

POLYANA SILVA PEREIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES DO TIPO ESBL E
KPC EM CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLADAS DE
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

NITERÓI

2009

POLYANA SILVA PEREIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES DO TIPO ESBL E
KPC EM CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLADAS DE
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal Fluminense como
requisito para obtenção do Grau de Bacharel.
Área de Concentração: Análises Clínicas**

ORIENTADORA: DR^a. MARISE DUTRA ASENSI

UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE

NITERÓI

2009

POLYANA SILVA PEREIRA

**ESTUDO DA PRODUÇÃO DE BETA-LACTAMASES DO TIPO ESBL E
KPC EM CEPAS DE *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* ISOLADAS DE
HEMOCULTURAS EM HOSPITAIS DO RIO DE JANEIRO**

**Trabalho de conclusão de curso apresentado
ao Curso de Graduação em Biomedicina da
Universidade Federal Fluminense como
requisito para obtenção do Grau de Bacharel.
Área de Concentração: Análises Clínicas**

Aprovada em novembro de 2009.

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Marise Dutra Asensi – Orientadora

FIOCRUZ

Prof. Dr^º. Nero de Araújo Barreto

UFF

Prof^ª. MSc. Liliane Miyuki Seki

FIOCRUZ

NITERÓI

2009

Pereira, Polyana Silva.

Estudo da produção de beta-lactamases do tipo ESBL e KPC em cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de hemoculturas em hospitais do Rio de Janeiro.

- Niterói: [s.n.], 2009.

58 f.: il., 30cm.

Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Biomedicina – Análises Clínicas)

- Universidade Federal Fluminense, 2009.

1. *Klebsiella pneumoniae*. - 2. ESBL - 3. KPC - 4. PCR

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que me ajudaram na execução desse trabalho e a todos que me acompanharam e apoiaram nesses quatro anos de Universidade.

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais, Lúcia Helena e Hermínio. Eles me deram o dom da vida, educação, amor, carinho e acima de tudo são um grande exemplo de vida para mim. Ambos começaram a trabalhar muito cedo, vieram de famílias humildes e hoje conseguiram um lugar na sociedade, possibilitando que eu tenha conquistado um diploma universitário e todas as coisas que almejei. Agradeço eles por todo o carinho, amor, apoio, conversas e cuidados recebidos durante toda a minha vida. Amo vocês!

Ao meu irmão, pelo companheirismo, amizade e compreensão.

A minha madrinha Valéria, que sempre me acompanhou e me ajudou nos momentos em que mais precisei.

Ao meu namorado Guilherme, pelo amor, amizade, carinho, companheirismo nesses anos de faculdade.

Aos meus amigos da faculdade, pelos momentos de diversão e estudo que compartilhamos. Davi, Felipe, Guilherme, Gabriella, Renata, Leonardo, Maria Isabel, Tiago, Emily, Thais, Bruna, Diego, Vinícius, Raquel, Daniela, Clara, Claudia, muito obrigada.

Aos professores da UFF e a Coordenação da Biomedicina, que me transmitiram o seu precioso conhecimento, que pretendo guardar para vida toda.

A Dra. Marise Asensi, pela orientação e apoio durante o desenvolvimento desse trabalho.

Aos integrantes do laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar, local onde aprendi grande parte das coisas que eu sei. Liliane, Júlia, Karyne, Fernanda, Thiago, Felipe, Paula, Ana Paula, Fernanda, Carlos. Agradeço também ao Setor de Meio de Cultura da Bacteriologia, principalmente ao Seu Evaldo, pela ajuda na confecção do projeto.

Aos hospitais estudados, pelo fornecimento das cepas. Ao Sérgio Antônio da Cruz Melo do HUPE, Lia Cristina Galvão dos Santos e Vera Lúcia do Amaral Val Passos do HGB, Maria José de Souza e Sonia Maria Coelho Chaves do HSE, Jupira Miron Caballido e Sílvio José Mello Junior do HUAP, André Nogueira Olendzki e Luciana Lemes Zamalloa do HNMD.

*“Educação é aquilo que a maior parte das pessoas recebe,
muitos transmitem e poucos possuem”*

Karl Kraus

RESUMO

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo da família *Enterobacteriaceae*, mais freqüentemente isolado como causa de pneumonias, infecções do trato urinário, bacteremias e sepse. Um dos temas de grande relevância clínica compreende a resistência de Enterobactérias, principalmente da espécie *K.pneumoniae*, aos antimicrobianos devido a produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs), que conferem resistência a antimicrobianos de amplo espectro de ação. Outro mecanismo importante, que tem emergido nos últimos anos, está relacionado à resistência ao grupo de antimicrobianos carbapenemas, devido à produção de carbapenemase do tipo KPC. O trabalho teve como objetivo a detecção fenotípica e genotípica da produção de ESBL e KPC em 121 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, oriundas de hemoculturas de pacientes internados em cinco hospitais sentinelas situados na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro. A detecção de ESBL foi realizada através de testes fenotípicos de disco aproximação e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os perfis de susceptibilidade aos antibióticos foram realizados através do método disco-difusão em ágar. A detecção de KPC foi realizada nas cepas consideradas resistentes ou com sensibilidade diminuída aos carbapenemas através do Teste de Hodge Modificado e PCR. A produção de ESBL foi observada em 52% (63/121) das cepas. Os isolados foram resistentes a: cefoxitina (10%), imipenem (1,5%), meropenem (1,5%), ertapenem (19%), piperaciclina / tazobactam(24%) , gentamicina (38%), amicacina (19%), ciprofloxacina (73%) e sulfametoxazole/trimetopima (83%). Observamos que 93% das cepas tinham o gene *bla*_{CTX-M}, 51% *bla*_{SHV} e 56% *bla*_{TEM}. A resistência ou sensibilidade diminuída ao Ertapenem estava presente em 12 cepas (19%) e dessas, 9 foram produtoras de KPC. Os resultados apontam para uma alto número de isolados ESBL positivos e emergência da resistência aos carbapenemas mediada pela produção de KPC na região do Rio de Janeiro. Esses resultados revelam a necessidade de mais estudos e pesquisas nessa temática, com intuito de melhor entender os mecanismos e a disseminação de resistência, promovendo melhoria na qualidade da assistência hospitalar a fim de diminuir a morbidade e a mortalidade, além dos custos com as internações.

ABSTRACT

Klebsiella pneumoniae is a gram-negative bacilli, which belongs to *Enterobacteriaceae* family, most frequently isolated as a cause of pneumonia, urinary tract infections, bacteremia and sepsis. One of the most relevant topics in clinical includes the resistance of *Enterobacteriaceae*, mainly the species *K.pneumoniae*, to antibiotics due to production of Extended-Spectrum β -lactamases (ESBLs), that confer resistance to broad-spectrum antimicrobials. Another important mechanism that has emerged in recent years is related to resistance to the group of antimicrobial carbapenems due to production of KPC-type carbapenemase. The study aimed at the phenotypic and genotypic detection of ESBL and KPC production in 121 strains of *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from September 2007 to September 2008, derived from blood cultures of hospitalized patients in five sentinel hospitals located in the metropolitan area of the state of Rio de Janeiro. The detection of ESBL was performed by phenotypic tests of disk approximation and Polymerase Chain Reaction (PCR). The profiles of susceptibility to antibiotics were performed by the disk diffusion method. Detection of KPC was performed on strains considered resistant or with decreased susceptibility to carbapenems by the modified Hodge Test and PCR. ESBL production was observed in 52% (63/121) of the strains. The isolates were resistant to: ceftazidime (10%), imipenem (1.5%), meropenem (1.5%), ertapenem (19%), piperacillin / tazobactam (24%), gentamicin (38%), amikacin (19%), ciprofloxacin (73%) and sulfamethoxazol / trimetopim (83%). It was observed that 93% of the strains had the gene *bla*_{CTX-M}, 51% *bla*_{SHV} and 56% *bla*_{TEM}. Resistance or decreased susceptibility to Ertapenem was present in 12 strains (19%) and 9 of this amount were KPC producer. The results indicate a high number of ESBL positive isolates and the emergence of resistance to carbapenems mediated by the production of KPC in the region of Rio de Janeiro. The results show the need for further studies and research in this area, aiming to better understand the mechanisms and spread of resistance, promoting improved quality of hospital care to reduce morbidity and mortality, and costs to the hospital.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Figura esquemática do teste fenotípico para detecção de ESBL e foto de cepa considerada positiva pelo teste..... 27

Figura 2: Desenho esquemático do Teste de Hodge modificado e foto representando cepas consideradas positivas e negativas pelo teste..... 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Iniciadores específicos para a detecção dos genes *bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, e *bla_{CTX-M}* utilizados nas reações de PCR..... 28

Tabela 2: Iniciadores específicos para a detecção do gene *bla_{KPC}* utilizados nas reações de PCR..... 30

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Distribuição das cepas de *K.pneumoniae* ESBL negativas e positivas por hospital..... 31
- Quadro 2:** Distribuição de 63 cepas de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivas isoladas de pacientes de cinco hospitais sentinelas: Hospital Geral de Bonsucesso, Hospital dos Servidores do Estado, Hospital Naval Marcílio Dias, Hospital Universitário Antônio Pedro e Hospital Universitário Pedro Ernesto, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, de acordo com o trimestre de isolamento..... 32
- Quadro 3:** Distribuição de 63 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de cinco hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, de acordo com o setor de atendimento..... 33
- Quadro 4:** Porcentagem de susceptibilidade aos antimicrobianos de 63 cepas de *K.pneumoniae* isoladas de pacientes oriundos de cinco hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, realizado através do método de disco-difusão em ágar..... 34
- Quadro 5:** Perfil de co-resistência aos antimicrobianos dos 63 isolados de *K.pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração..... 35
- Quadro 6:** Porcentagem de positividade das 63 cepas de *K.pneumoniae* em relação aos genes codificadores de beta-lactamases..... 36
- Quadro 7:** Perfis de produção das beta-lactamases das 63 cepas de *K.pneumoniae* estudadas..... 36
- Quadro 8:** Análise da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) das 12 cepas resistentes ao Ertapenem..... 37
- Quadro 9:** Perfis de produção das beta-lactamases das nove cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC estudadas..... 38

LISTA DE ABREVIATURAS

AK	Amicacina
AMC	Amoxicilina/ Ácido Clavulânico
ATCC	<i>American Type and Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
CAZ	Ceftazidima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CIP	Ciprofloxacina
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standards Institute</i>
CTX	Cefotaxima
CTX-M	Beta-lactamase Cefotaximase
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMB	<i>Eosin Methylene- blue Agar</i>
ERT	Ertapenem
ESBL	Beta-Lactamase de Espectro Estendido
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FOX	Cefoxitina
GN	Gentamicina
HGB	Hospital Geral de Bonsucesso
HNMD	Hospital Naval Marcílio Dias
HSE	Hospital dos Servidores do Estado
HUAP	Hospital Universitário Antônio Pedro
HUPE	Hospital Universitário Pedro Ernesto
IPM	Imipenem
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae Carbapenemase</i>
LAPIH	Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar
MEM	Meropenem
MgCl₂	Cloreto de Magnésio
MYSTIC	Estudo Epidemiológico: <i>Meropenem Yearly Susceptibility Test Information Collection</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PTZ	Piperacilina/ Tazobactam
SENTRY	Estudo Epidemiológico: <i>Antimicrobial Surveillance Program</i>
SHV	Beta-lactamase <i>Sulphydryl variable</i>
SIM	<i>Sulfide Indole Motility Agar</i>
SXT	Sulfametoxazole/ Trimetropima
TBE	Tampão Tris- Borato EDTA
TEM	Beta-lactamase Temoneira

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1.	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	15
1.2.	Antimicrobianos beta-lactâmicos.....	16
1.3.	Resistência bacteriana.....	18
1.4.	Produção de β -lactamases de espectro estendido.....	19
1.5.	Produção de carbapenemase (KPC).....	21
1.6.	Infecções nosocomiais causadas por ESBLs.....	22
1.7.	Relevância do estudo.....	23
2.	OBJETIVOS	25
3.	METODOLOGIA	26
3.1.	Seleção e identificação das cepas bacterianas.....	26
3.2.	Detecção fenotípica de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).....	26
3.3.	Teste de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	27
3.4.	Extração do DNA total pelo método da Guanidina.....	27
3.5.	Detecção dos genes codificadores de ESBLs por PCR	28
3.6.	Eletroforese em gel de agarose.....	29
3.7.	Detecção de carbapenemase do tipo KPC.....	29
4.	RESULTADOS	31
4.1.	Detecção fenotípica da produção de β -lactamases de espectro estendido (ESBLs).....	31
4.2.	Distribuição das cepas ESBL positivas.....	31
4.2.1.	Distribuição das cepas segundo os hospitais e período de isolamento.....	31
4.2.2.	Distribuição das cepas segundo os setores dos hospitais.....	32
4.3.	Determinação dos perfis de susceptibilidade aos antimicrobianos.....	33
4.4.	Detecção dos genes codificadores de ESBLs por técnica de PCR.....	36
4.5.	Detecção de carbapenemase do tipo KPC.....	37
5.	DISCUSSÃO	39
6.	CONCLUSÕES	50
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Klebsiella pneumoniae*

O gênero *Klebsiella*, pertencente a família *Enterobacteriaceae*, foi nomeado por Trevisan em 1885 para homenagear o microbiologista alemão Edwin Klebs (1834 - 1913). A primeira espécie de *Klebsiella* foi descrita como um bacilo encapsulado isolado de paciente com rinoscleroma e foi denominada *Klebsiella rhinoscleromatis* por Trevisan em 1887. Em 1982, uma bactéria foi isolada dos pulmões de um paciente que havia morrido de pneumonia e esta foi chamada por Trevisan em 1887 de *Klebsiella pneumoniae* (DROPA, 2006).

As espécies do gênero *Klebsiella* foram originalmente diferenciadas de acordo com suas características patogênicas, com doenças causadas ou quanto a sua origem. Posteriormente foram classificadas de acordo com a utilização de diversos substratos, provas bioquímicas e atividade enzimática. Finalmente, os estudos moleculares permitiram a identificação de novas espécies e a reclassificação das já existentes, alterando a taxonomia deste gênero. O gênero *Klebsiella* foi definido por sequenciamento de DNA e permitiu a identificação de cinco espécies: *K. oxytoca*; *K. planticola*; *K. terrigena*, *K. mobilis* e *K. pneumoniae*. Esta última é subclassificada em três subespécies: *Klebsiella pneumoniae* subespécie *pneumoniae*, *Klebsiella pneumoniae* subespécie *ozaenae* e *Klebsiella pneumoniae* subespécie *rhinoscleromatis*. Entre as três subespécies do gênero, *K. pneumoniae* subespécie *pneumoniae* é a mais frequente (PODSCHUN e ULLMANN, 1998; MARTÍNEZ et al., 2004).

Klebsiella spp. são onipresentes na natureza, sendo encontrados na água, esgoto, solo e na superfície das plantas. Também colonizam mucosas de mamíferos como seres humanos, cavalos e suínos. Nos seres humanos, *K. pneumoniae* faz parte da microbiota normal da maioria dos indivíduos, sendo encontrada na nasofaringe e principalmente no trato gastrointestinal (BROWN, 1973).

K. pneumoniae é um bastonete Gram-negativo aeróbio facultativo, não esporulado, imóvel, não produtor de gás sulfídrico (H₂S) e da enzima citocromo oxidase, utiliza o citrato como única fonte de carbono, possui a enzima lisina descarboxilase. No ágar EMB (*Eosin-Methylene-Blue*), produz colônias róseas, brilhantes, com aspecto elevado, de consistência mucóide com centro negro (KONEMAN et al., 2001).

Klebsiella é um gênero bastante conhecido como causa de infecções associadas a hospitalização. Dentre as síndromes clínicas mais frequentes citam-se: pneumonias, infecções do trato urinário, manifestações de feridas, bacteremia, rinite crônica atrófica, artrites, enterites, meningites em crianças e sepse. Como patógeno oportunista, *Klebsiella* spp. é frequentemente isolada de pacientes imunocomprometidos hospitalizados e com doenças de base como diabetes mellitus ou obstrução pulmonar crônica, causando alta taxa de mortalidade entre esse grupo de pacientes. Em um estudo americano, foi observado que *Klebsiella* spp. é isolada como causa de 8% de todas as infecções hospitalares na Europa e nos Estados Unidos, sendo a espécie *K.pneumoniae* a mais prevalente. Nos Estados Unidos, essa bactéria é o oitavo mais importante patógeno hospitalar (MADSON et al., 1994, PODSCHUN e ULMAN, 1998).

Os principais reservatórios para a transmissão de *Klebsiella* no ambiente hospitalar são equipamentos médicos contaminados, produtos derivados de sangue, trato gastrointestinal dos doentes e as mãos não higienizadas dos profissionais de saúde. A capacidade que este microorganismo possui de espalhar-se rapidamente leva frequentemente a surtos nosocomiais, especialmente em unidades neonatais (KUHN et al., 1993).

1.2. Antimicrobianos beta-lactâmicos

Os antimicrobianos beta-lactâmicos foram os primeiros a serem descritos e são até hoje, mesmo depois de 80 anos da sua descoberta, o maior grupo de antimicrobianos usados na prática clínica. A característica comum deste vasto grupo de antibióticos é a presença do anel beta-lactâmico na estrutura química da molécula. Esses compostos agem como inibidores da síntese da parede celular bacteriana (estrutura vital para as bactérias) e possuem baixa toxicidade (atuam na parede celular bacteriana, estrutura inexistente em células eucariotas). Todavia, para que o beta-lactâmico seja ativo, o anel beta-lactâmico deve estar unido a outros radicais (outros anéis ou cadeias lineares). A associação de diferentes cadeias lineares aos anéis modificam as propriedades do composto, resultando nos quatro tipos de beta-lactâmicos que existem hoje, disponíveis comercialmente: penicilinas, cefalosporinas, monobactâmicos e carbapenemas. Dentro de cada grupo, pequenas alterações na estrutura química são capazes de modificar as características dos antibióticos, como: espectro de ação, afinidade por receptores e resistência as beta-lactamases (SUÁREZ e GUDIOL, 2009).

A penicilina foi o primeiro beta-lactâmico descoberto. Alexander Fleming, em 1928, observou que o crescimento de *Staphylococcus aureus* era impedido na presença do fungo *Penicillium notatum* e em 1930, Cecil George Pain, um aluno de Fleming, utilizou pela primeira vez filtrados da cultura do fungo *Penicillium* como tratamento para pacientes com diversas lesões cutâneas. Contudo, somente em 1940, Ernst Chain conseguiu obter um extrato estável da penicilina. Nos dias atuais, as penicilinas não são indicadas para tratamento de infecções de cepas com elevado nível de resistência, pelo fato das penicilinas exibirem um restrito espectro de ação, poderem causar vários fenômenos de hipersensibilidade, e serem hidrolisadas pela maioria das beta-lactamases conhecidas (SUÁREZ e GUDIOL, 2009 ; GREENWOOD, 2007).

Outra classe importante é a das cefalosporinas. Essa classe foi descoberta por Giuseppe Brotzu, quando estudava a microbiota presente em esgoto, com o intuito de descobrir a ocorrência de beta-lactâmicos naturais. Um dos organismos isolados foi o fungo *Cephalosporium*, que apresentava atividade inibitória contra diversas espécies bacterianas, incluindo *Salmonella typhi*, causadora da febre tifóide. O composto ativo foi isolado e deu origem aos primeiro antibióticos dessa classe: Cefalosporina N (ativa contra Gram-negativos) e Cefalosporina P (ativa contra Gram-positivas). Comercialmente hoje existem cefalosporinas de primeira à quarta geração. As cefalosporinas de primeira geração, como cefalotina e cefalexina não são administradas por via oral e têm boa atividade contra bactérias Gram-negativas e positivas. As de segunda geração, como cefuroxima e cefoxitina possuem como característica uma estrutura química mais estável. As cefalosporinas de terceira geração, como cefotaxima, ceftriaxona e ceftazidima, e as de quarta geração (cefepime) possuem uma maior atividade sob bactérias Gram-negativas (GREENWOOD, 2007).

A classe dos carbapenemas foi primeiramente descrita através da análise do caldo de fermentação de um fungo, o actinomiceto *Streptomyces cattleya*, no ano de 1976, onde se observou a produção de um composto denominado Thienamycin. Esse composto apresentava um amplo espectro de atividade antibacteriana, tanto contra Gram-negativos, quanto para Gram-positivos. Hoje, os três principais antibióticos da classe são: imipenem, meropenem e ertapenem. Estes são os beta-lactâmicos com maior espectro de ação, sendo antibiótico de escolha para o tratamento de cepas produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (GREENWOOD, 2007; KROPP et al., 1980).

A classe dos monobactâmicos foi inicialmente descrita com a observação da produção de beta-lactâmicos monocíclicos por cepas de *Chromobacterium violaceum*, *Acetobacter sp.*, e *Agrobacterium radiobacter* em 1981. Hoje, o principal membro dessa classe é o aztreonam, que é um antimicrobiano estável a algumas beta-lactamases, mas possui um espectro de ação reduzido, somente tendo efeito contra Gram-negativos aeróbios (GREENWOOD et al., 2007).

1.3. Resistência Bacteriana

Os fenômenos de resistência bacteriana à antibióticos beta-lactâmicos são conhecidos desde a descoberta do primeiro antibiótico da classe, a penicilina. A primeira beta-lactamase a ser descrita foi identificada em uma cepa de *Escherichia coli* antes mesmo da liberação do uso da penicilina para a prática médica (ABRAHAM e CHAIN, 1940). As beta-lactamases estão amplamente distribuídas entre bactérias Gram positivas e negativas, e em patógenos Gram-negativos, a sua produção representa o maior fator de resistência a beta-lactâmicos. O mecanismo de ação dessas enzimas é através da hidrólise do anel beta-lactâmico presente no antibiótico, inativando-o (AMBLER, 1980).

Com o ampliado uso da penicilina na prática médica, pode-se observar a emergência de resistência em gram-positivos nos anos 40, em cepas de *S. aureus* através da produção de penicilinases (BRADFORD, 2001), enquanto que a primeira beta-lactamase encontrada em gram-negativos foi a TEM-1, descrita no início da década de 1960 (DATTA e KONTOMICHALOU, 1965).

Ao longo dos últimos 20 anos, novos beta-lactâmicos têm sido desenvolvidos com o intuito de serem resistentes à ação hidrolítica das beta-lactamases. No entanto, a cada nova classe que tem sido usada para tratamento dos pacientes, novas beta-lactamases emergem e provocam resistência às novas classes de fármacos. Esses fenômenos de resistência são devido principalmente à pressão seletiva do uso e o abuso da utilização dos novos antibióticos. Uma dessas novas classes de drogas desenvolvidas foi a classe das cefalosporinas de amplo espectro de ação (terceira geração), que se tornou amplamente utilizada para o tratamento de infecções graves geradas por bactérias gram-negativas na década de 1980 (BRADFORD, 2001).

Não surpreendentemente, a resistência a estes antibióticos de amplo espectro teve uma rápida emergência. A primeira destas enzimas capazes de hidrolizar cefalosporinas de terceira geração foi a SHV-2, encontrada em uma única cepa de *Klebsiella ozaenae* isolada na Alemanha (KLIEBE et al., 1985). Devido a seu maior espectro de atividade, estas enzimas foram chamadas de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs).

1.4. Produção de Beta-lactamases de Espectro Estendido

β -lactamases de espectro estendido são definidas como enzimas das classes A ou D (classificação de Ambler), ou das classes 2be ou 2d (classificação de Bush, Jacoby e Medeiros) capazes de hidrolizar cefalosporinas de terceira geração (oximino-cefalosporinas), possuem o aminoácido serina no sítio de ação catalítico e geralmente são inibidas por compostos como ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam (BUSH et al., 1995; BRADFORD, 2001; STÜRENBURG e MACK, 2003; PFALLER e SEGRETTE, 2006)

Atualmente, existem mais de 300 diferentes ESBLs descritas, sendo a maioria derivada das enzimas TEM ou SHV mutadas (BRADFORD, 2001, LAHEY STUDIES). Sua detecção tem sido observada com mais frequência em microrganismos do gênero *Klebsiella*, principalmente na espécie *K. pneumoniae* (JACOBY e MEDEIROS, 1991); além de outros representantes da família *Enterobacteriaceae*, tais como *Escherichia coli* e, com menor frequência *Proteus mirabilis*, *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Salmonella* spp. (PHILIPPON, et al., 1989a.; MARIOTTE, NORDMAN e NICOLAS, 1994).

A incidência de *Klebsiella pneumoniae* produtora de ESBL nos Estados Unidos tem sido relatada em torno de 5 % (JACOBY, 1996). Uma percentagem de 14 a 16% de cepas de *Klebsiella* de origem clínica tem sido relatada como produtora de ESBL na França e na Inglaterra (SIROT et al., 1995). Um estudo incluindo 36 hospitais brasileiros revelou que 48% das amostras de *K. pneumoniae* isoladas eram produtoras de ESBL (SADER et al., 2004). No Hospital da Universidade Federal do Rio de Janeiro em 2000, 46,4% das amostras de *K. pneumoniae* eram produtoras de ESBL (MARTINS, 2001).

Os principais problemas de resistência a antimicrobianos na América Latina, principalmente no Brasil, são entre outros os bastonetes Gram-negativos da família *Enterobacteriaceae* produtoras de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs). As taxas

de Enterobactérias produtoras de ESBLs, especialmente *K. pneumoniae* e *Escherichia coli*, estão entre as mais altas do mundo. Além da resistência as cefalosporinas, penicilinas de amplo espectro e monobactâmicos, estes isolados também têm mostrado altos níveis de resistência à outros antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos e fluoroquinolonas, se tornando cepas multirresistentes aos antimicrobianos utilizados normalmente na clínica (SADER et al., 2004).

As ESBLs mais freqüentemente encontradas são do tipo TEM, SHV e CTX-M (PATERSON, 2006). A beta lactamase TEM-1 é a enzima mais comumente encontrada em bactérias gram-negativas. TEM-1 foi primeiramente descrita em uma cepa de *Escherichia coli* em 1965, em Atenas, na Grécia, oriunda de uma paciente chamada Temoneira (por isso a designação TEM). Essa enzima é capaz de hidrolizar ampicilina, carbenicilina, oxacilina e cefalotina, mas é ineficiente contra cefalosporinas de amplo espectro. Seu primeiro derivado foi a enzima TEM-2, que difere da TEM-1 por alteração em um aminoácido e uma mudança no ponto isoelétrico (5,6 comparado com 5,4). TEM-12 foi a primeira ESBL dessa classe descrita. Ela foi isolada de uma *Klebsiella oxytoca*, apresentando um perfil de resistência a ceftazidima em Liverpool, na Inglaterra em 1982. As enzimas TEM-1, TEM-2 e TEM-13, por não apresentarem fenótipo de resistência às cefalosporinas de terceira geração, não são consideradas ESBLs.

As enzimas do tipo SHV são mais comumente encontradas em cepas de *K.pneumoniae*, onde o gene *bla_{SHV-1}* se encontra no cromossomo. A denominação dessa enzima se refere a “Sulphydryl variável”. A produção de SHV-1 está relacionada com a resistência a ampicilina, ticarciclina e piperaciclina. A alteração que ocorre na enzima SHV-1 que promove o fenótipo de ESBL é a substituição de uma glicina por serina na posição 238 e também pela substituição de lisina por glutamato na posição 240. A maioria das beta-lactamases SHV têm fenótipo ESBL, com exceção da SHV-4, SHV-10 e SHV-11 (PATERSON e BONOMO, 2005; DROPA, 2006).

A primeira CTX-M beta-lactamase foi isolada na Alemanha em 1989 e desde então se encontra altamente disseminada em todos os continentes. Ela tem sido isolada frequentemente de *Salmonella* spp., *E.coli*, *Klebsiella* spp. e outros gêneros da família *Enterobacteriaceae*. Essa classe de beta-lactamases hidroliza preferencialmente cefotaxima, mas também é

eficiente contra as outras cefalosporinas. Sua estrutura molecular não é muito relacionada as outras duas ESBLs, SHV e TEM. Os grupos de enzimas CTX mais prevalentes são CTX-M-1, CTX-M-2 e CTX-M-8. As CTX-M beta-lactamases são melhor inibidas pelo tazobactam, do que sulbactam e ácido clavulânico (BRADFORD, 2001; GAZOULI et al., 1998 e KNOTHE, 1983).

1.5. Produção de Carbapenemase (KPC)

Apesar de ainda não tão comum, alguns autores já relatam o aparecimento de casos de Enterobactérias, como a *K. pneumoniae* e *Enterobacter* spp. com resistência a carbapenemas, devido a presença de uma carbapenemase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). A primeira cepa contendo KPC foi isolada na Carolina do Norte, nos Estados Unidos, de uma cepa de *Klebsiella pneumoniae*, apresentando elevada concentração mínima inibitória (CIM) para os carbapenemas (YIGIT et al., 2001). Esse tipo de resistência já foi relatado em diversos países, como Colômbia, Grécia, Israel, França, China e Índia (COLE et al., 2009). No Brasil, essa carbapenemase foi encontrada primeiramente em 2006, em cepas de *K.pneumoniae* isoladas de urina e sangue, num hospital do Recife, mas já foram descritas cepas contendo KPC em outros estados, como Rio de Janeiro e São Paulo (PEIRANO et al., 2009).

Para a identificação da produção de carbapenemases do tipo KPC por isolados clínicos, o Clinical Laboratory and Standarts Institute (CLSI) preconiza que seja realizado o teste de difusão em ágar para análise da sensibilidade aos carbapenemas e o teste de Hodge modificado. Um indicativo da produção dessas carbapenemases é a resistência ou a sensibilidade diminuída (halo de inibição menor ou igual a 21 mm) para quaisquer dos carbapenemas e um resultado do teste de Hodge positivo (CLSI, 2009; LEE et al., 2000). Nos laboratórios clínicos com uma extensa rotina laboratorial essas técnicas não são usualmente empregadas, logo a detecção dessas carbapenemases fica a cargo de métodos automatizados. As metodologias automatizadas, apesar de sua enorme importância para a identificação dos microrganismos de uma maneira rápida e fidedigna, são muitas vezes falhos na identificação de bactérias resistentes aos carbapenemas. Em um estudo de QUALE e colaboradores foram comparados cinco métodos automatizados mais utilizados na rotina laboratorial, utilizando as mesmas cepas, frente aos carbapenemas. Infelizmente, foi observada uma variação de 7% a

87% de resistência a carbapenemas entre os mesmos isolados, mostrando que esses métodos não são suficientemente eficazes para detecção dessas enzimas (QUALE, 2008).

A produção de KPCs por isolados clínicos é um grande problema de saúde pública, já que estas enzimas conferem resistência aos antibióticos comumente utilizados na prática médica, tornando o tratamento mais difícil e custoso. Outro fato relevante é que os genes que codificam essa beta-lactamase estão localizados em elementos móveis do DNA genômico, como plasmídios, representando um alto poder de disseminação entre cepas. Outro fato importante é que os antibióticos da classe dos carbapenemas são os antibióticos de escolha para tratamento de bactérias produtoras de ESBLs, que são o fenótipo de resistência até o momento mais observado (HOSSAIN et al., 2004; BRATU et al., 2005; LANDMAN et al., 2005; PATERSON, 2006).

1.6. Infecções Nosocomiais causadas por ESBLs

Enterobactérias produtoras de ESBL são reconhecidas como importantes agentes etiológicos de infecções hospitalares, responsáveis por pneumonias e infecções do trato urinário especialmente em pacientes críticos e atualmente são descritas em percentuais endêmicos e epidêmicos em hospitais de todo o mundo (WINOKUR et al., 2001; PATERSON, 2006; LANDMAN et al., 2007). As infecções hospitalares contribuem para maiores índices de morbidade e mortalidade, tempos de internação prolongados, custos altos e principalmente trazem ameaça constante de disseminação de bactérias multi-resistentes (LANDMAN et al., 2007).

Os relatos são escassos sobre a incidência de infecção hospitalar no Brasil, porém dados de um estudo realizado pelo Ministério da Saúde em 1994, descreve que o índice de infecção hospitalar entre pacientes internados era 15,5%, valor que é equivalente ao aceito pela OMS, mas bem acima da média dos países desenvolvidos (OPAS, 2004; OMS, 2004). Os principais fatores de risco para o surgimento de infecções hospitalares são o uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro, internações prolongadas (principalmente em UTI), severidade da doença, entubação e ventilação mecânica, uso de cateteres e exposição prévia a antimicrobianos de qualquer classe (KLIEBE et al., 1985; BRADFORD, 2001; STÜRENBURG e MACK, 2003).

Dados da Rede Nacional de Monitoramento de Resistência Microbiana em Serviços de Saúde, obtidos no período de Julho de 2006 a Junho de 2008, em que foram monitoradas as infecções primárias da corrente sanguínea em pacientes internados em UTIs de 97 hospitais sentinelas do Brasil mostraram que os bastonetes Gram-negativos mais frequentemente isolados foram: *Klebsiella pneumoniae* (13%), *Pseudomonas aeruginosa* (11%), *Acinetobacter sp* (11%), *Enterobacter sp.* (6%), e *Escherichia coli* (3%). Os isolados de *Klebsiella pneumoniae* foram testados para a presença de ESBL em 37 (44%) dos 78 hospitais notificando a ocorrência desses microrganismos em infecções da corrente sanguínea de pacientes de terapia intensiva (BRASIL, 2009).

No estudo SENTRY, um estudo com 4.267 infecções de corrente sanguínea causadas por bacilos gram negativos de cepas coletadas nos Estados Unidos, Canada e América Latina demonstraram que *Klebsiella spp.* foi a segunda bactéria mais prevalente, representando 17,9% dos isolados (DIEKEMA et al., 1997).

Klebsiella pneumoniae é a enterobactéria mais importante em casos de infecções hospitalares. Segundo as estatísticas do CDC (Centros para Controle de Doenças e Prevenção-EUA), *Klebsiella spp.* representam 8% das endemias de infecções hospitalares e 3% dos surtos epidêmicos nos Estados Unidos (STAMM, WEINSTEIN e DIXON, 1981). Das 145 epidemias nosocomiais relatadas na literatura entre 1983 e 1991, 13 foram causados por *Klebsiella* (DOEBBELING, 1993). Estudo realizado em hospitais localizados no Rio de Janeiro, Florianópolis e em São Paulo, mostraram taxas de produção de ESBLs que variaram de 30 a 50% para amostras de *K. pneumoniae* associadas com infecção da corrente sanguínea (GALES et al., 1997).

1.7. Relevância do estudo

A produção de ESBL confere resistência à maioria dos beta-lactâmicos e muitas vezes estão associadas à resistência a outras classes de antimicrobianos, como aminoglicosídeos e fluorquinolonas. Assim, o rápido reconhecimento de amostras produtoras destas enzimas no ambiente hospitalar é importante para a seleção do agente antimicrobiano adequado para o tratamento da infecção.

Para a identificação presuntiva dessas amostras no laboratório, são utilizados testes

fenotípicos. Essas enzimas são sensíveis aos inibidores de β -lactamases (ácido clavulânico, sulbactam e tazobactam), que tem sido explorados como indicadores nos testes utilizados nos laboratórios de microbiologia (BUSH e SINGER, 1989; PHILIPPON et al., 1989a; PHILIPPON et al., 1989b; JACOBY e MEDEIROS, 1991). A maioria desses testes empregam, geralmente, o ácido clavulânico e uma cefalosporina de terceira geração e/ou o aztreonam, seguindo a metodologia dos testes de disco-difusão, e são muito úteis para identificação da produção de ESBLs. Apesar da utilidade dos testes fenotípicos, estes não são capazes de identificar o tipo de beta-lactamase (SHV, CTX-M ou TEM) envolvida no mecanismo de resistência. Assim, técnicas moleculares têm sido utilizadas como importantes ferramentas para a detecção e confirmação dos genes responsáveis por estes mecanismos (PODSCHUN & ULLMANN, 1998). Desta forma, a caracterização de genes de resistência por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) vem sendo empregada com sucesso (ARLET e PHILIPPON, 1991).

A relevância deste estudo deve-se à crescente incidência de *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs e KPC nos hospitais em questão e a carência de dados regionais e nacionais. Dados da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde mostraram que apenas 65% dos hospitais credenciados realizaram testes para detecção de ESBLs em 2008 (BRASIL, 2009). Esse baixo número demonstra a necessidade da implantação dos testes fenotípicos na rotina laboratorial, para que ocorra a detecção correta dessas β -lactamases e conseqüentemente o tratamento adequado desses pacientes. Outro fator relevante é o fato da infecção por *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs e KPC ser de difícil tratamento, uma vez que as bactérias carregam plasmídios que conferem resistência a múltiplos antibióticos. Pacientes com infecção causada por isolados produtores de ESBLs e KPC permanecem mais tempo no hospital, aumentando o custo da internação e apresentam maior letalidade. Com isso, se observa a necessidade de intervenção/contenção dos problemas causados por estes microrganismos, tais como: dificuldade de detecção, controle e tratamento das infecções causadas por essas bactérias.

2. OBJETIVOS

Objetivo Geral:

Detecção fenotípica e genotípica da produção de ESBLs e KPC em *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de hemoculturas de pacientes internados em hospitais sentinelas situados na região metropolitana do estado do Rio de Janeiro.

Objetivos Específicos:

- A. Detecção fenotípica da produção de ESBLs através de teste de disco-aproximação.
- B. Realização do teste de sensibilidade aos antimicrobianos e observação do perfil de susceptibilidade dos isolados.
- C. Detecção genotípica da produção de ESBLs através da técnica de reação em cadeia da polimerase.
- D. Detecção da produção de carbapenemases do tipo KPC através do teste de Hodge modificado e reação de PCR em cepas que apresentarem resistência ou sensibilidade reduzida aos carbapenemas.

3. METODOLOGIA

3.1. Seleção e identificação das cepas bacterianas:

No período de setembro de 2007 a setembro de 2008, o LAPIH recebeu um total de 121 cepas de *Klebsiella pneumoniae* oriundas de espécime clínico nobre (hemocultura), que foram selecionadas para o estudo. O estudo detalhado das cepas foi realizado somente nas cepas consideradas ESBL positivas pelo teste fenotípico.

As cepas utilizadas no estudo foram provenientes de cinco hospitais sentinelas do Estado do Rio de Janeiro: Hospital Universitário Antônio Pedro, Hospital Naval Marcílio Dias, Hospital dos Servidores do Estado, Hospital Geral de Bonsucesso e Hospital Universitário Pedro Ernesto, que fazem parte da Coleção de Culturas de Bactérias Hospitalares do Laboratório de Pesquisa em Infecção Hospitalar (LAPIH)- FIOCRUZ.

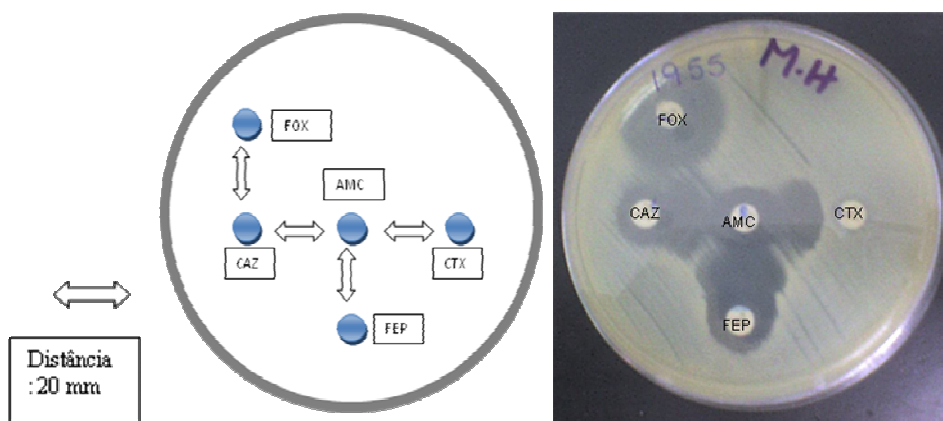
A confirmação da espécie *K.pneumoniae* das cepas utilizadas no estudo foi realizada no LAPIH, utilizando a observação da morfologia da colônia, a coloração das bactérias pela metodologia de Gram e provas bioquímicas e fenotípicas convencionais. Para confirmação da identificação dos isolados no LAPIH, estas foram retiradas do stock em Agar BHI com glicerol (estocados a -20° C) e foram semeadas em meio seletivo indicador Agar EMB (Difco) para a confirmação da pureza das culturas e incubadas a 37° C por 18 a 24 horas. Após observação da morfologia colonial estes isolados foram repicados para um meio de triagem de Costa e Vernin (COSTA e HOFER, 1972) e incubados a 37° C por 24 horas. Para a confirmação do perfil bioquímico foram utilizados os substratos: Meio de SIM (Difco) para a avaliação da mobilidade, produção de indol e gás sulfídrico; Meio de Citrato de Simmons (Difco) para observação da capacidade de utilização do citrato como única fonte de carbono; a capacidade de utilização de aminoácidos como a descaboxilação da Lisina, Ornitina, Arginina; e ausência de produção da enzima citocromo oxidase. Outros testes bioquímicos foram adicionados conforme necessidade com base nas recomendações de KONEMAN et al., 2001 e MURRAY et al., 2007.

3.2. Detecção Fenotípica de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

A detecção fenotípica da produção de beta-lactamases foi realizada através da metodologia de “disco-aproximação” conforme descrito por Jarlier, 1998. A produção de

ESBL é indicada por uma deformação (aumento) dos halos de inibição próximo ao disco do inibidor de beta-lactamase ou aparecimento de uma terceira zona irregular de inibição (zona fantasma) entre o inibidor e um dos substratos beta-lactâmicos.

Figura 1: Figura esquemática do teste fenotípico para detecção de ESBL e foto de cepa considerada positiva pelo teste.



Legenda: FOX: Cefoxitina, AMC: Amoxicilina/ Ácido Clavulânico, CAZ: Ceftazidima, CTX: Cefotaxima, FEP: Cefepime.

3.3. Teste de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado nas cepas positivas no teste de fenotípico de identificação de ESBL. O antibiograma foi realizado segundo o método de disco-difusão de acordo com CLSI, 2008. Os antibióticos testados foram: cefoxitina, imipenem, meropenem, ertapenem, piperaciclina/ tazobactam, gentamicina, ampicilina, ciprofloxacina e sulfametoxazole/trimetoprima.

3.4. Extração do DNA Total pelo método da Guanidina

O Ácido Desoxirribonucléico (DNA) total dos isolados ESBL-positivos foi extraído pelo método do tiocinato de guanidina com base nos critérios descritos por CAETANO-ANOLLES e GRESSHOFF, 1997 e mantido em freezer – 20°C para a realização dos testes moleculares.

3.5. Detecção dos genes codificadores de ESBL por técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Foram realizadas reações de PCR para a detecção das seqüências gênicas das ESBLs do tipo *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, e *bla*_{CTX-M}. Os iniciadores foram determinados a partir de seqüências disponíveis em trabalhos científicos publicados (Tabela 1) .

Tabela 1: Iniciadores específicos para a detecção dos genes *bla*_{SHV}, *bla*_{TEM}, e *bla*_{CTX-M} utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica
<i>bla</i> _{CTX-M}	CTX-F-ATGTGCAGYAACCAGTAARGTKATGGC	593pb	MULVEY et al.,2003
	CTX-R-TGGGTRAARTARGTSACCAGAAYCAGCGG		
<i>bla</i> _{SHV}	SHV-F-TTATCTCCCTGTTAGCCACC	797pb	HASMAN et al., 2005
	SHV-R-GATTTGCTGATTTTCGCTCGG		
<i>bla</i> _{TEM}	TEM-F-GCGGAACCCCTATTTG	859pb	HASMAN et al., 2005
	TEM-R-ACCAATGCTTAATCAGTGAG		

A mistura da PCR para detecção do gene *bla*_{CTX-M} foi preparada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico, 16,75 µl de água Milli-Q, 2,5µl do tampão PCR 10X, 1,25 µl (25pmoles) de cada “primer”, 0,5 µl (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos, 1,25 µl (1,5 mM) de solução MgCl₂ e 0,5 µl de *Taq* DNA polymerase (2,5 U) (Invitrogen). Para as condições de amplificação foram utilizados 30 ciclos de 5 minutos a 94^oC para desnaturação, 45 segundos a 61^oC para anelamento e 45 segundos a 72^o C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72^oC.

A mistura da PCR para detecção do gene *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} foi preparada seguindo-se a mesma quantidade de reagentes, sendo somente os primers modificados. A mistura de reagentes teve um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico, 17,25 µl de água Milli-Q, 2,5µl do tampão PCR 10X, 1,25 µl (25pmoles) de cada um dos primers, 0,5 (10 mM) µl da mistura de deoxinucleotídeos, 0,75 µl (1,5 mM) de solução MgCl₂ e 0,5 µl de *Taq* DNA polymerase (2,5 U) (Invitrogen). Para as condições de amplificação foram

utilizados 35 ciclos de 3 minutos a 94°C para desnaturação, 1 minuto a 53°C para anelamento e 1 minuto a 72°C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72°C.

3.6. Eletroforese em Gel de Agarose

A amplificação do DNA genômico pela técnica de PCR foi visualizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5% em TBE 0,5X. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida TBE 0,5X sob uma corrente de 130 Volts. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com brometo de etídio e observado sob luz ultravioleta em equipamento Image Quant 300-GE- Healthcare.

3.7. Detecção de Carbapenemase do tipo KPC

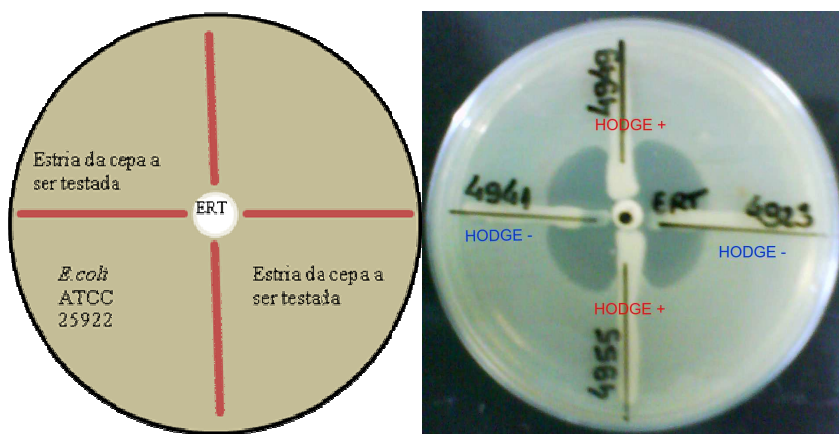
Nas cepas em que foram observadas resistência ou sensibilidade diminuída (halo de inibição menor ou igual a 21 mm) a pelo menos um dos carbapenemas (imipenem, meropenem e ertapenem) foram realizados testes para detecção do mecanismo mais comumente associado a resistência a carbapenemas encontrado em *K.pneumoniae*, que é a produção de carbapenemase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase).

Para detecção dessa enzima foram utilizados a realização do teste de Hodge modificado (LEE et al., 2000) e a detecção do gene codificador da enzima *bla*_{KPC} (YIGIT et al., 2001).

A metodologia para realização do teste de Hodge modificado consistiu em realizar uma suspensão de uma cepa padrão de *E.coli* (ATCC 25922) em solução salina (0,9% NaCl), ajustada para turvação 0,5 MacFarland. Após esse procedimento, foi necessária a diluição dessa suspensão dez vezes. Realização de semeadura do tipo tapete dessa suspensão em ágar Mueller Hinton, com auxílio de um swab ou cotonete estéril. No centro da placa, foi colocado um disco do carbapenema (ertapenem). Da cepa a ser testada, foi retirada uma colônia com alça bacteriológica e foram realizadas estrias finas da borda do disco até a borda da placa. A placa do teste deve ser incubada em estufa bacteriológica na temperatura de 35°C por 18-24 horas. O teste é interpretado da seguinte maneira: caso ocorra a produção de carbapenemase pela cepa que esta sendo testada, a carbapenemase produzida vai hidrolizar o carbapenema que foi adicionado na placa, propiciando que a cepa de *E.coli*, que é sensível ao carbapenema,

consiga crescer numa região mais próxima ao halo de inibição. A produção da carbapenemase consegue ser evidenciada pela distorção no halo de inibição na região onde ocorre concomitantemente o crescimento da cepa padrão *E.coli* e da cepa que esta sendo testada. Na Figura 2, se encontra um desenho esquemático representando o Teste de Hodge modificado.

Figura 2: Desenho esquemático do Teste de Hodge modificado e foto representando cepas consideradas positivas e negativas pelo teste.



A detecção do gene *bla_{KPC}* foi realizada através da metodologia de Reação em Cadeia da Polimerase, utilizando-se os primers descritos na Tabela 2. A reação foi realizada em um volume final de 25 µl contendo 1 µl de DNA cromossômico, 17,25 µl de água Milli-Q, 2,5µl do tampão PCR 10X, 1,25 µl (25pmoles) de cada “primer”, 0,5 µl (10 mM) da mistura de deoxinucleotídeos, 0,75 µl de solução MgCl₂ e 0,5 µl de *Taq* DNA polymerase (2,5 U) (Invitrogen). As condições de amplificação foram: um ciclo inicial de 3 minutos a 94 °C, 35 ciclos de: 1 minuto a 94 °C para desnaturação, 1 minuto a 50 °C para anelamento e 1 minuto a 72 °C para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 min a 72 °C.

Tabela 2: Iniciadores específicos para a detecção do gene *bla_{KPC}* utilizados nas reações de PCR.

Região alvo	Seqüência do iniciador (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)	Referência Bibliográfica
<i>bla_{KPC}</i>	KPC-F- CGGTTACGGCCAGTGGAATA KPC-R- GACGCAGACCGAAATCGAACT	1011-bp	PEIRANO et al., 2009

4. RESULTADOS

4.1. Detecção Fenotípica da produção de beta-lactamases de espectro estendido (ESBLs)

A detecção fenotípica da produção de beta-lactamases foi realizada com a metodologia de “disco-aproximação” conforme descrito por Jarlier, 1998. Das 121 cepas submetidas ao teste, 63 (52%) foram consideradas positivas. O Quadro 1 indica a percentagem de cepas de ESBL positivas e negativas oriundas de cada hospital.

Quadro 1: Distribuição das cepas de *K.pneumoniae* ESBL negativas e positivas por hospital.

Hospital	ESBL positivas n(%)	ESBL negativas n(%)	Nº total de cepas
HGB	11 (65)	6 (35)	17
HSE	3 (19)	13 (81)	16
HNMD	11 (65)	6 (35)	17
HUAP	16 (47)	18 (53)	34
HUPE	22 (59)	15 (41)	37
	Total: 63	Total: 58	Total: 121

4.2. Distribuição das cepas ESBL positivas

4.2.1. Distribuição das cepas segundo os hospitais e período de isolamento.

A distribuição das cepas de acordo com os Hospitais e o respectivo período de isolamento está representada no Quadro 2. O Hospital Universitário Pedro Ernesto foi o hospital que nos forneceu um maior número de cepas (22 cepas), totalizando 34% dos isolados.

Quadro 2: Distribuição de 63 cepas de *Klebsiella pneumoniae* ESBL positivas isoladas de pacientes dos cinco hospitais sentinela: Hospital Geral de Bonsucesso, Hospital dos Servidores do Estado, Hospital Naval Marcílio Dias, Hospital Universitário Antônio Pedro e Hospital Universitário Pedro Ernesto, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008, de acordo com o trimestre de isolamento.

Hospital	N° ESBL positivas(%)	Período de Isolamento			
		1° trimestre	2° trimestre	3° trimestre	4° trimestre
		Set.-Nov./07	Dez.-Fev/08	Mar.-Maio/08	Maio-Set./08
HGB	11 (17)	-	-	5	6
HSE	3 (5)	1	2	-	-
HNMD	11 (17)	3	6	1	1
HUAP	16 (25)	6	2	6	3
HUPE	22 (34)	10	5	1	6
Total	63	19	15	13	16

4.2.2. Distribuição das cepas segundo os setores dos hospitais

As 63 cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL estudadas foram obtidas a partir de hemoculturas de pacientes atendidos em diversos setores dos respectivos hospitais. No Quadro 3, podemos observar a distribuição das cepas em cada um dos setores dos respectivos hospitais, onde pode se observar que 21 cepas (33%) foram oriundas de CTI.

Quadro 3: Distribuição de 63 cepas de *Klebsiella pneumoniae* isoladas de cinco hospitais da Região Metropolitana do Rio de Janeiro, de acordo com o setor de atendimento.

Hospital	Total de cepas do Hospital	Setor de Atendimento			
		CTI	Enfermaria	Emergência	Cirurgia
HGB	11	1	10	-	-
HSE	3	1	2	-	-
HNMD	11	8	3	-	-
HUAP	16	8	3	3	1
HUPE	22	3	14	2	3
Total	63	21 (34%)	32 (50%)	6 (10%)	4(6%)

4.3. Determinação dos Perfis de Susceptibilidade aos Antimicrobianos

O teste de susceptibilidade aos antimicrobianos foi realizado nas 63 cepas de *K.pneumoniae* positivas no teste de fenotípico de identificação de ESBL. As cepas estudadas, além de apresentarem resistência às cefalosporinas de terceira geração devido a produção de beta-lactamases de espectro estendido, apresentam também resistência às outras classes de antimicrobianos. O antibiograma foi realizado segundo o método de disco-difusão de acordo com CLSI, 2008. As seguintes taxas de resistência ou sensibilidade diminuída aos antimicrobianos testados foram observadas: cefoxitina (10%), imipenem (1,5%), meropenem(1,5%) , ertapenem (19%) , piperaciclina/ tazobactam (24%) , gentamicina (38%), ampicilina (19%), ciprofloxacina (73%) e sulfametoxazol/trimetopim (83%) e estão representadas no Quadro 4.

Quadro 4: Porcentagem de susceptibilidade aos antimicrobianos de 63 cepas de *K.pneumoniae* isoladas de pacientes oriundos de cinco hospitais da região metropolitana do Rio de Janeiro, realizado através do método de disco-difusão em ágar.

Agentes Antimicrobianos	Susceptibilidade – n (%)		
	Resistente	Intermediária	Sensível
Cefoxitina (FOX)	6 (10)	4 (7)	52 (82)
Imipenem (IMP)	1 (1,5)	1 (1,5)	60 (96)
Meropenem (MER)	1 (1,5)	2 (3)	59 (94)
Ertapenem (ERT)	12 (19)	0 (0)	51 (81)
Gentamicina (GEN)	24 (38)	3 (5)	35 (56)
Amicacina (AK)	12 (19)	4 (7)	46 (73)
Piperacilina/Tazobactam (PTZ)	15 (24)	14 (23)	33 (53)
Ciprofloxacina (CIP)	46 (73)	1(1,5)	13 (20)
Sulfametoxazole/ Trimetropima (SXT)	52 (83)	1(1,5)	9 (14)

No Quadro 5, podemos observar os perfis de co-resistência encontrados nas 63 cepas de *K.pneumoniae* estudadas.

Quadro 5: Perfil de co-resistência aos antimicrobianos dos 63 isolados de *K.pneumoniae* resistentes a cefalosporinas de terceira geração.

Perfil co-resistência	N° cepas N (%)	Origem				
		HGB	HSE	HUPE	HUAP	HNMD
CIP/ SXT	19 (30)	4	1	5	1	8
CIP/ GN/ STX	6 (9)			5		1
PTZ/ ERT/ GN/ CIP/ SXT	4 (6)	1		2	1	
SXT	4 (6)		1	3		
AK/ CIP/ SXT	3 (4)				3	
PTZ/ GN/ CIP/ SXT	2 (3)		1		1	
PTZ/ ERT/ CIP/ SXT	2 (3)	1		1		
GN/ AK/ CIP/ SXT	2 (3)			1		1
PTZ/ERT/GN/AK/CIP/SXT/MEM/ IPM	1 (1,5)	1				
PTZ/ ERT/ GN/ AK/ CIP/ SXT	1(1,5)				1	
PTZ/ ERT/ GN/ AK/ CIP	1(1,5)	1				
ERT/ FOX/ GN/ CIP/ SXT	1(1,5)				1	
PTZ/ FOX/ CIP/ SXT	1(1,5)			1		
FOX/ GN/ CIP/ SXT	1(1,5)			1		
PTZ/ ERT/ GN/ CIP	1(1,5)			1		
FOX/ CIP/ SXT	1(1,5)			1		
PTZ/ CIP/ SXT	1(1,5)				1	
PTZ/ ERT/ FOX	1(1,5)	1				
GN/ AK/ SXT	1(1,5)				1	
AK/ SXT	1(1,5)				1	
GN/ AK	1(1,5)				1	
GN/ SXT	1(1,5)				1	
CIP	1(1,5)	1				
AK	1(1,5)				1	
GN	1(1,5)			1		
FOX	1(1,5)					1

4.4. Detecção dos genes codificadores de ESBLs por técnica de PCR.

A detecção dos genes de beta-lactamases foi realizada através da metodologia da Reação em Cadeia da Polimerase, e o resultado está no Quadro 6. O maior percentual de positividade foi em relação ao gene *bla*_{CTX-M}, em que 59 cepas (93%) foram positivas para esse gene.

Quadro 6: Porcentagem de positividade das 63 cepas de *K.pneumoniae* em relação aos genes codificadores de beta-lactamases.

	<i>bla</i> _{CTX-M} n(%)	<i>bla</i> _{SHV} n(%)	<i>bla</i> _{TEM} n(%)
Cepas Positivas	59 (93)	32 (51)	35 (56)

No Quadro 7 estão descritos os perfis de produção das beta-lactamases. Pode-se observar que o perfil mais prevalente foi a produção concomitante das beta-lactamases CTX-M e TEM.

Quadro 7: Perfis de produção das beta-lactamases das 63 cepas de *K.pneumoniae* estudadas.

Perfil	HGB	HSE	HMND	HUAP	HUPE	Total
CTX-M+,SHV+,TEM+	4	1	2	4	5	16
CTX-M+,SHV+,TEM-	4	1	-	3	5	13
CTX-M +,SHV-,TEM+	1	1	4	6	5	17
CTX-M +,SHV-,TEM-	-	-	4	2	7	13
CTX-M -,SHV+,TEM+	1	-	-	1	-	2
CTX-M -,SHV+,TEM-	-	-	1	-	-	1
CTX-M -,SHV-,TEM+	-	-	-	-	-	-
CTX-M -,SHV-,TEM-	1	-	-	-	-	1

4.5. Detecção de Carbapenemase do tipo KPC

Com a análise dos percentuais de resistência aos antibióticos testados, foi observado que 19% das cepas apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída ao Ertapenem, antibiótico do grupo dos carbapenemas. Essa resistência não é explicada pela produção de beta-lactamases de espectro estendido, já que estas conferem resistência a penicilinas, cefalosporinas de terceira geração e aztreonam.

De acordo com a literatura, o principal mecanismo de resistência aos carbapenemas encontrados em *K.pneumoniae* é devido a produção de carbapenemase do tipo KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase). Para a detecção dessa enzima, foram preconizados a realização do teste de Hodge modificado e a detecção do gene codificador da enzima *bla*_{KPC}.

Ambos os testes foram realizados nas cepas resistentes aos carbapenemas e o resultado está no Quadro 8.

Quadro 8: Análise da produção de *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase (KPC) das 12 cepas consideradas resistentes ao Ertapenem.

Cepas Ertapenem Resistentes	Origem			Teste de Hodge Modificado	PCR gene <i>bla</i> _{KPC} .
	HUAP	HUPE	HGB		
12(19% do total)	HUAP	HUPE	HGB	12 positivas	9 positivas
	3 cepas	4cepas	5 cepas	-	3 negativas

O perfil de produção de beta-lactamases das cepas produtoras de KPC foi analisado e está no Quadro 9.

Quadro 9: Perfis de produção das beta-lactamases das nove cepas de *K.pneumoniae* produtoras de KPC estudadas.

Perfil	HGB	HUAP	HUPE	Total
KPC+, CTX-M +,SHV+,TEM+	3	1	2	6
KPC+, CTX-M +,SHV+,TEM-	-	-	-	-
KPC+, CTX-M +,SHV-,TEM+	-	-	1	1
KPC+, CTX-M +,SHV-,TEM-	-	1	-	1
KPC+, CTX-M -,SHV+,TEM+	1	-	-	1
KPC+, CTX-M -,SHV+,TEM-	-	-	-	-
KPC+, CTX-M -,SHV-,TEM+	-	-	-	-
KPC+, CTX-M -,SHV-,TEM-	-	-	-	-

5. DISCUSSÃO

Klebsiella pneumoniae é um patógeno muito associado a infecções nosocomiais que vêm apresenta elevadas taxas de resistência aos antimicrobianos principalmente devido à produção de beta-lactamases de espectro estendido.

No presente estudo, das 121 cepas oriundas de hemocultura, 63 (52%) foram consideradas produtoras de ESBLs pelo teste fenotípico. Infecções causadas por bacilos gram-negativos multi-resistentes produtores de beta-lactamases de espectro estendido tem sido reportadas com alta frequência e estão associados a alta morbidade e mortalidade. No estudo de WINOKUR e colaboradores, avaliou-se a prevalência de ESBLs entre cepas da família *Enterobacteriaceae* oriundas de diversas regiões geográficas. Foi observado que a espécie *K.pneumoniae* foi a mais prevalente e o percentual de cepas dessa espécie produtoras de ESBLs foi de 45,4% na América Latina, 24,6% na Região Oeste do Pacífico, 22% na Europa, 7,6% nos Estados Unidos e 4,9% no Canadá (WINOKUR et al., 2001). Em 2000, um estudo com os países do leste europeu (Rússia, Turquia e Polônia), foi visto que quase 50% das cepas possuíam ESBLs (PATERSON et al., 2003a). Num estudo internacional de PATERSON e colaboradores, que analisou cepas de *K.pneumoniae* isoladas de infecções da corrente sanguínea oriundas de sete países, observou-se que 18% das cepas estudadas possuíam o fenótipo de produção de ESBLs (PATERSON et al., 2003b). Num artigo publicado em 2005, foi visto que o percentual de cepas de *K.pneumoniae* com perfil ESBL foi de 51,9% na América do Sul, 58,7% no Leste Europeu, 28,2% na região Ásia-Pacífico (TUNER, 2005). De acordo com os estudos analisados, o percentual de cepas ESBLs positivas em *K.pneumoniae* encontrado na nossa pesquisa condiz com os dados observados na América Latina.

Em relação a porcentagem de cepas de *K.pneumoniae* consideradas ESBL positivas oriundas de cada um dos hospitais, o Hospital Geral de Bonsucesso e o Hospital Naval Marcílio Dias, foram os hospitais com maior porcentagem de positividade em relação ao número total de cepas enviadas, com 65% (11 de 17 cepas em ambos os hospitais). Já o Hospital Universitário Antônio Pedro apresentou 47% (16 de 34) de cepas ESBL positivas. O Hospital Pedro Ernesto, de um total de 37 cepas enviadas, 22 (59%) foram consideradas ESBL positivas. O Hospital dos Servidores do Estado foi o Hospital com o menor percentual de cepas ESBL positivas, totalizando 3 cepas (19%) de um total de 16 recebidas.

A distribuição dos isolados de *K.pneumoniae* ESBL em relação aos quatro trimestres de isolamento foi considerada homogênea. Já o setor de atendimento dos hospitais em que foi isolado um maior número de *K.pneumoniae* ESBL positivas foi a Enfermaria. Pacientes hospitalizados são alvos fáceis de infecções nosocomiais por diversas razões. Esses pacientes são mais susceptíveis às infecções devido as suas doenças de base e aos procedimentos invasivos a que são submetidos. Como esses pacientes se encontram imunodeprimidos em muitos casos, microorganismos normalmente não patogênicos são capazes de causar doenças (EMORI *et al.*, 2003). Os centros de tratamento intensivos (CTIs) são vistos como o principal local de ocorrência de infecções da corrente sanguínea. Dados do estudo epidemiológico americano SCOPE informam que 49,4% das infecções de corrente sanguínea ocorrem em CTIs (WISPLINGHOFF *et al.*, 2004). Em um estudo prospectivo internacional, foi visto que 18,7% dos episódios de bacteremia causados por *K.pneumoniae* foram causados por bactérias produtoras de ESBLs. Nesse mesmo estudo, se observou que nas Unidades de Terapia Intensiva, onde o uso de antimicrobianos é extenso, a porcentagem foi de 43,5%. (PATERSON *et al.*, 2004).

No presente estudo, foram observadas taxas elevadas de resistência para alguns dos antimicrobianos testados, como sulfametoxazole/trimetropima (83% de resistência) e ciprofloxacina (73% de resistência).

Em relação ao grupo das sulfonamidas, representado pelo sulfametoxazole/trimetropima obtivemos o maior percentual de resistência (83%). Esse percentual se encontra bem elevado, quando comparado aos dados de três estudos. O primeiro, o programa SENTRY (estudo epidemiológico designado a monitorar o percentual de resistência entre os patógenos mais associados a infecções nosocomiais e da comunidade no Brasil e na América Latina) realizado em 2001, mostrou que as taxas de resistência à sulfametoxazole apresentadas pelas cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL foram 65% no Brasil e 59% na América Latina (SADER *et al.*, 2004). No outro estudo, onde se analisou epidemiologicamente cepas de *K.pneumoniae* envolvidas em infecções hospitalares num Hospital Universitário do Rio de Janeiro, o percentual de resistência ao sulfametoxazole/trimetropima foi de 52% (DE MORAES *et al.*, 2000). Em um estudo canadense, onde se estudou cepas de *Klebsiella* spp. e *E.coli* produtoras de ESBL, observou-se entre as cepas de *Klebsiella* um percentual de resistência de 57% (MULVEY *et al.*, 2004).

A segunda maior taxa de resistência observada foi frente a ciprofloxacina, representante do grupo das quinolonas, com 73%. Comparando-se com dados da literatura, podemos observar que no estudo SENTRY, um percentual de 34,9% de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL foram consideradas resistentes a ciprofloxacina (SADER et al., 2004), enquanto que em um estudo Espanhol, de cepas de *K.pneumoniae* e *E.coli* produtoras de ESBL demonstrou um percentual bem abaixo, em torno de 11% (HERNÁNDEZ et al., 2005). Já em um estudo mais atual, de cepas de *K.pneumoniae*, *K.oxytoca* e *E.coli* produtoras de ESBL realizado na Arábia Saudita, obteve-se um percentual de resistência em torno de 75% para ciprofloxacina, sendo o estudo que obteve dados mais próximos aos que foram encontrados (KHANFAR et al., 2009).

O percentual de resistência encontrado frente a gentamicina foi de 38%. Esse antimicrobiano, da classe dos aminoglicosídeos, obteve no estudo epidemiológico SCOPE (estuda infecções da corrente sanguínea ocorridos nos Estados Unidos), um percentual de resistência de 14% na espécie *K.pneumoniae* (WISPLINGHOFF et al., 2004), já em um estudo canadense, onde se estudou cepas de *Klebsiella* spp. e *E.coli* produtoras de ESBL, observou-se entre as cepas de *Klebsiella* um percentual de resistência de 69%. Nos estudos brasileiros dos programas de vigilância SENTRY (SADER et al., 2004) e MYSTIC (KIFFER et al., 2005), foram observados 73% e 34,3% respectivamente de cepas de *K.pneumoniae* resistentes a gentamicina. Logo, o percentual de resistência encontrado no estudo MYSTIC foi bastante semelhante ao encontrado nas cepas de *K.pneumoniae* estudadas.

Em relação à associação de antibiótico beta-lactâmico, piperacilina, com inibidor de beta-lactamase ,tazobactam, observamos um percentual de resistência de 24%. Dados da literatura, do estudo MYSTIC (KIFFER et al., 2005), apontam para 7,3% de resistência. No estudo de HAWSER e colaboradores, publicados em 2009, se estudou a emergência de bacilos gram-negativos produtores de ESBL na região da Ásia e Oceano Pacífico, foi observado um percentual de 43% de resistência entre as cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL. Já o estudo canadense de MULVEY e colaboradores, em 2004, observou um percentual de resistência de 17% (MULVEY et al., 2004), que foi o estudo com o percentual mais próximo ao encontrado em nosso estudo.

Outro antibiótico da classe dos aminoglicosídeos testado foi amicacina. O percentual de resistência encontrado entre as cepas testadas foi de 12% e diversos percentuais diferentes tem sido reportados no mundo. No estudo do SENTRY, foi observado um percentual de resistência de 26% entre cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL no Brasil e 37% na América Latina (SADER et al., 2004) Já no estudo brasileiro MYSTIC, foi encontrado um percentual de 6,5% de resistência. (KIFFER et al., 2005). Em dois outros estudos, um espanhol e outro canadense, sobre cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL, observou-se 9% e 0% de resistência respectivamente entre os isolados. (HERNÁNDEZ et al., 2005)

Em relação a cefalosporina de segunda geração cefoxitina, observamos 6% de resistência entre as *K.pneumoniae* testadas. No estudo SENTRY (SADER et al., 2004), foi encontrado um percentual de 29% de resistência, enquanto que em um estudo realizado em um Hospital Universitário do Rio de Janeiro em 2000, observou-se um percentual de 14% de resistência (DE MORAES et al., 2000). Em um estudo com os países da região do Oceano Pacífico, publicado em 2009, observou-se 39% de resistência a essa cefalosporina (HAWSER et al., 2009). De acordo com a literatura, a produção de beta-lactamases de espectro estendido não confere resistência as cefalosporinas de segunda geração (cefamicinas), como a cefoxitina e cefotetan. O fenômeno mais relacionado a resistência a essas cefalosporinas é a perda de porinas (ANANTHAN et al., 2005). Por outro lado, apesar da aparente sensibilidade *in vitro*, as bactérias produtoras de ESBLs podem apresentar resistência *in vivo* a quaisquer das cefalosporinas, ao aztreonam e as penicilinas. Logo, o Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), preconiza que as bactérias produtoras de ESBL sejam reportadas com resistentes a essas classes de antibióticos, e que o tratamento não seja realizado com nenhum dos antimicrobianos dessas classes (CLSI, 2009).

Quando as cepas de *K.pneumoniae* foram testadas frente aos carbapenemas (imipenem, meropenem e ertapenem), obtivemos uma resistência baixa ao imipenem e meropenem (1,5% cada), e bem mais elevada ao ertapenem (19%). A resistência aos carbapenemas ocorre principalmente devido a produção de beta-lactamases do tipo KPC, que ainda é considerado um fenômeno raro (LEAVITT et al., 2009). A resistência aos carbapenemas por cepas de *Klebsiella pneumoniae* produtoras de ESBL constitui um grande problema, já que essa classe de antibióticos é a classe de escolha para o tratamento dessas bactérias produtoras de beta-lactamases de espectro-estendido. Outro problema é que grande

parte das bactérias produtoras de ESBL possuem co-resistência a diversas classes de antibióticos, diminuindo as opções de tratamento.

Apesar de ainda não existirem muitos estudos epidemiológicos que analisem os percentuais de resistência aos carbapenemas, um estudo Israelense publicado em 2009, foi observado 3,77% de resistência ao ertapenem em cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs (LEAVITT et al., 2009). Em outro estudo, realizado em Nova York (região considerada endêmica), de 257 isolados, de *K.pneumoniae*, 109 (42%) foram produtoras de ESBL e 62 (24%) foram resistentes a carbapenemas (BRATU et al., 2005).

De maneira geral, os resultados obtidos em relação aos perfis de susceptibilidade frente aos antimicrobianos testados quando foram comparados com outros países ou estados, reforçam o fato de que os mesmos podem variar bastante dependendo da região geográfica envolvida e/ou o período do estudo.

Bactérias gram-negativas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, além da resistência a cefalosporinas de terceira geração, comumente apresentam fenômenos de co-resistência a outras classes de antimicrobianos. O uso indiscriminado de antimicrobianos é estritamente relacionado com fenômenos de mutiresistência, colonização, surtos hospitalares, e infecções severas causadas por organismos produtores de ESBL. (DROPA et al., 2006).

O perfil de co-resistência mais observado entre as cepas de *K.pneumoniae* estudadas foi a resistência a ciprofloxacina e sulfametoxazole/trimetropima, totalizando 19 (30%) dos isolados. Esse perfil de resistência foi o mais encontrado no Hospital Naval Marcílio Dias e a maior prevalência desse perfil já era esperada, já que esses antimicrobianos foram os que obtiveram a maior taxa de resistência. O segundo perfil mais importante foi a resistência a gentamicina, além da resistência a ciprofloxacina e sulfametoxazole/trimetropima, com 6 (9%) das cepas apresentando esse perfil. Um dado importante em relação a esse perfil, foi que 5 das 6 cepas com esse perfil foram oriundas do Hospital Universitário Pedro Ernesto. Possivelmente esses antibióticos são exaustivamente utilizados nesse hospital, causando uma pressão seletiva e selecionando cepas resistentes.

Foi observado que 53 (84%) das cepas apresentaram resistência a pelo menos três dos antimicrobianos testados, além da resistência a cefalosporinas de terceira geração, mas

felizmente nenhuma das cepas foi resistente a todos os antimicrobianos testados. A observação desses fenômenos de multirresistência na maioria das cepas estudadas é de extrema importância, já que as cepas que apresentam resistência a variadas classes de antimicrobianos são de tratamento difícil e custoso. Sabe-se também que esses fenômenos restringem as opções de tratamento que podem ser utilizadas. Esse fenômeno é considerado um problema de saúde pública, onde soluções e controle dependem de políticas de restrição do uso de antimicrobianos.

Em relação a detecção molecular através de PCR dos genes codificadores de beta-lactamases, observamos um percentual de 93% de cepas positivas para o gene *bla*_{CTX-M}, 51% para o gene *bla*_{SHV} e 56 % para o gene *bla*_{TEM}. Para a determinação de qual tipo de beta-lactamase presente nas cepas de *K.pneumoniae*, seria preciso que os amplicons do PCR dos genes *bla*_{SHV} e *bla*_{TEM} fossem sequenciados, já que algumas das enzimas do tipo SHV e TEM não apresentam o fenótipo de ESBL (SHV-4, SHV-10, SHV-11, TEM-1, TEM-2 e TEM-13). Em contrapartida, todas as enzimas do tipo CTX-M são consideradas beta-lactamases de espectro-estendido, logo pode-se concluir que 93% das cepas que apresentaram fenótipo de produção de ESBL foram consideradas produtoras dessas enzimas por testes moleculares.

O gene *bla*_{TEM} tem sido reportado em diversas porcentagens no mundo e foi encontrado em 56% das cepas de *K.pneumoniae* testadas. Em um estudo espanhol com cepas de *E.coli* e *K.pneumoniae*, o gene *bla*_{TEM} foi observado em 54% das cepas de *K.pneumoniae* (HERNÁNDEZ et al., 2005). No estudo canadense, foi observado o gene *bla*_{TEM} em 77% das cepas (MULVEY et al., 2004). Em um estudo brasileiro, publicado em 2009, onde se estudou cepas da família *Enterobacteriaceae* produtoras de ESBL, o gene *bla*_{TEM} foi detectado em 17,3% das cepas (DROPA et al., 2009). Num estudo internacional, que analisou cepas de *K.pneumoniae* isoladas de infecções da corrente sanguínea oriundas de sete países, observou-se a o gene *bla*_{TEM} em 87,7% das cepas estudadas (PATERSON et al., 2003a).

O gene *bla*_{SHV} foi encontrado em 51% das cepas de *K.pneumoniae* testadas. No estudo brasileiro de DROPA e colaboradores, de 2009, esse gene foi encontrado em 63% dos isolados. Em um estudo canadense, publicado em 2004, observou-se a prevalência de 67,5% do gene *bla*_{SHV} nas cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL (MULVEY et al., 2004). O gene *bla*_{SHV} foi encontrado em 97,3% dos isolados participantes de um estudo sobre

K.pneumoniae na Arábia Sudita (MOHAMMAD et al., 2009). Num estudo internacional de PATERSON e colaboradores, que analisou cepas de *K.pneumoniae* isoladas de infecções da corrente sanguínea oriundas de sete países, observou-se a o gene *bla_{SHV}* em 90% das cepas estudadas. (PATERSON et al., 2003)

Em um estudo publicado em 2008, onde se estudou a prevalência dos genes *bla_{SHV}* e *bla_{TEM}* em cepas de *Klebsiella* spp. na Índia, observou-se que 75% possuíam o gene *bla_{TEM}* e 46,8% tinham o gene *bla_{SHV}*. A co-produção das duas beta-lactamases foi observada em 26,5% das cepas, 48,4% tinham somente o gene *bla_{TEM}* e 20,3% possuíam somente o gene *bla_{SHV}*. De acordo com o artigo, a presença da beta-lactamase TEM é mais comum que a SHV (JAIN e MODAL, 2008). Na Itália, foi realizado um estudo sobre a produção de ESBL entre membros da família *Enterobacteriaceae*, e observou-se uma maior prevalência dos genes *bla_{TEM}* em relação aos genes *bla_{SHV}* (45% contra 33%) (SPANU et al., 2002). O resultado encontrado pelos dois estudos é semelhante ao observado no nosso estudo, já que a beta-lactamase TEM foi a mais prevalente.

Historicamente, a maior ameaça em relação a produção de ESBLs eram surtos hospitalares ocasionados principalmente por *Klebsiella* spp. e *E.coli* produtoras de enzimas do tipo TEM e/ou SHV. Entretanto, recentemente, enzimas do tipo CTX-M tem emergido e se tornado o tipo de ESBL mais importante em várias regiões do mundo, incluindo América do Sul, Europa e algumas regiões do Canadá (LEWIS II et al., 2007). A porcentagem de CTX-M tem variado muito em relação às regiões geográficas. Na Europa, um estudo Italiano que estudou a prevalência do gene CTX-M em 11 centros de saúde, foram observadas taxas de prevalência variando de 1,2 a 49,5% nesses centros (MUGNAIOLI et al., 2006). Em um estudo Indiano, publicado em 2008, os autores relataram a presença do gene *bla_{CTX-M}* em 15,8% das cepas da família *Enterobacteriaceae* com o fenótipo ESBL (JEMIMA e VERGHESE, 2008). Na Rússia, a prevalência de CTX-M em *K.pneumoniae* é de 34,9% (EDELSTEIN et al., 2003). No Reino Unido, observou-se que 70% das cepas da família *Enterobacteriaceae* carregavam o gene *bla_{CTX-M}* em 2000 (LEWIS II et al., 2007). No estudo Coreano, observou-se 25,2% de prevalência da enzima CTX-M em enterobactérias produtoras de ESBLs (KIM et al., 2005). Nos Estados Unidos, a prevalência da enzima CTX-M era considerada baixa, porém relatos do Texas mostram que mais de 70% das cepas ESBLs positivas continham o

gene *bla*_{CTX-M}. Em estudos na região da Pensilvânia, mostraram que a produção da CTX-M foi observada em 14% dos isolados gram-negativos.

A co-produção de beta-lactamases foi observada em 48 (76%) das cepas. O perfil mais observado foi a produção conjunta de enzimas do tipo CTX e TEM em 17 (27%) cepas. Esse resultado era esperado, já que essas duas beta-lactamases foram as mais prevalentes. Observando-se a distribuição destes perfis entre os hospitais estudados viu-se que das 17 cepas, 15 eram oriundas do HUAP, HNMD ou HUPE. Esses três também são os hospitais com o maior percentual de cepas ESBL positivas. O segundo perfil mais importante, presente em 16 (25%) das cepas, foi a produção concomitante de todas as beta-lactamases estudadas. Esse perfil foi encontrado em todos os hospitais, mas principalmente no HUPE, HUAP e HGB. A produção de SHV e CTX-M também foi de grande importância, estando presente em 20% das cepas, observada em quatro dos cinco hospitais. Apenas uma cepa, oriunda do HUAP possuía somente SHV e TEM. Treze amostras possuíam apenas o gene *bla*_{CTX-M} e uma cepa possuiu somente o gene *bla*_{SHV}.

Apenas uma cepa foi considerada negativa para os três genes testados. As beta-lactamases CTX-M, SHV e TEM são as enzimas mais prevalentes, mas não são as únicas. O resultado de PCR negativo para essas enzimas pode ser justificado pelo fato de nós não termos testados os outros tipos de beta-lactamases que existem, como GES e OXA que também promovem resistência a cefalosporinas. Além disso, existem outros fenômenos que promovem resistência, além das beta-lactamases. Esses fenômenos estão associados a perda de porinas do tipo OMPs e a superexpressão de bombas de efluxo.

Os carbapenemas são geralmente as drogas de escolha para o tratamento de patógenos produtores de ESBLs. Isso se deve ao fato de esse antimicrobiano demonstrar eficácia clínica e pela resistência aos carbapenemas ter sido reportada com baixa frequência. Porém, algumas cepas bacterianas têm demonstrado alto grau de resistência aos carbapenemas principalmente pela produção de carbapenemases do tipo KPC, que vêm se tornando endêmicas em várias partes do mundo. Logo, a emergência de mecanismos de resistência a essa droga são bastante alarmantes.

Em nosso estudo, foi observado que 19% das cepas apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída ao Ertapenem. De acordo com o Clinical and Laboratory Standards

Institute, a produção de carbapenemases é indicada pela resistência a essa classe nos testes de sensibilidade aos antimicrobianos e a deve ser confirmada através do teste de Hodge modificado (CLSI, 2009). Este foi realizado e todas as cepas foram consideradas positivas. A detecção molecular de carbapenemase do tipo KPC foi realizada por técnica de PCR e 9 das 12 cepas ertapenem resistentes foram consideradas positivas.

A prevalência de cepas KPC positivas encontradas no nosso estudo foi de 14% (9/63). Esta prevalência foi considerada alta, já que até o momento existem poucos relatos de casos na literatura no Brasil. Nos EUA, a presença dessa carbapenemase já é considerada endêmica em algumas regiões, como por exemplo a cidade de Nova York. Em um estudo nessa cidade, observou-se que 24% dos isolados de *K.pneumoniae* carregavam o gene KPC (BRATU et al., 2005). Em um estudo mais recente, publicado em 2009, estudou-se durante 6 meses, cepas de enterobactérias isoladas de casos de bacteremia, em um hospital em St. Louis no estado americano de Missouri, apenas 1,2% (3 cepas de um total de 243) foram consideradas *bla*_{KPC} positivas (MARSCHALL et al., 2009).

Na China, um estudo epidemiológico envolvendo oito hospitais de seis diferentes cidades do leste Chinês, de 39 cepas com resistência ou sensibilidade diminuída aos carbapenemas, todas foram produtoras de KPC (SHEN et al., 2009). Em estudo Canadense, publicado em 2009, foram detectados apenas 3 isolados produtores de KPC em um hospital em Ontario e quando se testou mais 186 isolados clínicos de *K.pneumoniae* do mesmo período, esse gene não foi mais encontrado (GOLDFARB et al., 2009). Em Israel, um hospital que apresenta alta prevalência de cepas KPC positivas realizou a pesquisa desse gene em swabs anais e observou que este gene estava presente em apenas 0,86% (62 de 716) dos swabs testados (SCHECHNER et al., 2009).

O primeiro relato no Brasil dessa carbapenemase foi realizado em 4 cepas oriundas do Recife de diferentes sítios de isolamento, em 2006. No Rio de Janeiro, foi relatado o aparecimento dessa carbapenemase da classe A de Ambler em 6 cepas oriundas de dois hospitais. (PEIRANO et al., 2009). Apesar da carbapenemase do tipo KPC ser mais prevalente em cepas de *K.pneumoniae*, relatos de KPC também ocorreram em cepas de *Enterobacter cloacae* isolados de hospitais Brasileiros. Mas, até o momento, não existem dados sobre a real prevalência dessa carbapenemase no território brasileiro.

A detecção de carbapenemase do tipo KPC tem sido um grande desafio, já que muitas vezes a concentração inibitória mínima (MIC) para os carbapenemas se encontra alta, mas abaixo da faixa considerada resistente de acordo com os critérios do CLSI, principalmente quando são utilizados métodos automatizados, mascarando a produção dessas enzimas. Ertapenem é o carbapenema menos ativo contra KPCs, logo este fármaco têm sido visto como antimicrobiano mais sensível para a detecção dessa carbapenemase. Em um estudo realizado em 2009, observou-se a especificidade do ertapenem para a detecção do gene *bla*_{KPC} foi muito maior do que a dos outros carbapenemas (65% imipenem, 48% meropenem e 79% ertapenem) (SHANNON et al., 2009). Em nosso estudo o antimicrobiano Ertapenem foi o que apresentou a melhor sensibilidade para avaliação de cepas produtoras de KPC. Das 9 cepas *bla*_{KPC} positivas, todas foram resistentes ou apresentaram sensibilidade diminuída ao ertapenem, e apenas uma foi resistente ao meropenem e ao imipenem.

Porém, a especificidade dessa droga tem sido questionada, já que Enterobactérias produtoras de ESBLs, cepas que apresentem mutação nas porinas, bactérias com produção de metallo-beta lactamases como IMP-1/IMP-8 ou a expressão de beta-lactamases da classe D como OXA-48 podem ser Ertapenem resistentes e não apresentar o gene *bla*_{KPC}. Em um recente estudo Europeu, apenas 2 de 171 isolados resistente a carbapenemas produziram carbapenemase, e nenhuma dessas duas cepas produziam KPC. Porém, no estudo de SHANNON e colaboradores, a especificidade do ertapenem para a detecção de produtoras de KPC foi boa 99,2% (SHANNON et al., 2009). No nosso estudo, das 12 cepas consideradas resistentes ao ertapenem, 9 foram positivas para o gene *bla*_{KPC}, apresentando 75% de especificidade. As três cepas consideradas negativas para o gene *bla*_{KPC}, mas resistentes ao ertapenem provavelmente apresentam outros mecanismos de resistência, como produção de outras carbapenemases e alteração de porinas, que não foram pesquisadas.

O teste de Hodge modificado, apesar de ter uma alta sensibilidade para a detecção de carbapenemases, não é específico, pois detecta quaisquer das carbapenemases. No nosso estudo, todas as cepas ertapenem resistentes foram consideradas Hodge positivas, mas porém, 3 delas não foram confirmadas para a produção de KPCs. Logo, apesar da baixa especificidade, o teste de Hodge positivo indica a presença de outras carbapenemases nessas cepas resistentes.

O principal fenótipo da produção de carbapenemas do tipo KPC é a produção conjunta dessas enzimas com beta-lactamases de espectro estendido, e este perfil tem sido relatado em diversos países. No estudo de cepas do Rio de Janeiro realizado por PEIRANO e colaboradores, das 6 cepas *bla*_{KPC} positivas, todas carregavam enzimas CTX-M e apenas uma não carregava SHV (PEIRANO et al., 2009). Num estudo Chinês com isolados de *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, e *Escherichia coli* produtores de KPC, das 10 *K.pneumoniae* estudadas, todas carregavam também, CTX-M e TEM (SHEN et al., 2009). Em nosso estudo com 9 cepas KPC positivas, o perfil mais observado foi a produção de todas as beta-lactamases testadas (KPC, TEM, CTX-M e SHV), em 6 isolados. Em um isolado, houve a produção de KPC, CTX-M e TEM, em outro isolado, a produção somente de KPC e CTX e em outra cepa, a produção de KPC, SHV e TEM. Um dado importante foi que nenhuma das cepas produziram somente KPC, reforçando a afirmação que cepas ESBL positivas são as principais cepas produtoras de KPC.

6. CONCLUSÕES

★ Os resultados obtidos revelaram taxas elevadas (52%) de cepas de *K.pneumoniae* produtoras de ESBL oriundas de hemocultura, no período de setembro de 2007 a setembro de 2008 de cinco hospitais do Rio de Janeiro.

★ Foram observadas taxas elevadas de resistência entre as cepas principalmente frente a ciprofloxacina e sulfamidas. Fenômenos de multirresistência foram observados em 84% das cepas, já que estas apresentaram resistência a pelo menos três antimicrobianos, além das cefalosporinas de terceira geração.

★ Os gene codificador de beta-lactamase *bla*_{CTX-M} foi encontrado em 93% de cepas, o gene *bla*_{SHV} em 51% e o gene *bla*_{TEM} em 56 %. A co-produção dessas beta-lactamases foi observada em 76% das cepas.

★ Em nosso estudo, foi observado que 19% das cepas apresentaram resistência ou sensibilidade diminuída ao Ertapenem. Dessas, 9 foram produtoras de carbapenemase do tipo KPC.

★ O ertapenem foi o antimicrobiano mais sensível para detecção da produção de KPC.

★ Os resultados obtidos, sobre a alta prevalência de *K.pneumoniae* produtoras de ESBLs e a emergência de KPC no Rio de Janeiro, revelam a necessidade de mais estudos e pesquisas nessa temática, com intuito de melhor entender os mecanismos e a disseminação de resistência, promovendo melhoria na qualidade da assistência hospitalar a fim de diminuir a morbidade e a mortalidade, além dos custos com as internações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**. n. 146, p. 837-837, 1940.

AMBLER, R. P. The Structure of β -Lactamases. **Biological Sciences**. v. 289, n. 1036, p. 321-331, 1980.

ANANTHAN, S.; SUBHA, A. Cefoxitin resistance mediated by a loss of a porin in clinical strains of *Klebsiella pneumoniae* and *Escherichia coli*. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 1, n. 23, p. 20-23, 2005.

ARLET, G.; PHILIPPON, A. Construction by polymerase chain reaction and use of intragenic DNA probes for three main types of transferable beta-lactamases (TEM, SHV, CARB) [corrected]. **FEMS Microbiology Letters**. v. 15, n. 66, p.19–25, 1991.

BRADFORD, A. P. Extended-Spectrum β -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat **Clinical Microbiology Reviews**. v. 14, n. 4, p. 933–951, 2001.

BRASIL. Boletim Informativo da Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde - Rede RM. Ano III Edição nº 1 de 10 de julho de 2009. Análise de dados: julho de 2006 a junho de 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/divulga/newsletter/rede_rm/2009/100709_perfil_sensibilidade.htm> Acesso em: 29/09/2009.

BRATU, S. et al. Detection of carbapenem-hydrolyzing enzymes in *Enterobacter* spp. From Brooklyn, New York. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 49, n. 2, p. 776–778, 2005.

BROWN, C.; R. J. SEIDLER. Potential pathogens in the environment: *Klebsiella pneumoniae*, a taxonomic and ecological enigma. **Applied Microbiology**. v. 25, p. 900–904. 1973.

BUSH, K.; SINGER, S. B. Biochemical characteristics of extended broad spectrum β -lactamases. **Infection**. v. 17, p. 429-433, 1989.

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

CAETANO-ANOLLES, G.; GRESSHOFF, P.M. DNA markers: protocols, applications and overviews. Editora J. Wiley and Sons, New York, N.Y., p.151-171, 1997.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standard for antimicrobial susceptibility testing. Document M100–S19 CLSI, Wayne, PA, 2009.

Clinical Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 18th informational supplement. Document M100-S18. CLSI, Wayne, PA, 2008.

COLE, J. M. et al. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. **Journal Clinical Microbiology**. v. 47, n. 2, p. 322–326, 2009.

COSTA, G.A.; HOFER, E. Isolamento e identificação de Enterobactérias. **Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, 120p., 1972.

DATTA, N.; KONTOMICHALOU, P. Penicillinase synthesis controlled by infectious R Factors in Enterobacteriaceae. **Nature**. n. 208, p.239–244, 1965.

DE MORAES, B.A et al. Epidemiological analysis of bacterial strains involved in hospital infection in a university hospital from Brazil. **Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo**. v. 4, n. 42, p. 201-207, 2000.

DIEKEMA, D. J. et al. Frequency of Occurrence and Antimicrobial Susceptibility of Isolates Collected in the United States, Canada, and Latin America for the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program, 1997.

DOEBBELING, B. N. Prevention and control of nosocomial infections. **Epidemics: identification and management**. p. 177–206, 1993.

DROPA, 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 [dissertação de mestrado]. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública da USP, 2006.

EDELSTEIN, M. et al. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 47, n. 12, p. 3724–3732, 2003.

EMORI, T. G.; GAYNES R. P. An Overview of Nosocomial Infections, Including the Role of the Microbiology Laboratory. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 6, n. 4, p. 428-442, 1993.

GALES, A. C. et al. Comparative in vitro activity of meropenem versus other extended-spectrum antimicrobial agents against 2085 clinical isolates tested in 13 Brazilian Centers. **Brazil Journal of Infectious Diseases**. v. 1, p. 294-305, 1997.

GAZOULI, M. et al. Two novel plasmid-mediated cefotaximehydrolyzing beta-lactamases (CTX-M-5 and CTX-M-6) from *Salmonella typhimurium*. **FEMS Microbiology Letters**. n. 165, p. 289-293, 1998.

GOLDFARB, D. et al. Detection of Plasmid-Mediated KPC-Producing *Klebsiella pneumoniae* in Ottawa, Canada: Evidence of Intrahospital Transmission. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 6, p. 1920–1922, 2009.

GREENWOOD, D. Antimicrobial Chemotherapy. Oxford University Press, 5ed, 2007.

HASMAN, H. et al. Beta-lactamases among extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-resistant *Salmonella* from poultry, poultry products and human patients in the Netherlands. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 56, p. 115-121, 2005.

HAWSER S. P. et al. Emergence of High Levels of Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Gram-Negative Bacilli in the Asia-Pacific Region: Data from the Study for Monitoring Antimicrobial Resistance Trends (SMART) Program, 2007. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 8, p. 3280–3284, 2009

HERNÁNDEZ, J. R. et al. Nationwide Study of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* Producing Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Spain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 5, p. 2122–2125, 2005.

HOSSAIN, A., et al. Plasmid-mediated carbapenem-hydrolyzing enzyme KPC-2 in an *Enterobacter* sp. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 11, p. 4438–4440, 2004.

JACOBY, G. A. Antimicrobial-resistant pathogens in the 1990s. **Annual Reviews Medicine**. v. 47, p.169–179, 1996.

JACOBY , G. A.; MEDEIROS, A. A. More extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 35, p. 1697-1704, 1991.

JAIN, A.; MONDAL, R. TEM & SHV genes in extended spectrum β -lactamase producing *Klebsiella* species & their antimicrobial resistance pattern. **Indian Journal Medicine**. n. 128, p. 759-764, 2008.

JARLIER, V. et al. Extended broad spectrum β -lactamases conferring transferable resistance to new β -lactam agents in *Enterobacteriaceae*: Hospital prevalence and susceptibility patterns. **Infectious. Diseases**. v. 10, p. 867-878 , 1998.

JEMIMA, S.A.; VERGHESE, S. Molecular Characterization of Nosocomial CTX-M type Beta-Lactamase producing *Enterobacteriaceae* from a tertiary care hospital in South India. **Indian Journal of Medical Microbiology**. v. 26, n.4, p. 365-368, 2008.

KHANFAR, H. S. et al. Extended spectrum beta-lactamases (ESBL) in *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: trends in the hospital and community settings. **Journal Infectious Diseases**. v. 4, n. 3, p. 295-299, 2009.

KIFFER, C. et al. Antimicrobial Susceptibility of Gram-Negative Bacteria in Brazilian Hospitals: The MYSTIC Program Brazil 2003. **The Brazillian Journal Infectious Diseases**. v. 9, n. 3, p. 216-224, 2005.

KIM, J. et al. Occurrence of CTX-M-3, CTX-M-15, CTX-M-14, and CTX-M-9 Extended-Spectrum Beta-Lactamases in *Enterobacteriaceae* Clinical Isolates in Korea **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 4, p. 1572–1575, 2005.

KLIEBE, C. et al. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 28, p. 302–307, 1985.

KNOTHE, H. et al. Transferable resistance to cefotaxime, ceftioxin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. **Infection**. n. 11, p. 315-317, 1983.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico. 5 ed, São Paulo, 2001.

KROPP, H. et al. MK0787 (N-Formiimidoyl Thienamycin): Evaluation of In Vitro and In Vivo Activities **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 17, n. 6, p. 993-1000, 1980.

KUHN, I. et al. The use of colonization rate and epidemic index as tools to illustrate the epidemiology of faecal *Enterobacteriaceae* strains in Swedish neonatal wards. **Journal of Hospital Infections**. v. 23, p. 287–297, 1993.

LAHEY STUDIES [homepage na Internet]. [acesso em 2 de outubro de 2009] Disponível em www.lahey.org/Studies/

LANDMAN, D. et al. Evaluation of Techniques for Detection of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* in Stool Surveillance Cultures. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 43, n. 11, p. 5639–5641, 2005.

LANDMAN, D. et al. Evolution of antimicrobial resistance among *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* and *Klebsiella pneumoniae* in Brooklyn, NY. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 60, p.78-82, 2007.

LEAVITT, A. et al. Ertapenem Resistance among Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing *Klebsiella pneumoniae* Isolates. **Journal Clinical Microbiology**. v. 47, n.4, p. 969–974, 2009.

LEE, K. et al. Modified Hodge and EDTA-disk synergy tests to screen metallo beta-lactamase- producing strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter species* **Concise Communications**, 2000.

LEWIS II, J. S. et al. First Report of the Emergence of CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases (ESBLs) as the Predominant ESBL Isolated in a U.S. Health Care System **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 51, n. 11, p. 4015-4021, 2007.

MADSON, B. et al. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar binding specificities of their fimbriae H adhesions. **Infections and Immunology**. v. 62, p. 843-8, 1994.

MARSCHALL, J. et al. Presence of the KPC Carbapenemase Gene in *Enterobacteriaceae* Causing Bacteremia and Its Correlation with In Vitro Carbapenem Susceptibility *Journal Of Clinical Microbiology*. v. 47, n. 1, p. 239–241, 2009.

MARIOTTE, S.; NORDMANN, P.; NICOLAS, M. H. Extended-spectrum β -lactamase in *Proteus mirabilis*. *Journal Antimicrobial. Chemotherapy*. v. 33, p. 925-935, 1994.

MARTÍNEZ, J. et al. How are genes sequence analyses modifying bacterial taxonomy. *International Microbiology*. v. 7, p. 261-268, 2004.

MARTINS, I. S. *Klebsiella pneumoniae* produtora de β -lactamase de espectro estendido no CTI de um hospital universitário. Rio de Janeiro: UFRJ. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas e Parasitárias). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro, 2001.

MOHAMMAD, H. M. et al. Prevalence and molecular characterization of extended-spectrum β -lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in Riyadh, Saudi Arabia. *Annals of Saudi Medicine*. v. 29, n. 4, p. 253-257, 2009.

MUGNAIOLI, C. et al. CTX-M-Type Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Italy: Molecular Epidemiology of an Emerging Countrywide Problem. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. v. 50, n. 8, p. 2700–2706, 2006.

MULVEY, M. R. et al. Characterization of the first extended-spectrum beta-lactamase-producing *Salmonella* isolate identified in Canada. *Journal Clinical Microbiology*. v. 4, p. 460-462, 2003.

MULVEY, M. R. et al. Ambler Class A Extended-Spectrum Beta-Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella* spp. in Canadian Hospitals. *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. v. 48, n. 4, p.1204-1214, 2004.

MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. v.1, 9 ed, Washington (USA); Ed.American Society for Microbiology (ASM), p.649-698, 2007.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE [homepage na Internet]. [acesso em 26 de julho de 2009] Disponível em www.who.int

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DA SAÚDE [homepage na Internet]. [acesso em 26 de julho de 2009] Disponível em www.opas.org.br

PATERSON, L.D. et al. Antibiotic Therapy for *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Production of Extended-Spectrum Beta-Lactamases *Clinical Infectious Diseases*. n. 39, p. 31-37, 2003a.

PATERSON, D. L et al. Extended Spectrum Beta-Lactamases in *Klebsiella pneumoniae* Bloodstream Isolates from Seven Countries: Dominance and Widespread Prevalence of SHV- and CTX-M-Type Beta-Lactamases *Antimicrobial Agents And Chemotherapy*. v. 47, n. 11, p. 3554-3560, 2003b.

PATERSON, D.L. et al. International Prospective Study of *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Implications of Extended-Spectrum Beta-Lactamase Production in Nosocomial. **Infections Annals of Internal Medicine**. n. 140, p. 26-32, 2004.

PATERSON, D. L.; BONOMO, R. A. Extended-Spectrum β -Lactamases: a Clinical Update **Clinical Microbiology Reviews**. v. 18, n. 4, p. 657–686, 2005.

PATERSON, D.L. Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. **American Journal of Medicine**. v. 119, p. S20-S28, 2006.

PEIRANO et al. First Report of KPC-2-Producing *Klebsiella pneumoniae* Strains in Brazil **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 1, p. 333-334, 2009.

PFALLER, M. A.; SEGRETI, J. Overview of the epidemiological profile and laboratory detection of extended-spectrum β -lactamases. **Clinical Infectious Diseases**. v. 45, p. 153-163, 2006.

PHILIPPON, A. et al. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamases. **Infection**. v. 17, p. 347-354, 1989a.

PHILIPPON, A.; LABIA, R.; JACOBY, G. Extended-spectrum β -lactamases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 33, p. 1131-1136, 1989b.

PODSCHUN, R.; ULLMANN, U. *Klebsiella* spp. as nosocomial pathogen: epidemiology, taxonomy, typing methods, and pathogenicity factors. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 11, p. 589-603, 1998.

QUALE, J. Global Spread of Carbapenemase-Producing *Klebsiella pneumoniae*. **Microbe**, 2008

SADER, H. et al. SENTRY Antimicrobial Surveillance Program Report: Latin American and Brazilian Results for 1997 through 2001. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**. v. 8, n. 1, p. 25-79, 2004.

SCHECHNER, V. Evaluation of PCR-Based Testing for Surveillance of KPC-Producing Carbapenem-Resistant Members of the *Enterobacteriaceae* Family. **Journal of Clinical Microbiology**. n. 10, v. 47, p. 3261–3265, 2009.

SHANNON, E. et al. Specificity of Ertapenem Susceptibility Screening for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemases **Journal of Clinical Microbiology**. v. 47, n. 3, p. 785–786, 2009.

SHEN, P. et al. Novel Genetic Environment of the Carbapenem-Hydrolyzing Beta-Lactamase KPC-2 among Enterobacteriaceae in China. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 53, n. 10, p. 4333–4338, 2009.

- SIROT, D. et al. Extended-spectrum plasmid-mediated beta-lactamases. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v. 36, p. 19–34, 1995.
- SPANU, T. et al. Occurrence of Extended-Spectrum Beta-Lactamases in Members of the Family *Enterobacteriaceae* in Italy: Implications for Resistance to Beta-Lactams and Other Antimicrobial Drugs. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. p. 196–202, 2002.
- STAMM, W. E.; WEINSTEIN, R. A.; DIXON, R. E. Comparison of endemic and epidemic nosocomial infections. **Nosocomial infections**. p. 9–13, 1981.
- STÜRENBURG, E.; MACK, D. Extended-spectrum β -lactamases: implications for the clinical microbiology laboratory, therapy and infection control. **Journal of Infections**. v. 47, p. 273-295, 2003.
- SUAREZ, C.; GUDIOL, F. Antibiótico Betalactámicos. **Enferm Infecc Microbiol Clin**. v. 2, n. 27, p. 116-129, 2009.
- TURNER, P. J. Extended-Spectrum Beta-Lactamases. **Clinical Infectious Diseases**. n. 4, p. 273–275 , 2005.
- WINOKUR, P. L. et al. Variations in the prevalence of strains expressing an extended-spectrum beta-lactamase phenotype and characterization of isolates from Europe, the Americas, and the Western Pacific region. **Clinical Infectious Diseases**. v. 32, p. S94-103, 2001.
- WISPLINGHOFF, H. et al. Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study **Clinical Infectious Diseases**. n. 39, p. 309-317, 2004.
- YIGIT, H. et al. Novel Carbapenem-Hydrolyzing β -Lactamase, KPC-1, from a Carbapenem-Resistant Strain of *Klebsiella pneumoniae*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. n. 4, v. 45, p. 1151–1161, 2001.