leng Polymorphism*) e PCR-SSCP (*Single-Strand Conformational Polymorphism*). O método padrão, no entanto, é o sequenciamento da cadeia específica dos nucleotídeos dos genes de ESBL (BRADFORD, 2001; SHAH *et al.*, 2004).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Tipo de Pesquisa

A presente pesquisa é classificada como descritiva e transversal, de abordagem quantitativa.

5.2 População do Estudo

O estudo baseou-se inicialmente na análise retrospectiva das infecções por bactérias multirresistentes de um hospital de médio porte no interior do Rio Grande do Sul, durante o período de janeiro de 2011 a junho de 2012. Os dados foram coletados a partir do banco de dados do Serviço de Controle de Infecção Hospitalar do referido hospital. Posteriormente, a partir da seleção das bactérias de maior prevalência, foram realizadas coletas dos isolados entre outubro de 2012 e fevereiro de 2013, então sendo realizada a caracterização molecular através da pesquisa de genes relacionados à multirresistência. As bactérias do estudo foram coletadas dos pacientes hospitalizados após a sua avaliação, diagnóstico e identificação pelo laboratório responsável.

Os microrganismos isolados foram mantidos em meio skim milk (água destilada e leite em pó) e posteriormente o repique foi realizado no Agar Macconkey, o qual é um meio seletivo para bactérias gram negativas. O tempo de cultivo foi de 24 horas em estufa a $35^{\circ}\text{C} \pm 1$.

5.3 Ambiente de Pesquisa

As coletas dos isolados bacterianos foram realizadas no laboratório de análises clínicas, o qual atende os pacientes internados no hospital. A identificação, o antibiograma e o teste de aproximação de discos foram realizados pelo mesmo e após serem liberados, os isolados foram encaminhados para a utilização na pesquisa.

5.4 Aspectos Éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Centro Universitário UNIVATES (Protocolo nº 358.936 de 23 de julho de 2013) e também pelo Centro de Ensino e Pesquisa do Hospital em questão.

5.5 Critérios de Inclusão

Foram incluídos na pesquisa os isolados bacterianos coletadas de pacientes do hospital, as quais apresentaram quadro de infecção patológica e que foram identificados como enterobactérias ou *Pseudomonas spp.*

5.6 Identificação, antibiograma e método de aproximação de discos das bactérias

O isolamento e a identificação dos isolados bacterianos foram realizados por laboratório terceirizado, realizado através de testes bioquímicos. Para avaliação de suscetibilidade aos antimicrobianos foi utilizado o método de difusão de discos (antibiograma), através do método padronizado pelo CLSI (CLSI, 2013), onde um disco impregnado com um antimicrobiano é colocado na superfície do ágar já semeado. As placas foram incubadas por 18 a 24 horas em temperatura de 35°C \pm 1, e depois de mensurados os halos de inibição de crescimento. Para caracterização dos isolados produtores de ESBL foi utilizado o método fenotípico de aproximação de discos. Este método consiste na inoculação da suspensão do isolado ajustada ao padrão 0,5 na escala de

McFarland em ágar MullerHinton. Foram colocados discos de amoxicilina e ácido clavulânico (AMC) no centro da placa. Os antimicrobianos aztreonam (ATM), cefotaxima (CTX), ceftazidima (CAZ) e cefepime (CPM) foram posicionados próximos ao disco central, e, após incubação da placa durante 18 a 20 horas a 35°C ±1, pode-se analisar se houve presença de uma terceira zona entre o disco de ácido clavulânico e um substrato marcador, o que confirma positividade de produção de ESBL (JARLIER, 1988; SEKAR, 2009).

5.7 Análise da presença dos genes TEM, SHV, CTX-M e dos genes pertencentes às famílias CTX-M1, CTX-M2 e CTX-M9

O DNA bacteriano foi isolado utilizando o kit PureLink Genomic DNA kit (Invitrogen®, Carlsbad, USA) seguindo o protocolo do fabricante. Após a extração do DNA, realizou-se a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando os primers específicos para os genes em questão (Tabela 1)

Tabela 1 - Sequência dos primers utilizados no presente estudo.

Gene	Primers	Fragmento	Referência
SHV	5'- GGG TTA TTC TTA TTT GTC GC-3' 5'-TTA GCG TTG CCA GTG CTC-3'	930 pb	JAIN, 2008
TEM	5'- ATA AAA TTC TTG AAG ACG AAA-3' 5'- GAC AGT TAC CAA TGC TTA ATCA-3'	1080 pb	JAIN, 2008
Família CTX-M 1	5'-AAA AAT CAC TGC GCC AGT TC -3' 5'-AGC TTA TTC ATC GCC ACG TT -3'	415 pb	WOODFORD, 2005
Família CTX-M 2	5'-CGACGCTAC CCCTGC TAT T -3' 5'-CCAGCGTCAGATTTT TCA GG-3'	552 pb	WOODFORD, 2005
Família CTX-M 9	5'-CAA AGA GAG TGC AAC GGA TG-3' 5'-ATT GGA AAG CGT TCA TCA CC-3'	205 pb	WOODFORD, 2005
CTX-M	5' ACC GCG ATA TCG TTG GT 3' 5' CGC TTT GCG ATG TGC AG 3	550 pb	AHMED, 2004

As reações de PCR foram realizadas no termociclador TC-512 (Techne® Barloworld Scientific, Stone, Staffordshire, UK) com um volume final de 50 µL sendo utilizado PCR Buffer (20 mM de Tris HCL pH 8,4 e 50mM de KCL), 1,5

mM de MgCl₂, 1,25 U de Taq DNA polimerase, 50 picomoles/μL de primers sense e antisense e 0,2 mM de dNTP mix. Como controles positivos foram utilizadas cepas já conhecidas, nas quais já foram identificados genes produtores de ESBL. Estas cepas foram doadas pelo instituto Fiocruz do Rio de Janeiro e pelo Laboratório de Microbiologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA). As condições da reação para cada gene estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Programas utilizados para amplificação dos genes analisados.

Gene	Desnaturação inicial	Anelamento	Extensão	Número de ciclos	Extensão Final
SHV	94° C 30s	55° C 40s	72° C 40s	35	72° C 10min
TEM	94° C 60s	52° C 60s	72° C 60s	35	72° C 10min
Família CTX-1	94° C 60s	49° C 50s	72° C 60s	37	72° C 6min
Família CTX-2	94° C 60s	49° C 50s	72° C 60s	37	72° C 6min
Família CTX-9	94° C 30s	50° C 40s	72° C 50s	35	72° C 6min
CTX-M	94° C 45s	54° C 45s	72° C 60s	38	72° C 5min

Posteriormente, para visualização dos fragmentos, foi realizada eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com Brometo de Etídio, submetida a corrente de 90 Volts por cerca de uma hora. (Figuras I a VI do Apêndice).

5.8 Controles Positivos

As análises de PCR contaram com cepas para a padronização dos programas e para comparação do tamanho de banda no momento da visualização dos géis de agarose com os isolados. As cepas utilizadas foram:

ATCC IOC.- Fiocruz CCBH 4955 *Klebsiella pneumoniae* e ATCC 700603.- Fiocruz CCBH 3858 *Klebsiella pneumoniae*.

5.9 Análise estatística

A sensibilidade e especificidade foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) e teste exato de Fisher. As análises estatísticas foram realizadas com o software Probabilitas, adotando nível de significância de 5%.

Este teste utilizou os resultados das presenças dos genes pelo teste de PCR, comparando com o resultado do método de aproximação de discos. Levando em conta que a presença de qualquer gene CTX-M no isolado acarretará em produção de ESBL. E o teste de aproximação de discos pode representar resultados falso-negativos graças a interação entre enzimas, ou a baixa produção de ESBL.

6. RESULTADOS

A análise retrospectiva de 374 amostras clínicas obtidas no período de janeiro de 2011 a julho de 2012 mostrou que o aspirado traqueal foi a amostra que obteve maior índice de infecção (70,70%), seguido da urina (6,99%) e do escarro (6,72%). As amostras menos encontradas foram: líquido do tórax (0,27%), hematoepático (0,27%) e fragmentos do esterno (0,54%). As bactérias mais prevalentes foram: *Klebsiella oxytoca*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Staphylococcus aureus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Pseudomonas Aeruginosa*, *Streptococcus pneumoniae* e *Klebsiella spp.*

Com relação à resistência a antibióticos, as bactérias que apresentaram resistência a um grande número de antibióticos foram: *Klebsiella spp.*, *Acinetobacter sp.*, *Enterobacter sp.*, *Escherichia coli*, *Serratia sp.*, *Pseudomonas sp.* e *Staphylococcus aureus*. (Tabelas I a VI do Apêndice). Do total destas amostras foram selecionadas para o presente estudo, 62 isolados, sendo eles: *Klebsiella spp* (35 isolados), *Escherichia coli* (24 isolados), *Pseudomonas spp.* (2 isolados) e *Enterobacter spp* (1 isolado).

Deste total, 45,76% (27) foram classificadas como ESBL positivas através do método de aproximação de discos. Destas, a *Klebsiella spp.* foi a que apresentou maior percentual de ESBL positivas, 54,28%, seguida da *Escherichia coli*, com 33,3%. Este teste não foi aplicado aos isolados de *Enterobacter spp* e *Pseudomonas spp*, pois este teste não se aplica a estas bactérias devido à interação de enzimas que inibem o resultado do teste.

Com relação à metodologia genotípica, a distribuição do percentual da presença dos genes analisados está representada na figura 1, sendo os mais prevalentes o CTX-M (92,6%) e o TEM (85,18%).

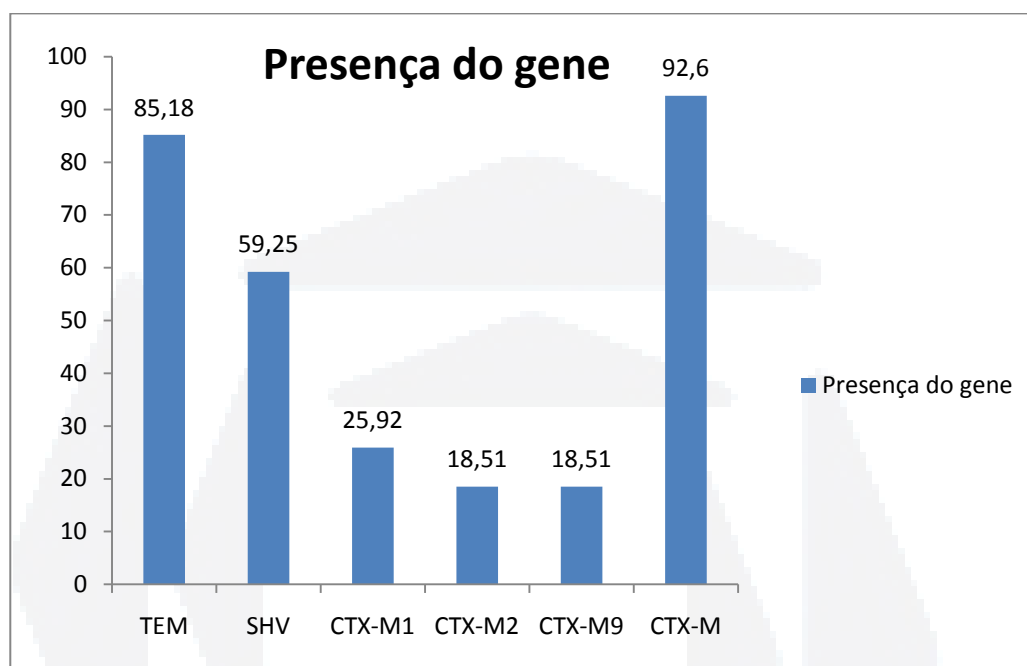


Figura 1: Presença dos genes TEM, SHV, CTX-M e famílias CTX-M1, CTX-M2 e CTX-M9 na população analisada Dados em percentual.

A presença dos genes pertencentes às famílias CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 ou CTX-M confere às bactérias a produção de ESBL. Somente em um dos isolados não foi identificado nenhum dos genes, consequentemente houve a identificação dos genes nas outras 61 (98,4%) das amostras. (Tabela VII do Apêndice).

A produção de ESBL não é sempre conferida à bactéria que os genes TEM ou SHV são identificados, pois as enzimas TEM-1, TEM-2 e SHV-1 produzem somente a enzima beta-lactamase sem espectro estendido. Foram identificados ao menos um dos genes TEM ou SHV em 53 (85,5%) isolados.

Os genes TEM, SHV e CTX-M foram os mais prevalentes em *Klebsiella spp.* A Tabela 3 mostra a presença dos genes e o resultado do teste de aproximação de discos nos isolados de *Klebsiella spp.* e *Escherichia coli*

Tabela 3. Relação entre a presença dos genes e o teste de aproximação de discos. Dados expressos em número de isolados.

	<i>Klebsiella spp.</i>	<i>E.coli</i>
Aprox. de discos+ TEM+	17	6
Aprox. de discos - TEM+	10	10
Aprox. de discos + SHV+	12	4
Aprox. de discos - SHV+	11	6
Aprox. de discos +CTX-M1+	5	2
Aprox. de discos -CTX-M1+	5	2
Aprox. de discos +CTX-M2+	3	2
Aprox. de discos - CTX-M2+	3	1
Aprox. de discos +CTX-M9+	2	3
Aprox. de discos -CTX-M9+	2	7
Aprox. de discos +CTX-M+	17	7
Aprox. de discos -CTX-M+	14	14

A análise estatística realizada comparou os dois métodos de identificação de produção de ESBL. A técnica de PCR foi utilizada como padrão, assim a eficácia da técnica de aproximação de discos foi comparada. A tabela 2 mostra o resultado as especificidade e sensibilidade.

Tabela 4: Resultados de sensibilidade e especificidade da comparação da técnica de PCR e a técnica de aproximação de discos.

Gene	Sensibilidade	Especificidade
SHV	0,4571	0,5926 (p=0,9262)
TEM	0,5227	0,7778 (p=0,0957)
Família CTX-M1	0,4667	0,5745 (p=0,9616)
Família CTX-M2	0,5556	0,5849 (p=0,7344)
Família CTX-M9	0,3571	0,5417 (p=0,7979)
CTX-M	0,4464	0,6667 (p=0,8685)

7. DISCUSSÃO

As beta-lactamases formam um grande grupo de enzimas que são capazes de hidrolizar o anel betalactâmico de penicilinas, cefalosporinas e monobactâmicos (antibióticos betalactâmicos). Dentre as beta-lactamases, destacam-se as ESBL. A produção de ESBL é mediada por plasmídeos que conferem ampla resistência aos antimicrobianos que contém o anel betalactâmico em sua estrutura e agem neste anel betalactâmico rompendo-o e inativando assim, o antibiótico. *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* são as espécies bacterianas mais comumente encontradas produzindo ESBL (KONEMAN *et al.*, 1999).

Através do levantamento de dados realizado e dados fornecidos pelo centro de controle de infecção hospitalar (CCHI) do hospital em estudo, os casos de bactérias produtoras de ESBL representam o principal desafio ao controle de infecções.

Entre as 374 amostras clínicas analisadas, as amostras mais frequentes foram de aspirado traqueal, pois o trato respiratório é um sítio facilmente infectável, graças a utilização de respiradores mecânicos nos hospitais.

No presente estudo as amostras clínicas que apresentaram maior resistência a antibióticos segundo o teste de difusão de disco foram *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas sp.*, *Serratia sp.* e *Staphylococcus aureus*. Um estudo retrospectivo observou maior frequência de *Staphylococcus sp.*, seguido de *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella sp.* em amostras de pacientes com infecção hospitalar (ANDRADE *et al.*, 2006).

Diversas técnicas estão sendo propostas para identificar a produção de ESBL, mas a maioria direciona-se para a detecção em bactérias que possuem baixa atividade de beta-lactamase de origem cromossômica, como nas

enzimas AmpC, que mascaram a presença da enzima. Desta maneira dificulta o estabelecimento de um padrão-ouro de identificação, já que podemos ter resultados falso-positivos ou falso-negativos, sendo o recomendado uma combinação de testes (FILHO *et al.*, 2003). A detecção de enzimas de origem cromossômica induzível tornou-se o grande desafio. Em *Enterobacter spp.* e em *Pseudomonas aeruginosa* essa dificuldade se encontra, provavelmente devido à maior permeabilidade da sua membrana externa, assim como a resistência à antimicrobianos mediada por sistema de efluxo (POURNARAS *et al.*, 2005).

Diversos métodos para a tipagem molecular de patógenos bacterianos e estudo de infecções hospitalares têm sido utilizadas e descritas como eficientes para a tipagem molecular de patógenos pertencentes à família *Enterobacteriaceae* e outros (SINGH *et al.*, 2006). Para a tipagem molecular de *K. pneumoniae*, a técnica de PFGE é considerada padrão ouro, devido a sua excelente capacidade discriminatória (PFALLER *et al.*, 2001). Contudo, demanda de vários dias para sua execução, possui alto custo e algumas cepas não podem ser tipadas através do PFGE, devido à degradação do DNA (SILBERT *et al.*, 2003). Como alternativa para a técnica de PFGE, métodos baseados em PCR têm sido amplamente utilizados.

A presente pesquisa avaliou através da técnica de PCR, a presença de genes relacionados à produção de ESBL, sendo que os resultados obtidos indicam que os genes CTX-M foram os prevalentes.

Os genes TEM e SHV são produtores de enzimas beta-lactamase e algumas vezes também são produtores de ESBL. O gene com maior prevalência foi o TEM.

Um estudo recente utilizando PCR multiplex para caracterização genotípica observou também maior prevalência para o gene CTX-M, seguido do gene TEM (TISSERA, 2013).

Em estudo similar de Minarini (2007), avaliando a prevalência do gene TEM em enterobactérias, o resultado chegou a 90%. Valor este acima do

presente estudo, que identificou o gene TEM em 70,96% das amostras. Por outro lado, Cao *et al.* (2002), também avaliou a prevalência deste gene e o resultado foi abaixo do identificado no presente estudo em amostras de *Klebsiella pneumoniae* (38%) e maior em *Escherichia coli* (84%).

Estudos no Iran, em diferentes hospitais da cidade de Teerã com 80 amostras de *Klebsiella pneumoniae*, utilizou a PCR-RFLP para identificar genes de resistência. Foram identificados os genes TEM, SHV e CTX-M, com as seguintes prevalências, 18%, 26% e 24,5%. O presente estudo demonstrou uma prevalência superior nos genes TEM e principalmente no gene CTX-M. Já o gene SHV ficou com valores similares ao estudo (NASEHI *et al.*, 2010).

Uma pesquisa em um hospital da cidade de Santa Maria, interior do Rio Grande do Sul, analisou a prevalência de beta-lactamases de espectro estendido pertencentes às famílias TEM, SHV e CTX-M entre amostras de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* Empregando-se o método do disco combinado, a presença de ESBL foi confirmada em 55 (61,1%) amostras. Quando o método do duplo disco foi utilizado, 57 (63,3%) amostras foram produtoras de ESBLs. Com base na PCR, as ESBL do tipo TEM e SHV foram mais presentes em *Klebsiella pneumoniae*, enquanto que ESBL do tipo CTX-M foram mais presentes em *Klebsiella oxytoca*. Em comparação, o presente estudo tem níveis similares de confirmação de ESBL, com 59% de confirmação através da técnica de PCR (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Em contrapartida, um estudo na cidade de São Paulo, SP, encontrou em enterobactérias o gene TEM em 17% das bactérias analisadas, o gene SHV em 60% e o gene CTX-M em 33% (DROPPA, 2006), percentuais estes, que são inferiores aos obtidos na presente pesquisa.

Em outro estudo, foram coletadas enterobactérias, todas previamente identificadas como imipenem resistentes, obtidos de diversos materiais clínicos coletados em oito centros hospitalares do Brasil no período de 2003 a 2008. A coprodução de carbapenemase ou enzimas do tipo AmpC com ESBL do tipo CTX-M foi confirmada em 68% dos isolados (PAVEZ, 2009). O resultado obtido se aproxima dos resultados da presente pesquisa, contudo o gene TEM

apresentou resultados inferiores, estando presente em apenas 17% das amostras. Todavia, uma pesquisa na Malásia observou a presença de 80% do gene TEM, 20% de CTX-M e apenas 8% do SHV em bactérias do gênero *Escherichia coli* ESBL positivas (LIM *et al.*, 2009). Outro estudo avaliando também amostras com *Escherichia coli* produtora de ESBL, isoladas de urina, observou maior prevalência do gene CTX-M (94,6%), seguida do gene TEM (56,8%) e SHV (13,5%) (MOGHADDAM *et al.*, 2012).

Os dados obtidos nos diferentes estudos podem sugerir que os genes CTX-M e TEM sejam os mais difundidos se comparado com os outros. Deve-se destacar que existe a possibilidade de se detectar estes genes em bactérias não caracterizadas como ESBL positivas, como verificado no presente estudo. Bonnet (2004) cita a coexistência dos genes TEM e CTX-M no mesmo plasmídeo, podendo estes ser transmitidos e detectados.

Celenza *et al.* (2006) detectou em seu estudo na Bolívia, genes CTX-M em 92% das cepas estudadas, em 6 diferentes espécies de enterobactérias, assemelhando-se aos valores do presente estudo. Em estudos na Argentina, o grupo CTX-M foi detectado em 67% das amostras, com oito espécies de enterobactérias (CELENZA *et al.*, 2006; QUINTEROS *et al.*, 2003).

Com relação aos demais genes da família CTX-M, a presente pesquisa verificou uma baixa prevalência destes, sendo os genes pertencentes à família CTX-M1 são os mais prevalente (25,92%). Em Ribeirão Preto um estudo identificou os genes CTX-M em *Klebsiella pneumoniae*. Foi realizado um perfil de sensibilidade das linhagens estudadas, e foram identificados genes CTX-M em plasmídeos conjugativos em 13 (37%) linhagens estudadas. Destas 13 amostras, foram identificados os genes pertencentes às famílias CTX-M9 em quatro amostras de *Klebsiella oxytoca*, e CTX-M2 em nove amostras de *Klebsiella pneumoniae*, mostrando que estes genes estão cada vez mais numerosos na região (CLÍMACO, 2007).

Estudos em um hospital de Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, foram avaliados pelo método de PCR, 62 amostras de *Klebsiella pneumoniae*. Destas

amostras 59 (95,2%) possuíam o gene TEM, 51 (82,3%) o gene CTX-M e 26 (74,3%) o gene SHV. O presente estudo avaliou exatamente o mesmo número de amostras, sendo que os resultados foram similares em relação ao gene CTX-M, todavia os genes TEM e SHV apresentaram percentual maior do que o encontrado no presente estudo (WOLLHEIM, 2009).

Apesar da presença dos genes não ser diagnóstico para a produção de ESBL, já que este gene pode estar silenciado ou haver a produção de enzimas que inibem a produção da ESBL, como a enzima AmpC, a grande preocupação é com a grande presença destes genes e a facilidade desses serem transmitidos para outras bactérias por meio de plasmídeos. Desta maneira, a produção de ESBL pode ser fator agravante em conjunto com outras multirresistências (BRADFORD, 2001). Em geral, bactérias relacionadas às infecções hospitalares, demonstram resistência a múltiplos antimicrobianos, os quais causam surtos de infecções, fator primordial na epidemiologia de cepas hospitalares (MOOLENAAR *et al.*, 2000).

A produção de beta-lactamases é o mais importante mecanismo de resistência contra antimicrobianos beta-lactâmicos em organismos Gram negativos. Essas enzimas limitam os tratamentos hospitalares. Estão presentes principalmente em espécies da família *Enterobacteriaceae* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2003). A alta frequência de multirresistências entre bactérias com o gene CTX-M pode ser resultado da coexistência, em um mesmo plasmídeo, de genes CTX-M com genes que conferem resistência a outras classes de antibióticos (CANTÓN *et al.*, 2006).

A frequência de ESBL isolados no mundo varia muito de região para região. Nos Estados Unidos a prevalência de *Klebsiella spp.* produtoras de ESBL não ultrapassa 5%, já na Europa este índice atinge entre 20 e 25% e na América Latina, a prevalência varia entre 35 e 40% (FEDLER *et al.*, 2006). Resultados de prevalência diferentes também levam a níveis diferentes de prevalência dos genes. Os genes variam em prevalência em pequenas regiões, até mesmo em hospitais da mesma cidade, e podem variar ainda mais em países ou continentes (SADER *et al.*, 2004).

Diversos estudos são realizados analisando prevalência de produtores de ESBL. Na maioria dos casos, as bactérias mais isoladas são *Klebsiella spp.* e *Escherichia coli*. Alguns autores apresentam valores superiores de outras enterobactérias, mas devem ser estudos isolados ou com número pouco significativo de isolados (PAGANI *et al.*, 2002).

A diversidade de resultados encontrados na literatura, bem como o elevado índice de infecções hospitalares provocadas por cepas multirresistentes, sugerem que outros estudos, envolvendo mais isolados e outros genes, são necessários para o melhor entendimento dos mecanismos de evolução e disseminação da produção de ESBL no ambiente hospitalar. Além disso, a caracterização destes genes em isolados de *Klebsiella spp* e *Escherichia coli*, em outros hospitais, poderia contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a epidemiologia, as formas evolução e de disseminação destes patógenos.

O método de aproximação de discos é uma técnica amplamente utilizada pelos laboratórios de microbiologia clínica para identificar bactérias produtoras de ESBL, principalmente devido ao seu baixo custo, já que todo o material utilizado já faz parte da rotina do antibiograma. É um método que deve ser continuado, mas por se tratar de um método manual, ter interação entre outras enzimas como a AmpC e ter diferentes níveis de produção da enzima. Deve-se observar a possibilidade de falso-negativos (CLSI, 2013).

8. CONCLUSÃO

A prevalência de infecções avaliadas neste estudo mostrou uma grande quantidade de infecções no hospital em estudo. Uma grande diversidade de espécies bacterianas também foi observada, mas se tratando de multirresistências, os casos apesar de estarem em constante crescimento, não foram observadas multirresistências mais preocupantes como observado em hospitais localizados em grandes regiões próximas.

A presença dos genes produtores de ESBL estudados foi identificada com uma alta prevalência nos isolados deste estudo. O gene CTX-M demonstrou ser o principal ligado a produção de ESBL na região. Já os genes produtores de enzima beta-lactamase estudados, demonstraram resultados similares a outras regiões, com uma prevalência maior do gene TEM, seguido do gene SHV.

A correlação entre a identificação de genes produtores de ESBL e o teste de aproximação de discos, demonstrou que os resultados dos dois testes não são similares. Assim sendo o teste de aproximação de discos evidencia casos de falso-negativos, devido a outras enzimas que podem influenciar na sinergia entre os discos impregnados por antibióticos utilizados na técnica. Outra causa pode ser atribuída à baixa produção de ESBL pelos isolados, e assim, a quantidade da enzima não será suficiente para produzir o sinergismo entre os discos, consequentemente tornando impossível sua observação. Apesar do teste de aproximação de discos não ser uma técnica muito efetiva, ela se apresenta de extrema importância nas rotinas dos laboratórios clínicos, pois é uma técnica rápida de se realizar, utiliza os mesmos materiais utilizados no teste de antibiograma, levando a um baixo custo financeiro.

O estudo realizado é de grande importância epidemiológica. O conhecimento da prevalência dos genes auxilia em estratégias de combate das

bactérias produtoras de ESBL, além de mostrar uma prevalência de produção de ESBL através da técnica de PCR, mais confiável que dados demonstrados pelo método de aproximação de discos.



REFERÊNCIAS

ABRANTES P.M. *et al.* A qualidade da prescrição de antibióticos em ambulatórios da Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, MG. *Ciência e Saúde Coletiva*. Rio de Janeiro, v. 13, 2008.

AHMED A.M., NAKANO H., SHIMAMOTO T., The first characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Salmonella* in Japan. *J Antimicrob Chemother*; 54:283-284, 2004.

ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS K., WALTER, P., *Biologia Molecular da Célula*. 5ª edição - Porto Alegre: Artmed, 2010.

AMARANTE JMB., Prevalência de ESBL pode chegar até a 100% das Bactérias Isoladas em Hospitais. *Fato Hospitalar*; 3:4-6, 2002.

AMBLER, R.P., COULSON A.F., FRERE J.M., GHUYSEN J.M., JORIS B., FORSMAN M., LEVESQUE R.C., TIRABY G., WALEY S.G.. A standard numbering scheme for the class A beta-lactamases. *Biochem J*. 15;276 (Pt 1):269-70, 1991

ANDRADE, D., ANGERAMI, E.L.S. Reflexões acerca das infecções hospitalares às portas do terceiro milênio. *Medicina*, Ribeirão Preto. 32: 492-497, Out-Dez; 1999.

ANDRADE D., LEOPOLDO, V.C., HASS,V. Ocorrência de bactérias multirresistentes em um Centro de terapia Intensiva de Hospital Brasileiro de Emergências. *Revista Brasileira Terapia Intensiva*. Vol. 18, nº1, Jan/mar, 2006.

ARAKAWA Y., SHIBATA N., SHIBAYAMA K., KUROKAWA H., YAGI T., FUJIWARA H., GOTO M. Convenient test for screening Metallo-beta-lactamase-producing gram-negative bacteria by using thiol compounds. *J Clin Microbiol*. Jan;38(1):40-3, 2000.

ARAUJO, M.C. Estudo comparativo do perfil de sensibilidade de amostras de *Staphylococcus aureus* resistentes a metilina isoladas de pacientes internados em dois períodos diferentes, com intervalo de 10 anos. 2010. Tese (Curso de Pós-graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Clínica”) Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.

ARCHIBALD, L.K., Gram-negative, hospital-acquired infections: a growing problem. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25:809-811, 2004.

AHLUWALIA G., SHARMA S.K. Philanthropy and medical science: at last a new dawn for tuberculosis also! *Indian J Chest Dis Allied Sci.*; 49:71–73, 2007.

BABINI G.S., LIVERMORE D.M. Are SHV beta-lactamase Universal in *Klebsiella pneumoniae*? *Antimicrob Agents Chemother*; 44: 2230. Letter, 2000.

BELL J.M., CHITSAZ M., TURNIDGE J.D., BARTON M., WALTERS L.J., JONES R.N. Prevalence and significance of a negative extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) confirmation test result after a positive ESBL screening test result for isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: results from the SENTRY Asia-Pacific Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* May;45(5):1478-82, 2007.

BERTONCHELI C.M.; HÖRNER, R. Uma revisão sobre metalo-beta-lactamases. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44 (4): 577-599, 2008.

BONNET R. *et al.* A novel CTX-M beta-lactamase (CTX-M8) in cefotaxime-resistant *Enterobacteriaceae* isolated in Brazil. *Antimicrob Agents Chemother*, v. 44, n. 7, p. 1936-42, 2000.

BONNET R. Growing group of extended-spectrum β -lactamases: CTX-M enzymes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1-14, 2004.

BONOMO R.A.; ENDIMIANI A.; HUJER K. M.; PEREZ F. The continuing Challenger of ESBL. *Curr Opin Pharmacol*, p. 459-469, 2007.

BOPP C.A.; BRENNER F.W.; FIELDS P.I.; WELLS J.G.; STROCKBINE N.A. *Escherichia, Shigella, and Salmonella*. In: Murray, P.R.; Baron, E.JO; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.A.; Tenover, R.H. (eds). Manual of clinical microbiology. 8 (ed). Vol 1. Washington: ASM Press. pp.654-671, 2003.

BORGES L.F de A. E. Higiene das mãos de profissionais de saúde em um hospital brasileiro: adesão, controle de infecção e transmissão de *Staphylococcus aureus*. [tese de doutorado] Uberlândia (MG): Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia, 2009.

BRADFORD P.A. Extended-spectrum β -lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. Clin Microbiol Rev; 14:933-51. Review, 2001.

BRASIL, Ministério da Saúde. Consenso sobre o uso racional de antimicrobianos. Brasília., 36p. 2001

BRUN-BUISSON C., LEGRAND P., PHILIPPON A., MONTRAVERS F., ANSQUER M., DUVAL J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet. Aug 8;2(8554):302-6, 1987

BUSH K., JACOBY G.A., MEDEIROS A.A. A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure, Antimicrob Agents Chemother. Jun;39(6):1211-33, 1995

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

BUSTIN S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology, No. 25, pages 169-193, 2000.

BUSTIN STEPHEN A. Real-Time PCR. Encyclopedia of Diagnostic Genomics and Proteomics. University of London, UK, 2005.

CAETANO J.A. *et al.* Identificação de contaminação bacteriana no sabão líquido de uso hospitalar. Rev. Esc. Enferm. USP. 45(1):153-60. 2011.

CANTÓN R.; COQUE, T.M. The CTX-M β -lactamase pandemic. Current Opinion in Microbiology, v.9, p.1-10, 2006.

CAO V, LAMBERT T, NHU DQ, LOAN H.K, HOANG N.K, ARLET G, COURVALIN P. Distribution of extended-spectrum β -lactamases in clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Vietnam. Antimicrob Agents Chemother; 46:3739-43, 2002

CARTER, M.W.; OAKTON, K.J.; WARNER, M.; LIVERMORE, D. M. Detection of extended-spectrum beta-lactamases in *Klebsiellae* with the Oxoid combination disk method. J Clin Microbiol, v. 38, p. 4228–4232, 2000.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. 4a. ed. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, 250p. 1999.

CELENZA G., PELLEGRINI C., CACCAMO M., SEGATORE B., AMICOSANTE G., PERILLI M. Spread *bla*CTX-M-type and *bla*PER-2 beta-lactamase genes in clinical isolates from Bolivian hospital. J Antimicrob Chemother; 57: 9975-978, 2006

CLÍMACO E.C. Caracterização molecular de genes *bla*CTX-M presentes em *Klebsiella spp.* isoladas em hospital universitário do Brasil. 2007. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-28052007-093704/>>. Acesso em: 2013-01-04.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. M100-S23. Wayne, PA, USA, 2013

COUTO, R.C.; PEDROSA, T.M.G.; NOGUEIRA, J.M. Infecção hospitalar – epidemiologia, controle e tratamento. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Médica e Científica; 2003.

DAVIN-REGLI A., BOLLA J.M., JAMES C.E., LAVIGNE J.P., CHEVALIER J., GARNOTEL E., MOLITOR A., PAGÈS J.M. Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Curr Drug Targets*. Sep;9(9):750-9, 2008.

DECLOUR A., Outer Membrane Permeability and Antibiotic Resistance. *National Institutes of Health*. 1749 (5), 808-816, 2009.

DESHPANDE L.M., JONES R.N., FRITSCH T.R., SADER H.S. Occurrence of plasmidic AmpC type beta-lactamase-mediated resistance in *Escherichia coli*: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2004). *Int J Antimicrob Agents*. Dec;28(6):578-81, 2006.

DRIEUX L.; BROSSIER F.; SOUGAKOFF W.; JARLIER V. Phenotypic detection of extended-spectrum β -lactamase production in *Enterobacteriaceae*: review and bench guide. *Clin Microbiol Infect*, v. 14 (1), p. 90–103, 2008.

DROPPA M. Caracterização genotípica de cepas da família *enterobacteriaceae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido, isoladas de pacientes de um hospital da rede pública da cidade de São Paulo. 2006. Dissertação (Mestrado em Serviços de Saúde Pública) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/6/6135/tde-12022007-141647/>>. Acesso em: 2013-01-04.

DU BOIS S.K. MARRIOT M.S., AMYES S.G.B., TEM and SHV derived extended-spectrum beta-lactamases: relationship between selection, structure and function. *J. Antimicrob. Chemother*. 35:7-22. 1995.

DZIDIC S., BEDEKOVIC V. Horizontal gene transfer-emerging multidrug resistance in hospital bacteria. *Acta Pharmacol Sin*; 24:519-26, 2003.

EISENSTEIN, B.I.; ZALEZNIK, D.F. *Enterobacteriaceae*. In: Mandell, G.L.; Bennett, J.E.; Dolin, R. (eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 5th (ed). Vol 2. Philadelphia: Churchill Livingstone. pp.2294-2309, 2000.

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

FERRAREZE M.V.G. LEOPOLDO V.C. ANDRADE D. SILVA M.F.I. HAAS V.J. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que precedem? *Acta Paul Enferm*; 20(1):7-11, 2007.

FILHO, J.R.C.; PEREIRA, A.S.; SADER, H.S.; TOGNIM, B. Avaliação da acurácia de testes laboratoriais para a detecção de *Klebsiella pneumoniae* produtora de betalactamase de espectro estendido. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 39 (4), 2003.

FLAHERTY J.P., STOSOR V., Nonfermentative Gram-Negative Bacilli. *Hospital Epidemiology and Infection Control*. 3^a Ed. Philadelphia, 2004.

FLOSOS J., ROUSSOS C.; *Infection Control in the ICU*. RT magazine. 32, 2001.

FLUIT A.C., JONES M.E., SCHMITZ F.J., ACAR J., GUPTA R., VERHOEF J. Bacteremia in European hospitals, incidence and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis*. 30:454-460, for the SENTRY Participants Group, 2001.

FLUIT A.C., VISSER M.R., SCHMITZ, F.J. Molecular detection of Antimicrobial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev*. vol.14 no. 4: 836-871, 2001.

GALES A.C., MENEZES L.C., SILBERT S., SADER H.S. Dissemination in distinct Brazilian regions of an epidemic carbapenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* producing SPM metallo-beta-lactamase. *Journal Antimicrob Chemother*. ;52:699-702. 2003

HOSOGLU S., HASCUHADAR M., YASAR E., USLU S., ALDUDAK B. Control of an *Acinetobacter baumannii* outbreak in a neonatal ICU without suspension of service: a devastating outbreak in Diyarbakir, Turkey. *Infection*. Publicação on line, DOI 10.1007/s15010-011-0180-y, 2011.

HALEY R.W., CULVER, D.H. The nationwide nosocomial infection rate: a new need for virtual statistic. *Am J Epidemiol*; 121:159, 1985.

HERNÁNDEZ J.R., PASCUAL A., CANTÓN R., MARTÍNEZ-MARTÍNEZ L. *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* productores de betalactamasas de espectro extendido em hospitales españoles (Proyeto GEIH-BLEE 2000). *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínicas*; 21:77-82. 2003.

HOWARD C., DAAL A., KELLY G., SCHOONEVELDT J., NIMMO G., GIFFARD P.M. Identification and minisequencing-based discrimination of SHV beta-lactamases in nosocomial infection-associated *Klebsiella pneumoniae* in Brisbane, Australia. *Antimicrob Agent Chemother*; 46: 659-664. 2002.

Jacoby G.A., Medeiros A.A., More extended-spectrum beta-lactamases. *Antimicrob. Agents Chemother*, 35(9):1697. DOI: 10.1128/AAC.35.9.1697. 1991.

JACOBY T.S. Associação entre o consumo de antimicrobianos e multirresistência bacteriana em centro de terapia intensiva de hospital universitário brasileiro, 2004-2006. (dissertação de mestrado) Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2008.

JAIN A., MONDAL R.; TEM & SHV genes in extended spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella* species beta their antimicrobial resistance pattern. *Indian J Med Res.*; 128(6): 759–764, 2008.

JANDA W.M., SCHERECKBERGER P.C., Win, W.C.-Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. Fifth Edition. p.189-252. 1997.

JARLIER V.; NICOLAS M.H.; FOURNIER G.; PHILIPPON, A. Extended broad-spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to newer beta-lactam agents in Enterobacteriaceae: hospital prevalence and susceptibility patterns. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 28: 302-307, 1988.

JUNIOR M.A.S.; FERREIRA, E.S., CONCEIÇÃO, G.C. β -lactamases de espectro ampliado (ESBL): um importante mecanismo de resistência bacteriana e sua detecção no laboratório clínico. *Revista Newslab*, 63: 152-174, 2004.

KIFFER C., HSIUNG A., OPLUSTIL C., SAMPAIO J., SAKAGAMI E., TURNER P., MENDES C. & THE MYSTIC BRAZIL GROUP. Antimicrobial Susceptibility of Gram Negative Bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. *Braz J Infect Dis Jun;9(3):216-24*, 2005.

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

KONEMAN E.W., ALLEN S.D., JANDA W.M., SCHRECKENBERGER PC, WINN WC. Diagnóstico Microbiológico - texto y atlas color. Ed. Médica panamericana. 5ªed. Buenos Aires, 1999.

KUBOYAMA R. H. Detecção de cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de β -lactamases de espectro estendido em pacientes assistidos em hospitais terciários na cidade de Campinas: epidemiologia molecular e fatores de risco. 2009. 166 f. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

KOROLKOVAS, A.; FRANÇA, F. F. A. C.; CUNHA, B. C. A.; Dicionário Terapêutico Guanabara. 7ª ed., Guanabara Koogan S.A.: Rio de Janeiro, 2000.

LINCOPAN N., LEIS R., VIANELLO M.A., ELMOR DE ARAUJO M.A., RUIZ A.S. & MAMIZUKA E. Enterobacteria producing extended-spectrum β -

lactamases and IMP-1 Metallo- β -lactamases isolated from Brazilian hospitals. J Med Microbiol. 7: 1-3, 2006.

LIM, K.T., YASIN R., YEO C.C., PUTHUCHEARY S., THONG K.L. Characterisation of multidrug resistant ESBL-producing *Escherichia coli* isolated from hospitals in Malaysia. J Biomed Biotechnol. 2009.

LIMA M.E.; ANDRADE D.; HASS V.J. Avaliação prospectiva da ocorrência de infecção em pacientes críticos de unidades de terapia intensiva. Rev. Bras. Terap. Intens., v.19, n.3, p.342-7, 2007.

LIVERMORE D.M., WOODFORD N. The beta-lactamase threat in Enterobactériaceae, *Pseudomonas* and *Acinetobacter*. Trends Microbiol. Sep;14(9):413-20, 2006.

MACKAY I.M. Real-time PCR in the microbiology laboratory. Clinical Microbiology and Infection. Volume 10 Number 3, March 2004.

MARTINS-LOUREIRO M., MORAES B.A., MENDONÇA V.L., ROCHA-QUADRA M.R., SANTOS-PINHEIRO G., DUTRA-ASENSI M., Molecular epidemiology of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* isolated for neonatal intensive care unit patients involved in hospital infection cases in Rio de Janeiro, Brazil. Rev Latinoam Microbiol, 43(2): 88-95, 2001.

MASTERTON R.G. MISFUD A.J., RAO G.G.; Hospital Isolation Precautions Working Group. Review of hospital isolation and infection control precautions. J Hosp Infect; 54(3): 171-3, 2003.

MINARINI L.A.R., GALES A.C., PALAZZO I.C.V., DARINI A.L.C. Prevalence of community-occurring extended spectrum β -lactamase-producing enterobacteriaceae in Brazil. Curr Microbiol. 54:335–341. 2007.

MOHANTY S., GAIND R., RANJAN R., DEB M., Use of the cefepime-clavulanate ESBL Etest for detection of extended-spectrum beta-lactamases in AmpC co-producing bacteria. J Infect Dev Ctries. Nov 21;4(1):24-9., 2009.

MOHR JF., 3rd. Update on the efficacy and tolerability of meropenem in the treatment of serious bacterial infections. Clin Infect Dis. Sep 15;47 Suppl 1:S41-51, 2008.

MOOLENAR R. L. *et al.* A prolonged outbreak of *Pseudomonas aeruginosa* in a neonatal intensive care unit: did staff fingernails play a role in disease transmissibility. Control Hosp. Epidemiol, v. 21 p. 80-85, 2000.

MOURA M.E.B., RAMOS M.N., SOUSA, C.M.M., SILVA A.O., ALVES M.S.C.F.,. Infecção Hospitalar no olhar de enfermeiros portugueses: representações sociais. Texto Contexto Enfermagem, Florianópolis; 17(4): 743-9, 2008.

MOGHADDAM M.N., FORGHANIFARD M.M., MOSHREFI S. Prevalence and molecular characterization of plasmid-mediated Extended-Spectrum β -Lactamase genes (*bla*TEM, *bla*CTX and *bla*SHV) Among Urinary *Escherichia coli* Clinical Isolates in Mashhad, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences Vol. 15, No. 3, 833-839. 2012.

MURCHAN S., KAUFFMANN M.E., DEPLANO A., RYCK R., STRUELENS M., ZINN C.E. *et al.* Harmonization of Pulsed-Field Gel Electrophoresis Protocols for Epidemiological Typing of Strains of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: a Single Approach Developed by Consensus in 10 European Laboratories and Its Application for Tracing the Spread of Related Strains. Journal of Clinical Microbiology. vol. 41 no. 4 1574-1585. April, 2003.

MURRAY P.R., BARON E.J., TENOVER F.C., YOLKEN R.H. Manual of Clinical Microbiology. 8^a ed. Washington DC: American Society for Microbiology; Cap. 47, p 719-25: *Pseudomonas*, 2003.

MURRAY P.R., BARON E.J. JORGENSEN J.H., LANDRY M.L., PFALLER, M.A., Manual of Clinical Microbiology, 9^a ed. American Society for Microbiology: Washington, v. 1 cap. 42, p. 649 – 669, 2007.

NASEHI L., SHAHCHERAGHI F., NIKBIN V. S. PER, CTX-M, TEM and SHV Beta-lactamases in Clinical Isolates of *Klebsiella pneumoniae* Isolated from Tehran, Iran. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, Vol. 13, No. 3, 111-118, 2010.

NETO V.A., NICODEMO A.C., VASCONCELLOS H. Antibióticos na prática Médica. 6ª Edición. Editorial Sarver ,S.P. Brasil, 2007.

NIKAIDO H. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. Microbiol Mol Biol Rev. Dec;67(4):593-656, 2003.

O'BRIEN T.F. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: how use of an Antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clinical Infectious Diseases, 34 (3): 78-84, 2002.

OLIVEIRA, C.F. de *et al* . Prevalência das famílias TEM, SHV e CTX-M de β -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 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822009000500014&lng=en&nrm=iso>. access on 04 Jan. 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822009000500014>.

OPLUSTIL C., MENDES C., SAKAGAMI E., TURNER P., KIFFER C., The mystic Brazil group. Antimicrobial Susceptibility in Intensive Care Units: MYSTIC Program Brazil 2002. Braz J Infect Dis 9(1): 44-51, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Vencendo a resistência microbiana [texto na Internet]. OMS; 2000. Disponível em: <http://www.ccih.med.br/vencendoresistencia.html> Acessado em 26/04/2014.

PAGANI L., MAGLIAVACCA R., PALECCHI L., MATT C., GIACOBONE E., AMICOSANTE G., ROMERO E., ROSSOLINI G. M. Emerging extended-

spectrum betalactamase in *Proteus Mirabilis*. J Clin Microbiol; 40(4): 1549-52, 2002.

PATERSON D.L., BONOMO R.A., Extended-spectrum beta-lactamase: a clinical update. Microbiol. Rev., 18:657-686, 2005.

PAVEZ M. Caracterização molecular da resistência aos carbapenêmicos em enterobactérias isoladas em hospitais brasileiros.125 f. Dissertação (mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

PAVEZ M., NEVES P., DROPA M., MATTÉ M.H., GRINBAUM R.S., ELMOR DE ARAÚJO M.R., MAMIZUKA E.M., LINCOPAN N. Emergence of carbapenemresistant *Escherichia coli* producing CMY-2-type AmpC {beta}-lactamase in Brazil. J Med Microbiol. Dec;57(Pt 12):1590-2, 2008.

PAGANI L., MIGLIAVACCA R., PALLECCHI L., MATTI C., GIACOBONE E., AMICOSANTE G. *et al.* Emerging extended-spectrum β -lactamases in *Proteus mirabilis*. J Clin Microbiol, 40:1549-52, 2002.

PATERSON D.L., The epidemiological profile of infections with multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* species . Clin Infect Dis.;43(2):S43–8., 2006.

PAYNE D.J., MARRIOTT M.S., AMYES S.G. Characterisation of a unique ceftazidime-hydrolysing beta-lactamase, TEM-E2. J Med Microbiol. Jun; 32(2):131-4, 1990.

PEIRANO G., SEKI L.M., VAL PASSOS V.L., PINTO M.C., GUERRA L.R., ASENSI M.D. Carbapenem-hydrolysing {beta}-lactamase KPC-2 in *Klebsiella pneumoniae* isolated in Rio de Janeiro, Brazil. J Antimicrob Chemother. Nov 20, 2008.

PEREIRA et. al. A infecção hospitalar e suas implicações para o cuidar da Enfermagem. Texto e contexto de Enfermagem. v. 14, n. 2, p. 256. Goiânia, , Abr-Jun. 2005.

PFALLER M.A., SEGRETI J., Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum beta-lactamases. *Clin Infect Dis*, 42:S153-63, 2006

PIDDOCK L.J. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev*. Apr; 19(2):382-402, 2006.

PITOUT J.D.D., LAUPLAND K. Extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae: an emerging public-health concern. *Lancet Infectious Diseases*, v. 8, p. 159-166, 2008.

PFAFFL, MICHAEL W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, Vol. 29. No. 9, 2001.

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

PFALLER M.A., SEGRETI J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. *Clin Infect Dis*; 42:S153-63, 2006.

POURNARAS S., *et al.* Spread of efflux pump-overexpressing, non-metallo-beta-lactamase-producing, meropenem-resistant but ceftazidime-susceptible *Pseudomonas aeruginosa* in a region with blaVIM endemicity. *J. Antimicrob. Chemother.* 56:761–764, 2005.

PROCOP G.W.; COCKERILL II, F. Enterites causadas por *Escherichia coli* e espécies de *Shigella* e *Salmonella*. In: WILSON, W.R.; SANDE, M.A.; HENRY, N.K.; DREW, W.L.; RELMAN, D.A.; STECKELBERG, J.M.; GERBERDING, J.L. (Eds). *Doenças infecciosas. Diagnóstico e tratamento*. Porto Alegre: Artmed. pp 563-580, 2004.

QUINTEROS M., RADICE M., GARDELLA N., RODRIGUES M. M., COSTA N., KORBEMFELD D. *et al.* Extended-spectrum beta-lactamase in

Enterobacteriaceae in Buenos Aires, Argentina, Public Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother*; 47: 2864-2867. 2003.

RANG H.P.; DALE M.M.; RITTER J.M.; MOORE PK. *Farmacologia*. 7ª. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RAO GG. Risk and factors for the spread of antibiotic-resistant bacteria. *Drugs*; 55(3): 323-30, 1998.

RICHARDS M., THURSKY K., BUISING K.. *Epidemiology, Prevalence, and Sites of Infections in Intensive Care Units*. *Semin Respir Crit Care Med*; 24(1), 2003

RONALD A.R.; LUDWIG, E. Urinary tract infection in adults with diabetes. *Int. J. Antimicrob. Agents* 17:287-292, 2001.

ROSSI F. The challenges of antimicrobial resistance in Brazil. *Clin. Infect. Dis.* ; v.52, n.9, p.1138-1143. 2011.

ROSSI F., ANDREAZZI, D.B. *Resistência Bacteriana Interpretando o Antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 118p, 2005.

SADER H., JONES R., GALES A., SILVA J., PIGNATARI A., & SENTRY PARTICIPANT GROUP. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. *Braz J Infect Dis* 8(1):25-79, 2004.

SAMPAIO J.L.M., *Mecanismos de Ação dos Antibióticos*. In NETO A, NICODEMO V, LOPES AC, VASCONCELOS H. *Antibióticos na Prática Médica* 6. ed. São Paulo, v. 1, p. 17-25, 2007.

SANTOS N.Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Contexto Enferm*; 13(n.esp): 64-70, 2004.

SANTOS N.Q. O uso indiscriminado de antibióticos na ecologia das bactérias antibiótico-resistentes associadas à problemática da infecção hospitalar:

conhecimento e prática de profissionais de saúde, a luz da ética da responsabilidade de Hans Jonas [tese]. Florianópolis (SC): Programa de Pós-Graduação em Enfermagem/UFSC; 2002.

SCHWABER M.J., GRAHAM C.S., SANDS B.E., GOLD H.S., CARMELI Y. Treatment with a broad-spectrum cephalosporin versus piperacillin-tazobactam and the risk for isolation of broad-spectrum cephalosporin-resistant *Enterobacter* species. *Antimicrob Agents Chemother*; 47:1882-1886. 2003.

SCHWABER M.J., NAVON-VENEZIA S., KAYE K.S., BEN-AMI R., SCHWARTZ D., CARMELI Y. Clinical and Economic Impact of bacteremia with Extended-Spectrum- β -Lactamase- producing *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother*; 50(4):1257-1262, 2006.

SEKAR U., SHANTHI M. The expanding family of beta- lactamases. *J Acad Clin Microbiol*; 11(2):72-86. 2009.

SEREFHANOGLU K. et al . Bloodstream infections caused by ESBL-producing *E. Coli* and *K. pneumoniae*: risk factors for multidrug-resistance. *Braz J Infect Dis*, Salvador , v. 13, n. 6, Dec. 2009.

SERRANO P.H. Responsible use of antibiotics in aquaculture. *FAO Fisheries Technical Paper*, 469. 97p., 2005.

SHAH A.A., HASAN F., AHMED, S., HAMEED, A. Extended spectrum beta-lactamases (ESBLs): characterization, epidemiology and detection. *Crit Rev Microbiol*, v. 30, p. 25-32, 2004.

SHIJU M.P., YAASHAVANTH R., NARENDRA N. Detection of extended spectrum β -lactamase production and multidrug resistance in clinical isolates of *E. coli* and *K. pneumoniae* in Mangalore. *J Clin Diagn Res* 4, 2442–2445, 2010.

SILBERT S., BOYKEN L., HOLLIS R.J., PFALLER M.A. Improving typeability of multiple bacterial species using pulsed-field gel electrophoresis and thiourea. *Diagn Microbiol Infect Dis*. v. 47, n. 4, p. 619-21. 2003.

SILVA K.C., LICOPAN N., Epidemiologia das betalactamases de espectro estendido no Brasil: impacto clínico e implicações para o agronegócio. J Bras. Patol. Med. Lab., v.48, n.2, p. 91-99, 2012.

SILVEIRA G.P. NOME F. GESSER J.C. SÁ M.M. TERENCE H. Estratégias utilizadas no combate a resistência bacteriana. Quim. Nova vol. 29 no.4 São Paulo Jul/Ago. 2006.

SINGH A. GOERING R.V. SIMJEE S. FOLEY S.L. ZERVOS, M.J. Application of Molecular Techniques to the Study of Hospital Infection. Clin. Microbiol. Rev. vol. 19 no. 3 512-530. July, 2006.

SIROT D., SIROT J., LABIA R., MORAND A., COURVALIN P., DARFEUILLE-MICHAUD A., Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae*: identification of CTX-1, a novel beta-lactamase. J Antimicrob Chemother; 20(3):323-34. 1987.

STÜRENBURG E., MACK D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy, and infection control. J Infect; 47:273-95. Review, 2003.

SUPERTI S.V., AUGUSTI G., ZAVASCKI A.P. Risk factors for and mortality of extended-spectrum- β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli* nosocomial bloodstream infections. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, São Paulo , v. 51, n. 4, Aug. 2009 .

TANSARLI G.S., POULIKAKOS P., KAPASKELIS A., FALAGAS M.E.. Proportion of extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing isolates among Enterobacteriaceae in Africa: evaluation of the evidence—systematic review. J. Antimicrob. Chemother. 2014 69: 1177-1184.

TIERNEY L.M., MACPHEE S.J., PAPADAKIS M.A., editores. Current Medicina - Diagnóstico e Tratamento; 45ª edição. MacGraw Hill; pág. 1202, 2006.

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

THOMSON K.S., SANDERS C.C. Detection of Extended-Spectrum β -Lactamases in Members of the Family Enterobacteriaceae: Comparison of the Double-Disk and Three-Dimensional Tests. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*, p. 1877-1882, 1992.

TOFTELAND S., HALDORSEN B., DAHL K.H., SIMONSEN G.S., STEINBAKK M., TIMOTHY R., WALSH T.R., SUNDSFJORD A. Effects of Phenotype and Genotype on Methods for Detection of Extended-Spectrum- β -Lactamase-Producing Clinical Isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Norway. *Journal of Clinical Microbiology*, 45 (1): 199-205, 2007.

TRABULSI L.R., ALTHERTHUM F., GOMPETZ O.F., CANDELAS J. A. N. *Microbiologia* 4ª Ed. São Paulo: Ateneu; Cap. 49, p. 259 – 68: *Pseudomonas aeruginosa*. 2003.

TURNER P.J. MYSTIC Europe 2007: activity of meropenem and other broadspectrum agents against nosocomial isolates. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Feb;63(2):217-22, 2009.

WALEY S.G., An explicit model for bacterial resistance: application to β -lactam antibiotics. *Microbiol. Sci.* 4:143-146, 1987.

WOLLHEIM C., Epidemiologia molecular de *Escherichia coli* e *Klebsiella spp.* produtoras de beta-lactamase de espectro ampliado, Dissertação de mestrado. Universidade de Caxias do Sul; Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2009.

WOODFORD N., FAGAN E., ELLINGTON M.J.; Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum β -lactamases; *J. Antimicrob. Chemother.* 57: 154-155, 2006.

WEBER D., RAASCH R., RUTALA W. Nosocomial infections in ICU. 115:34S-41S, 1999.

YUM J.H., KIM S., LEE H., YONG D., LEE K., CHO S.N., CHONG Y., Emergence and wide dissemination of CTX-M type ESBLs and CMY-2 and DHA-1 type AmpC beta-lactamase in Korean respiratory isolates of *Klebsiella pneumoniae*. Journal Korean Medicine Science, 20: 961-965, 2005.

ZAOUTIS E.T, GOYAL M., CHU J.M., COFFIN S.E. *et al.* Risk Factors for and Outcomes of Bloodstream Infection caused by Extended- Spectrum β -Lactamases Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* Species in Children. Pediatrics;115(4):942-949, 2005.

ZAVASCKI A.P., MACHADO A.B., DE OLIVEIRA K.R., SUPERTI S.V., PILGER D.A., CANTARELLI V.V., PEREIRA P.R., LIEBERKMECHT A.C., BARTH A.L. KPC-2- producing *Enterobacter cloacae* in two cities from Southern Brazil. Int J Antimicrob Agents., 2009.

APÊNDICES

Tabela I: Prevalência de contaminação conforme a amostra (Dados em percentual)

Micro-organismo	AP	ESC	FO	FE	HP	HC	LB
<i>Acinetobacter sp.</i>	84,93	5,48	-	-	-	-	1,37
<i>Enterobacter sp.</i>	70,60	5,88	5,88	5,88	-	5,88	-
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	39,13	-	8,69	-	-	4,35	-
<i>Haemophilus sp.</i>	-	33,33	66,67	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	100,0	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella sp.</i>	64,40	11,86	1,70	-	-	3,39	1,70
<i>Proteus mirabilis</i>	46,66	-	-	-	6,67	6,67	-
<i>Proteus vulgaris</i>	66,67	33,33	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	79,08	6,98	2,32	-	-	-	4,65
<i>Pseudomonas sp.</i>	85,72	-	14,28	-	-	-	-
<i>Serratia sp.</i>	75,00	-	-	-	-	-	25,00
<i>Staphylococcus aureus</i>	84,62	2,56	2,56	2,56	-	2,56	-
<i>Staphylococcus sp.</i>	30,00	10,00	25,00	-	-	5,00	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	84,85	6,06	3,03	-	-	3,03	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	68,75	18,75	-	-	-	-	-
<i>Neisseria Meningitidis</i>	-	-	-	-	-	-	-

AP= aspirado brônquico, ESC= escarro, FO= ferida operatória, FE= fragmento do esterno, HP=hematoepatico, HC= hemocultura, LB= lavado brônquico

Tabela II: Prevalência de contaminação conforme a amostra (Dados em percentual)

Micro-organismo	LT	LP	LCR	PA	PC	FS	UR
<i>Acinetobacter sp.</i>	1,37	-	-	-	4,11	1,37	1,37
<i>Enterobacter sp.</i>	-	-	-	-	-	-	5,88
<i>Enterococcus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	100,00
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-	4,35	-	4,35	39,13
<i>Haemophilus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebsiella sp.</i>	-	5,08	-	1,70	3,39	1,70	5,08
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-	6,67	-	-	33,33
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas Aeruginosa</i>	-	-	-	2,32	4,65	-	-
<i>Pseudomonas sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Serratia sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-	-	-	-	5,14
<i>Staphylococcus sp.</i>	-	-	-	-	25,00	-	5,00
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	-	-	-	3,03	-	-	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	-	6,25	-	-	-	6,25
<i>Neisseria Meningitidis</i>	-	-	100,0	-	-	-	-

LT= Líquido de tórax, LP= líquido pleural, LCR= liquor, PA= parede abdominal, PC= ponta de cateter, FS= ferida sacro, UR= urina

Tabela III. Percentual de resistência das bactérias com relação aos antibióticos testados

	<i>Acinetobacter sp.</i>	<i>Enterobacter sp.</i>	<i>Enterococcus sp.</i>	<i>E.coli</i>
Amoxicilina/ clavulanato	1,37	88,23	-	21,73
Cefepima	75,34	5,88	-	21,73
Ciprofloxacina	72,60	35,29	66,66	30,43
Tobramicina	57,53	-	-	-
Levofloxacina	71,23	-	-	-
Gentamicina	72,60	29,42	66,66	30,43
Piperacilina	71,23	-	-	-
Piperacilina/ tazobactam	23,28	-	-	4,34
Ampicilina/ Sulbactam	19,17	-	-	-
Ceftazidima	57,53	29,42	-	21,73
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	75,34	23,52	-	43,47
Ácido Nalidixico	-	5,88	-	8,69
Ampicilina	-	100	33,33	43,47
Amicacina	72,60	17,64	-	4,34
Cefalotina	-	94,11	-	26,08
Ceftriaxona	-	29,41	-	21,73

Cefuroxima	-	64,70	-	21,73
Norfloxacina	-	5,88	66,66	8,69
Estreptomicina	-	-	66,66	-
Tetraciclina	-	-	100,0	-
Cloranfenicol	-	-	-	-
Nitrofurazona	-	5,88	-	-
Perfloxacina	-	-	-	-
Aztreonam	-	-	-	-
Clindamicina	-	-	-	-
Eritromicina	-	-	-	-
Oxacilina	-	-	-	-
Ticarciclina	-	-	-	-
Penicilina	-	-	-	-
Imipenem	2,74	-	-	-
Meropenem	1,37	-	-	-

Tabela IV. Percentual de resistência das bactérias com relação aos antibióticos testados

	<i>P. aeruginosa</i>	<i>Serratia sp.</i>	<i>Stenotrophomonas sp.</i>
Amoxicilina/ clavulanato	-	62,50	-
Cefepima	4,00	37,50	-
Ciprofloxacina	52,00	37,50	-
Tobramicina	-	-	-
Levofloxacina	-	-	3,03
Gentamicina	42,00	37,50	-
Piperacilina	12,00	-	-
Piperacilina/ tazobactam	4,00	12,50	-
Ampicilina/ Sulbactam	-	-	-
Ceftazidima	2,00	37,50	-
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	-	37,50	6,06
Ácido Nalidixico	-	-	-
Ampicilina	-	100,0	-
Amicacina	32,00	12,50	-
Cefalotina	-	100,0	-
Ceftriaxona	2,00	37,50	-
Cefuroxima	-	100,0	-

Norfloxacina	-	-	-
Estreptomicina	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-
Cloranfenicol	-	-	-
Nitrofurazona	-	-	-
Perfloxacina	2,00	-	-
Aztreonam	14,00	-	-
Clindamicina	-	-	-
Eritromicina	-	-	-
Oxacilina	-	-	-
Ticarciclina	46,00	-	-
Penicilina	-	-	-
Imipenem	-	-	-
Meropenem	-	-	-

Tabela V. Percentual de resistência das bactérias com relação aos antibióticos testados

	<i>Klebsiella sp.</i>	<i>Proteus spp.</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
Amoxicilina/ clavulanato	49,15	16,66	-
Cefepima	45,76	5,55	-
Ciprofloxacina	35,59	-	-
Tobramicina	-	-	-
Levofloxacina	-	-	6,25
Gentamicina	38,98	27,77	-
Piperacilina	-	-	-
Piperacilina/ tazobactam	22,03	-	-
Ampicilina/ Sulbactam	-	-	-
Ceftazidima	47,45	5,55	-
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	42,37	16,66	25,00
Ácido Nalidixico	5,08	11,11	-
Ampicilina	98,30	38,88	-
Amicacina	5,08	-	-
Cefalotina	64,40	38,88	-
Ceftriaxona	54,23	11,11	-
Cefuroxima	55,93	22,22	-

Norfloxacina	3,39	-	-
Estreptomicina	-	-	-
Tetraciclina	-	-	25,00
Cloranfenicol	-	-	-
Nitrofurazona	5,08	27,77	-
Perfloxacina	-	-	-
Aztreonam	-	-	-
Clindamicina	-	-	6,25
Eritromicina	-	-	12,50
Oxacilina	-	-	-
Ticarciclina	-	-	-
Penicilina	-	-	18,75
Imipenem	-	-	-
Meropenem	-	-	-

Tabela VI. Percentual de resistência das bactérias com relação aos antibióticos testados

	<i>Haemophilus sp.</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus sp.</i>
Amoxicilina/ clavulanato	8,33	28,20	35,00
Cefepima	-	-	-
Ciprofloxacina	-	20,51	35,00
Tobramicina	-	-	-
Levofloxacina	-	-	-
Gentamicina	-	23,07	25,00
Piperacilina	-	-	-
Piperacilina/ tazobactam	-	-	-
Ampicilina/ Sulbactam	-	-	-
Ceftazidima	-	-	-
Sulfametoxazol/ Trimetoprima	50,0	10,25	15,00
Ácido Nalidixico	-	-	-
Ampicilina	8,33	-	-
Amicacina	-	-	-
Cefalotina	-	-	-
Ceftriaxona	-	-	-
Cefuroxima	-	-	-

Norfloxacina	-	2,56	-
Estreptomicina	-	-	-
Tetraciclina	-	-	-
Cloranfenicol	8,33	5,12	10,00
Nitrofurazona	-	-	-
Perfloxacina	-	-	-
Aztreonam	-	-	-
Clindamicina	-	25,64	65,00
Eritromicina	-	46,15	35,00
Oxacilina	-	12,82	65,00
Ticarciclina	-	-	-
Penicilina	-	-	-
Imipenem	-	-	-
Meropenem	-	-	-

Tabela VII: com resultados de PCR e teste de aproximação de discos das 62 amostras analisadas:

Nº	Espécie	Teste de Aprox. de discos	SHV	TEM	CTX-M1	CTX-M2	CTX-M9	CTX-M
1	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N	N
	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	N	N	N	Positivo	N	Positivo
3	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	N	N	N	Positivo
	<i>Pseudomonas spp.</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
5	<i>Klebsiella spp.</i>	N	N	Positivo	N	Positivo	N	Positivo
6	<i>Klebsiella spp.</i>	N	N	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
	<i>Escherichia coli</i>	N	N	N	N	N	Positivo	N
8	<i>Klebsiella spp.</i>	N	N	Positivo	N	Positivo	N	N
9	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	N	Positivo	N	Positivo
10	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
	<i>Escherichia coli</i>	N	N	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
12	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
13	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
14	<i>Klebsiella spp.</i>	N	N	N	N	N	N	Positivo
15	<i>Klebsiella spp.</i>	N	N	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia coli</i>	N	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia coli</i>	N	N	N	N	N	N	N
	<i>Escherichia coli</i>	N	N	N	N	N	N	Positivo
19	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo

	<i>Escherichia</i>							
20	<i>coli</i>	N	N	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
	<i>Enterobacter</i>							
21	<i>spp.</i>	N	N	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
22	<i>coli</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
23	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
24	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
	<i>Pseudomonas</i>							
25	<i>spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
26	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N
	<i>Escherichia</i>							
27	<i>coli</i>	N	N	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
28	<i>coli</i>	N	N	Positivo	Positivo	N	Positivo	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
29	<i>coli</i>	N	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
30	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	N	N	N	Positivo	Positivo
31	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
32	<i>coli</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
33	<i>coli</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
34	<i>coli</i>	N	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
35	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	Positivo
36	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	N	N	N	N	Positivo
37	<i>Escherichia coli</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
38	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
39	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	N	N	N	Positivo

	<i>Escherichia</i>							
40	<i>coli</i>	Positivo	N	Positivo	N	N	N	Positivo
41	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
42	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	N	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
43	<i>coli</i>	Positivo	Positivo	N	Positivo	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
44	<i>coli</i>	N	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
45	<i>coli</i>	Positivo	N	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
46	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
47	<i>coli</i>	N	N	Positivo	N	N	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
48	<i>coli</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	N
49	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
50	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo	Positivo
51	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
52	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	Positivo
53	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	N	N	N	Positivo
54	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
55	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	Positivo	N	Positivo
56	<i>Klebsiella spp.</i>	N	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo
57	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	N	N	N	Positivo	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
58	<i>coli</i>	Positivo	N	Positivo	N	Positivo	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
59	<i>coli</i>	N	N	Positivo	N	Positivo	N	Positivo
	<i>Escherichia</i>							
60	<i>coli</i>	N	N	Positivo	N	N	Positivo	Positivo

61	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	N	Positivo	N	N	N	Positivo
62	<i>Klebsiella spp.</i>	Positivo	Positivo	Positivo	N	Positivo	N	Positivo

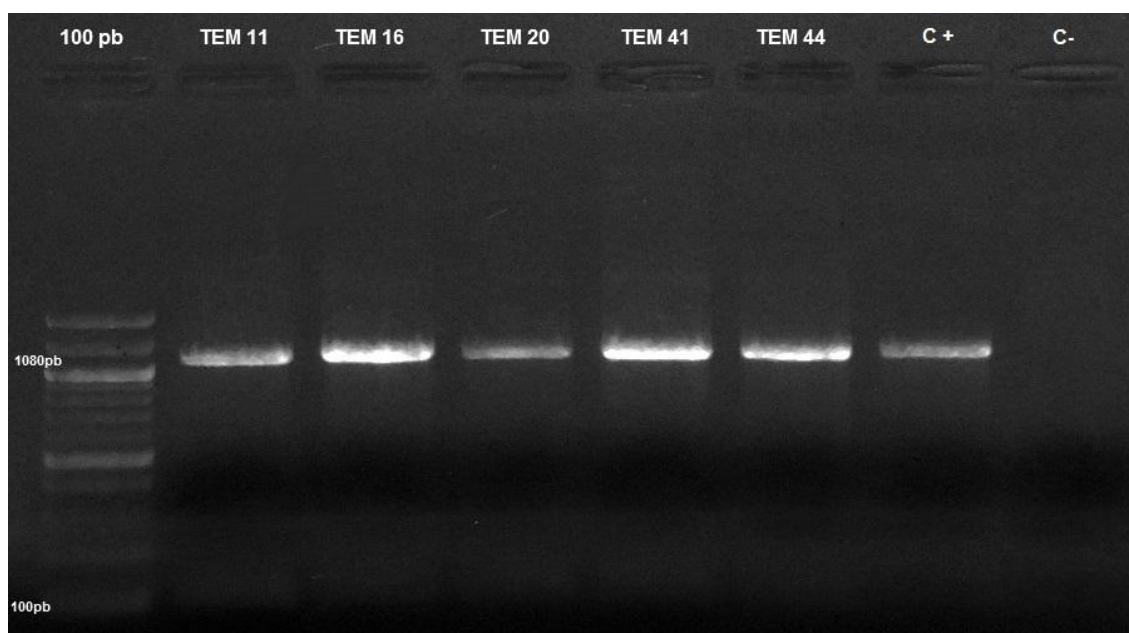


Figura I: Imagem representativa da presença do fragmento de 1080pb referente ao gene TEM nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC IOC.- Fiocruz CCBH 4955 *Klebsiella pneumoniae*). 100pb = Marcador de peso molecular 100 pares de base. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.

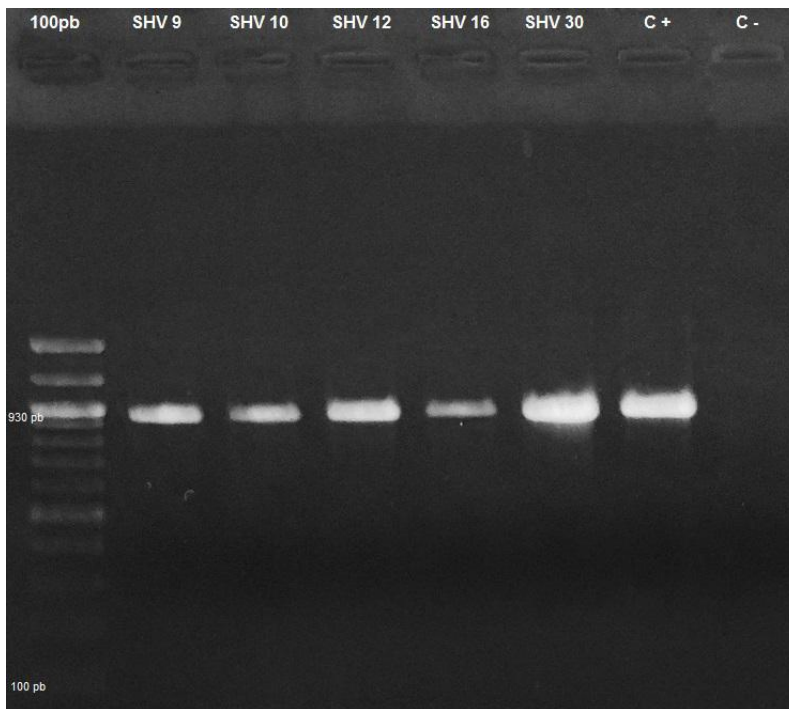


Figura II: Imagem representativa da presença do fragmento de 930pb referente ao gene SHV nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC IOC.- Fiocruz CCBH 4955 *Klebsiella pneumoniae*). M= Marcador de peso molecular 100pb. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.

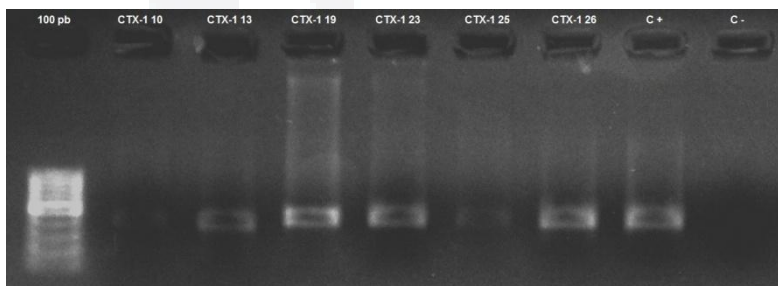


Figura III: Imagem representativa da presença do fragmento de 415pb referente ao gene CTX-M 1 nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC IOC.- Fiocruz CCBH 4955 *Klebsiella pneumoniae*). M= Marcador de peso molecular 100pb. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.

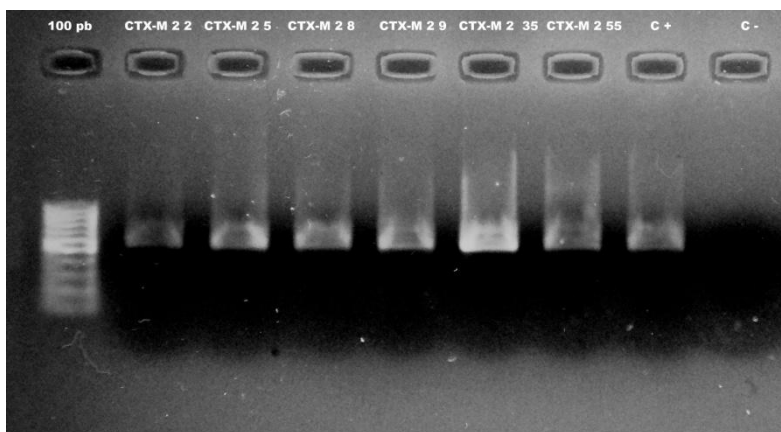


Figura IV: Imagem representativa da presença do fragmento de 552pb referente ao gene CTX-M2 nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC 700603.- Fiocruz CCBH 3858 *Klebsiella pneumoniae*). M= Marcador de peso molecular 100pb. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.

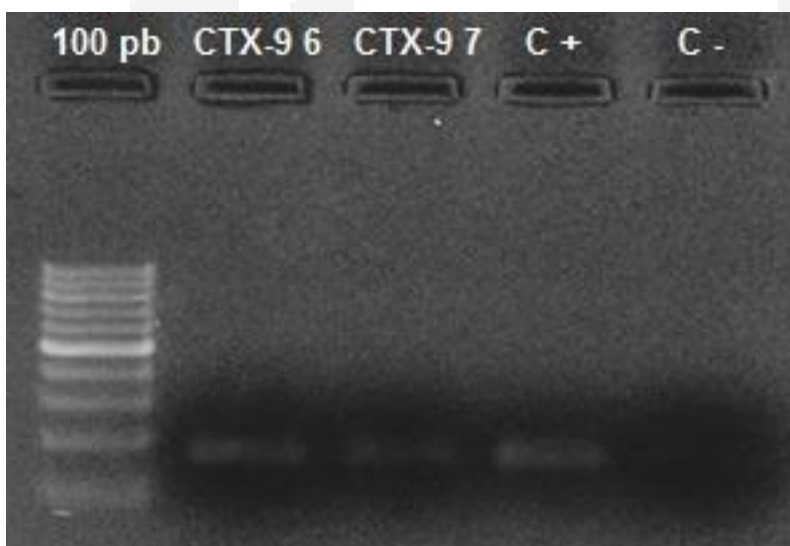


Figura V: Imagem representativa da presença do fragmento de 205pb referente ao gene CTX-M9 nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC 700603.- Fiocruz CCBH 3858 *Klebsiella pneumoniae*). M= Marcador de peso molecular 100pb. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.

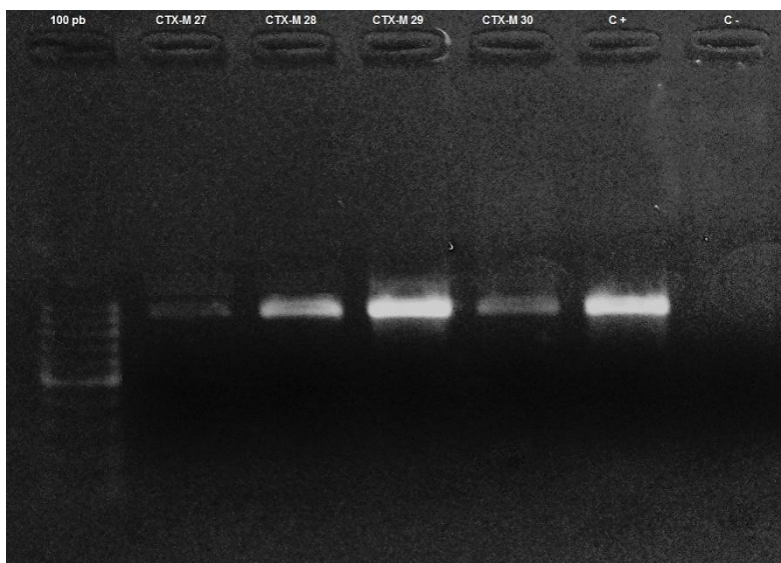


Figura VI: Imagem representativa da presença do fragmento de 550pb referente ao gene CTX-M nas amostras analisadas. C- = controle negativo. C+ = Controle positivo (ATCC 700603.- Fiocruz CCBH 3858 *Klebsiella pneumoniae*). M= Marcador de peso molecular 100pb. Gel de agarose a 1.5% corado com Brometo de Etídeo.